

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Danielle Afonso Balsanulfo

ANÁLISE DE MUTAÇÕES DOS GENES EGFR E PIK3CA EM CÉLULAS TUMORAIS DE DIFERENTES NEOPLASIAS

Duque de Caxias
2021

Danielle Afonso Balsanulfo

Análise de mutações dos genes EGFR e PIK3CA em células tumorais de diferentes neoplasias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) (UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO), como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr.Vivaldo Moura Neto

Coorientadora: Dra.Luciana Pessoa

Duque de Caxias
2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

B196a Balsanulfo, Danielle Afonso.
 Análise de mutações dos genes EGFR e PIK3CA em células tumorais de diferentes neoplasias / Danielle Afonso Balsanulfo. – Duque de Caxias, 2021.
 63 f. : il. ; 30 cm.

 Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2021.
 “Orientador: Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto
 Coorientadora: Prof.^a Dra. Luciana Pessoa”.
 Referências: f. 53.

 1. Biomedicina. 2. Neoplasias. 3. Glioblastoma. 4. Astrocitoma. 5. Mutações. I. Moura Neto, Vivaldo. II. Pessoa, Luciana. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

CDD – 610.28

DANIELLE AFONSO BALSANULFO

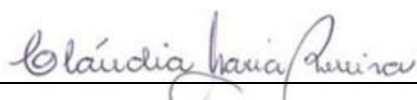
**ANÁLISE DE MUTAÇÕES DOS GENES EGFR E PIK3CA EM CÉLULAS
TUMORAIS DE DIFERENTES NEOPLASIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) (UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO), como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto
Dra. Luciana Pessoa

Aprovada em 22 de janeiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dra. Cláudia Maria Pereira

Prof^a. Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional
Universidade do Grande Rio



Pro. Dr. Rômulo Sperduto Dezone

Prof. Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional
Universidade do Grande Rio



Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar

Prof. Adjunto do Programa de Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas ao
Sistema Musculoesquelético
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado essa oportunidade e ter permitido chegar até aqui.

Agradeço também à minha família por todo apoio e incentivo que sempre me deram.

Agradeço ao querido professor e orientador Vivaldo Moura Neto que sempre me incentivou, não me deixando desistir quando tantas vezes eu tive vontade. Agradeço também por todos puxões de orelha, mas também por todas as palavras de carinho e paciência que sempre teve.

Agradeço a minha coorientadora Luciana Pessoa por toda paciência (que eu sei que não é muito o seu forte rsrsr), por todas as vezes que pediu para que eu prestasse atenção, também por toda ajuda, disponibilidade quando precisava me ensinar os experimentos e quando precisávamos nos locomover para a UFRJ. Agradeço também a nossa técnica Geralda que desde o início quando cheguei no laboratório me sentindo muito perdida, sempre me ajudou e me incentivou, se mostrando sempre muito solícita quando eu precisava me ajudando até o final sempre que possível.

Agradeço também a toda equipe do laboratório por toda ajuda, em especial a Manuela que sempre se mostrou disposta a ajudar e me explicar quando era necessário, um agradecimento especial também para a Lucy que foi de grande valia me ajudando muito nessa reta final.

Agradeço ao Laboratório de Virologia Molecular do Instituto de Biologia da UFRJ do professor Amílcar permitindo que usássemos o seu laboratório para que fizéssemos os experimentos e a todos que lá trabalham que sempre se mostraram dispostos a ajudar.

Enfim não sou muito boa em me expressar mais gostaria de agradecer imensamente a todos que me ajudaram a chegar até aqui, sendo eternamente grata.

Resumo

O câncer corresponde a um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e a propagação de células anormais. Sendo causado tanto por fatores externos, quanto por fatores internos. Tumores cerebrais malignos estão entre os mais temidos tipos de câncer, não apenas pelo seu mau prognóstico, mas também por causa das repercussões diretas na qualidade de vida e função cognitiva. Glioblastomas (GBMs) são o tipo mais maligno e frequente de astrocitomas primários. Cerca de 60% são astrocitomas ou glioblastoma de todos os tumores cerebrais em adultos. Apesar da variedade de terapias modernas contra GBM, ainda é uma doença fatal com prognóstico extremamente escasso. O presente estudo tem como objetivo o reconhecimento de genes mutados em células tumorais permitindo uma melhor análise e descrição das culturas celulares utilizadas na pesquisa em nosso laboratório, comparativamente aos padrões de mutações indicados na literatura. Foram analisadas variações na expressão gênica dos genes EGFR, AKT1 e mTOR, além da mutação L858R no gene EGFR e H1047R no gene PIK3CA, comparando com a expressão destas mutações em estudo com linhagens de glioblastomas a outras linhagens tumorais, não gliais, como a de tumor de mama e de câncer oral. As análises moleculares dos genes foram realizadas através do PCR em tempo real e PCR digital. Através das análises observamos a presença da mutação de PIK3CA em três linhagens celulares e hiperexpressão do gene AKT1 em quatro linhagens do nosso estudo. Em suma, os nossos resultados sugerem, de forma preliminar, a heterogeneidade das linhagens utilizadas no nosso laboratório.

Palavras-chave: Câncer, glioblastoma, gene EGFR e mutações.

ABSTRACT

Cancer corresponds to a group of diseases characterized by uncontrolled growth and the spread of abnormal cells. Being caused by both external and internal factors. Malignant brain tumors are among the most feared types of cancer, not only because of their poor prognosis, but also because of the direct repercussions on quality of life and cognitive function. Glioblastomas (GBMs) are the most malignant and frequent type of primary astrocytomas. About 60% are astrocytomas or glioblastoma of all brain tumors in adults. Despite the variety of modern therapies against GBM, it is still a fatal disease with an extremely poor prognosis. The present study aims to recognize mutated genes in tumor cells allowing a better analysis and description of the cell cultures used in the research in our laboratory, compared to the mutation patterns indicated in the literature. Variations in the gene expression of the EGFR, AKT1 and mTOR genes were analyzed, in addition to the L858R mutation in the EGFR and H1047R gene in the PIK3CA gene, comparing with the expression of these mutations in a study with glioblastoma lines to other non-glial tumor lines, such as breast tumor and oral cancer. Molecular analyzes of the genes were performed using real-time PCR and digital PCR. Through the analyzes we observed the presence of the PIK3CA mutation in three cell lines and hyperexpression of the AKT1 gene in four lines of our study. In summary, our results suggest, in a preliminary way, the heterogeneity of the strains used in our laboratory.

Keywords: Cancer, glioblastoma, EGFR gene and mutations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do câncer	15
Figura 2. Processo de metástase em um tumor maligno	16
Figura 3. Oncogênese (ganho de função)	17
Figura 4. Gene supressor (perda de função)	18
Figura 5. O gene EGFR	19
Figura 6. Sinalização do receptor do EGFR e vias relacionadas no câncer	20
Figura 7. Gene PIK3CA	23
Figura 8. Neuroimagem de um glioblastoma	27
Figura 9. Mecanismos de resistência em células de glioma	29
Figura 10. Estrutura do gene EGFR	36
Figura 11. Fotos das células de GBM, MC7F e SSC9 em cultura	41
Figura 12. Gráfico em tempo real da célula GBM 11	42
Figura 13. Gráfico RT-PCR da célula T98G	42
Figura 14. Avaliação de mutações por Ddpcr na célula MCF7	43
Figura 15. Avaliação de mutações por Ddpcr na célula T98G	43
Figura 16. Avaliação de mutações por Ddpcr na célula GBM 11.....	44
Figura 17. Imunocitoquímica do gene AKT	45
Figura 18. Imunocitoquímica do gene mTOR	46
Figura 19. Gráfico da expressão do gene EGFR no RT-PCR com os novos iniciadores	47
Figura 20. Gráfico da expressão do gene AKT no RT-PCR	48
Figura 21. Gráfico da expressão do mTOR no RT- PCR.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos tumores do sistema nervoso central selecionados de acordo com a Organização mundial de saúde 2016	25
Quadro 2. Característica das células	35
Quadro 3. Iniciadores para o gene EGFR.....	36
Quadro 4. Iniciadores para o gene AKT.....	36
Quadro 5. Iniciadores para o gene mTOR	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
Akt / PKB	Proteína quinase B
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFRIII	Fator de crescimento epidérmico de receptor variante III
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
GBMs	Glioblastomas
HER-1	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-1</i>
LMA	Leucemia mielóide aguda
MGMT	<i>O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>
Min	Minuto
NOS	Not otherwise specified (não especificado)
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases
PIK3CA	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase catalítica subunidade alfa isoforma
PTEN	Fosfatase homóloga a Tensina (Phosphatase and Tensin Homologue)
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptor Tirosina Quinase
SMD	Síndromes mielodisplásicas
SVs	Variantes estruturais somáticas
TMZ	Temozolomida adjuvante
TP53	Proteína de tumor 53
TTFields	Terapia de campo elétrica alternada
v-ErbB	Oncogene análogo viral
Wt	Selvagem

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Câncer.....	14
1.2 Gene.....	18
1.2.1 EGFR	18
1.2.2 PIK3CA.....	21
1.3 Glioblastoma.....	23
2. Justificativa.....	32
3. Objetivo	33
3.1 Objetivo principal.....	33
3.1.1 Objetivos específicos:.....	33
4. Material e métodos	34
4.1 Linhagens celulares.....	34
4.2 Extração, transcrição reversa e quantificação	35
4.3 Lista de iniciadores (primers)	35
4.4 DDPCR.....	37
4.5 ImunociTOQUÍMICA.....	37
4.6 PCR em tempo real.....	38
4.6.1 Taqman para análise de mutação	38
4.6.2 Análise de mutação do EGFR	39
4.6.3 Sybr green para análise de quantificação relativa de expressão gênica.....	39
5. Resultados:	40
7. Conclusões:	53
Referências:	54

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da etiologia dos tumores malignos, ainda não é totalmente elucidada apesar dos grandes avanços realizados na pesquisa sobre o câncer nas últimas décadas, provavelmente terá como base o melhor conhecimento das interações entre as diversas exposições ambientais e os fatores genéticos ligados à suscetibilidade individual (WÜNSCH *et al.*, 2001).

O câncer é uma doença genética e que as mutações somáticas de oncogenes e genes supressores de tumor são os iniciadores do processo cancerígeno (KARAKAS *et al.*, 2006).

Os últimos anos testemunharam uma transformação notável em nossa compreensão do desenvolvimento e classificação do glioma. É agora reconhecido que os gliomas consistem em entidades patológicas clinicamente distintas, definidas molecularmente, com diferentes entidades frequentemente distinguidas por mutações somáticas em genes únicos. Esses subgrupos moleculares não são apenas distinguíveis por sua biologia e associações com o resultado, mas muitos têm características clínicas altamente distintas, como idade, diagnóstico, aparência radiográfica ou localização dentro do sistema nervoso central (TANAKA *et al.*, 2019).

Os gliomas malignos, particularmente o glioblastoma multiforme (GBM), são responsáveis pela maioria dos tumores cerebrais altamente heterogênea com um espectro de características patológicas que podem variar de paciente para paciente. Sua incidência está aumentando em todo o mundo e são incuráveis. Embora seja observada uma resposta transitória à terapia, a recorrência do tumor é inevitável e ocorre dentro do tecido que recebeu a terapia citotóxica (BINDA *et al.*, 2012; CHESLER *et al.*, 2012).

O GBM é o glioma maligno mais comum de todos os tumores cerebrais e atualmente ainda faltam opções de tratamento eficazes. GBM é frequentemente acompanhado com superexpressão e / ou mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que subsequentemente leva à ativação de muitas vias de sinal a jusante, como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / Akt / complexo mTOR sensível à rapamicina (mTOR) (LI *et al.*, 2016).

O GBM é mais comum em adultos e carrega um prognóstico sombrio. Embora o uso de terapias direcionadas molecularmente seja comum em outros tumores sólidos, o desenvolvimento destes agentes em GBM tem sido um desafio.

Os obstáculos incluem heterogeneidade intratumoral marcada, redundância de vias de sinalização que conduzem a proliferação de células tumorais e uma escassez de drogas que penetram na barreira hematoencefálica (MAKHLIN *et al.*, 2019).

O câncer de mama continua sendo um problema de saúde pública em escala global. Avaliação de potenciais alvos moleculares é agora importante no diagnóstico primário. Inibidores da tirosina quinase e outras drogas com propriedades anti-angiogênese estão atualmente passando por investigações para poder ajudar no tratamento (HARRIS *et al.*, 1992).

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto câncer mais comum no mundo. É responsável por 2,5% de todos os novos casos de câncer e 1,9% de todas as mortes por câncer anualmente. Mais de 90% dos cânceres orais (que ocorrem na boca, lábios e língua) são carcinoma de células escamosas oral. A taxa de incidência de câncer bucal varia amplamente em todo o mundo. Pesquisadores relataram que esses comportamentos levam a variações genéticas em genes supressores de tumor, proto-oncogenes, oncogene e genes que controlam processos celulares normais. Para o desenvolvimento de opções preventivas e terapêuticas, é necessário compreender os mecanismos moleculares básicos que forçam a tumorigênese oral (ALi *et al.*, 2017).

Embora cientistas e médicos em todo o mundo tenham feito incontáveis esforços no passado para melhorar as terapias para pacientes, o tumor tende a se espalhar rapidamente e retornar após o tratamento, resultando em um surto mediano (MUÑOZ-HIDALGO *et al.*, 2020).

1.1 CÂNCER

O câncer corresponde a um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e a disseminação de células anormais. Se a propagação não for controlada, pode resultar na morte do paciente. O câncer é causado tanto por fatores externos (tabaco, produtos químicos, radiação e organismos infecciosos) quanto por fatores internos (mutações hereditárias, hormonais, condições imunes e mutações que ocorrem a partir do metabolismo). Estes fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese (GARCIA *et al.*, 2007).

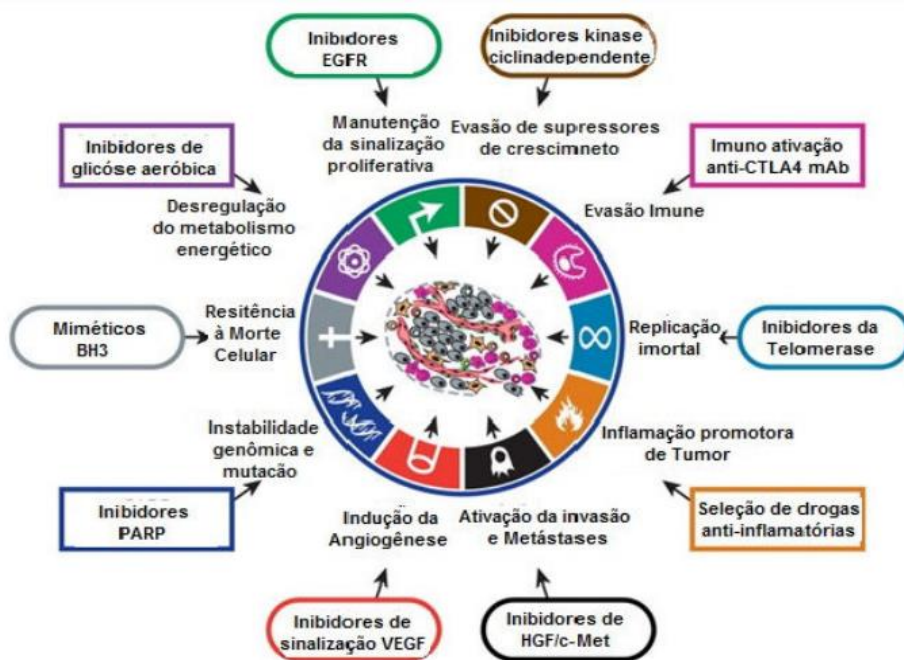
De acordo com Hanahan e colaboradores no ano de 2000, o câncer tem como características: autossuficiência em sinais de crescimento, sensibilidade a sinais antiproliferativos, evitando apoptose, ilimitado potencial replicativo, angiogênese sustentada, invasão de tecido e metástase (Figura 1) (Hallmarks I - HANAHAN *et al.*, 2000). Depois de uma década, o mesmo grupo fez uma revisão atualizada (denominado Hallmarks II - HANAHAN *et al.*, 2011) adicionando duas características emergentes: reprogramação do metabolismo energético, evitar a resposta imune e duas características facilitadoras: instabilidade e mutação do genoma e inflamação promotora de tumores (FOUAD *et al.*, 2017; HANAHAN *et al.*, 2000 e HANAHAN *et al.*, 2011).

Entre essas seis marcas, a metástase (Figura 2) desempenha o papel mais importante na determinação do destino de um paciente. Se cada malignidade permanecesse em sua localização inicial, a maioria dos cânceres sólidos poderia ser tratada de forma eficaz com a cirurgia. A metástase ou a disseminação do câncer para múltiplos novos locais, no entanto, torna cada vez mais difícil rastrear e remover novas colônias de células afetadas. Eventualmente o câncer pode tornar-se tão grave que nada pode ser feito para o paciente, além de reduzir a dor com a administração de fármacos para retardar a invasão (DIVOLI *et al.*, 2011).

Mutações somáticas acontecem no genoma de todas as células em divisão, tanto normais quanto neoplásicas (GREENMAN *et al.*, 2007). Os tumores surgem quando as células normais acumulam alterações suficientes para afetar os sistemas normais de controle regulatório. Estas alterações geralmente incluem variantes estruturais somáticas (SVs, do inglês *structural variants*) que são mudanças em larga escala no genoma, variando de 50 nucleotídeos até várias megabases de

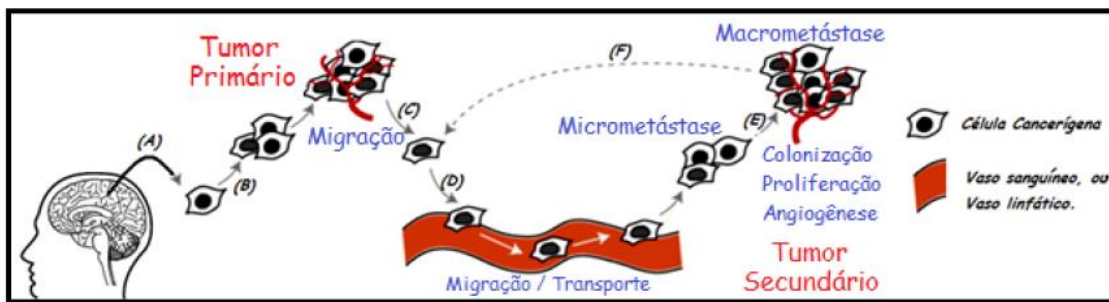
comprimento. Os SVs podem ocorrer como um resultado do reparo incorreto da quebra de fita dupla de DNA e são tradicionalmente classificados em cinco tipos diferentes: inserções, deleções, duplicações, inversões e translocações (EWING *et al.*, 2018). Além das alterações causadas pelas mutações e SVs, outros tipos de alterações podem ocorrer no genoma, como variação no número de cópias de metilação de promotores, alterações em sítios relevantes para a transcrição, *splicing*, maturação do RNA ou eficiência de tradução (DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018).

Figura 1. Características do câncer



Legenda: Esta ilustração engloba as seis marcas registradas das características do câncer. As marcas do câncer são recursos que permitem o crescimento do tumor e a disseminação metastática continuando a fornecer uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer (Adaptado de HANAHAN, 2005; Lopes 2015).

O DNA nas células normais é continuamente danificado por mutagênicos de origem tanto interna quanto externa, sendo a maior parte desses danos reparado. No entanto, uma pequena fração pode ser convertida em mutações fixas e replicação de DNA em si tem uma baixa taxa de erro intrínseca. A compreensão das taxas de mutação somática em células humanas normais ainda é relativamente rudimentar. No entanto, é provável que as taxas de mutação de cada uma das várias classes estruturais da alteração somática difiram e que existem diferenças entre os tipos de células (STRATTON *et al.*, 2009).

Figura 2. Processo de metástase em um tumor maligno

Legenda: (A) Início da diferenciação celular no órgão que possui a neoplasia original, (B) ocorre um aumento descontrolado das células neoplásicas, ocasionando o começo da proliferação celular, (C) início da metástase provocando a separação de um conjunto de células, que possuem a capacidade de migrar, (D) propagação dessas células para o interior de vasos sanguíneos ou linfáticos, percorrendo todo o corpo humano, (E) saída dos vasos sanguíneos ou linfáticos, em direção a outros órgãos e (F) Processo cíclico, com o reinício de todo o ciclo, a partir da migração celular. (Adaptado de LOPES *et al.*, 2012).

O câncer resulta de mutações que perturbam os controles harmoniosos que regulam o crescimento e desenvolvimento celular normal. Essas mutações surgem em duas classes de genes em interação: aqueles que facilitam o crescimento celular e a formação de tumores, nos quais a mutação ou superexpressão é oncogênica e aqueles que inibem esses processos que são os genes supressores de tumores (SAGER, 1989).

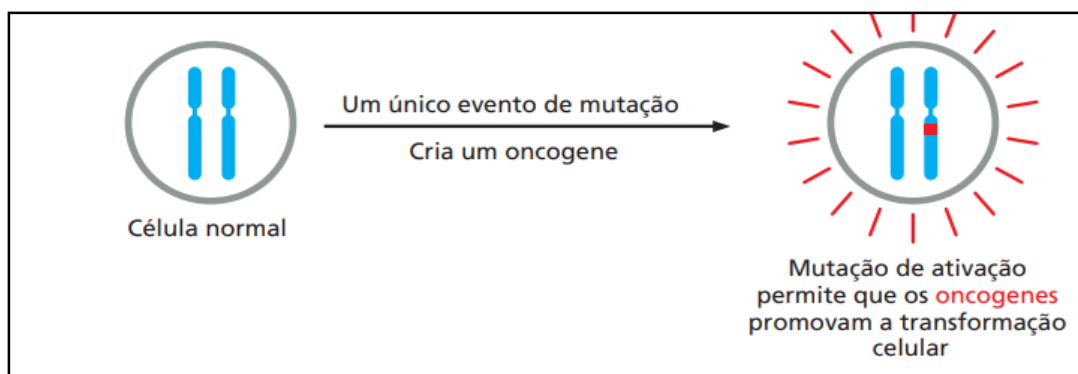
As células tumorais são proliferações clonais que surgem devido a mutações que conferem vantagens de crescimento nas células. Os genes mutados que são implicados no desenvolvimento do câncer são conhecidos como 'oncogenes' e 'genes supressores de tumores' (GREENMAN *et al.*, 2007).

Alterações nos oncogenes e genes supressores de tumores, são geralmente eventos somáticos, embora haja uma pequena porcentagem de pessoas com câncer nas quais a doença se deve a um tipo diferente de mutação, chamada mutação hereditária ou familiar ou mutação da linhagem germinativa, porém, uma única mudança genética raramente é suficiente para o desenvolvimento de um tumor maligno (CROCE, 2008). A maioria das evidências aponta para um processo de várias etapas de alterações sequenciais em vários oncogenes e genes supressores de tumores em células cancerígenas (CROCE, 2008). A formação de tumores surge como consequência de alterações no controle da proliferação e desordens celulares nas interações entre as células e seus arredores que resultam em invasão e metástase. Uma ruptura no relacionamento entre o aumento do número de células resultante da divisão celular e a retirada do ciclo celular devido à diferenciação ou

morte celular (apoptose) podem levar a distúrbios no controle da proliferação celular (MARSHALL, 1991).

Oncogenes (Figura 3) codificam proteínas que controlam a proliferação celular, apoptose ou ambos. Eles podem ser ativados por alterações estruturais resultante de mutação ou fusão de genes, por justaposição ou por amplificação. Translocações e mutações podem ocorrer como eventos iniciantes ou durante a progressão do tumor, enquanto que a amplificação geralmente ocorre durante a progressão (CROCE, 2008).

Figura 3. Oncogênese (ganho de função)



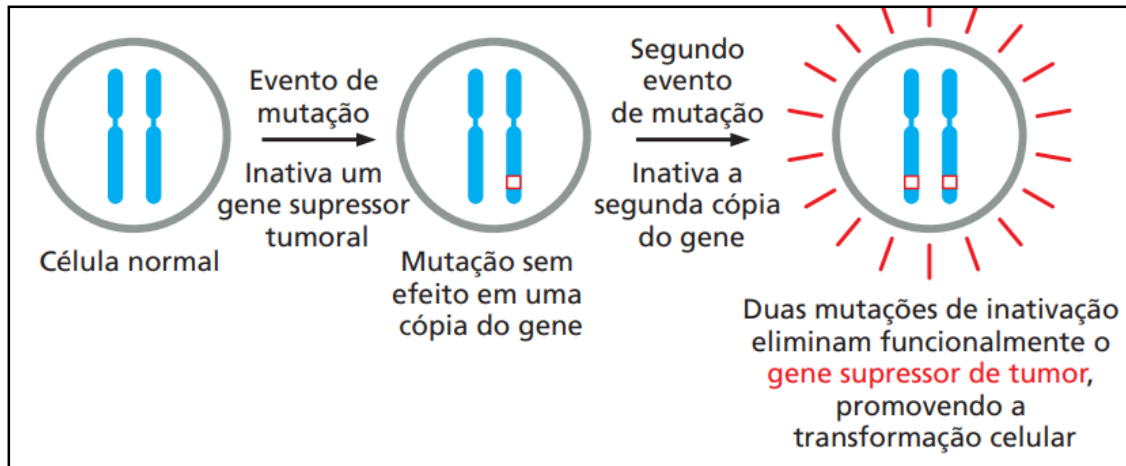
Legenda: São classificados como proto-oncogenes os genes que são críticos para o câncer. Os oncogenes agem de forma dominante, o ganho de função de uma mutação em uma cópia do proto-oncogene pode fazer a célula se tornar cancerosa (Adaptado de Alberts *et al.*, 2017).

Os genes supressores (Figura 4) de tumor são alelos de genes do tipo selvagem que desempenham papéis reguladores na proliferação, diferenciação e outros processos celulares e sistêmicos. Dois ou mais genes supressores diferentes podem ser inativados no mesmo tumor ou em diferentes tipos de tumores (por exemplo, pulmão, mama e cólon). Os genes supressores já identificados estão envolvidos no controle do ciclo celular, transdução de sinal, angiogênese e desenvolvimento, indicando que eles contribuem para uma ampla gama de funções normais e relacionadas aos tumores (SAGER, 1989).

O diagnóstico e o tratamento do câncer, incluindo avaliações clínicas e patológicas cuidadosas, é o primeiro passo para a gestão da doença. Quando o diagnóstico é confirmado, se torna necessário determinar o estágio do câncer, onde as principais metas são para ajudar na escolha da terapia, para determinar o prognóstico e para padronizar o projeto de protocolos de tratamento de pesquisa. As

principais modalidades de tratamento são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, podendo ser utilizados sozinhos ou em combinação (GARCIA *et al.*, 2007).

Figura 4. Gene supressor (perda de função)



Legenda: Genes supressores de tumor normalmente atuam de maneira recessiva, ambas as cópias do gene deve ser perdidos para induzir a célula ao câncer (Alberts *et al.*, 2017).

O estudo completo do sequenciamento genômico reforça a nossa impressão de cada tumor como uma combinação única de mutações. O sequenciamento genômico completo, pode ser usado para identificar variações estruturais em tumores comparando o padrão de variação estrutural no tecido tumoral com o observado em células normais (EWING *et al.*, 2018).

1.2 GENE

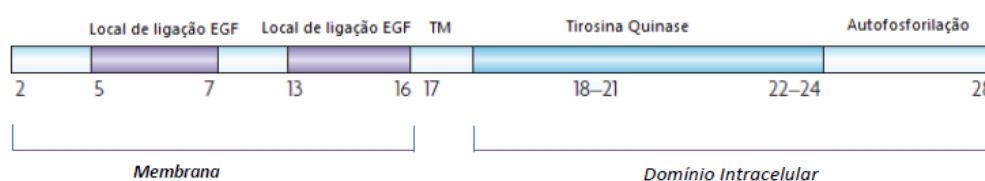
1.2.1 EGFR

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) pertence a família ErbB de receptores de tirosina quinases (RTKs) e exerce funções críticas em células epiteliais. É frequentemente mutada e / ou superexpressa em diferentes tipos de câncer humanos e é o alvo de múltiplas terapias cancerígenas atualmente adotadas na prática clínica. Estudos iniciais da via do EGFR começaram com a descoberta do EGF em 1963 por Stanley Cohen e, mais tarde, na década de 1980, do gene EGFR. Desde então, estudos bioquímicos, estruturais e genéticos descreveram mecanismos moleculares subjacentes à transfosforilação do receptor, que

geralmente ocorre em resposta à estimulação do ligante e conseqüente ativação da cascata de sinalização intracelular (SIGISMUND, 2018) (Figura 5).

A primeira molécula a ser ligada à oncogênese no glioblastoma foi o EGFR. Durante o tempo das primeiras descrições de oncogene, seu gene tornou-se ligado a um oncogene viral - v-erb B. A amplificação maciça desse gene foi encontrada em glioblastomas e alterações somáticas no número de cópias estão presentes em 43% dos pacientes (WESTPHAL *et al.*, 2017)

Figura 5. O gene EGFR



Legenda: Transcrição do gene EGFR com aproximadamente 200 kbp de DNA genômico, expressa uma proteína de 170 kDa constituída por 1186 aminoácidos dispostos em 28 exons sendo composto por um domínio extracelular (1-16), transmembranar (17) e intracelular (18-28) (Adaptado de SHARMA *et al.*, 2007).

O EGFR é um oncogene potente e o qual as neoplasias desenvolveram uma maneira de aumentar a atividade desse gene. O EGFR pode ser modificado de várias maneiras em diferentes graus de astrocitoma, especialmente glioblastoma (GBM) por superexpressão, amplificação, mutantes de deleção e outros. As alterações do EGFR promovem proliferação, sobrevivência, angiogênese e invasão. Assim, as alterações podem impactar a gliogênese, mas sua relevância clínica prognóstica, diagnóstica e terapêutica permanece controversa. Em GBMs, a amplificação de EGFR demonstrou promover invasão, proliferação e resistência à radioterapia e quimioterapia (SAADEH *et al.*, 2018).

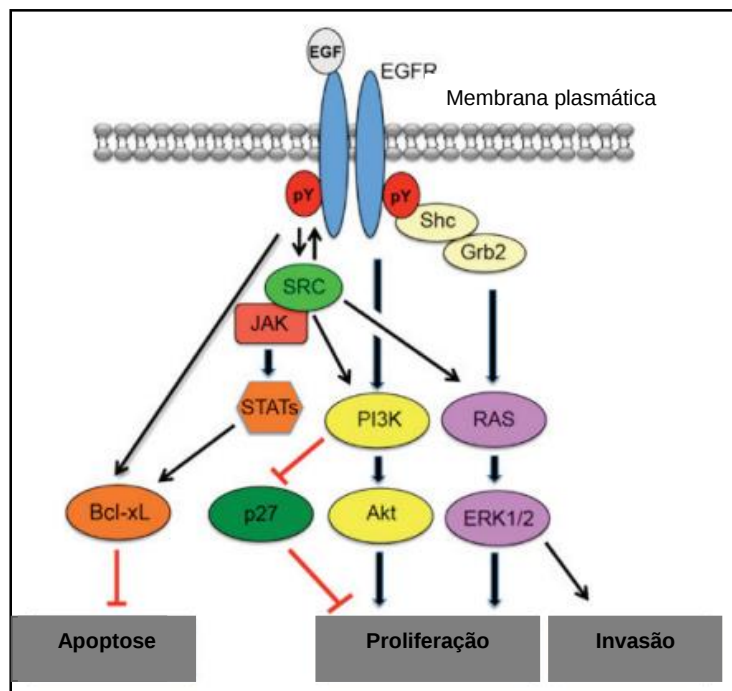
Os cânceres colorretais, de cabeça, pescoço e de pulmão são totalmente diferentes do que no GBM. Além das diferenças nos tecidos e acessibilidade terapêutica associada, o EGFR também é molecularmente heterogêneo entre esses cânceres. Mutações do EGFR no GBM ocorre dentro dos éxons que codificam o domínio extracelular enquanto que mutações no gene EGFR no câncer de pulmão ocorrem tipicamente no domínio cinase (ESKILSSON *et al.*, 2018).

O fator de crescimento epidérmico (EGF), conhecido por HER-1 (*Human Epidermal growth factor Receptor-1*) medeia numerosos processos essenciais nas

células epiteliais normais, incluindo proliferação, sobrevivência diferenciação, adesão e migração (LEITE, 2012).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor tirosina quinase da membrana celular codificado por proto-oncogenes. O fator de crescimento epidérmico (EGF), se acopla nos domínios extracelulares dos receptores e iniciam uma cascata de sinalização intracelular, aumentando o potencial de proliferação celular, angiogênese e resistência à apoptose. A ativação do EGFR também prejudica a adesão célula-célula, por meio da desestabilização dos complexos juncionais (E-caderina, beta-catenina), o que contribui para a aquisição de motilidade e fenótipo invasivo (Figura 6) (GOMES,et al., 2018).

Figura 6. Sinalização do receptor do EGFR e vias relacionadas no câncer



Legenda: Ilustração dos produtos gênicos envolvidos na transferência de sinais do exterior da célula para o núcleo mediado pelo EGFR. Sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e vias relacionadas no câncer. Ilustração dos produtos gênicos envolvidos na transferência de sinais de fora da célula para o núcleo mediado por EGFR, principalmente por meio de PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase (Adaptado de XU et al., 2017).

Além de ser um regulador crítico dos processos celulares fisiológicos, a sinalização do EGFR tem um papel crucial no desenvolvimento e progressão de muitos tipos de câncer, uma condição em que a homeostase celular normal é subvertida. A transformação neoplásica induzida pelo EGFR pode ser desencadeada pela amplificação gênica e / ou superexpressão de proteína mutações ou deleções.

Desde então, numerosos estudos caracterizando o papel do EGFR no câncer foram conduzidos (CALDIERI, 2018).

EGFR está implicado na tumorigênese, assim como na inflamação, psoríase, eczema e aterosclerose. Alterações e mutações do EGFR foram identificadas no tecido canceroso, incluindo pulmão, cabeça, pescoço, mama, trato gastrointestinal e cérebro, e devido a isso muitas pesquisas têm sido dedicadas a correlacionar as alterações do EGFR com os resultados clínicos (SAADEH *et al.*, 2018).

1.2.2 PIK3CA

As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) são uma família quinases lipídicas que regulam a via de sinalização envolvidas na proliferação celular, adesão, sobrevivência e motilidade através da fosforilação do anel inositol de fosfoinositídeos, desta forma, agindo como transdutores de sinal (GALLIA *et al.*, 2006; SAMUELS *et al.*, 2004, Samuels, 2010). A via de PI3K é considerada como fator importante na tumorigênese, pois mutações ativadoras na subunidade de PI3K (PIK3CA) foram identificadas em um amplo espectro de tumores (Ligresti *et al.*, 2009).

As PI3Ks são quinases heterodiméricas compostas por subunidades variantes catalíticas e adaptadoras/regulatórias codificadas por genes separados e por *splicing* alternativo. A família PI3K é organizada em três classes principais: classe I, classe II e classe III. Vários subgrupos foram categorizados baseados na estrutura primária, especificidade do substrato e regulação (Karakas B *et al.*, 2006).

A mutação no gene PIK3CA é clinicamente importante na maioria das malignidades sólidas. Essas mutações levam à hiperativação da atividade quinase da via PI3K, promovendo uma proliferação celular desregulada, aumentam a invasão celular e as metástases. Essas mutações têm implicações na eficácia no prognóstico dos cânceres e no tratamento (ALQAHTANI *et al.*, 2020; LIGRESTI *et al.*, 2009).

A atividade de quinase de PI3K foi relatada pela primeira vez como associada a oncoproteínas virais. A amplificação do PI3K, bem como deleções de sequências curtas de nucleotídeos, resulta em uma atividade lipídica-quinase elevada da p110, uma subunidade catalítica de PI3K (PIK3CA) em vários tipos de câncer funcionando como um oncogene. O gene PIK3CA codifica a subunidade catalítica p110 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), sendo um gene de 34 kb localizado no cromossomo 3q26.3 que consiste em 20 éxons que codificam 1068 aminoácidos que produzem

uma proteína de tamanho de 124 kDa (Figura 7) (GYMNOPOULOS, 2007; KARAKAS *et al.*, 2006; LIGRESTI *et al.*, 2009).

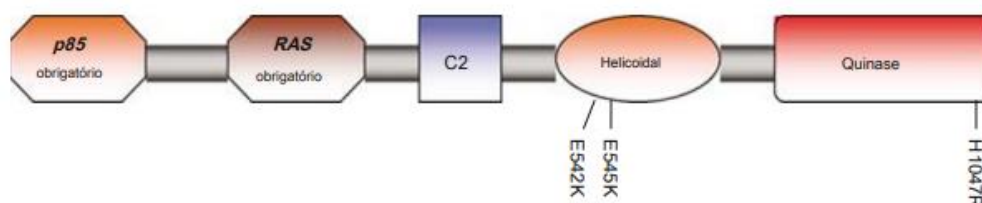
A maioria das mutações, é mapeada para três locais, E542 e E545 no domínio helicoidal (éxon 9) e H1047 no domínio quinase (éxon 20). E542 e E545 são comumente alterados para lisina, enquanto H1047 é frequentemente substituído por arginina (LIGRESTI *et al.*, 2009).

PIK3CA codifica uma subunidade catalítica do fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K), um componente da via PTEN-Akt, sugerindo assim mutação no PIK3CA como um método alternativo para mutação na PTEN para desregular esse importante via no glioma (MUELLER *et al.*, 2005).

PIK3CA sofre mutação somática em mais de 25% dos tumores de colorretais, gástricos, mama e certos tumores cerebrais, sofrendo mutação em frequências significativas em outros tipos de tumor. A partir dessas frequências de mutação, PIK3CA parece ser um dos oncogenes mais mutados já identificados em cânceres humanos (SAMUELS *et al.*, 2005).

Segundo o estudo de HARTMANN *et al.*, 2005, em uma grande escala de análise mutacional de todos os principais genes PI3K em tumores de colorretal, câncer gástrico, mama, pulmão e GBM, foram identificadas mutações no gene PIK3CA, mas em nenhum outro membro da família. Neste estudo 85 de 396 tumores (22%) incluindo 4 de 15 GBM (27%) exibiram mutações PIK3CA. A maioria das mutações nesta série de tumor está agrupada em regiões dos éxons 1, 9 e 20, encontrando mutações PIK3CA em apenas 5 dos tumores (5%). Em contraste com o GBM, amplificação ou superexpressão de PIK3CA foi identificada em meduloblastoma, pulmão, cervical, cabeça, carcinoma de pescoço e esôfago (HARTMANN *et al.*, 2005).

O estudo de SAMUELS *et al.*, 2004 sugere que PIK3CA mutante provavelmente funcione como um oncogene em humanos. Essa ideia é consistente com as alterações relatadas dos membros da via PI3K particularmente a inativação do PTEN, cuja função é reverter a fosforilação mediada por PI3Ks. Reduplicação ou amplificação do cromossomo das regiões somáticas contendo PIK3CA foram relatados em alguns cânceres humanos (SAMUELS *et al.*, 2004).

Figura 7. Gene PIK3CA

Legenda: *PIK3CA* é um gene de 34 kb localizado no cromossomo 3q26.3 que consiste em 20 exons que codificam 1068 aminoácidos produzindo uma proteína de tamanho de 124 kDa composto por p110 uma subunidade catalítica de PI3K e seus domínios funcionais com as mutações somáticas mais comuns, E542K, E545K e H1047R nos domínios helicoidais e quinases indicados (Adaptado de KARAKAS *et al.*, 2006).

O gene *PIK3CA* pode ser útil para diagnóstico e propósitos terapêutico. O agrupamento de mutações com o *PIK3CA* poderia tornar um excelente marcador para detecção precoce de cânceres ou para monitorar a progressão do tumor. (SAMUELS *et al.*, 2004).

Segundo TANAKA *et al.*, 2019 também pode ser observado *in vitro* e *in vivo* a mutação do gene *PIK3CA* aumentando constitutivamente a atividade da via PI3K que podem ser oncogênicas em vários modelos de câncer. Mutações somáticas recorrentes em *PIK3CA* foram identificados respectivamente em 6 - 15 e 10% dos glioblastomas, que foram acompanhados por sinalização PI3K ativada. No entanto, o impacto clínico dessas mutações não é amplamente descrito no GBM (TANAKA *et al.*, 2019).

1.3 GLIOBLASTOMA

Tumores cerebrais malignos estão entre os mais temidos tipos de câncer, não apenas pelo seu mau prognóstico, mas também por causa das repercussões diretas na qualidade vida e função cognitiva (OMURO *et al.*, 2013).

Glioma é um termo geral usado para descrever tumores cerebrais primários e é classificado de acordo com sua célula de origem. Estes incluem tumores astrocíticos (astrocitoma, astrocitoma anaplásico e glioblastoma), oligodendrogliomas, ependimomas e gliomas mistos (SCHWARTZBAUM *et al.*, 2006). O glioblastoma (GBM) é o tipo mais maligno e frequente de astrocitoma primário, sendo responsável por mais de 60% de todos os tumores cerebrais em adultos. Apesar da variedade de

terapias modernas contra GBM, ainda é uma doença fatal com prognóstico extremamente pobre, onde os pacientes geralmente têm uma sobrevida mediana de aproximadamente 14 a 15 meses a partir do diagnóstico (HANIF *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde os GBMs dividem-se em (1) glioblastoma, IDH-selvagem (cerca de 90% dos casos), que corresponde com maior frequência ao glioblastoma primário *,de novo* (não passa pela sequência de uma lesão cancerizável para o câncer) e predomina em pacientes com mais de 55 anos de idade; (2) glioblastoma IDH-mutante (cerca de 10% dos casos), o que corresponde de perto ao glioblastoma secundário com história prévia de grau de glioma difuso e, de preferência, surge em pacientes jovens e (3) glioblastoma, NOS (designações não especificadas de outra forma / NOS), um diagnóstico que é reservado para aqueles tumores para os quais a avaliação do IDH não pode ser realizada (LOUIS *et al.*, 2016) (Quadro1).

Acredita-se que os tumores neste grupo heterogêneo surjam de células-tronco neurogliais ou células progenitoras e são classificados histologicamente em astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas oligoastrocíticos mistos ou ependimomas com base em semelhanças morfológicas com os tipos de células neurogliais encontradas no cérebro normal. A classificação posterior ocorre com base na localização (por exemplo, na ponte ou no nervo óptico), padrões de diferenciação característicos (como pilocítico ou mixopapilar) e características da aneuploidia (incluindo alta atividade mitótica, proliferação microvascular ou necrose) (WELLER *et al.*, 2015).

Acredita-se que os tumores neste grupo heterogêneo surjam de células-tronco neurogliais ou células progenitoras e são classificados histologicamente em astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas oligoastrocíticos mistos ou ependimomas com base em semelhanças morfológicas com os tipos de células neurogliais encontradas no cérebro normal. A classificação posterior ocorre com base na localização (por exemplo, na ponte ou no nervo óptico), padrões de diferenciação característicos (como pilocítico ou mixopapilar) e características da aneuploidia (incluindo alta atividade mitótica, proliferação microvascular ou necrose) (WELLER *et al.*, 2015).

Quadro 1. Classificação dos tumores do sistema nervoso central selecionados de acordo com a Organização mundial de saúde 2016

Classificação dos tumores selecionados do SNC		
Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos		
Astrocitoma difuso	IDH mutante	II
Astrocitoma anaplásico	IDH mutante	III
Glioblastoma	IDH selvagem	IV
Glioblastoma	IDH mutante	IV
Glioma difuso da linha média	H3K27M- mutante	IV
Oligodendroglioma	IDH - mutante e 1p/19q- codeletado	II
Oligodendroglioma anaplásico	IDH - mutante e 1p/19q- codeletado	III

Fonte: Adaptado de LOUIS *et al.*, 2016.

Acredita-se que os tumores neste grupo heterogêneo surjam de células-tronco neurogliais ou células progenitoras e são classificados histologicamente em astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas oligoastrocíticos mistos ou ependimomas com base em semelhanças morfológicas com os tipos de células neurogliais encontradas no cérebro normal. A classificação posterior ocorre com base na localização (por exemplo, na ponte ou no nervo óptico), padrões de diferenciação característicos (como pilocítico ou mixopapilar) e características da aneuploidia (incluindo alta atividade mitótica, proliferação microvascular ou necrose) (WELLER *et al.*, 2015).

A origem do GBM ainda é uma questão indefinida. Inicialmente foi sugerido que astrócitos, as únicas células conhecidas por replicar no cérebro adulto, sofreriam alterações oncogênicas e dariam origem ao GBM (GERALDO *et al.*; 2018). Outras hipóteses sugerem que esses tumores podem derivar a partir de precursores, tais como neuronal ou oligodendrócitos de células progenitoras (GERALDO *et al.*; 2018). A heterogeneidade celular do GBM torna extremamente difícil de identificar com precisão sua célula de origem. Embora essas sejam células de propagação de tumores e não de iniciação tumoral, a sua presença tem sido associada a heterogeneidade desses tumores, já que elas podem se dividir e diferenciar assimetricamente e ser mais resistente a quimioterapia convencional (GERALDO *et al.*; 2018).

Apesar da heterogeneidade genética dos tumores gliais individuais, alterações moleculares comuns são encontradas frequentemente em vias de transdução de sinal,

uma rede de comunicação de moléculas reguladoras no interior da célula, regulação de processos celulares que contribuem para a homeostase normal e malignidade. Estes processos celulares são regulados por vários fatores de crescimento, hormônios e citocinas (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007).

O GBM é o tumor cerebral primário mais comum e maligno, caracterizado pela presença de necrose e / ou proliferação vascular e um infiltrado de neoplasia astrocítica definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como grau IV (GOKDEN, 2017). São tumores astrocíticos difusos apresentando atipia nuclear, pleomorfismo celular e intensa atividade mitótica associada à necrose e proliferação microvascular (GERALDO *et al.*, 2018).

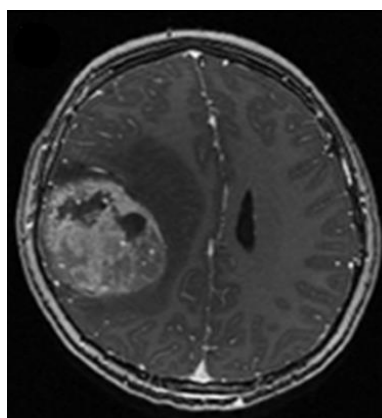
Os GBMs primários se apresentam como tumores completos, sem evidência clínica, radiológica ou histopatológica de uma lesão precursora menos maligna. Eles também são chamados de GBM *de novo*, mas isso não sugere uma transformação em uma única etapa; como outras neoplasias humanas, elas resultam da aquisição de múltiplas alterações genéticas. Os GBMs secundários desenvolvem-se lentamente através da progressão do astrocitoma difuso de baixo grau (grau II da OMS) ou astrocitoma anaplásico (grau III da OMS). O diagnóstico de GBM secundário requer evidência clínica (neuroimagem) ou histológica de uma evolução de um astrocitoma menos maligno. A separação do GBM primário e secundário, que evoluem através de diferentes vias genéticas, podem afetar pacientes em diferentes idades. Essa classificação é meramente conceitual, não sendo utilizada como termos diagnósticos em grande parte porque esses subtipos são considerados histopatologicamente indistinguíveis (OHGAKI *et al.*, 2007; THAKKAR *et al.*, 2014).

Os GBMs primários representam 80% dos GBMs e ocorrem em pacientes mais velhos (média de idade de 62 anos). GBMs secundários se desenvolvem a partir de astrocitoma de baixo grau ou oligodendrogliomas e ocorrem em pacientes mais jovens (idade média, 45 anos). São mais comumente localizados na região supratentorial (frontal, temporal, parietal e occipital), raramente são vistos no cerebelo, e são muito raros na medula espinal (Figura 8) (THAKKAR *et al.*, 2014).

Os gliomas comuns que afetam os hemisférios cerebrais de adultos são denominados gliomas difusos por causa da sua propensão para se infiltrar em todo o cérebro. Esta natureza invasiva é uma das características fundamentais dos gliomas malignos e resulta na incapacidade de cirurgia para curar pacientes mesmo quando estas lesões surgem em áreas em que a ampla ressecção cirúrgica é possível. O

GBM continua sendo um dos cânceres mais fatais apesar das terapias ideais. São altamente resistentes à radioterapia convencional e quimioterapia, e muitas vezes se repetem de forma local, apesar da máxima ressecção cirúrgica (CHENG *et al.*, 2010; MAHER *et al.*, 2001). Os sintomas mais comuns para indivíduos com GBM são: déficits neurológicos focais como: dores de cabeça e convulsões. Complicações como confusão, sonolência, disfagia e náusea também são frequentemente observadas (SIZOO, 2010). Contudo, é importante salientar que os sintomas podem variar dependendo da localização do tumor no cérebro. Por exemplo, pacientes com GBM disseminado para a medula espinhal apresentam sintomas neurológicos diferentes daqueles observados em outros tumores cerebrais malignos (FAKHOURY *et al.*, 2015).

Figura 8. Neuroimagem de um glioblastoma



Legenda: Embora as características de neuroimagem não sejam específicas, a imagem mostra uma localização superficial e demarcação nítida, como visto nesta imagem de Ressonância magnética. Histologicamente, o GBM pode mostrar uma borda discreta com o cérebro adjacente, muitas vezes sugestivo de metástase (Adaptado de LOUIS *et al.*, 2016).

Existem evidências de que as células-tronco que foram definidas como células dentro do tumor possuem a capacidade de se auto-renovar e de causar linhagens heterogêneas de células cancerígenas que compõem o tumor, podendo contribuir para a resistência dos gliomas para o tratamento padrão (Figura 9). A radioresistência em células-tronco geralmente resulta preferencialmente na ativação da resposta a danos no DNA, enquanto que os resultados de quimiorresistência em parte da superexpressão da MGMT(O(6)-*Methylguanine-DNA Methyltransferase*), a regulação positiva dos genes de resistência a múltiplas drogas e a inibição da apoptose. Estratégias terapêuticas que efetivamente visam as células-tronco e superam sua

resistência ao tratamento serão necessárias para que os gliomas malignos sejam completamente erradicados (WEN *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2012).

A terapia padrão para pacientes recém-diagnosticados com GBM consiste em: ressecção cirúrgica + radioterapia cerebral padrão ou hipofracionada + temozolomida adjuvante (TMZ), mesmo para pacientes idosos. Apesar do tratamento agressivo, praticamente todos os pacientes apresentam recidiva do tumor (GERALDO *et al.*, 2018).

Os regimes de tratamento atuais para o câncer mostraram benefícios de sobrevivência limitados quando usados para o câncer em estágio mais avançado, porque esses tratamentos visam principalmente o volume do tumor, mas não as células-tronco do câncer. A maioria das terapias é direcionada para a massa tumoral em rápido crescimento, mas não para as células-tronco tumorais que se dividem lentamente (HU *et al.*, 2012).

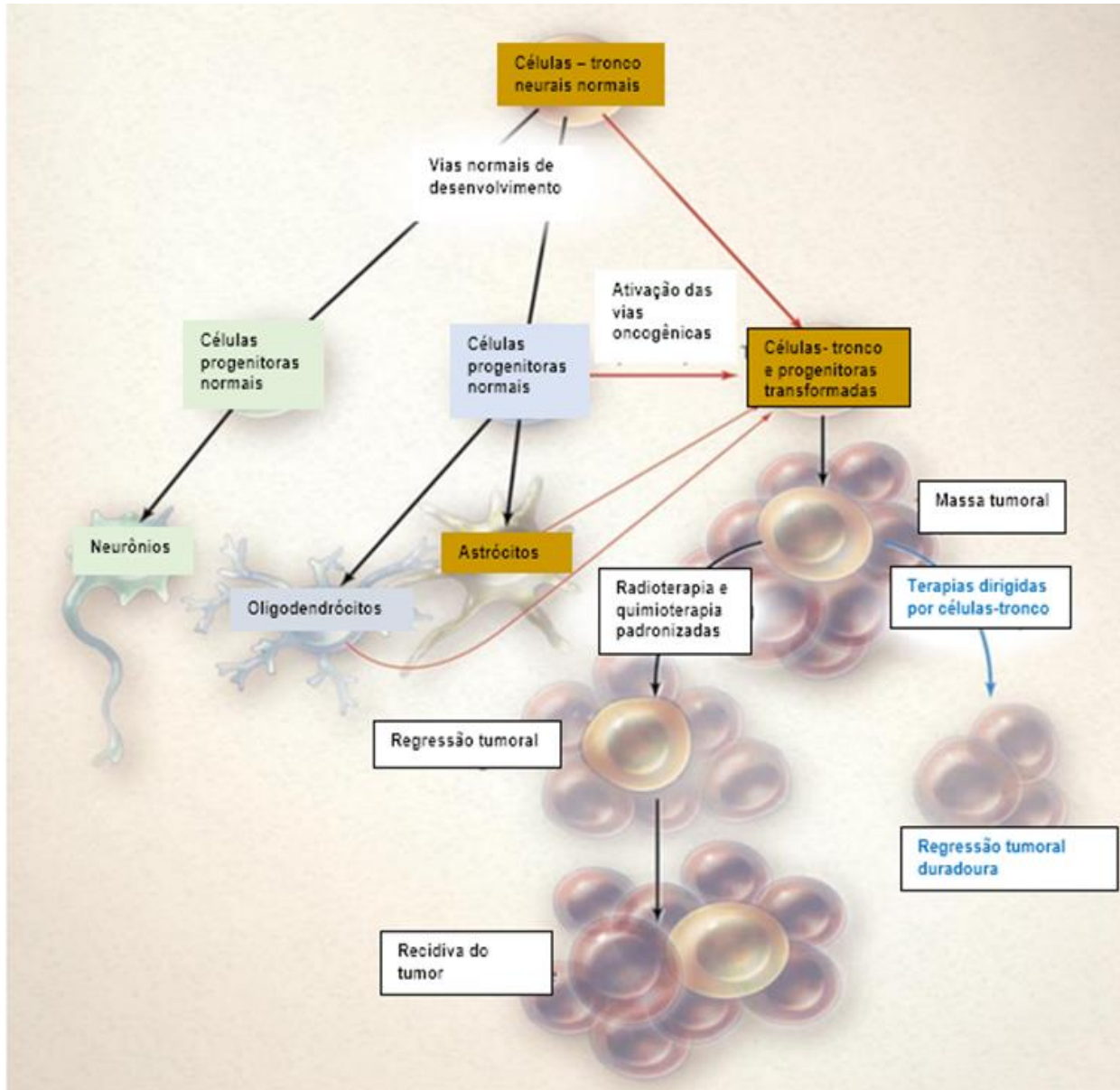
A disseminação rápida e extensa de células GBM dentro do cérebro impede que a ressecção cirúrgica seja eficaz. Além disso, a maioria das células infiltrantes é dotada de atividade proliferativa limitada, o que explica em parte a ineficácia da quimioterapia e radioterapia. A sobrevida média após a ressecção cirúrgica sozinha é de 6 meses com apenas técnicas neurocirúrgicas, quimioterapia e radioterapia. A sobrevida média após a ressecção cirúrgica sozinha é de 6 meses com apenas 7,5% dos pacientes sobrevivendo 2 anos no pós-operatório. A radioterapia adicional prolonga a sobrevida média para 9 meses, enquanto a quimioterapia sistêmica fornece benefícios mínimos de sobrevida (BINDA *et al.*, 2012).

A segmentação de múltiplas vias de sinalização, ou mesmo diferentes alvos na mesma via da terapia de combinação podem aumentar a eficácia do tratamento. Uma estratégia para determinar as combinações mais promissoras é importante, pois o número de combinações terapêuticas é ilimitado, mas o número de pacientes com gliomas malignos é muito limitado (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007).

TMZ e outros agentes alquilantes (mecloreteamina, ciclofosfamida, carmustina e etc) modificam a posição O6 em guaninas formando assim lesões críticas de DNA que progridem para letais. Ligações cruzadas de DNA proíbem a replicação celular. A enzima de reparo do DNA a MGMT é capaz de remover grupos alquílicos, introduzindo a resistência ao tratamento com TMZ. No entanto, quando o promotor de MGMT é metilado, MGMT não é transcrito e, por conseguinte, não é possível

reparar danos no DNA causados por TMZ, tornando TMZ mais eficientes (BLEEKER *et al.*, 2012; KATZUNG, 2017).

Figura 9. Mecanismos de resistência em células de glioma



Legenda: Células-tronco neurais normais se auto-renovam e dão origem as células progenitoras multipotenciais que formam neurônios, oligodendroglia e astrócitos. As células-tronco do glioma surgem da transformação de células-tronco neurais ou células progenitoras (vermelho) ou, menos provável, da diferenciação de um oligodendrócito ou astrócitos (setas vermelhas finas) e levar a malignidade dos gliomas. As células-tronco de glioma são relativamente resistentes ao tratamento padrão, como radiação e quimioterapia e levar ao novo crescimento do tumor após o tratamento. Terapias dirigidas a células-tronco podem esgotar essas células e potencialmente levar a uma regressão tumoral mais duradoura (azul) (Adaptado de WEN *et al.*, 2008).

De fato, as terapias convencionais contra o câncer têm como alvo as células neoplásicas que estão em grande parte em rápido crescimento, sugerindo que as células-tronco cancerígenas podem sobreviver devido à sua alta resistência às drogas e menor taxa de proliferação. Todas as terapias tradicionais contra o câncer, incluindo cirurgia, terapia hormonal, terapia antiangiogênese e imunoterapia mostram uma falta de eficácia em termos de resultados a longo prazo, devido à sua incapacidade de atingir células-tronco cancerígenas e toxicidade devido a efeitos não específicos em células normais (HU *et al.*, 2012).

Vários marcadores moleculares estão associados a variações dos graus de glioma. Todos os GBMs de grau 4, exibem heterogeneidade genética significativa e subtipos tumorais com alterações genéticas existem dentro desta maior categoria histológica homogênea que leva a um prognóstico com significância (THAKKAR *et al.*, 2014).

Estudos anteriores forneceram evidências de que GBMs primários e secundários se desenvolvem por vias genéticas distintas. A superexpressão EGFR é típica de GBMs primários, tendo uma mutação em PTEN e alteração no cromossomo 10. Alterações genéticas mais comuns em GBMs secundários incluem mutação em TP53 e alteração no cromossomo 19q. Entretanto, até a identificação da mutação *IDH1* como marcador molecular do GBM secundário, os padrões de alterações genéticas, embora diferentes, não permitiram uma separação precisa dos 2 subtipos. A mutação do gene *IDH1* como um marcador molecular de GBM secundário, é mais confiável e objetivo do que critérios clínicos e / ou patológicos (OHGAKI *et al.*, 2007; OHGAKI *et al.*, 2013).

A via de EGFR / PTEN / Akt / mTOR é uma via de sinalização chave no desenvolvimento de GBMs primários. A superexpressão do EGFR ocorre em 40% dos GBMs primários, mas raramente em GBMs secundários. A superexpressão do EGFR também é mais comum em GBMs primários (60%) do que em GBMs secundário (10%) (OHGAKI, 2007).

Em suma, GBMs primários e secundários realizam alterações genéticas diferentes. As mutações TP53 foram raramente encontradas em GBMs primários, mas ocorrem com uma incidência elevada em GBMs secundários; a prevalência da superexpressão do receptor de EGF (EGFR) é maior em GBMs primários, porém mais raramente em GBMs secundárias (OHGAKI *et al.*, 2007).

No estudo de MOLENAAR, Remco J. *et al.* (2014) concluiu que combinações das mutações IDH1 e metilação MGMT supera as mutações IDH1 ou metilação MGMT isoladamente na previsão de sobrevida de pacientes com GBM. Isso seria devido a metilação do promotor do gene MGMT parecendo ser um fator preditivo para a resposta de pacientes com GBM à temozolomida e radioterapia e, conseqüentemente, à sua sobrevivência (MOLENAAR *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das terapias intensivas, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o prognóstico dos pacientes com glioma ainda permanece desfavorável, uma vez que a sobrevida média é de 14-16 meses para os pacientes com o subtipo mais agressivo, GBM. Pesquisas focadas na identificação de alterações genéticas implicadas no GBM podem ajudar a definir subgrupos de pacientes com prognósticos diferentes e respostas diferentes a tratamentos específicos.

O estudo de mutações nas células tumorais de GBM estabelecidas em nosso laboratório irá ajudar nas nossas pesquisas, de forma a identificar o perfil mutacional de genes relacionados aos GBMs que podem estar relacionados a resistência a alguns tratamentos.

O câncer de mama continua sendo uma doença comum em todo o mundo. O prognóstico do câncer de mama inicial é geralmente favorável. Portanto, o diagnóstico precoce e o início precoce do tratamento tem sido importante. Outra abordagem para manter a doença sob controle é a elucidação da função molecular do câncer de mama características biológicas. A avaliação de potenciais alvos moleculares pode levar ao diagnóstico precoce e direcionamento molecular tratamento.

O câncer oral é uma das doenças malignas mais comuns. Os primeiros estágios da doença, que têm um bom prognóstico, geralmente são assintomáticos. Assim, a maioria dos casos são diagnosticados em um estágio já avançado caracterizado por um mau prognóstico e baixa sobrevida. Apesar dos avanços no diagnóstico e terapia, a incidência de recorrência, local e distante metástases e as taxas de mortalidade ainda permanecem altas.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

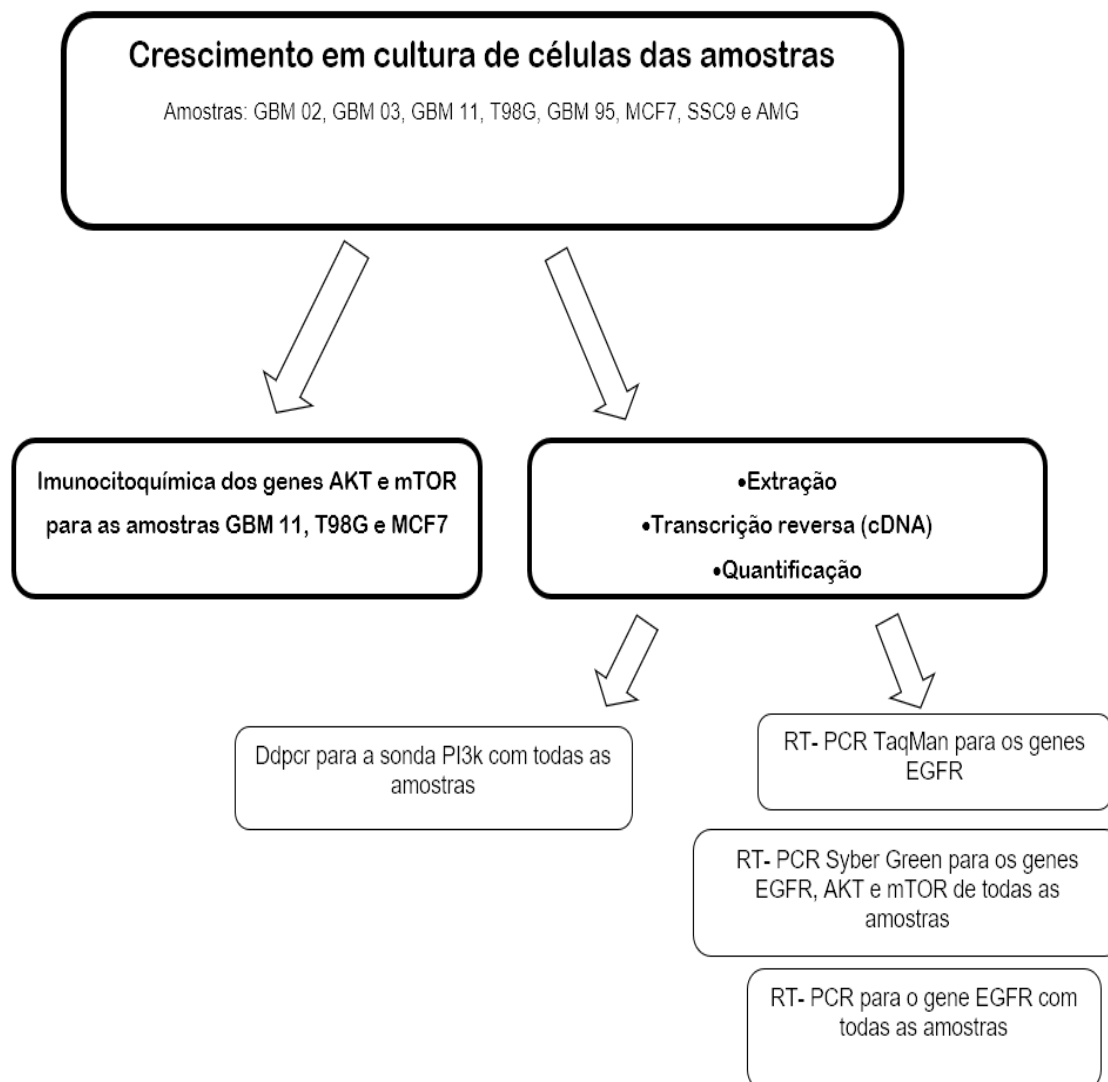
Reconhecer os genes mutados em células tumorais permitindo uma melhor análise e descrição das culturas celulares utilizadas na pesquisa em nosso laboratório, comparativamente aos padrões de mutações indicados na literatura.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar a mutação H1047R do gene PIK3CA nas células utilizadas no estudo através da técnica de DDPCR
- Avaliar a expressão gênica dos genes AKT1, mTOR e EGFR por PCR em tempo real
- Comparar a expressão destas mutações em estudo nos genes EGFR e PIK3CA a outras linhagens tumorais, não gliais, como a de tumor de mama e de câncer oral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

FLUXOGRAMA



4.1 LINHAGENS CELULARES

As células que foram utilizadas no projeto são GBMs (CONEP 2340) previamente caracterizadas em nosso laboratório obtidas de pacientes e denominadas GBM 095 (HUCFF- UFRJ), GBM 02 (HUCFF- UFRJ), GBM 03, GBM11 (HUCFF- UFRJ) e T98G, obtidas a partir do American Type Culture Collection (ATCC, www.atcc.org), número de catálogo CRL-1690 (Quadro 1). Células gliais primária humana foram utilizadas como controle. As células foram descongeladas e propagadas

em cultura. As células foram cultivadas em meio DMEM F12 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de SFB (Invitrogen, EUA) e 50g/mL de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, EUA). As células foram mantidas incubadas em estufa com 5%/CO₂/37° C.

Quadro 2. Característica das células

Célula	Tipo	Tratamento
GBM 95	Tumor de recidiva	Não
GBM02	Astrocitoma grau III evoluindo para GBM (secundário)	Não
GBM 03	Recidiva de GBM primário	Radioterapia
GBM 11	Recidiva	Quimioterapia (termozolamida)+ radioterapia
T98G	Obtida a partir do American Type Culture Collection	

4.2 EXTRAÇÃO, TRANSCRIÇÃO REVERSA E QUANTIFICAÇÃO

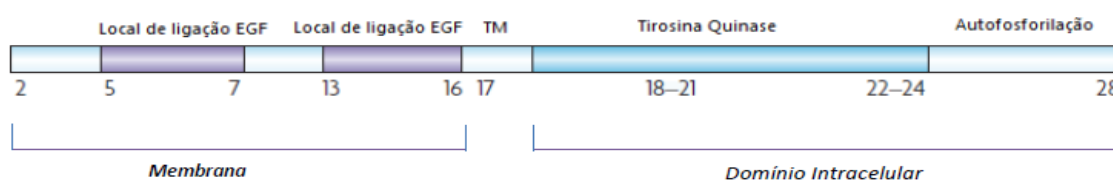
O isolamento do RNA mensageiro foi realizado através do Maxwell® 16 *Viral Total Nucleic Acid Purification kit* (Promega,EUA), utilizando a extração automatizada com Maxwell® 16 Instrument (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram submetidas a uma reação de transcrição reversa para a produção do cDNA utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida foi feita a quantificação do material extraído utilizando o *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific).

4.3 LISTA DE INICIADORES (PRIMERS)

Os iniciadores para a região de ectodomínio de EGFR (Figura 10) foram desenhados a partir da sequência NM_005228.5 EGFR variante 1 retirada do GenBank, utilizando o programa online Primer3Plus (Quadro 2).

Os iniciadores para os genes AKT1 e mTOR (Quadro 3 e 4) foram desenhados a partir das sequências NM_005163.2 Homo sapiens AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1), transcript variant 1 e NM_001386500.1 Homo sapiens mechanistic target of rapamycin kinase (MTOR), transcript variant 2, respectivamente, também utilizando como ferramenta o programa Primer3Plus. Estes iniciadores foram utilizados para PCR em tempo real utilizando o $2^{-\Delta\Delta CT}$ como método para análise de expressão gênica.

Figura 10. Estrutura do gene EGFR



Legenda: Estruturas correspondentes às alterações do gene e do transcrito do gene EGFR, sendo os cDNAs sintetizados para análise de sequências (Adaptado de FREDERICK *et al.*, 2000).

Quadro 3. Iniciadores para o gene EGFR

Iniciadores (nome)	Sequência	Produto
EGFR ECD 1 F	5' ACGAGTAACAAGCTCACGCA 3'	169 pb
EGFR ECD 1 R	5' GGACATAACCAGCCACCTCC 3'	
EGFR ECD 2 F	5' CCAGGAGGTGGCTGGTTATG 3'	261pb
EGFR ECD 2 R	5' CTGACTATGTCCCGCCACTG 3'	
EGFR ECD3 F	5' GGTGCAGGAGAGGAGAACTG 3'	174 pb
EGFR ECD 3 R	5' GGCTTCGTCTCGGAATTTGC 3'	
EGFR ECD 4 F	5' CTACAACCCACACGTACC 3'	190 pb
EGFR ECD 4 R	5' AGGCCCTTCGCACTTCTTAC 3'	
EGFR ECD 5 F	5' GGCCGACAGCTATGAGATGG 3'	164 pb
EGFR ECD 5 R	5'CACTGATGGAGGTGCAGTTT 3'	

Quadro 4. Iniciadores para o gene AKT

Primer AKT1 F	5' GGACAAGGACGGGCACATTA 3'
Primer AKT1 R	5' CGACCGCACATCATCTCGTA 3'

Quadro 5. Iniciadores para o gene mTOR

Primer mTOR F	5' CGATGGCCAGGGATCTCTTC 3'
Primer mTOR R	5' GGTCTGTGTGACTTCAGCGA 3'

4.4 DDPCR

A metodologia de PCR digital, foi realizada no QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad Laboratories). A reação apresentou volume final de 20µL constituindo de 10µL do 2x Supermix (Bio-Rad Laboratories), 1µL de sonda PIK3CA WT for p.H1047R e PIK3CA p.H1047R, Human (Bio Rad, #1863133) e o cDNA. Os 20µL de reação foram colocados no cartucho para geração de gotículas utilizando as 8 canaletas e 70µL de óleo para geração da gota foi adicionado a cada canaleta. Depois disso, o cartucho será conectado a um gerador de gotículas gerado aproximadamente 20.000 gotículas. Após o processamento, a emulsão de gotícula foi transferida para a placa contendo 96 poços. A placa foi subsequentemente selada usando o selador de placa. A amplificação da placa foi realizada utilizando o termociclador. A concentração absoluta de cada amostra foi relatada automaticamente pelo software ddPCR, calculando a proporção das gotículas positivas sobre as gotículas totais.

4.5 IMUNOCITOQUÍMICA

Para a análise de imunocitoquímica, 1×10^4 células em 300µl DMEM / F12 foram semeadas em lamínulas colocadas em uma placa de 24 poços. As lamínulas foram fixadas com PFA 4% em PBS por 15 minutos após atingir a confluência desejável. As células fixadas foram então lavadas com PBS a 1% e a permeabilização feita usando Triton X-100 a 0,1%. As lamínulas foram então incubadas em 5% de BSA diluído em PBS por 30 minutos para minimizar a ligação não específica. A incubação foi feita com anti-mTOR (sinalização celular, 1:200, Cell Signaling Technology cat nº, 2983), anti-fosfo mTOR (sinalização celular, 1:50, Cell Signaling Technology cat nº 5536), anti-Akt (sinalização celular, 1:400, Cell Signaling Technology cat nº C67E7) anti-fosfo Akt (sinalização celular, 1:400, Cell Signaling Technology cat nº D9E). As células foram incubadas durante a noite a 4 ° C com anticorpos primários, depois lavadas novamente com PBS seguido de incubação com anticorpos secundários

conjugados com Alexa Fluor 546 (anti-coelho de cabra; 1:400) por 2 horas. As lâminas foram lavadas com PBS, coradas com DAPI, lavadas novamente com PBS e montadas em lâminas de vidro com agente antifading Fluoromount-G (Emsdiasum). Os controles negativos foram corados apenas com anticorpos IgG de coelho. A imagem foi realizada em microscopia de fluorescência avançada DMI8 (Leica Microsystems, Alemanha). A intensidade de fluorescência de células individuais foi analisada usando o software ImageJ (NIH, EUA).

4.6 PCR EM TEMPO REAL

4.6.1 TAQMAN PARA ANÁLISE DE MUTAÇÃO

O iniciador utilizado para detecção da mutação L858R no gene EGFR foi o PrimePCR Mutation Assay EGFR WT and p.L858R, Human (Bio Rad, EUA). Todas as reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, sob condições de plena assepsia, utilizando os reagentes descritos no quadro abaixo. A reação foi feita em triplicata, incluindo como calibrador a amígdala, utilizando 50 ng de cDNA.

MASTER MIX	
Reagentes	Quantidade em µl (01 reação)
TaqMan® Master Mix	10
Primer mut	1
Primer wt	1
cDNA	9
Água	9
Total	20

Misturas das reações para PCR em tempo real e concentrações finais dos reagentes

Logo após o preparo da reação foi colocado em cada microtubo 9 µL de cDNA e 11 µL do Master mix, em seguida os tubos foram colocados no termociclador (Veriti 96-well thermal cycler, 0.2ml / Applied Biosystems).

As condições utilizadas para a reação foram 60 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

4.6.2 Análise de mutação do EGFR

O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação com a utilização da Taq DNA polimerase em sondas marcadas com corantes fluorescentes (TaqMan). Essas sondas, específicas para o segmento gênico cuja expressão se deseja estudar, apresentam uma substância (fluoróforo na posição 5' da sonda) capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda, porém na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por substância (quencher) presente na extremidade 3' da sonda. Como resultado, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do quencher que agora não mais será capaz de absorver a luz emitida. O equipamento utiliza uma fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo envolvido na reação. A fluorescência eventualmente produzida pela amostra é detectada pelo sistema e o momento da reação de PCR em que a fluorescência determinada é denominada de CT ou CP (threshold cycle, crossing point). Quando há hibridização da sonda suficiente é clivada pela *Taq Polimerase*, a intensidade da fluorescência do repórter aumenta, permitindo a detecção da fluorescência gerando o plot de amplificação, que na sua fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção Ct (*Cycle*). Nos ciclos iniciais da PCR, há uma pequena alteração no sinal de fluorescência, isso define o Baseline para o gráfico de amplificação, um aumento na fluorescência acima do Baseline indica a detecção de alvo acumulado. Um threshold de fluorescência fixa pode ser ajustado acima do Baseline. O parâmetro CT (ciclo threshold) é definido como o ciclo no qual a fluorescência ultrapassa o threshold.

4.6.3 SYBR GREEN PARA ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para avaliar a expressão gênica foi utilizado o Sybr Green, a sequência de primers utilizada foi desenhada pelo programa online Primer3Plus, sendo descrita na lista de iniciadores acima (tabelas 1, 2 e 3). A reação foi feita em triplicata, incluindo controle negativo, utilizando 50 ng de cDNA. A linhagem proveniente da amígdala

cerebral foi utilizada como controle e como normalizador o GAPDH. Os reagentes utilizados foram descritos abaixo:

MASTER MIX	
Reagentes	Quantidade em µl (01 reação)
SyberGreen	7,5
Primer wt	0,6
Primer mut	0,6
cDNA	1
Total	15

As condições utilizadas para a reação foram 95 °C durante 10 minutos, 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minutos e 39 repetições de 65 °C por 5 segundos e 95 °C por 5 minuto.

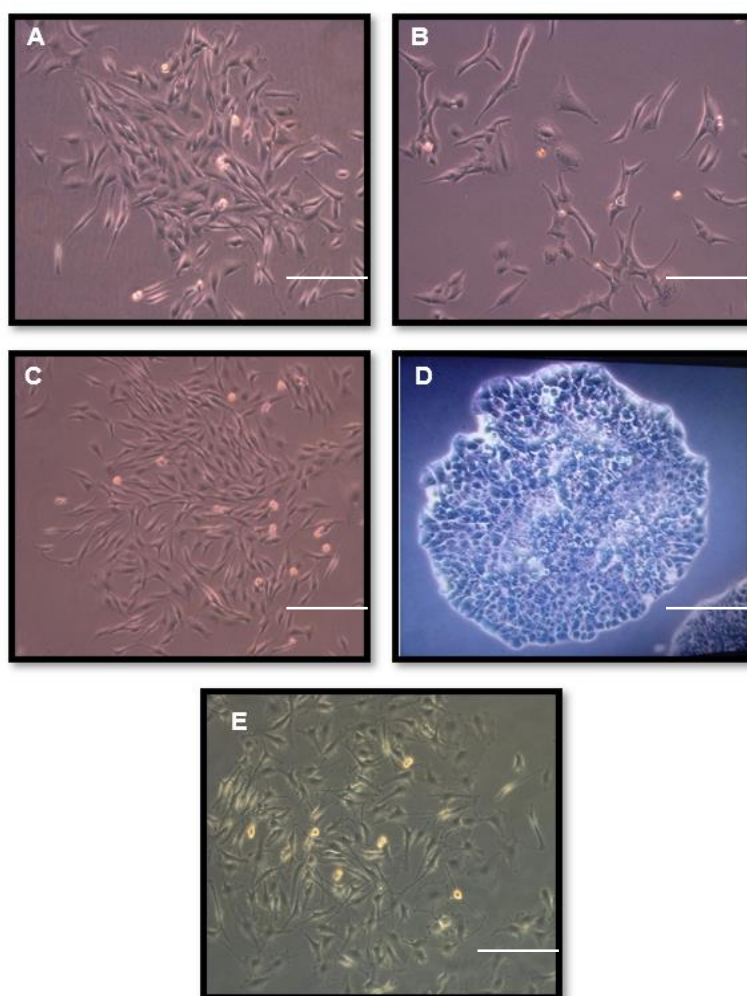
Para a nossa análise dos dados utilizamos método de quantificação relativa CT comparativa $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde permite fazer a avaliação do nível de expressão da amostra e de um controle endógeno. O ciclo de limiar (CT) é o ciclo no qual o nível de fluorescência atinge um determinado valor (o limiar). Este método usa diretamente as informações de CT geradas a partir de um sistema qPCR para calcular a expressão relativa do gene em amostras alvo e de referência, usando um gene de referência como o normalizador.

5. Resultados:

Inicialmente foram tiradas fotos das células GBM03, GBM11, T98G, MCF7 e SSC9 crescidas em cultura, por microscopia de luz óptica através do microscópio invertido modelo Leica DMI1, com a objetiva de 40x (figura 11), de forma apenas ilustrativa, não obtendo nenhuma relação com a descrição dos resultados.

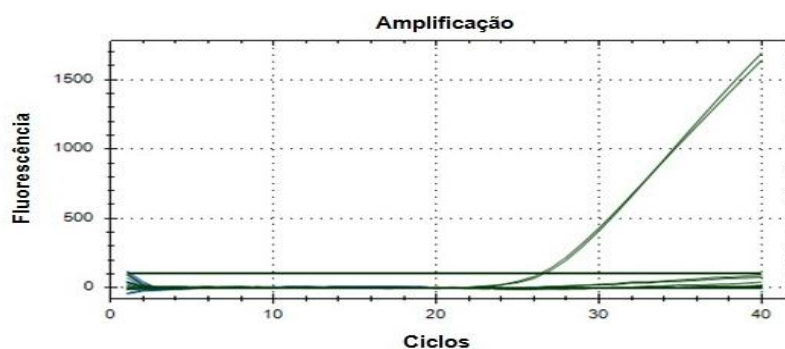
A fim de analisar mutações no gene EGFR, foi realizada a reação de RT-PCR nas amostras de GBMs 95, T98G, 02, 03 e 11, sendo realizada duas reações independentes, uma contendo iniciadores e sonda para o gene selvagem (WT) e outra para a mutação específica, no caso de EGFR, a mutação L858R. Não foi observada amplificação tanto de WT quanto mutados nas linhagens de GBMs 95, 02 e 03. Gráficos das curvas de amplificação gerada pelo CFX96 Real Time System (Figuras 12 e 13).

Figura 11. Fotos das células de GBM, MC7F e SSC9 em cultura



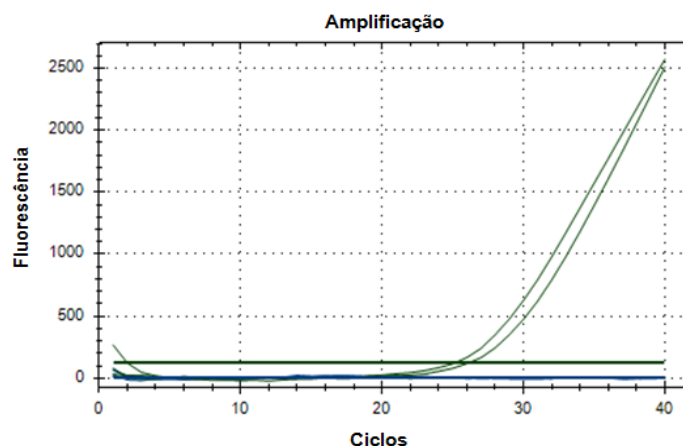
Legenda: (A) Corresponde as células de GBM 03 possui o crescimento rápido; (B) Células de GBM 11 possui o crescimento lento; (C) Células de GBM T98G possui o crescimento rápido, (D) Células de mama MCF7 possui o crescimento lento tem o aspecto arredondado crescendo em grumos e (E) Células de câncer oral SSC9 possui o crescimento lento. As células apresentam diferentes morfologias. Barra 200 μm

Figura 12. Gráfico em tempo real da célula GBM 11



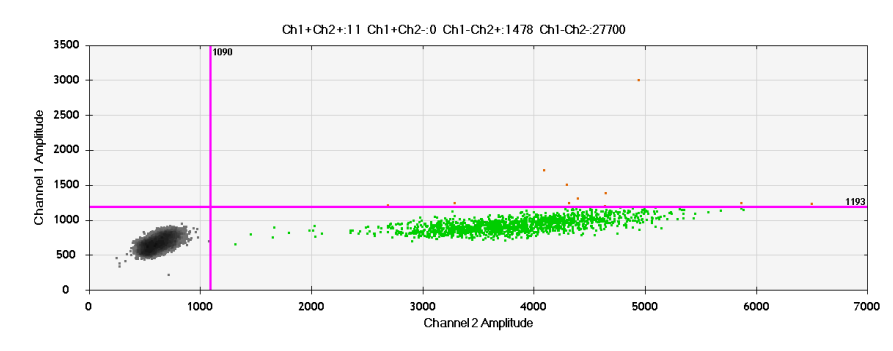
Gráficos 1: Curva de amplificação de RT-PCR para o gene humano EGFR tipo selvagem na amostra de GBM 11, fazendo o monitoramento da fluorescência que mostra quantidade de ciclos para a amplificação em tempo real.

Figura 13. Gráfico RT-PCR da célula T98G

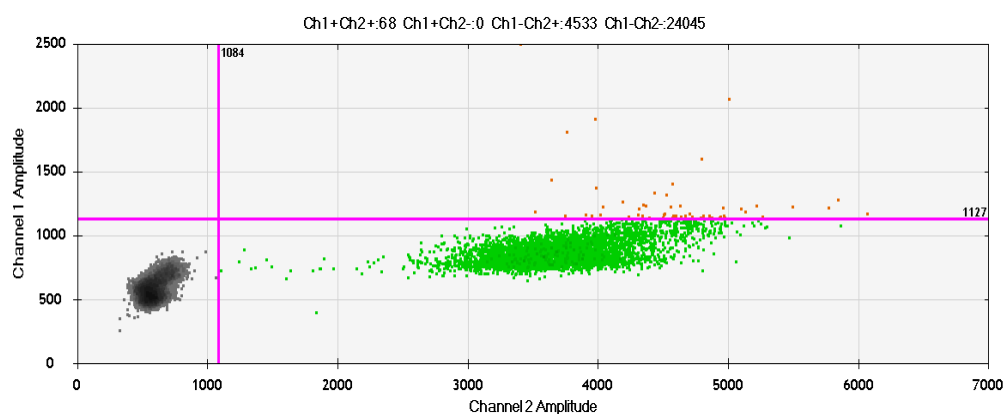


Gráficos 2: Curva de amplificação de RT-PCR para o gene humano EGFR tipo selvagem na amostra T98G, fazendo o monitoramento da fluorescência que mostra quantidade de ciclos para a amplificação em tempo real.

Os gráficos 1 e 2 mostram o plot de amplificação do gene EGFR para as células GBM 11 e T98G. Foi observado amplificação apenas nas amostras selvagens, não sendo observada nenhuma mutação por esta metodologia. Realizamos a técnica de ddPCR com a sonda para PIK3CA H1047R de forma a tentar observar a possibilidade de mutações nessas células para esse gene. Na técnica de ddPCR nas células T98G e MCF7 e GBM11(Figuras 14, 15 e 16) apresentaram populações selvagem em verde e mistas em laranja. Na célula GBM 11 foi observado uma pequena mutação isolada podendo ser identificada em azul (Figura 16) para o gene PIK3CA.

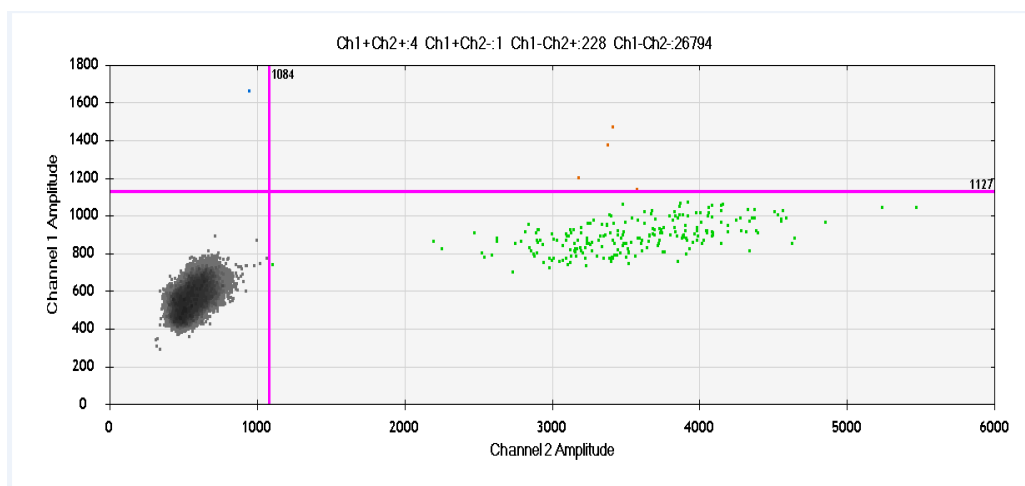
Figura 14. Avaliação de mutações por Ddpcr na célula MCF7

Legenda: Representação gráfica do resultado do PCR digital da amostra de câncer de mama MCF7. O traço na cor rosa representa o limite entre a população de gotas positivas e negativas. A região em cinza representa a população controle, a região em verde a população selvagem e a região em laranja a população mista.

Figura 15. Avaliação de mutações por Ddpcr na célula T98G

Legenda: Representação gráfica do resultado do PCR digital da amostra T98G. O traço na cor rosa representa o limite entre a população de gotas positivas e negativas. A região em cinza representa a população controle, a região em verde a população selvagem e a região em laranja a população mista (mutado e selvagem).

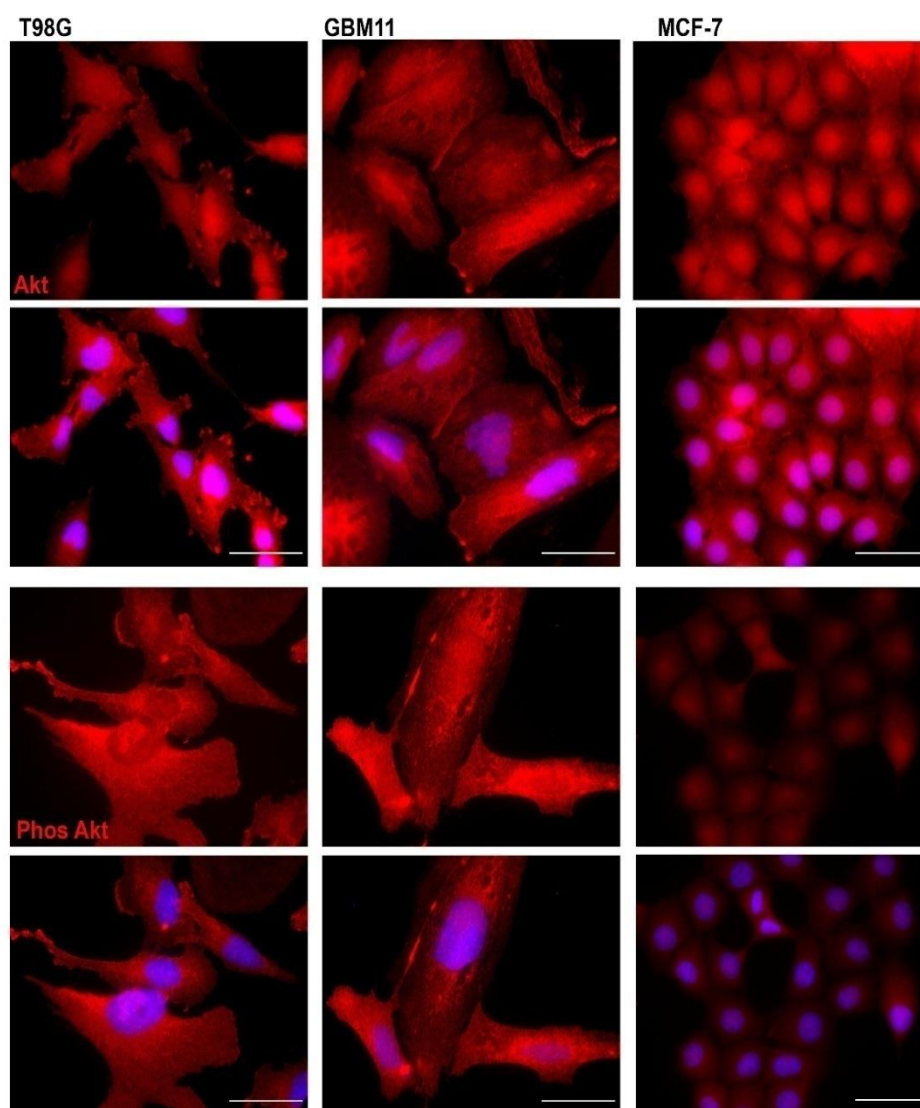
Figura 16. Avaliação de mutações por Ddpcr na célula GBM 11



Legenda: Representação gráfica do resultado do PCR digital da amostra GBM11. O traço na cor rosa representa o limite entre a população de gotas positivas e negativas. A região em cinza representa a população controle, a região em verde população selvagem, região em laranja a população mista (selvagem e mutada) e a região em azul população mutada.

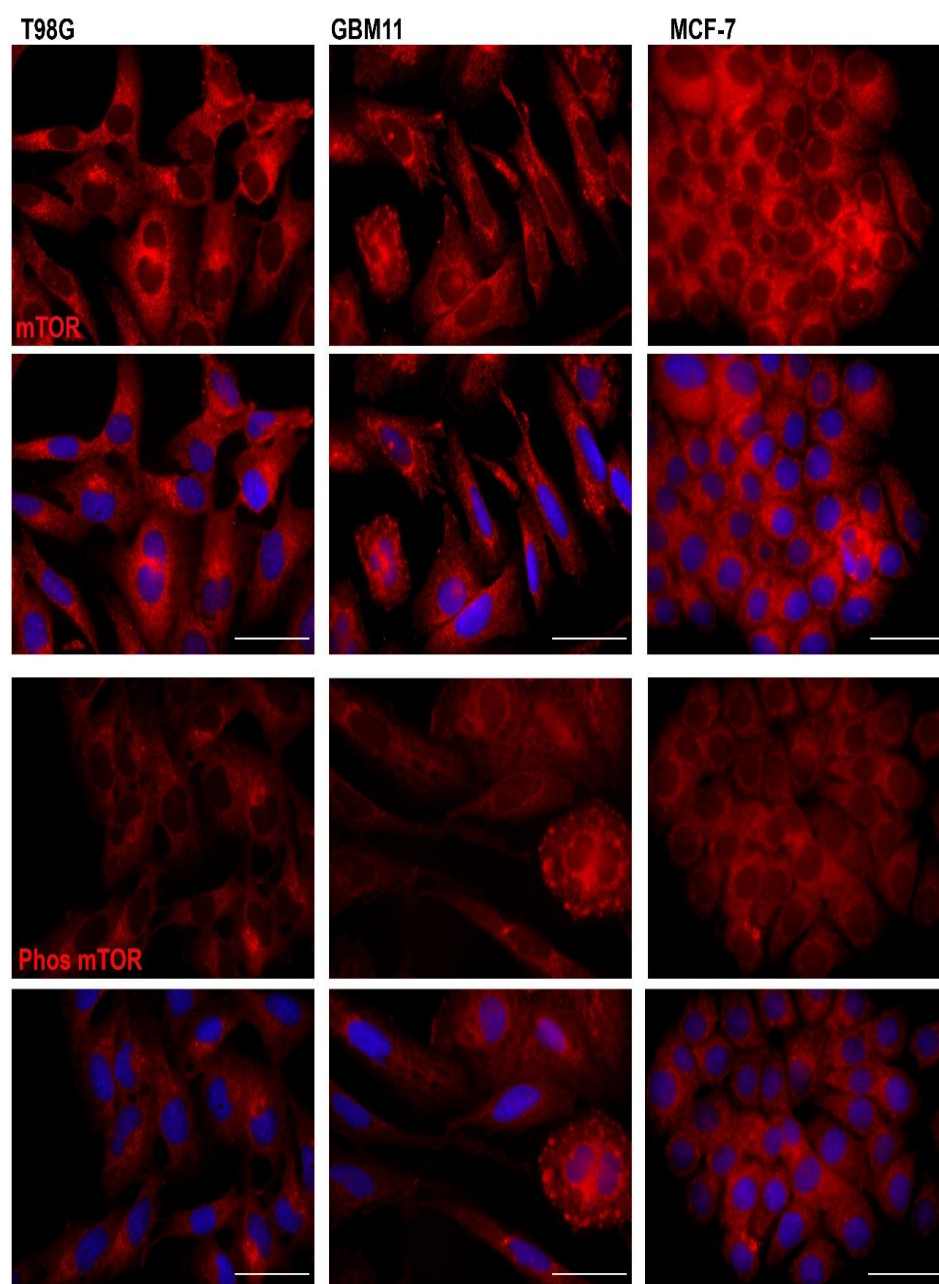
Das amostras que foram feitas a técnica de Ddpcr digital, as amostras T98G, GBM11 e MCF7 apresentaram mutação para o gene PIK3CA. Diante desses resultados partimos para os próximos experimentos.

Devido a isso resolvemos fazer a imunocitoquímica dessas células com anticorpos para proteínas que estão envolvidas na via de PIK3CA, como AKT1 e mTOR conforme demonstrado abaixo (Figuras 17 e 18).

Figura 17. Imunocitoquímica do gene AKT

Legenda: Expressão de Akt / Phos Akt em células de câncer de mama humano MCF-7 e GBMs T98G e GBM 11 usando a análise de imunocitoquímica mostrando a expressão citoplasmática e nuclear de anticorpos Akt / Phos Akt. As células T98G e GBM 11 apresentam imunocoloração positiva para Akt / Phos Akt, já a MCF7 apresentou uma coloração mais fraca. Barra: 50 μ m.

Figura 18. Imunocitoquímica do gene mTOR



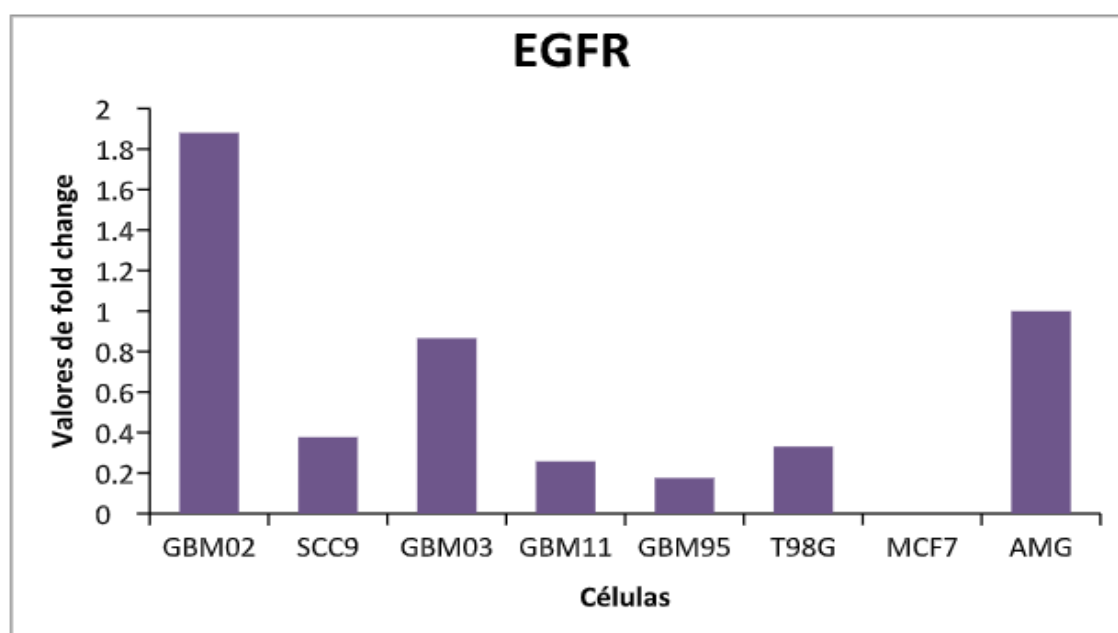
Legenda: Expressão de mTOR / Phos mTOR em células de câncer de mama humano MCF-7 e gbms T98G e GBM 11 usando a análise de imunocitoquímica mostrando a expressão citoplasmática e nuclear de anticorpos mTOR / Phos mTOR. As células T98G e GBM 11 apresentam imunocoloração positiva para todas as amostras mTOR / Phos mTOR. Barra: 50 μ m.

Através da análise das imunocitoquímicas das amostras T98G, GBM11 e MCF7 (Figuras 17 e 18) para AKT/Phos AKT, sugerimos que as células de mama se mostraram menos expressa e para mTOR/ Phos mTOR todas as células se mostraram bastantes expressas.

Inicialmente iniciadores primers foram desenhados para o sequenciamento de forma a observar mutação do gene EGFR, não sendo possível seguir com o sequenciamento, então resolvemos desenhar novos iniciadores de forma a verificar a expressão gênica.

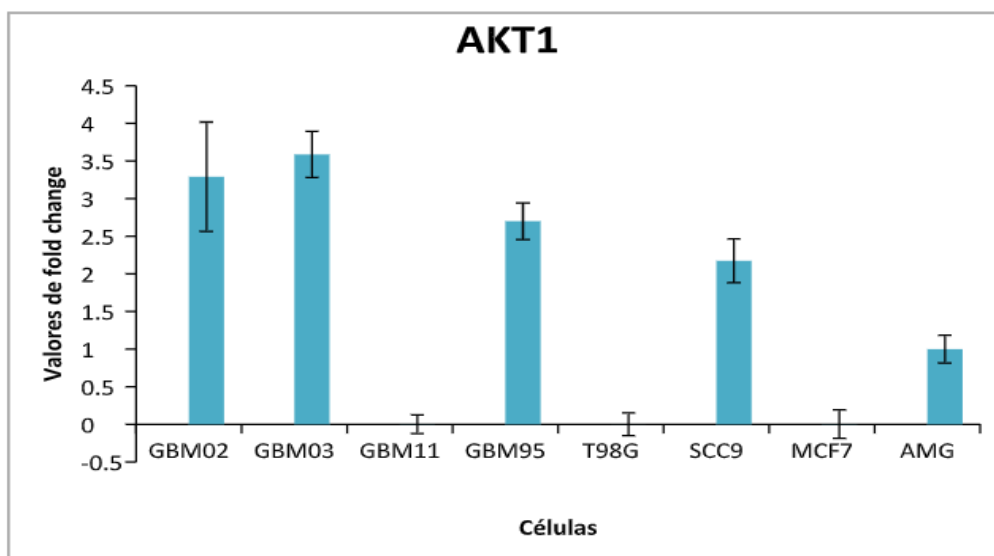
Em seguida fizemos o PCR em tempo real Sybr Green com os novos iniciadores desenhados da região do ectodomínio do gene EGFR, também para o gene AKT e mTOR de forma a verificar a superexpressão dessas células seriam compatíveis como os resultados encontrados para PIK3CA.

Figura 19. Gráfico da expressão do gene EGFR no PCR em tempo real com os novos iniciadores



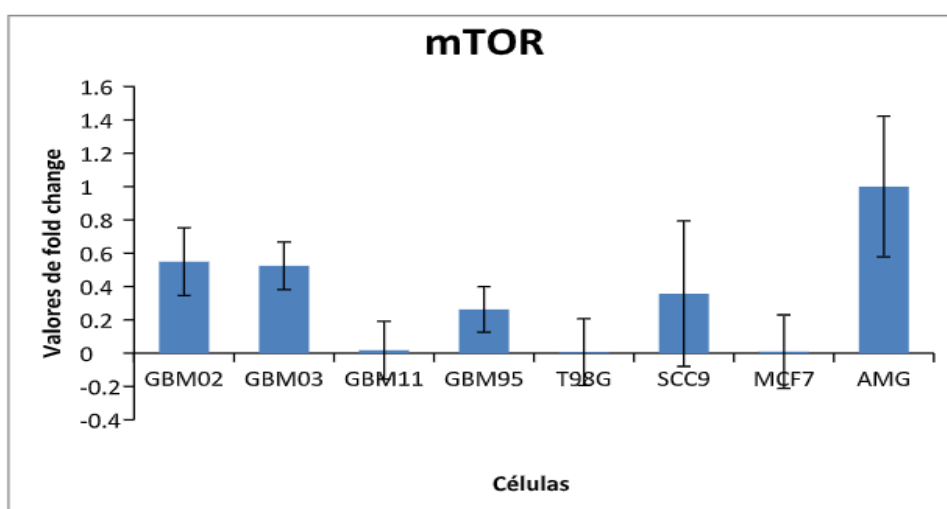
Legenda: Análise da expressão do gene EGFR nas células de gbm, MCF7 e SCC9.

Foi realizado o PCR em tempo real com os iniciadores para EGFR e GAPDH de forma a comparar se haveria uma superexpressão (Figura 19), utilizando a linhagem AMG (amígdala cerebral) como controle. Como pode ser analisado quase todas as células mostraram valores de fold change abaixo de 2, sendo 1 nossa referência. Nenhuma célula apresentou hiperexpressão para esse gene.

Figura 20. Gráfico da expressão do gene AKT no PCR em tempo real

Legenda: Análise da expressão do AKT1 nas células de GBMs, SCC9 e MCF7. As barras representam o +/- desvio padrão.

As células GBM11, T98G e MCF7 se mostraram menos expressas do que amígdala para o gene AKT1, um dos genes envolvidos na via de PIK3CA (Figura 20). Porém, observamos que as células GBM02 -, GBM03 -, GBM95 - e SCC9 -, apresentando valores de *fold change* de 3,4; 3,6; 3,0 e 2,3 respectivamente, mostraram hiperexpressão em relação ao controle (amígdala).

Figura 21. Gráfico da expressão do mTOR no RT-PCR

Legenda: Análise da expressão do MTOR nas células de GBMs e SCC9. As barras representam a média +/- desvio padrão.

As células para mTOR não se mostraram hiperexpressas em relação ao gene de controle a amígdala (Figura 21).

6. DISCUSSÃO

Um dos maiores desafios no tratamento do câncer é o tumor cerebral GBM sendo bastante agressivo, mesmo com os avanços da medicina, o prognóstico para os pacientes com GBM ainda é bastante debilitado devido à resistência terapêutica e a recorrência tumoral após a remoção cirúrgica, dessa forma apresentando sobrevida curta, cerca de 15 meses. Novas vias moleculares importantes estão sendo associadas à patogênese, biologia e abordagem terapêutica dos GBMs, entre elas os RTKs e PI3K (Cury, 2016).

A descoberta de novos biomarcadores de uso potencial no diagnóstico e no tratamento são importantes. A expressão gênica de gliomas se correlaciona melhor com a sobrevivência do que com a classificação histológica, a identificação de marcadores moleculares associados à progressão do tumor, grau do tumor e sobrevida do paciente usando métodos de alto rendimento, a fim de compreender a biologia complexa que regula o crescimento do tumor, a transformação maligna e a acessibilidade terapêutica dos gliomas se faz necessário (RÖHN *et al.*, 2018).

Vários estudos relataram a identificação do EGFR em rearranjos genéticos e/ou alterações da proteína EGFR em GBMs. As mutações de EGFR parecem ocorrer em tumores que abrigam e expressam genes de tipos selvagens e proteínas, a presença das quais pode obscurecer a detecção de mutantes (FREDERICK, 2000).

O papel do EGFR na oncogênese é particularmente convincente no GBM, o mais agressivo tumor cerebral humano com uma sobrevivência de dois anos inferior a 5% apesar da cirurgia, radiação e quimioterapia. Estudos anteriores mostram que aproximadamente 40% dos GBMs mostram amplificação do gene EGFR. Talvez a prova mais forte para um papel do gene EGFR na biologia do GBM deriva de ensaios clínicos em que 15% a 20% dos doentes com GBMs experimentaram regressão tumoral significativa em resposta à pequena molécula inibidores da quinase EGFR (LEE *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2012).

Receptor tirosina quinase, EGFR é frequentemente demonstrado que é geneticamente alterado em cânceres humanos. O EGFR, é encontrado para ser

superexpresso no câncer de mama em ~ 10 - 30% dos pacientes e associada a baixa sobrevida. A mutação do gene EGFR resulta na superexpressão desse gene e suas mutações são frequentemente encontradas em cânceres humanos. Mutações no EGFR são mais frequentemente relatadas em ~ 25% a 82% dos cânceres colorretais, ~ 30 - 50% GBMs e em 5% - 20% em câncer de pulmão de células não pequenas, etc (MURUGAN *et al.*, 2019).

EGFR é amplificado em cerca de 36% das amostras de glioma. Embora EGFR seja o oncogene mutado mais comumente encontrado em amostras de GBMs, outros RTKs também podem ser amplificados em GBMs. As mutações ativadoras no próprio AKT são muito raras em gliomas e outros tipos de câncer. Ainda não foi determinado se existem mutações ativadoras de AKT em células de glioma (AMCDOWELL *et al.*, 2011).

Embora em outros estudos os GBMs demonstraram amplificação no gene EGFR, no nosso estudo onde foi analisado 8 amostras e 1 controle, não foi possível observar essa amplificação. No nosso estudo comparativo do gene EGFR e GAPDH não sendo observado uma hiperexpressão. As outras amostras de célula não apresentaram essa hiperexpressão ficando com os valores abaixo da amígdala mediante a essa observação SSC9 - 0.4; GBM 03 - 0.8; GBM 11- 0.3; GBM 95 - 0.2; T98G - 0.4 e MCF7- 0.

A ativação de mutações somáticas de outros oncogenes (EGFR, KRAS, HRAS, BRAF, AKT1 e assim por diante) envolvidas em eventos moleculares a jusante da ativação de RKT e frequentemente observados em outros cânceres sendo raros no câncer de mama (CIZKOVA *et al.*, 2012).

O gene EGFR foi identificado, como sendo um dos principais contribuintes para a proliferação, imortalização e metástase de células tumorais na tumorigênese oral. A rede de interação entre esses oncogenes entre eles o EGFR, foi associada a várias vias oncogênicas que são a sinalização PI3 quinase / Akt, sinalização NF- κ B, sinalização de controle do ciclo celular e crescimento e diferenciação nas vias de sinalização MAPK / Erk. No geral, essas vias oncogênicas regulam-se de forma cruzada e são reguladas pela fosforilação de EGFR, ERK e Akt, formando uma rede importante que aumenta as atividades das células tumorais, como a evasão do apoptose (ZHU *et al.*, 2017).

Normalmente os genes que regulam as funções celulares básicas devam ser quase invariáveis entre as diferentes amostras, mesmo assim os níveis de

expressão de possíveis genes de referência podem variar em um conjunto de amostras como resultado de transformação patológica ou tratamento experimental, por exemplo (AITHAL *et al.*, 2015; GRUBE *et al.*, 2015).

O gene de referência se mostrou variado quando comparado com AKT para as células GBM11 e T98G. Para corroborar nossos resultados, como perspectiva utilizaremos outro gene de referência.

Mutações ativadoras no gene PIK3CA são observadas em 6 -15% dosGBMs, embora não seja amplamente descrita. As mutações ativadoras de PIK3CA são associado à recorrência precoce e mau prognóstico em GBM (TANAKA *et al.*, 2019).

O oncogene PIK3CA é o gene mutado com maior frequência nos cânceres de mama humanos; mutações são observadas em 20% a 40% dos casos. A mutação é um evento precoce no câncer de mama e é mais provável que desempenhe um papel na iniciação do tumor do que na progressão invasiva (CIZKOVA *et al.*, 2012).

A sinalização PI3K/Akt desempenha um papel essencial na sobrevivência e motilidade das células tumorais, as células de GBMs não são completamente viciantes a esta via de sinalização (ZHAO *et al.*, 2017).

Vários estudos também investigaram GBMs para mutações PIK3CA e relataram uma taxa de mutação PIK3CA significativamente mais baixa aproximadamente 7% (GALLIA *et al.*, 2006).

Embora na literatura seja descrito que as mutações sejam mais frequentes em células de mama, no nosso estudo através da técnica de Ddpcr analisamos 3 amostras GBM11, T98G e MCF7, sendo possível observar uma pequena mutação da célula GBM 11 isoladamente e o restante na população selvagem.

A Akt ativada fosforila uma variedade de moléculas da via a jusante para facilitar a sobrevivência das células tumorais, proliferação, migração, invasão e metabolismo da glicose. O eixo mTORC1 Akt a jusante também regula a síntese de proteínas e o crescimento celular (ZHAO *et al.*, 2017).

Akt / Phos AKT é expresso em cânceres de mama humanos primários e tecidos normais. Devido a essa informação é sugerido que pode não haver diferença na expressão de Akt / Phos AKT em tecidos normais e tumorais, e que sua expressão não se restringe a células tumorigênicas ou câncer de mama (Al-Bazz *et al.*, 2009).

Até o presente, as isoformas Akt foram encontradas hiperexpressas em vários tipos de tumor, mas a informação sobre câncer de mama ainda é limitada. Apesar de uma correlação positiva entre Akt e a proteína ativada, alguns casos negativos de Akt

resultaram como Phos/Akt positivos. Este paradoxo pode ser explicado pela sensibilidade diferente dos anticorpos ou pela reatividade cruzada do anticorpo Phos/Akt com outra isoforma ativada presente no tumor, como Akt-2 ou Akt-3. Isso sugere que pAkt pode ser indicativo de recidivas distantes, apesar de um baixo estado proliferativo do tumor, provavelmente por promover a sobrevivência celular em vez da proliferação celular (PÉREZ *et al.*, 2002).

A via RTK / PTEN / PI3K leva a AKT ativada e os níveis de fosfo-AKT são elevados na maioria das amostras de tumor de GBM e linhas celulares, estudos que mostram que as células de glioma ajudam a crescer descontroladamente, evitam a apoptose e aumentam a invasão tumoral. AKT representa um ponto nodal nesta via que permite a amplificação dos sinais de crescimento, tornando a inibição de AKT um alvo atraente para a terapia com GBM (MCDOWELL *et al.*, 2011).

Muitos estudos foram feitos para examinar os níveis de fosfoAKT em tumores de gliomas primários. Os níveis de expressão de PhosphoAKT foram inicialmente mostrados como elevados em glioblastomas *in vitro* e *in vivo* e esta expressão mostrou estar correlacionada com a perda de PTEN. Em amostras de tumor de glioma, foi demonstrado que o fosfoAKT elevado está associado a um pior prognóstico para os pacientes (MCDOWELL *et al.*, 2011).

O alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) impulsiona vários processos celulares fisiológicos e patológicos e é frequentemente desregulado em diferentes tipos de tumores, incluindo GBMs. O mTORC1 contribui para o crescimento das células tumorais ao inibir a autofagia, uma via catabólica que degrada organelas envelhecidas ou danificadas (MECCA *et al.*, 2018).

Toda a imunocoloração foi avaliada de forma cega, sem qualquer conhecimento de dados clínico-patológicos ou outros tipos de resultados clínicos. Na etapa da análise por imunocitoquímica podemos observar que a imuno com o anticorpo Akt foi mais expressa nas células de glioma T98G e menos nas células de mama MCF7, assim como a imuno para mTOR foi expressa em todas as células tanto de glioblastoma quanto de mama, já as de phosp mTOR também apresentaram expressividade em todas as células.

O complexo mTORC1, muitas vezes é desregulado em cânceres de mama que se tornaram resistentes às terapias. A via PI3K / PTEN / Akt / mTORC1 é frequentemente hiperativada e desregulada em muitos tipos diferentes de câncer, incluindo: mama, pâncreas, próstata e cérebro (STEELMAN *et al.*, 2016).

No gráfico de fold change para esse gene mTOR não foi observado nenhuma hiperexpressão das células GBM 02 e GBM - 0.5; GBM 11, T98g e MCF7 - 0; GBM 03 - 0.3 e SSC9 - 0.4, quando comparado com a amígdala. Não foi bem esclarecido o porquê não ocorreu hiperexpressão de nenhuma célula dos diferentes tipos de cânceres analisado GBM, mama e oral, podendo sugerir que possa estar relacionado com a via de expressão.

7. CONCLUSÕES:

- Embora o gene EGFR seja expresso na célula não foi possível observar a mutação L858R
- A análise de expressão gênica do gene EGFR mostrou uma possível hiperexpressão observada na linhagem celular GBM02 – não foi observada hiperexpressão do gene EGFR em nenhuma das células analisadas
- Foi encontrada a mutação H1047R do gene PIK3CA nas linhagens GBM11, T98G e MCF7, analisadas pela técnica de PCR digital
- A análise da expressão gênica do gene AKT1 sugere hiperexpressão nas células GBM02, GBM03, GMB95 e SCC9, porém não vimos correlação com as análises de expressão gênica do gene mTOR

Referências:

AITHAL, Madhuri GS; RAJESWARI, Narayanappa. Validation of housekeeping genes for gene expression analysis in glioblastoma using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Brain tumor research and treatment**, v. 3, n. 1, p. 24-29, 2015.

AL-BAZZ, Yousif O., et al. Prognostic significance of Akt, phospho-Akt and BAD expression in primary breast cancer. **European Journal of Cancer**, 45.4: 694-704, 2009.

ALBERTS, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*. **Artmed**, 1994. 1294 p.

ALBERTS, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Fundamentos da Biologia Celular* - 4.ed. Artmed, 2017. 811p. ALDAPE, Kenneth et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta neuropathologica**, v. 129, n. 6, p. 829-848, 2015.

ALI, Johar et al. Genetic etiology of oral cancer. **Oral oncology**, v. 70, p. 23-28, 2017.

ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALQAHTANI, Ali; AYESH, Hazem SK; HALAWANI, Hafez. PIK3CA gene mutations in solid malignancies: association with clinicopathological parameters and prognosis. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 93, 2020.

BALÇA-SILVA, Joana et al. Glioblastoma entities express subtle differences in molecular composition and response to treatment. **Oncology reports**, v. 38, n. 3, p. 1341-1352, 2017.

BINDA, Elena et al. Heterogeneity of cancer-initiating cells within glioblastoma. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 4, p. 1235-1248, 2012.

BINDA, Elena et al. Heterogeneity of cancer-initiating cells within glioblastoma. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 4, p. 1235-1248, 2012.

BLEEKER, Fonnet E.; molenaar, Remco J.; Leenstra, Sieger. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 108, n. 1, p. 11-27, 2012.

CALDIERI, Giusi et al. EGFR trafficking in physiology and cancer. In: **Endocytosis and Signaling**. Springer, Cham, 2018. p. 235-272.

CHENG, Lin; BAO, Shideng; RICH, Jeremy N. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 654-665, 2010.

CHESLER, David et al. The potential origin of glioblastoma initiating cells. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 4, p. 190, 2012.

CHISTIAKOV, Dimitry A.; CHEKHONIN, Ivan V.; CHEKHONIN, Vladimir P. The EGFR variant III mutant as a target for immunotherapy of glioblastoma multiforme. **European journal of pharmacology**, v. 810, p. 70-82, 2017.

CIZKOVA, Magdalena et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. R28, 2012.

COHEN, A. L., Holmen, S. L., & Colman, H. (2013). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **Current neurology and neuroscience reports**, 13(5), 345.

CROCE, Carlo M. Oncogenes and cancer. **New England journal of medicine**, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

Cury, Fernanda de Paula. PAPEL FUNCIONAL DAS ISOFORMAS GNNK+ E GNNK-DE KIT EM GLIOBLASTOMA. 2016. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, Barreto, São Paulo. 2016.

DIVOLI, Anna et al. Conflicting biomedical assumptions for mathematical modeling: the case of cancer metastasis. **PLoS computational biology**, v. 7, n. 10, p. e1002132, 2011.

DOMÍNGUEZ, Vigil, Irma G. et al. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2912, 2018.

ESKILSSON, Eskil et al. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. **Neuro-oncology**, v. 20, n. 6, p. 743-752, 2018.

EWING, Ailith; Semple, Colin. Breaking point: the genesis and impact of structural variation in tumours. **F1000Research**, v. 7, 2018.

FAKHOURY, Marc. Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 1365-1373, 2016.

FARIA, Jane et al. Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. **Differentiation**, v. 74, n. 9-10, p. 562-572, 2006.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FREDERICK, Lori et al. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. **Cancer research**, v. 60, n. 5, p. 1383-1387, 2000.

GALLIA, Gary L. et al. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 10, p. 709-714, 2006.

GAN, Hui K.; CVRLJEVIC, Anna N.; JOHNS, Terrance G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. **The FEBS journal**, v. 280, n. 21, p. 5350-5370, 2013.

GAN, Hui K.; KAYE, Andrew H.; LUWOR, Rodney B. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 748-754, 2009.

GARCIA, M. et al. Global cancer facts & figures 2007. **Atlanta, GA: American cancer society**, v. 1, n. 3, p. 52, 2007.

GERALDO Luiz Henrique Medeiros, et al. Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. **Trends in Cancer**, v. 5, n. 1, p. 46-65, 2018.

GOKDEN, Murat. If it is Not a Glioblastoma, Then What is it? A Differential Diagnostic Review. **Advances in anatomic pathology**, v. 24, n. 6, p. 379-391, 2017.

GOMES, Rodrigo Vieira; et al. Expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em colangiocarcinomas: fatores preditivos e sobrevida. **Rev Col Bras Cir**. 2018; 45(3):e): e1826.

GREENMAN, Christopher et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 153, 2007.

GRUBE, Susanne et al. Selection of suitable reference genes for expression analysis in human glioma using RT-qPCR. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 123, n. 1, p. 35-42, 2015.

GYMNOPOULOS, Marco; ELSLIGER, Marc-André; VOGT, Peter K. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5569-5574, 2007.

HANAHAN, Douglas; Weinberg, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANIF, Farina et al. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 1, p. 3, 2017.

HARRIS, Jay R. et al. Breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 5, p. 319-328, 1992.

HARTMANN, Christian et al. PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. **Acta neuropathologica**, v. 109, n. 6, p. 639-642, 2005.

HEIMBERGER, Amy B. et al. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. **Journal of translational medicine**, v. 3, n. 1, p. 38, 2005.

HU, Yapeng; FU, Liwu. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. **American journal of cancer research**, v. 2, n. 3, p. 340, 2012.

JACQUIN, M. A. et al. GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 8, p. 1043-1054, 2013.

JUBRAN, Maria R. et al. Dissecting the role of crosstalk between glioblastoma subpopulations in tumor cell spreading. **Oncogenesis**, v. 9, n. 2, p. 1-15, 2020.

KARAKAS, B. et al. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. **British journal of cancer**, v. 94, n. 4, p. 455-459, 2006.

KARAKAS, B.; BACHMAN, K. E.; PARK, B. H. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. **British journal of cancer**, v. 94, n. 4, p. 455-459, 2006.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia Básica e Clínica-13**. McGraw Hill Brasil, 2017.

KHAN, Shabana I. et al. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 1, p. 61-73, 2011.

LEE, Jeffrey C. et al. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. **PLoS Med**, v. 3, n. 12, p. e485, 2006.

LEITE, Caio Abner V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, 2012.

LI, Xiaoman et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 33440, 2016.

LIGRESTI, Giovanni et al. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. **Cell cycle**, v. 8, n. 9, p. 1352-1358, 2009.

Lopes, Cleiton Mendes. Análises dos genes TP53, PTEN, IDH1 e IDH 2 em tumores não glioid do sistema nervoso humano. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular). 43p. Universidade Federal do Pará, 2015.

LOPES, TÁCILA GABRIELE; FERNANDES, ANDRIELLE CASTILHO; TEDESCO, ANTÔNIO CLÁUDIO. Ampla caracterização do Glioblastoma e abordagens terapêuticas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 2, p. 12-25, ago./dez. 2012.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

MAHER, Elizabeth A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & development**, v. 15, n. 11, p. 1311-1333, 2001.

MAKHLIN, Igor et al. Clinical activity of the EGFR tyrosine kinase inhibitor osimertinib in EGFR-mutant glioblastoma. **CNS oncology**, v. 8, n. 3, p. CNS43, 2019.

MARSHALL, Christopher J. Tumor suppressor genes. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 313-326, 1991.

MATIAS, Diana et al. Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 3, p. 247-261, 2017.

MCDOWELL, Kelli; J RIGGINS, Gregory; L GALLIA, Gary. Targeting the AKT pathway in glioblastoma. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 23, p. 2411-2420, 2011.

MECCA, Carmen et al. Targeting mTOR in glioblastoma: rationale and preclinical/clinical evidence. **Disease markers**, v. 2018, 2018.

MOLENAAR, Remco J. et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. **Neuro-oncology**, v. 16, n. 9, p. 1263-1273, 2014.

MUELLER, Wolf et al. Mutations of the PIK3CA gene are rare in human glioblastoma. **Acta neuropathologica**, v. 109, n. 6, p. 654, 2005.

MUÑOZ-HIDALGO, Lisandra et al. Somatic copy number alterations are associated with EGFR amplification and shortened survival in patients with primary glioblastoma. **Neoplasia**, v. 22, n. 1, p. 10-21, 2020.

MURUGAN, Avaniyapuram Kannan. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press. p. 92-111, 2019.

OHGAKI, Hiroko; Kleihues, Paul. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

OHGAKI, Hiroko; Kleihues, Paul. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 4, p. 764-772, 2013.

OMURO, Antonio; Deangelis, Lisa M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

PÉREZ TENORIO, Gizeh; STÅL, Olle. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. **British journal of cancer**, 86.4: 540-545 ,545, 2002.

RÖHN, Gabriele et al. ACTB and SDHA are suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human astrocytomas using quantitative RT-PCR. **Technology in cancer research & treatment**, v. 17, p. 1533033818802318, 2018.

SAADEH, Fadi S.; MAHFOUZ, Rami; ASSI, Hazem I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. **The International journal of biological markers**, v. 33, n. 1, p. 22-32, 2018.

SAGER, Ruth. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. **Science**, v. 246, n. 4936, p. 1406-1412, 1989.

SAMUELS, Yarden et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, 2004.

SATHORNSUMETEE, Sith et al. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. **Cancer**, v. 110, n. 1, p. 13-24, 2007.

SCHWARTZBAUM JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nat Clin Pract Neurol**. 2006;2:4942006; 2:494–494.

SHARMA, Sreenath V. et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 3, p. 169-181, 2007.

SIGISMUND, Sara; AVANZATO, Daniele; LANZETTI, Letizia. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular oncology**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2018.

SILVEIRA, Vanessa. Mecanismos genéticos do câncer, 2013. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4315421/mod_resource/content/1/mecanismos%20geneticos%20cancer_RCG1002.pdf. Acesso em: 02 /05/ 2020.

SIZOO, Eefje M. et al. Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 11, p. 1162-1166, 2010.

STEELMAN, Linda S. et al. The therapeutic potential of mTOR inhibitors in breast cancer. **British journal of clinical pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 1189-1212, 2016.

STEPHENS, Philip J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27-40, 2011.

STRATTON, Michael R.; CAMPBELL, Peter J.; FUTREAL, P. Andrew. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719, 2009.

TANAKA, Shota et al. PIK3CA activating mutations are associated with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. **Acta neuropathologica communications**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2019.

TANAKA, Shota et al. PIK3CA activating mutations are associated with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. **Acta neuropathologica communications**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2019.

TAYLOR, T.; B FURNARI, F.; K CAVENEE, W. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. **Current cancer drug targets**, v. 12, n. 3, p. 197-209, 2012.

THAKKAR, Jigisha P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.

WELLER, Michael et al. Glioma. **Nature reviews Disease primers**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2015.

WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh. Malignant gliomas in adults. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 5, p. 492-507, 2008.

WESTPHAL, Manfred; MAIRE, Cecile L.; LAMSZUS, Katrin. EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise. **CNS drugs**, v. 31, n. 9, p. 723-735, 2017.

WÜNSCH, FILHO et al. Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. **Cadernos de saude publica**, v. 17, n. 3, p. 467-480, 2001.

XIA, Liang et al. Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17354, 2015.

XU, Hongsheng et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. **Oncology letters**, v. 14, n. 1, p. 512-516, 2017.

ZHAO, Hua-fu et al. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 100, 2017.

ZHU, Qing-Hao et al. Biomarkers in molecular epidemiology study of oral squamous cell carcinoma in the era of precision medicine. **Cancer Translational Medicine**, v. 3, n. 6, p. 214, 2017.