

Instituto Politécnico do Porto
Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Caracterização molecular do gene EGFR em pacientes com NSCLC

Trabalho para obtenção do Título de Especialista em
Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

Luís Cirnes
Porto 2013

Índice de Figuras

FIGURA 1 – INCIDÊNCIA E MORTALIDADE ONCOLÓGICA RELATIVA AO ANO DE 2007, NOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA.....	7
FIGURA 3 – OS ELEMENTOS DA FAMÍLIA HER E OS SEUS LIGANDOS	11
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO GENÉTICA DO EGFR NO CROMOSSOMA 7 E RELAÇÃO ENTRE GENE E DOMÍNIOS PROTEICOS.....	12
FIGURA 5 – VIAS DE SINALIZAÇÃO DO EGFR	13
FIGURA 6 HALLMARKS OF CANCER: CAPACIDADES ADQUIRIDAS PELOS TUMORES, DURANTE A PROGRESSÃO.....	14
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS PEQUENAS MOLÉCULAS INIBIDORAS DA ACTIVIDADE TIROSINA QUINASE DO EGFR UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE NSCLC: GEFITINIB/IRESSA E ERLOTINIB/TARCEVA	17
FIGURA 8 – RESPOSTA POSITIVA AO TRATAMENTO COM <i>GEFITINIB</i> (INIBIDOR DA ACTIVIDADE TK) NUM PACIENTE COM NSCLC	18
FIGURA 9 – PET-SCAN DE UM PACIENTE COM MUTAÇÃO NO EXÃO 19, EGFR QUE APRESENTOU REMISSÃO COMPLETA E DURADOURA DA LESÃO APÓS TRATAMENTO COM ERLOTINIB.....	18
FIGURA 10 – RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E TAXA DE RESPOSTA AOS TKI E FREQUÊNCIA MUTACIONAL NO EGFR.....	19
FIGURA 11 – DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES QUE CONFEREM SUSCEPTIBILIDADE À TERAPIA COM TKI	23
FIGURA 12 – VIAS ACTIVADAS NA CARCINOGENESE PULMONAR A) DOS FUMADORES ASSOCIADA À ACTIVAÇÃO DO EGFR; B) DOS FUMADORES, VIA ASSOCIADA À ACTIVAÇÃO DO KRAS	24
FIGURA 13 – EVOLUÇÃO DE UM PACIENTE TRATADO COM TKI, MOSTRANDO A AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA APÓS LONGO PERÍODO DE TRATAMENTO.	26
FIGURA 14 – ASPECTO MICROSCÓPICO DE TRÊS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE ADENOCARCINOMA.	27

Índice de tabelas

TABELA 1 - AGENTES ESPECÍFICOS DIRECCIONADOS AO EGFR NO TRATAMENTO ONCOLÓGICO.....	15
TABELA 2 – TKI APROVADOS OU EM TESTE PARA O TRATAMENTO DE NSCLC	16
TABELA 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS APRESENTADAS NO GRUPO DE PACIENTES COM RESPOSTA E MUTAÇÕES NO EGFR	21
TABELA 4 – AGENTES TERAPÊUTICOS EM FASE DE APROVAÇÃO PARA A UTILIZAÇÃO INDIVIDUAL, OU EM COMBINAÇÃO COM OS TKI-EGFR.....	25
TABELA 5 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A AMPLIFICAÇÃO POR PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>) DOS EXÕES 18-21 DO EGFR.....	31
TABELA 6– FREQUÊNCIAS MUTACIONAIS OBTIDAS NA AMOSTRA EM ESTUDO DE ACORDO COM O GÉNERO DOS INDIVÍDUOS.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
TABELA 7 FREQUÊNCIAS MUTACIONAIS OBTIDAS NA AMOSTRA EM ESTUDO DE ACORDO COM A NATUREZA DO MATERIAL. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
TABELA 8– PERCENTAGENS MUTACIONAIS ENCONTRADAS NOS DIFERENTES EXÕES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
TABELA 9 – MUTAÇÕES ENCONTRADAS E IMPLICAÇÃO NA RESPOSTA À TERAPIA COM TKI ...	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Índice

Palavras-Chave	5
I - Introdução.....	6
1.1 Epidemiologia e factores de risco	7
1.2 Classificação do Cancro do Pulmão	9
1.3 <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	10
1.3.1 Descoberta da proteína	10
1.3.2 Família HER.....	10
1.3.3 EGFR, o gene	11
1.3.4 Activação do EGFR e sinalização	12
1.4 Argumentos para a terapia dirigida.....	14
1.4.1 Pequenas moléculas inibidoras da actividade tirosina quinase do EGFR em NSCLC17	
1.5 <i>Status</i> mutacional vs avaliação da amplificação.....	20
1.6 Mutações no EGFR	21
1.6.1 Mutações Activantes	22
1.7 Resistência	23
1.7.1 Resistência primária: Mutações no KRAS, BRAF e HER2, amplificação de MET	24
1.7.2 Resistência secundária, ou adquirida.....	25
1.8 Metodologias para a caracterização molecular do TK-EGFR.....	26
Diferenciação histológica e alterações no EGFR	27
II – Objetivos.....	29
III – Materiais e Métodos.....	30
3.1 Caracterização da amostra.....	31
3.2 Métodos.....	31
V – Resultados.....	33
VI – Discussão dos Resultados	38

VII – Conclusão.....	41
VI – Referências Bibliográficas	42

PALAVRAS-CHAVE

NSCLC, EGFR, TKI, Terapia Molecular Dirigida

I - INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e fatores de risco

No início do século XX o cancro do pulmão era uma doença de relativamente rara incidência, no entanto, o surgir de hábitos de consumo de tabaco e inerente exposição crónica a agentes etiológicos novos, bem como o aumento da esperança média de vida tornaram o cancro do pulmão um flagelo do século XX.(1)

Num estudo retrospectivo relativo às décadas 40-80 verificou-se um aumento da incidência de cancro do pulmão em mais de 220% e 400%, nos homens e mulheres respetivamente(2)

No final do século XX, o cancro do pulmão tornou-se a principal causa de mortes preveníveis, representando atualmente a primeira causa de morte oncológica nos países industrializados, tendo-se registado em 2008 1.608.823 novos casos e 1.378.415 mortes em todo mundo. Em Portugal, no mesmo período foram registados 3.288 novos casos e 3.319 mortes sendo já a neoplasia maligna mais mortal (1, 3, 4)

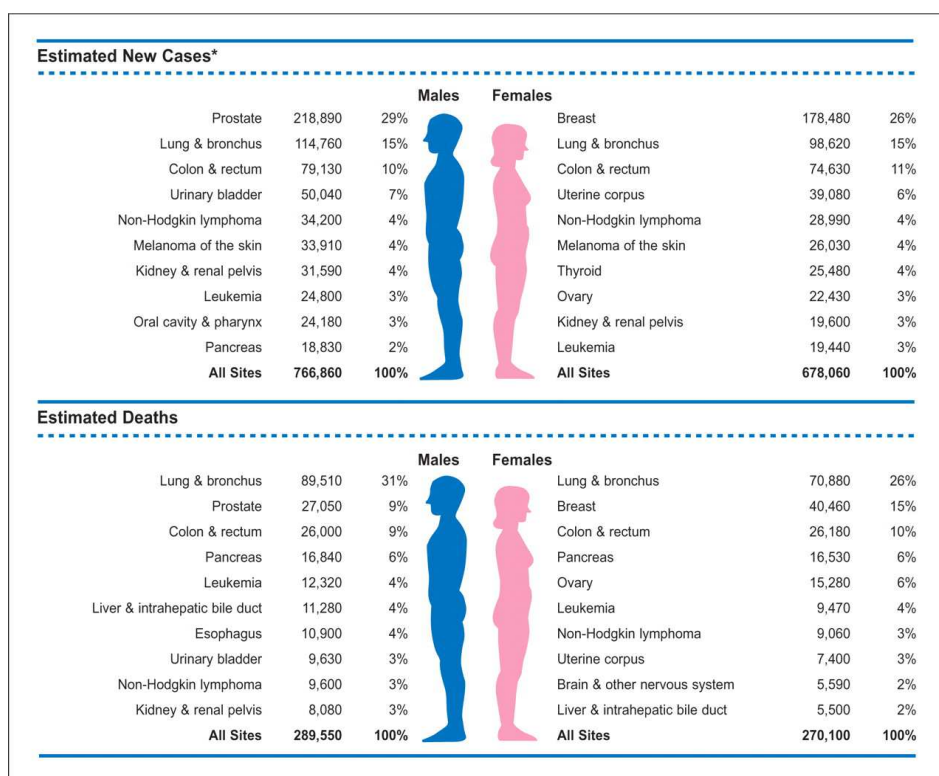


Figura 1 – Incidência e mortalidade oncológica relativa ao ano de 2007, nos Estados Unidos da América.

Fonte: Jemal. *CA Cancer J Clin* 2007

Actualmente está bem estabelecida a causalidade directa entre exposição ao fumo do tabaco e cancro do pulmão. No fumo do tabaco foram identificadas mais de 1.200 substâncias, muitas das quais potenciais carcinogénios, aqui se incluindo iniciadores (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o benzo[a]pireno) e promotores (por exemplo o benzeno). Mais de 85% dos casos de cancro do pulmão estão intimamente associados ao tabagismo. Há uma invariável relação entre quantidade de cigarros diária e tempo de exposição com o risco de desenvolvimento de neoplasia maligna do pulmão: os fumadores têm cerca de 10 vezes maior risco, aumentando esse risco de acordo com a intensidade de exposição (indivíduos que fumem mais de 40 cigarros por dia têm um risco acrescido cerca de 60 vezes). (1, 5)

No entanto existem muitos outros agentes, atuando frequentemente de modo sinérgico com as substâncias presentes no fumo do tabaco. Destes, salientam-se os agentes ocupacionais de exposição prolongada. O primeiro a levantar suspeita de causar cancro, foi o gás radão, quando se verificou que os mineiros subterrâneos expostos apresentavam uma maior incidência desta neoplasia, o que valeu ao radão a classificação de carcinogénio ocupacional, e o primeiro a ser identificado. A este seguiu-se a identificação de outras substâncias de exposição ambiental e com ação carcinogénica, das quais se destacam o arsénio, amianto, cromatos, níquel, compostos aromáticos policíclicos.(1, 6)

Apesar da epidemiologia do cancro do pulmão ter sido amplamente investigada nos últimos 50 anos, ainda há muitas áreas intensivas de pesquisa, com grande interesse sob o ponto de vista de prevenção, nomeadamente a relação entre o cancro e a dieta sabendo-se já que dietas ricas em antioxidantes e outros micronutrientes, particularmente carotenoides representam um aumento na proteção contra o desenvolvimento de neoplasias malignas, nomeadamente do pulmão.(1, 4, 7)

Finalmente, supõe-se que as exposições citadas previamente atuem causando alterações genéticas nas células pulmonares, que se acumulam e eventualmente levam ao fenótipo neoplásico. Estima-se que 10 a 20 mutações genéticas tenham ocorrido no momento em que o tumor se torna clinicamente detetável. Existem lesões moleculares comuns na carcinogénese pulmonar, independentemente do tipo histológico, estas incluem alterações nos oncogenes c-MYC, KRAS, EGFR e HER2/neu, ou em genes supressores tumorais p53, RB, p16, FHIT e RASSF1A.(5, 7)

Sabendo-se no entanto, que a via preferencialmente activa para a oncogénese seja diferente consoante estejamos a falar de fumadores, ou não fumadores.

Recentemente, vários estudos independentes reportaram associação entre variantes comuns na região cromossômica 15q24-25.1 e susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cancro do pulmão. Este locus de aproximadamente 200 Kb contém entre outros o gene que codifica para o receptor nicotínico neuronal de acetilcolina (nAChR) e um receptor de superfície celular que medeia a ligação da nicotina e promove alteração celular. Dois SNPs (rs1051730 e rs8034191) foram já reportados tanto em formas familiares como esporádicas de cancro do pulmão(4) (introduzir referências 3-7 do *artigo A Second Genetic Variant on Chromosome 15q24-25.1*)

1.2 Classificação do Cancro do Pulmão

As neoplasias malignas pulmonares podem ser genericamente classificadas em dois tipos tendo principalmente em conta o comportamento biológico e terapêutico das neoplasias: Cancro do Pulmão de Pequenas Células (SCLC, do inglês *small-cell lung cancer*), com maior potencial metastático, mas com alta taxa de resposta inicial à terapia convencional (terapia convencional para SCLC) e Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células (NSCLC, do inglês *non-small-cell lung cancer*), caracteristicamente com menor potencial metastático, mas com pior resposta à quimioterapia sistémica convencional em regimes combinados (habitualmente carboplatin/paclitaxel ou cisplatin/gemcitabine).(5) (8)

O NSCLC representa a maioria dos casos de cancro do pulmão (80-85 %) e histologicamente tem três variantes: Carcinoma de células pavimentosas (>30%), carcinoma de células grandes (10%) e adenocarcinoma (30%), sendo o ultimo um dos mais comuns e o menos associado à exposição ao tabaco.(5)

Apesar de serem os mais frequentes, estes tumores tendem a não apresentar grande resposta à terapia convencional. Para este grupo de pacientes, a melhor hipótese terapêutica é a remoção cirúrgica da lesão que se apresenta como opção válida apenas para os pacientes com doença localizada (estádios I e II, segundo a classificação TNM). Cerca de 70 a 85% dos pacientes têm já doença localmente avançada, ou apresentam metástases na altura do diagnóstico, ficando limitados a regimes de quimioterapia sistémica combinada e radioterapia. Infelizmente o prognóstico para estes pacientes permanece bastante reservado, sendo a taxa de sobrevivência aos 5 anos de 22% para os pacientes com doença localmente avançada e 3% para os pacientes com metástases.(1, 4, 5, 7, 9, 10)

Por este motivo, muitos têm sido os estudos no sentido de descobrir e implementar novas opções terapêuticas, que se mostrem mais eficazes no tratamento dos NSCLC: desde formas de

tratamento complementares, passando mais recentemente, pela terapia molecular dirigida, como é o caso dos agentes dirigidos ao receptor de crescimento epidérmico (EGFR).(11, 12)

1.3 Epidermal Growth Factor Receptor

1.3.1 Descoberta da proteína

Em 1975 foi pela primeira vez reportada a existência de um receptor específico para o factor de crescimento epidérmico (EGF) em fibroblastos, o EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), do qual então mais não se sabia senão que era uma proteína com 170kDa.(13-15)

Mais tarde, em 1984 foi verificado que a sequência do *v-erbB*, um oncogene da leucemia eritroblástica aviária viral, era extremamente similar à do EGFR. Concluindo-se posteriormente que o EGFR e o *v-erbB* são homólogos, derivando o *v-erbB* de uma forma truncada do EGFR.(16, 17)

A descoberta que uma forma truncada do EGFR estava activamente envolvida na leucemia eritroblástica aviária viral, bem como a observação que o EGFR e HER2 estavam sobreexpressos numa grande parte de neoplasias malignas humanas motivaram os estudos de Mendelshon e Slamon, que conseguiram demonstrar pela primeira vez *in vitro* e *in vivo* a capacidade de inibir a progressão no ciclo celular e indução de apoptose através da inibição destes dois receptores (EGFR, HER2)(18-20)

1.3.2 Família HER

O EGFR pertence à família dos receptores de crescimento epidérmico (HER, do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptors*), composta por quatro receptores que partilham entre eles uma certa homologia: O factor de crescimento epidérmico EGFR (HER1, ERBB1), HER2 (ERBB2), HER3 e HER4.(19-21)

Todos os membros da família HER têm uma estrutura genérica de glicoproteína transmembranar contendo um ectodomínio de ligação aos ligandos e um receptor intracelular com actividade tirosina quinase (RTK, do inglês *receptor tyrosine kinase*).

As diferenças entre os quatro membros da família HER concentram-se essencialmente nos domínios extracelulares e COOH-terminal. (19-21)

Enquanto que o EGFR e o HER4 são formas completas e autónomas, uma vez que são capazes de se ligar aos factores de crescimento, dimerizar e gerar uma cascata de sinalização intracelular, o HER2 e HER3 necessitam de outro membro (formar heterodímeros) já que o HER2 não tem a capacidade de ligação ao ligando e o HER3 não apresenta actividade TK citoplasmática (figura 1). (19-21)

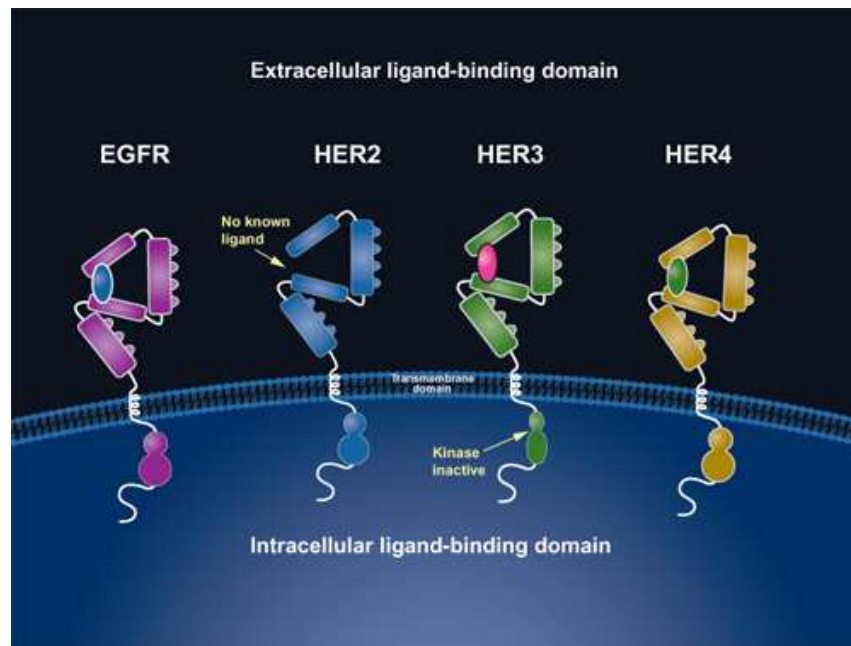


Figura 2 – Os elementos da família HER e os seus ligandos
 Fonte: <http://www.biooncology.com/research-education/her/dimer/index.html>

1.3.3 EGFR, o gene

O gene humano que codifica a proteína EGFR, tem aproximadamente 200 kb, é composto por 28 exões e 27 intrões e está localizado no braço curto do cromossoma 7 (7p12).(13, 19, 22)

Os exões 1-16 codificam a porção extracelular, o domínio de reconhecimento e ligação aos ligandos. O exão 17 codifica para a região hidrofóbica transmembranar e os exões 18-28 codificam a porção intracelular: o domínio TK é codificado pelos exões 18-24, enquanto que a porção COOH terminal pelos exões 25-28 (figura 2).(14, 19, 20)

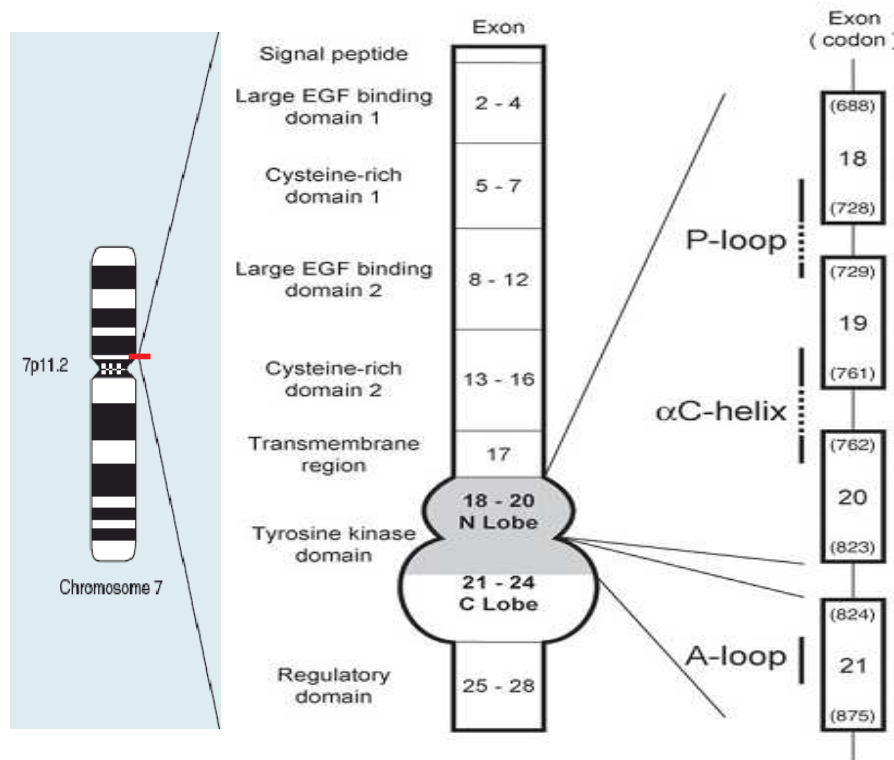


Figura 3 – Localização genética do EGFR no cromossoma 7 e relação entre gene e domínios proteicos.
 Fonte: Adaptado de Martin P, Catherine MA, Kelly M, et al. *Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer*; *Cancer Control*; 2006; 113: 129-140

1.3.4 Activação do EGFR e sinalização

Em condições normais as vias de sinalização do EGFR são altamente controladas e os factores de crescimento (EGF, TGF- α , anfiregulina, epirregulina, HB-regulina e betacelulina) têm um importante papel na comunicação entre o espaço extra-celular e os compartimentos internos. Mediante o ligando e o dímero formado, a cascata de sinalização activada vai ser diferente. Há quatro possíveis vias após a activação do EGFR: (1) **Via Ras/Raf/MAPK**; (2) **Via PI3K/Akt**; (3) **Via STAT**; (4) **Via Src quinase** (figura 3) (13, 14, 22)

1) Via Ras/Raf/MAPK – É a principal via activada pela família erbB/HER. Após activação do EGFR e consequente fosforilação do domínio TK o complexo GRB2/Sos liga-se directa, ou indirectamente, através do complexo Shc a locais de ligação específicos do domínio intracelular do EGFR. Esta interacção entre proteínas resulta num alteração estrutural de Sos, levando ao recrutamento de Ras-GDP e consequente activação de Ras (Ras-GTP), que por sua vez activa

RAF1, MAPK1 e MAPK2 (MK01 e MK03). As MAPKs activas vão fosforilar e regular factores específicos de transcrição intranucleares induzindo a migração celular e proliferação.(14, 21)

2) **Via PI3K/Akt** – A via PI3K regula o crescimento celular, apoptose e resistência à quimioterapia, bem como invasão tumoral e migração. Activação PI3K dependente de EGFR ocorre quando a dimerização do receptor é feita com o HER3, uma vez que o EGFR não tem locais de ligação para PI3K, mas existem em grande número no HER3. PI3K são enzimas diméricas compostas por uma subunidade reguladora (p85) e outra catalítica (p110). A sub-unidade p85 está relacionada com a ligação ao HER3 através da interacção do seu domínio homólogo de Src (SH2, do inglês *Src homology domain 2*), enquanto que a p110 catalisa a fosforilação do fosfatilinositol 4,5-difosfato para o segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, que por sua vez fosforila e activa a Akt (serina/treonina quinase).(14, 21)

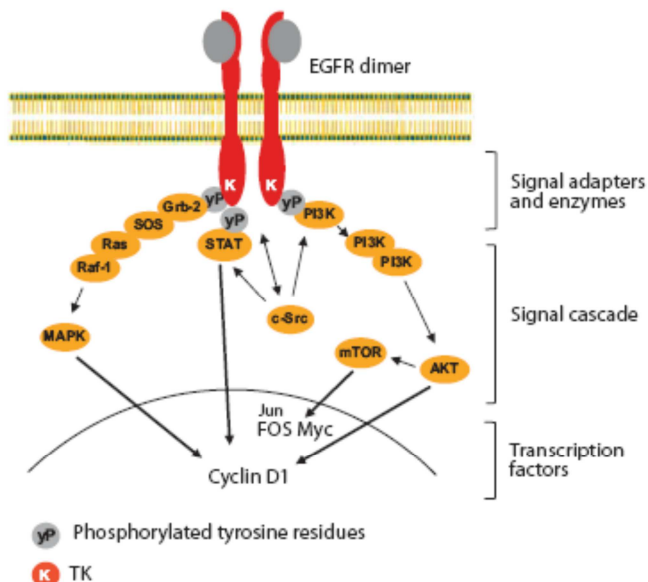


Figura 4 – Vias de sinalização do EGFR
 Fonte Lurje, G. and H.-J. Lenz, *EGFR Signaling and Drug Discovery*. Oncology, 2009. 77: p. 400-410.

3) **Via STAT** (*Signal Transducers Activators Transcriptors*) – a activação do EGFR pode ainda regular as vias STAT através de mecanismos dependentes ou independentes de *Janus kinases* (JAK). As proteínas STAT são factores de transcrição citoplasmáticos que existem como monómeros inactivos e partilham um grande homologia com outros membros da família STAT. As proteínas STAT interagem com resíduos de fosfotirosina através do seu domínio SH2 e, através de dimerização, deslocam-se para o núcleo e induzem a expressão de genes alvo específicos. Nas células normais a activação das proteínas STAT é transitória e de alguns minutos ou horas, no entanto, em tumores, verifica-se muitas vezes a activação constitutiva da STAT-3 e STAT-5.(14)

4) **Via Src quinase** – Embora já há muitos anos que se tenha relacionado as Src quinases com o desenvolvimento e progressão de cancro, nunca se conseguiu esclarecer totalmente o seu papel na malignidade. Src é um membro de uma família com dez membros (FYN, YES, BLK,

FRK, HCK, LCK, LYN e SMRS), são enzimas sem receptor de tirosina quinase que têm um papel activo na proliferação celular, migração, adesão e angiogénese tumoral. Com a sua localização no citosol, a via Src tem pontos de ligação com outra vias, como por exemplo a via PI3K ou STAT.(14, 21)

1.4 Argumentos para a terapia dirigida

A complexidade de respostas que se geram com a activação do EGFR, e a sua importância para o crescimento e sobrevivência celular é tão grande que a sua activação é firmemente controlada nas células normais. Em contrapartida, nas células tumorais é visível uma sobreexpressão do receptor, e/ou dos seus ligandos, o que se traduz numa estimulação autócrina e parácrina exacerbadas. Também em tumores são observáveis mutações em regiões específicas do gene, levando ao aumento de actividade do domínio TK. Todas estas alterações, promovem a proliferação celular, diferenciação, angiogénese e evasão da apoptose, favorecendo desta forma o desenvolvimento do tumor e sua metastização. no fundo todas estas alterações parecem garantir as condições que a célula neoplásica necessita para progredir (figura 4).(7, 13, 14, 21, 23, 24)

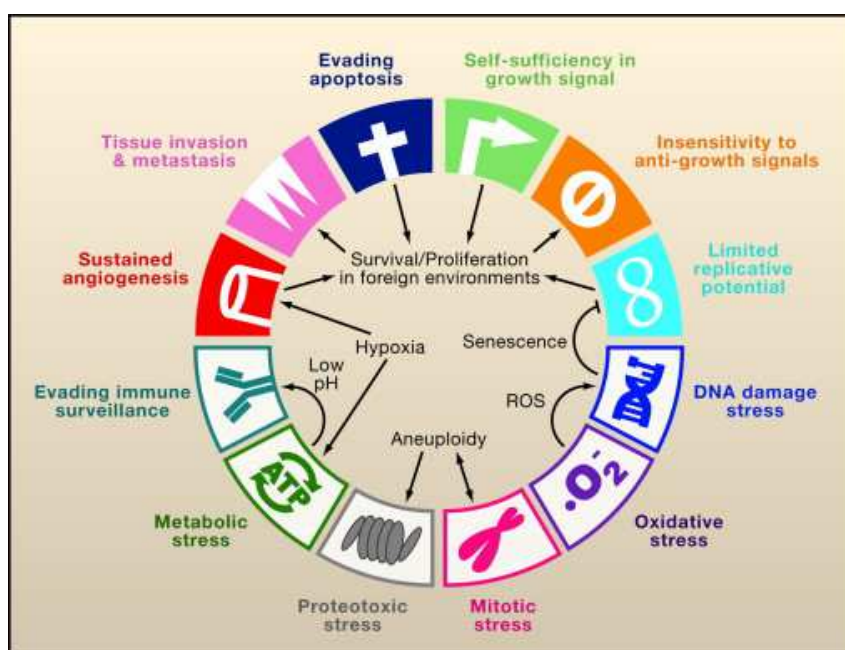


Figura 5 Hallmarks of cancer: Capacidades adquiridas pelos tumores, durante a progressão. Fonte: Luo et al., Cell 2009

Por outro lado, vários ensaios e modelos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a inibição da via EGFR com agentes específicos têm acção bloqueadora na progressão celular, na metastização, tem um papel inibitório na angiogénese e induz a apoptose, resultados que tornam

este receptor um atraente alvo para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas direccionadas.(7, 13, 22)

Duas principais classes de terapia dirigida ao EGFR foram desenvolvidas: anticorpos monoclonais (mAbs) anti-EGFR e inibidores específicos da actividade TK do EGFR (TKI, do inglês *Tyrosine Kinase Inhibitors*). Embora ambas as classes tenham o EGFR como alvo elas diferem significativamente no que se prende com os mecanismos de acção e consequente aplicação clínica (tabela I).(7, 19, 20, 25, 26).

Tabela 1 - Agentes específicos direccionados ao EGFR no tratamento oncológico

Agente	Nome	Entidade e data de aprovação	Aplicação clínica
Anticorpos Monoclonais (mAbs)	Cetuximab	CMPHU, 2008	mCCR e mCCP
	Panitumumab	FDA, 2006	mCCR
Pequenas Moléculas (TKI)	Gefitinib	FDA, 2005	NSCLC
	Erlotinib	FDA, 2004	NSCLC
	Lapatinib	FDA, 2005	PC
	Lapatinib	FDA, 2007	BC e mCCR

CMPHU – Committee for Medicinal Products for Human Use; FDA – Food and Drug Administration; mCCR – Cancro Colorrectal metastático; mCCP – Cancro da Cabeça e do Pescoço Metastático; NSCLC – Cancro do Pulmão de não pequenas células; PC – Cancro do Pâncreas; BC – Cancro de Mama.

Na classe dos mAbs anti-EGFR o Cetuximab (ImClone), um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino, aprovado em Maio de 2008 pelo *Committee for Medicinal Products for Human Use*, para o tratamento do cancro colorrectal metastático e em Outubro do mesmo ano para o tratamento do cancro da cabeça e do pescoço avançado). O Cetuximab liga-se ao EGFR com alta afinidade, impedindo a ligação com EGF e TGF α e subsequente activação do receptor. Possui uma meia-vida prolongada de três a quatro dias, permitindo a administração semanal. Estudos pré-clínicos demonstraram a capacidade de indução de remissão completa de tumores em xenoinxertos. Os mecanismos que contribuem para a actividade antitumoral do cetuximab são, além do bloqueio do receptor do EGF, a supressão da angiogénese através da redução da expressão de VEGF em células tumorais e a indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Cetuximab é capaz de estimular a internalização do EGFR levando à degradação e diminuição no número de receptores disponíveis na superfície celular. O Cetuximab actua ainda como potenciador da actividade citotóxica dos vários agentes quimioterápicos dados em concomitância, tais como doxorrubicina, cisplatina, paclitaxel, gencitabina e topotecano.

O Panitumumab (Amgen), aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em Setembro de 2006, é uma opção mAbs anti-EGFR totalmente humano, que actua segundo os mesmos princípios do Cetuximab, mas que segundo alguns estudos apontam, acaba por ser mais eficaz, uma vez que não sendo quimera, induz menor resposta anti-anticorpo no paciente. Ao não serem neutralizados os mAbs ficam disponíveis mais tempo e em maior quantidade para se ligar com maior especificidade ao alvo terapêutico (26, 27).

Outra classe disponível para a inibição da via EGFR são as pequenas moléculas mimetizadoras de ATP que se ligam ao domínio intracelular TK impedindo a fosforilação dos resíduos tirosina e bloqueando a activação das vias a jusante.

Fonte: EGFR Mutations and Lung Cancer

Este grupo engloba o Erlotinib (Roche, aprovado pela FDA para o tratamento de NSCLC em Novembro de 2004 e do cancro do pâncreas em Novembro de 2005), Gefitinib (AstraZeneca,

Table 1 EGFR sensitizing mutations and response rates to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in Phase III trials

Trial	Tumors with known mutation status	Tumors with sensitizing EGFR mutations	Type of sensitizing mutation		Therapeutic regimen	Response rate of tumors with sensitizing mutations to TKIs	Reference
			Exon 19 deletion	L858R point mutation			
TRIBUTE	274	26	19	7	Erlotinib plus chemotherapy	Not applicable	77
BR.21	204	37	29	8	Erlotinib	27%	44
ISEL	215	25	14	11	Gefitinib	37.5%	97
IDEAL/INTACT	391	41	33	8	Gefitinib/erlotinib	46%	61
INTEREST	297	38	22	16	Gefitinib	42.1%	104
IPASS	437	251	140	111	Gefitinib	71.2%	83
Total	1,818	418	257 (61.5%) ^a	161 (38.5%) ^a	—	—	—

^aPercentage of all sensitizing mutations.

aprovado pela FDA para o tratamento de NSCLC em Junho de 2005) e Lapatinib (GlaxoSmithKlein, aprovado para o tratamento de mama e bexiga cólon avançado e metastizado, pela FDA em 2007 e um inibidor simultâneo do RTK do EGFR e HER2).(14, 20, 25).

Tabela 2 – TKI aprovados ou em teste para o tratamento de NSCLC

Classe	Agente terapêutico	Alvo	Farmacêutica	Fase
EGFR TKI (inibição reversível)	Gefitinib (Iressa)	EGFR	AstraZeneca	Aprovado (NSCLC)
	Erlotinib (Tarceva)	EGFR	OSI, Genentech e Roche	Aprovado (NSCLC)
EGFR TKI (inibição irreversível)	EKB-569	EGFR	Wyeth	Fase II (colorrectal)
	CL – 387, 785	EGFR	Wyeth	Préclínica
TKI da família ErbB	Lapatinib	EGFR, HER2	GlaxoSmithKline	Aprovado

(inibição múltipla e reversível)				(Cancro da Mama)
TKI da família ErbB	Canertinib	EGFR, HER2, HER4	Pfizer	Fase II (NSCLC, Mama)
(inibição múltipla e irreversível)	HKI-272	EGFR, HER2	Wyeth	Préclínica
	BIBW 2992	EGFR, HER2	Boehringer Ingelheim	Fase I/II (ovário, próstata e mama)
	HKI-357	EGFR, HER2	Wyeth	Préclínica
TKI da família RTK	ZD-6474	EGFR, HER2, FLT1, KDR	AstraZeneca	Fase III (NSCLC, tiróide)
(inibição múltipla e reversível)	AEE 788	EGFR, HER2, KDR	Novartis	Fase I/II (Glioblastoma)
	XL647	EGFR, HER2, KDR, EPHB4	Exelixis	Fase II (NSCLC)

Adaptado: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer

1.4.1 Pequenas moléculas inibidoras da actividade tirosina quinase do EGFR em NSCLC

Os dois TKI utilizados no tratamento de NSCLC, são anilinoquinazolininas (Gefitinib com o nome químico de 4-Quinazolinamine e o Erlotinib com o nome químico N-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamine), figura 6.

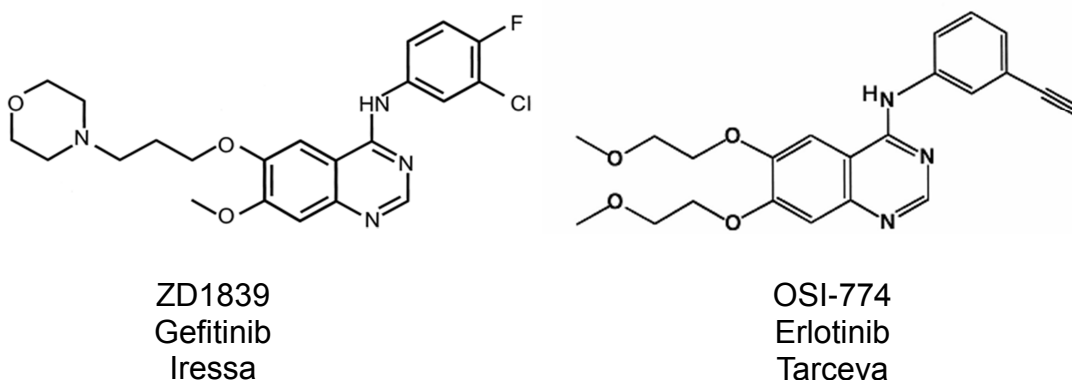


Figura 6 – Estrutura química das pequenas moléculas inibidoras da actividade tirosina quinase do EGFR utilizadas no tratamento de NSCLC: Gefitinib/Iressa e Erlotinib/Tarceva.

O mecanismo da acção antitumoral desta classe de moléculas não está totalmente caracterizado, mas sabe-se que ambas inibem a fosforilação intracelular dos RTK associados ao TK-EGFR, limitando a capacidade de divisão das células tumorais promovendo e potenciando desta forma a morte celular por apoptose. Na figura 8 pode ver-se a evolução de um paciente que apresentou resposta aos TKI em 6 semanas de tratamento, e na figura 9 um outro paciente que apresentou remissão total e duradoura da lesão neoplásica, após tratamento com TKI. (28)

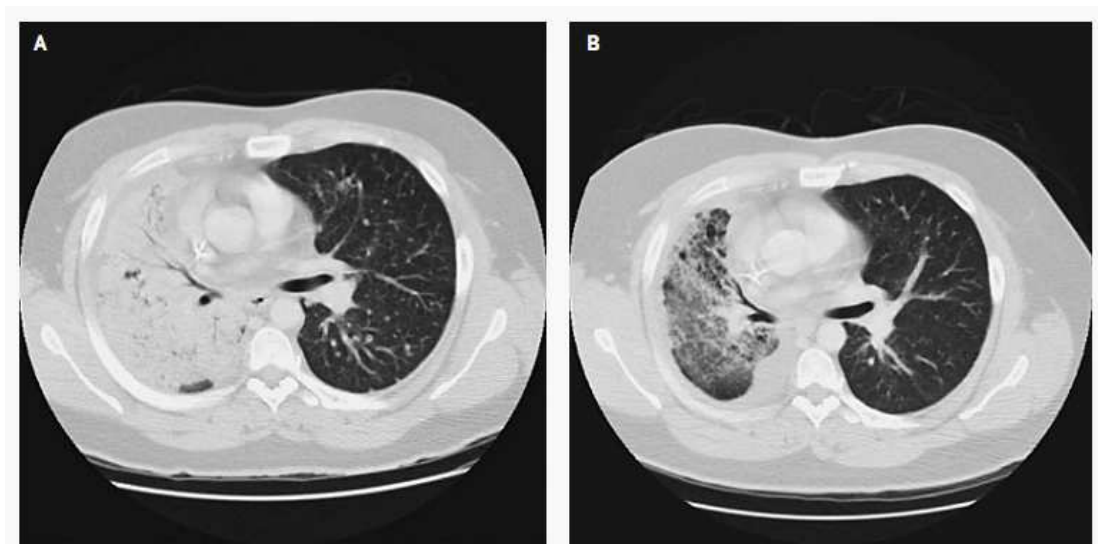


Figura 7 – Resposta positiva ao tratamento com *Gefitinib* (inibidor da actividade TK) num paciente com NSCLC

A – Tomografia Computorizada (TC) antes do início do tratamento

B – TC seis semanas após o tratamento com o inibidor da TQ.

Fonte: Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. *Activating Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor*

Junho de 2005

Dezembro de 2005

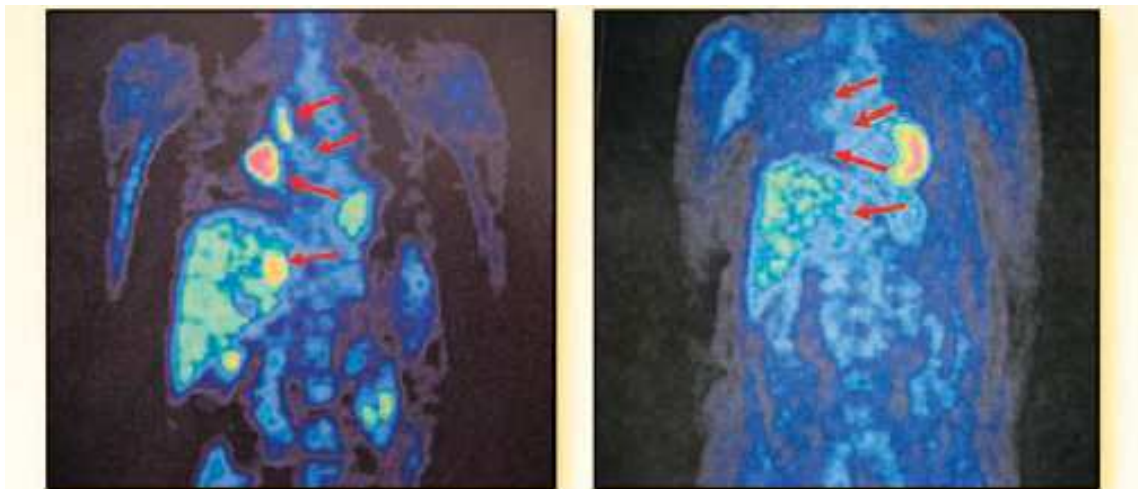


Figura 8 – PET-Scan de um paciente com mutação no exão 19, EGFR que apresentou remissão completa e duradoura da lesão após tratamento com Erlotinib

Fonte: Rosell et al. *Clin Cancer Res* 2006

Apesar dos resultados promissores obtidos nos ensaios clínicos em alguns pacientes com doença avançada, a percentagem de pacientes com resposta à terapia molecular dirigida foi relativamente baixa: 10% nos pacientes de origem europeia, e 30% nos pacientes de origem asiática (Fukuoka, 2003; Kris, 2003; Perez-Soler, 2004; Shepherd, 2005; Thatcher, 2005; Sharma, 2007).

A divergência tão grande de resposta fez com que fosse necessário estabelecer critérios que permitissem seleccionar pacientes elegíveis para o tratamento com TKI.(23, 29)

Um dos principais estudos teve em vista a determinação do “fenótipo” mais associado à resposta terapêutica foi realizado por *William Pao* e *Vincent Miller* em 2004.

O estudo foi realizado em 96 pacientes com NSCLC e revelou que os pacientes com maior percentagem de resposta eram não fumadores, do sexo feminino, de origem asiática com um NSCLC do tipo adenocarcinoma e diferenciação broquioloalveolar (fenótipo encontrado em mais de 75% dos casos sensíveis à terapia com inibidores de TK).

Ao complementar a análise com a caracterização molecular do EGFR verificou-se que o grupo com resposta aos TKI era simultaneamente o grupo com maior percentagem de alterações no status do EGFR .(13, 19, 29)

Posteriormente outros estudos vieram a confirmar os resultados obtidos por Pao e Miller. Em 2006, no Japão foi feito um estudo retrospectivo, que compilou os dados da literatura que confirmou que as características fenotípicas: etnia, género, história tabágica e histologia tumoral estavam associadas não só com a taxa de resposta, mas também com a presença alterações genéticas no EGFR e por conseguinte, associadas à resposta terapêutica aos TKI. Deste modo, foi possível estabelecer, pela primeira vez, uma relação entre alterações genéticas no EGFR e as características clínicas dos pacientes com maior probabilidade de resposta a TKI (figura 10).(21, 30)

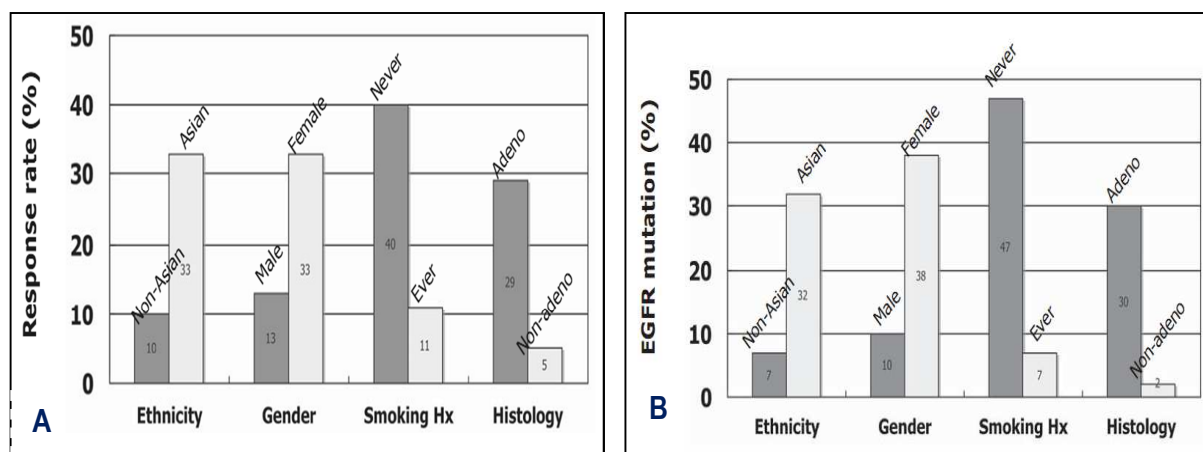


Figura 9 - Relação entre características fenotípicas e taxa de resposta aos TKI e frequência mutacional no EGFR
A: Relação entre a taxa de resposta à terapia com TKI em função de vários factores clínicos como etnia, género, antecedentes de fumador e histologia da neoplasia, em 1974 pacientes com NSCLC
B: Incidência da frequência mutacional no TK-EGFR de acordo com os mesmos factores clínicos (etnia, género, antecedentes de fumador e histologia da neoplasia), em 2880 pacientes.
Fonte: Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y *Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer*; Int J Clin Oncol; 2006; 11: 190-198

1.5 Status mutacional vs avaliação da amplificação

Verificada a relação entre o “status” do EGFR e a resposta à terapia dirigida, ao longo dos últimos tempos foi sendo levantada a possibilidade de fazer outro tipo de *screening* dos pacientes com NSCLC, nomeadamente por imunohistoquímica ou avaliação da amplificação do gene (FISH/CISH/SISH).(13, 31)

Alternativamente à pesquisa de mutações no domínio tirosina quinase do EGFR (TK-EGFR), foram estudadas associações entre a resposta e a expressão da proteína (imunohistoquímica). Embora se tenha verificado que a maioria dos indivíduos demonstravam sobreexpressão do EGFR (90% no carcinoma de células pavimentosas, 20-75% nos adenocarcinomas e raramente em tumores de células grandes) este critério apenas se parece relacionar com o prognóstico dos pacientes, não parecendo estar relacionado com a sensibilização aos inibidores da actividade da TK. Ou seja, o facto de haver sobreexpressão nada faz prever acerca do comportamento da resposta aos TKI e deste modo, não devendo ser utilizada como técnica para fazer o *screening* dos pacientes. (4, 9, 12, 13, 32)

O desafio tem sido esclarecer qual a alteração com maior correlação com a resposta: *status* mutacional ou a amplificação do gene.(4, 9, 12, 13, 32)

A principal dificuldade em chegar a resultados claros prende-se essencialmente com o facto destas duas alterações genéticas ocorrerem muitas vezes em simultâneo. Segundo Ladanyi e Pao (2008) cerca de 50% dos casos com mutações no EGFR apresentam também amplificação do gene. Por outro lado, 75% dos casos com amplificação do EGFR têm em simultâneo mutações.(26, 33)

Dos muitos estudos que foram feitos, há já bastantes evidências que parecem suportar a avaliação do *status* mutacional como a metodologia mais pertinente e eficaz para a selecção de pacientes alvo da terapia molecular:

1. Mutações no TK-EGFR levam à activação das vias de sinalização independentemente dos ligandos, o que não acontece com a sobreexpressão do EGFR *wild-type*;
2. Quando nos tumores ambas as alterações estão presentes, o alelo mutado é amplificado preferencialmente, o que sugere que em casos com amplificação do gene e mutação no TK-EGFR, é a mutação que confere a vantagem biológica às células tumorais;
3. As mutações no EGFR têm uma maior relação com as características fenotípicas dos pacientes tipicamente com resposta a TKI: não fumadores, mais frequentes nas mulheres e na população asiática (tabela 3)

Tabela 3 – Associação entre as características fenotípicas apresentadas no grupo de pacientes com resposta e mutações no EGFR

	Étnia		Género		Hábitos tabágicos		Histologia tumoral	
	Asiático	Não Asiático	Feminino	Masculino	Não Fumador	Fumador	Adenocarcinoma	Não-Adenocarcinoma
% resposta	33%	10%	33%	13%	40%	11%	29%	5%
% mutacional do EGFR	32%	7%	38%	10%	47%	7%	30%	2%

4. A resposta a TKI é mais alta nos casos com mutação no TK-EGFR independentemente do número de cópias, enquanto que os casos com amplificação e sem mutações têm baixa taxa de resposta (na ordem dos 8%);
5. Em vários estudos foi demonstrado que as mutações no EGFR são melhor preditor do *outcome* dos pacientes tratados com TKI.

Para justificar os casos que beneficiam de TKI com amplificação e sem mutações no TK-EGFR alguns argumentos têm sido utilizados. O principal motivo apontado explica que estes achados devem prender-se com o facto das metodologias FISH/CISH/SISH serem técnicas baseadas na morfologia dos tecidos e que apenas considera para a análise as células tumorais, em contrapartida o estudo mutacional é feito com DNA tumoral, mas sempre com grande percentagem de células normais, o que aumenta a possibilidade de falsos negativos. O que actualmente se teoriza é que estes casos com amplificação do gene EGFR e resposta à terapia talvez tenham mutações no domínio TK-EGFR que não foram detectadas por sequenciação directa.(9, 34, 35)

1.6 Mutações no EGFR

As mutações no EGFR são as mais prevalentes e melhor caracterizadas nos NSCLC, estando intimamente relacionadas com a resposta a TKI. Devido à sua frequência neste tipo de tumor, pensa-se que esta alteração genética represente um evento precoce na transformação neoplásica. As mutações no EGFR podem ser classificadas de acordo com o impacto na resposta ao tratamento com TKI em: mutações activantes e de resistência. (29) (14, 36)

1.6.1 Mutações Activantes

As mutações activantes do EGFR são encontradas nos primeiros quatro exões codificantes para o domínio TK (exões 18-21) sendo agrupadas em 3 classes, as classes das mutações clássicas, descritas por Gaznar (2010):(36)

Classe I – Delecções *in frame* do exão 19, que envolvem quase sempre os resíduos de leucina-747 e ácido glutâmico-749 (Δ LRE) e representam 44% das mutações do TK-EGFR

Classe II – Mutações num único nucleótido, levando à substituição do aminoácido. A alteração mais prevalente deste tipo ocorre no exão 21, e leva à substituição de uma arginina por uma leucina na posição 858 (L858R). Esta alteração representa cerca de 41% das mutações. Também desta classe, existe a alteração G719 que leva à substituição da glicina dessa posição por uma serina, alanina ou cisteína (4% das mutações). As restantes mutações missense representam cerca de 6% dos casos positivos para mutações no TK-EGFR.

Classe III – Duplicações ou inserções *in frame* no exão 20 e perfazem os restante 5% das mutações.

De um modo geral as delecções do exão 19 e mutações pontuais envolvendo o exão 21 (L858R) perfazem quase 90% das mutações descritas no EGFR, e são denominadas de mutações “clássicas”, havendo abordagens metodológicas que se limitam ao estudo destes dois exões para a orientação terapêutica.(13, 37)

Embora ainda não se compreenda totalmente de que forma estas mutações interferem com a molécula EGFR e consequentes vias de sinalização, parece claro que de algum modo estas alterações genéticas alteram o equilíbrio “on-off” do TK-EGFR promovendo a activação e aumento de actividade enzimática. Como consequência as células tumorais que contenham tal alteração acabam por crescer mais e obter vantagens de proliferação.(14, 34)

Nem todas as mutações activadoras conduzem necessariamente a uma completa activação constitutiva de TK-EGFR. Portanto, o tipo de mutações no EGFR em tumores NSCLC parece influenciar a sensibilidade do tumor para a acção do gefitinib ou erlonitib. Por exemplo, as células tumorais com mutação L858R são significativamente mais sensíveis ao gefitinib que as que possuem G719S. Também as taxas de resposta são consideravelmente diferentes conforme se trate de mutações no exão 19 (sensibilidade a TKI 70-100%) ou mutações no exão 21 (sensibilidade a TKI 20-70%).(12, 38)

Na figura X pode ver-se a distribuição das mutações que conferem susceptibilidade ao tratamento com TKI ao longo dos exões codificantes para o domínio TK do EGFR.

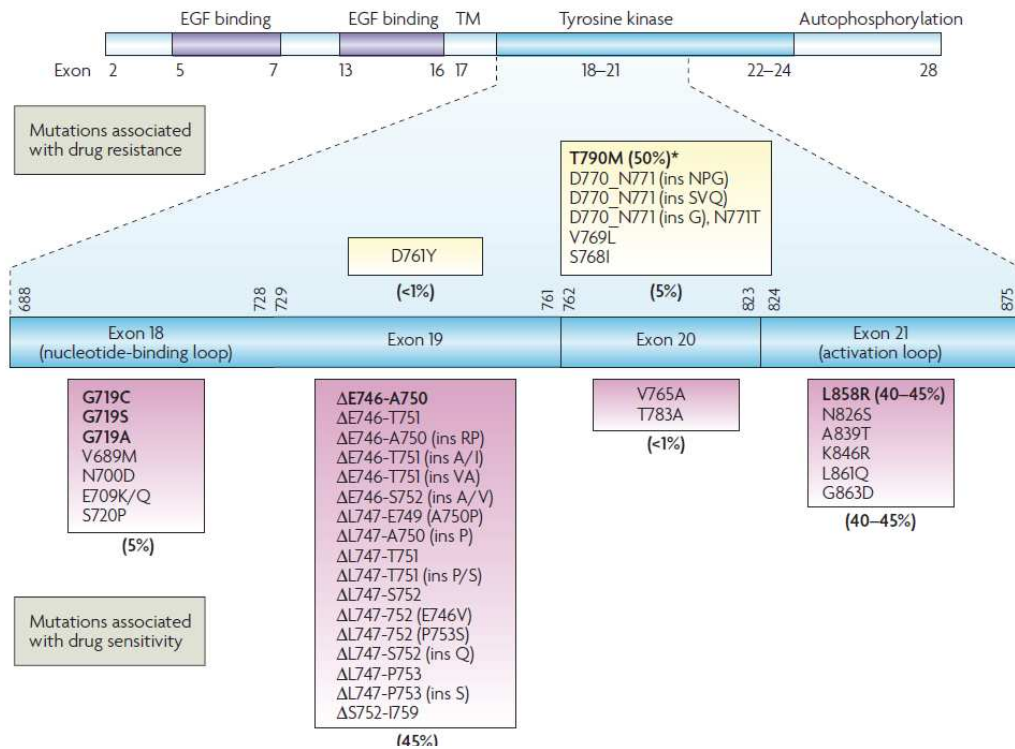


Figura 10 – Distribuição das mutações que conferem susceptibilidade à terapia com TKI

Fonte: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer

Tabela com a síntese de percentagem de cada uma das classes clássicas apresentadas

1.7 Resistência

Apesar das mutações no TK-EGFR serem tradicionalmente associadas a aumento de sensibilidade dos tumores a TKI, nem todas as mutações conferem necessariamente aumento de resposta clínica. Pensa-se que os tumores que contenham mutações activantes no TK-EGFR e não respondam à terapia molecular, tenham uma alteração genética adicional que tornem o tumor independente da via EGFR, ou então que a mutação no TK-EGFR leve à alteração de conformação do domínio activo da proteína, impedindo a ligação das pequenas moléculas inibidoras ao alvo citoplasmático do receptor e consequente inibição. (33, 36, 38)

Do ponto de vista de resistência à terapia com TKI, esta pode ser classificada em resistência primária, que envolve uma segunda alteração em moléculas a jusante da via EGFR e resistência secundária ou adquirida que engloba uma segunda mutação no EGFR. Um mecanismo

associado a fenómenos de resistência secundária a TKI deve-se à presença de mutações no exão 20 do EGFR (D770_N771, ins NPG; D770, ins SVQ ou D770; ins G).(12, 39)

1.7.1 Resistência primária: Mutações no KRAS, BRAF e HER2, amplificação de MET

As mutações no EGFR, KRAS, BRAF e HER2 são mutuamente de exclusão no NSCLC. Este facto parece reflectir que estas alterações representam vias alternativas de activação oncogénica a jusante, como a via PI3K-AKT e a via das MAPK.(12)

Mutações no HER2 aparecem em cerca de 1-2% dos adenocarcinomas e aparecem, tal como as mutações no EGFR mais frequentemente associados a subtipos bronquioloalveolares e em mulheres não fumadoras.(7)

A presença de mutações nos codões 12 e 13 do KRAS são simultaneamente um marcador de mau prognóstico, e um preditor de ausência de resposta ao tratamento com TKI. De facto, mutações no KRAS têm mais que um papel de resistência a TKI, pacientes com mutações no KRAS e tratados com TKI parecem piorar consideravelmente quando a terapia molecular é adicionada à quimioterapia convencional. Ao contrário das mutações no EGFR, as mutações no KRAS parecem estar associadas à exposição ao fumo do tabaco, figura X.(33)

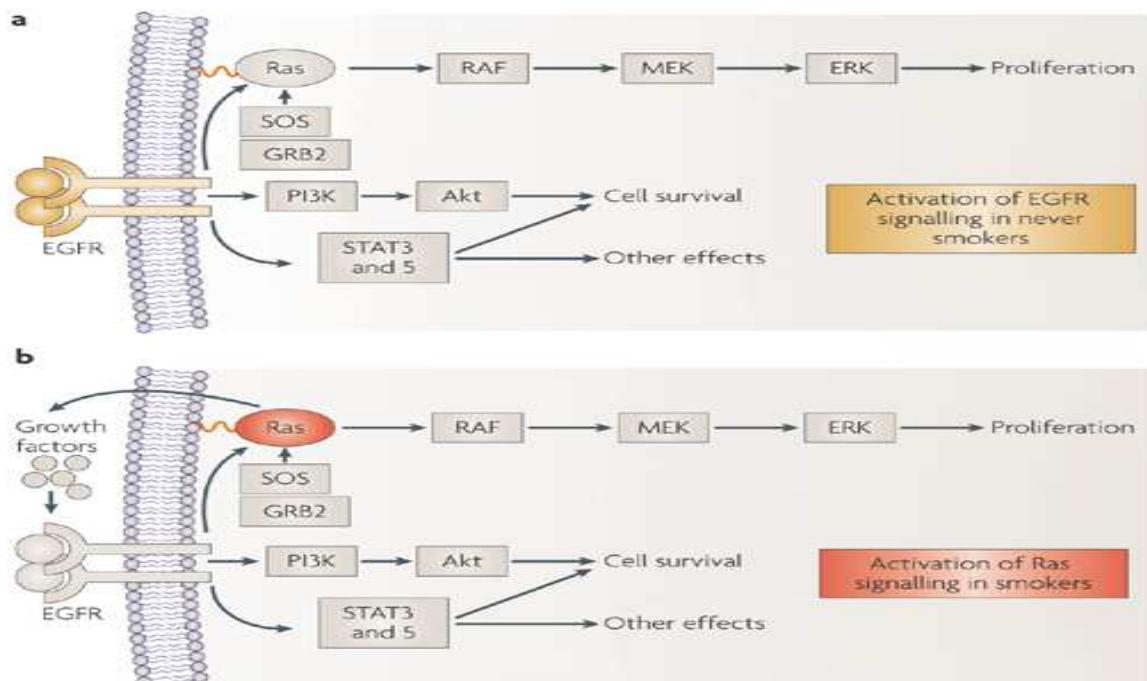


Figura 11 – Vias activadas na carcinogénese pulmonar a) dos fumadores associada à activação do EGFR; b) dos fumadores, via associada à activação do KRAS

Fonte: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer

O protooncogene MET parece estar envolvido em mecanismos de resistência à terapia com TKI através da activação alternativa da via PI3K e Akt independentemente da activação do EGFR. Esta activação é mediada pelo HER3 e pensa-se que este mecanismo esteja na origem de 10-20% dos casos de resistência e que a inibição de MET possa restabelecer a sensibilidade a TKI.(34)

As mutações no BRAF para além de conferirem resistência a TKI podem ainda indicar grande sensibilidade dos tumores a inibidores de MEK.(12)

Com o crescimento acerca dos mecanismos que estão por trás dos fenómenos de resistência à terapia molecular dirigida ao TK-EGFR, têm sido investigados novos alvos terapêuticos, para serem utilizados independentemente, ou em associação com os TKI, com vista ao restabelecimento da sensibilidade a esta classe de fármacos.

Tabela 4 – Agentes terapêuticos em fase de aprovação para a utilização individual, ou em combinação com os TKI-EGFR

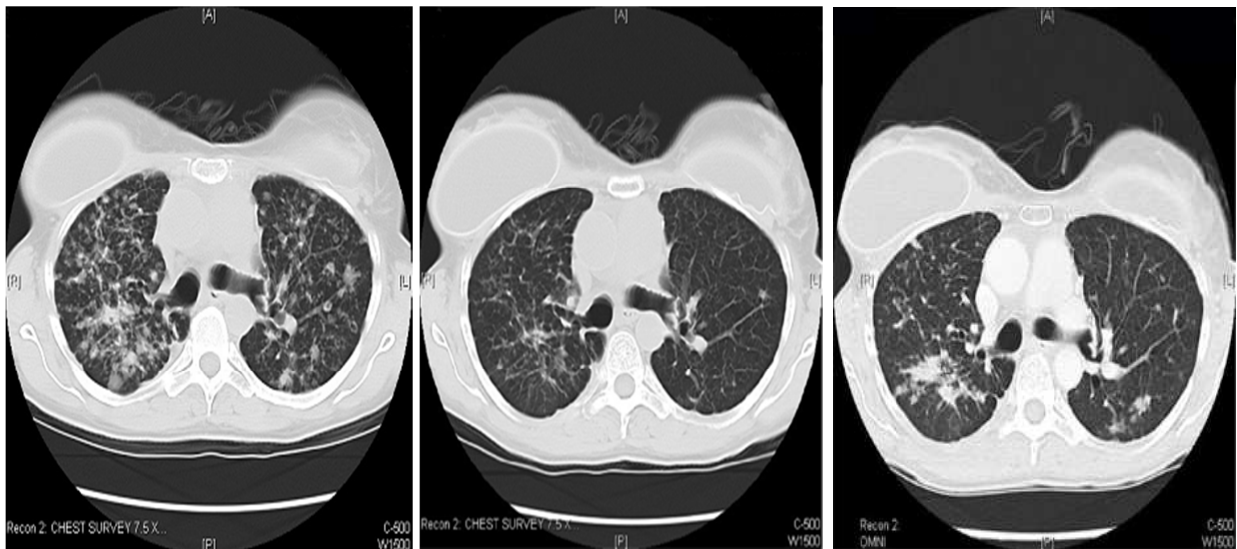
Table 2 | Targeted therapeutics used alone or in combination with EGFR-TKIs

Mode of action	Therapeutic	Target	Company	Stage of development (tumour type)
p110 α -specific inhibition	PX-866 (combination with gefitinib)	PI3K	ProIX Pharmaceuticals	Preclinical (NSCLC)
Rapamycin analogues	Sirolimus (combination with gefitinib)	mTOR	Wyeth	Phase I/II (NSCLC, glioblastoma)
	Temsirolimus (CCI-779; combination with erlotinib)	mTOR	Wyeth	Phase I/II (glioblastoma)
	Everolimus (RAD001; combination with gefitinib or erlotinib)	FKBP12, mTOR	Novartis	Phase I/II (NSCLC, glioblastoma, breast)
	AP23573	mTOR	Ariad	Phase I/II (endometrial)
MAPK pathway	Sorafenib (BAY49-9006; alone or in combination with erlotinib)	Raf, (KDR, p38 α ?)	Bayer	Phase I/II (NSCLC, glioblastoma)
	PD-325901 (single agent)	MEK	Pfizer	Phase II (NSCLC)

Fonte: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer

1.7.2 Resistência secundária, ou adquirida

Actualmente pensa-se que a resistência adquirida ocorra em praticamente todos os NSCLC com resposta inicial a TKI. Reconhece-se portanto que a sensibilidade dos tumores ao erlotinib e gefitinib é limitada no tempo, figura X.



Day 0

4 months

25 months

Figura 12 – Evolução de um paciente tratado com TKI, mostrando a aquisição de resistência após longo período de tratamento.

Fonte: Pao et al, Medicine 2005

em grande parte devido a uma possível segunda mutação localizada no TK-EGFR. A mutação T790M do exão 20 é encontrada em cerca de 50% dos pacientes com resistência adquirida a TKI. Pensa-se que esta mutação seja adquirida através de pressão selectiva durante o tratamento já que raramente esta é encontrada em pacientes antes da terapia dirigida, ou então que ela já estivesse presente num clone limitado que não é detectado por ser de pequenas dimensões, mas que após terapia e por crescimento selectivo, acaba por ganhar destaque após a terapia molecular.(33, 38)

1.8 Metodologias para a caracterização molecular do TK-EGFR

Para o estudo molecular em causa, e apesar das várias metodologias possíveis que permitem a análise rápida e sensível de muitas amostras, como por exemplo o HRM (*High Resolution Melting*), SSCP (*Single Stranded Conformation Polymorphism*), ou dHPLC (*denaturing High Performance Liquid Chromatography*). Estas metodologias, apesar de bastante atractivas do ponto de vista de rapidez têm a desvantagem de necessitarem da identificação e confirmação de mutações através de sequenciação directa. Por este facto, a abordagem escolhida para o estudo molecular do EGFR, foi PCR seguido de sequenciação directa.. (31, 34, 40, 41)

Diferenciação histológica e alterações no EGFR

Embora seja já clara a pertinência da avaliação do EGFR para a determinação da probabilidade de resposta dos pacientes, tendo em conta que 80-85% dos novos casos de cancro de pulmão são do tipo NSCLC, foram feitos estudos com o objectivo de determinar o conjunto de características clinicopatológicas que permitissem fazer uma primeira triagem dos pacientes com maior probabilidade de terem alterações no EGFR, já que apenas 5-20% dos pacientes têm alterações.(36, 42)

As evidências encontradas apontam para que as alterações no EGFR sejam mais frequentes nos adenocarcinomas bronquioloalveolares, enquanto que mutações no EGFR parecem ser extremamente raras nos carcinomas de células gigantes e carcinomas de células pavimentosas puros.(21, 39)

Dentro dos adenocarcinomas, estes podem ainda ser subdivididos em várias categorias (figura 7). A primeira classificação dos adenocarcinomas pulmonares foi proposta por Hashimoto em 2000 e inclui o adenocarcinoma colunar, poligonal, células de globet, misto e *hobnail*. Mais tarde, em 2002, Amin *et al.* descreveu um outro componente também com papel relevante para o prognóstico, que é o padrão micropapilar.(43, 44)

Os padrões *hobnail* e micropapilar são os que apresentam maior correlação com mutações no EGFR e conseqüentemente maior percentagem de resposta à terapia dirigida. Por outro lado, adenocarcinomas do tipo colunar estão mais associados a mutações no TP53, sugerindo a acção de agentes exógenos, como os encontrados no fumo do tabaco, e respondem menos frequentemente a TKI. (11, 43)

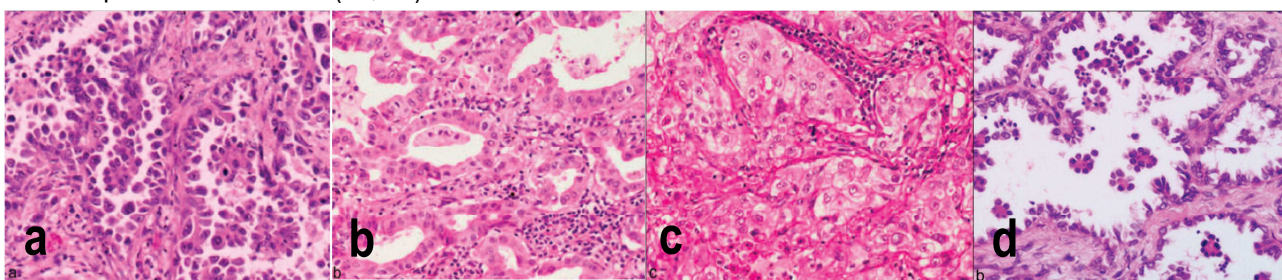


Figura 13 – Aspecto microscópico de três subtipos histológicos de adenocarcinoma.

A) *Hobnail* com as porções apicais das células contendo núcleo orientado para o lúmen;

B) Adenocarcinoma de células colunares

C) Adenocarcinoma de células poligonais em “lençol”

D) Adenocarcinoma com padrão micropapilar

400x

Fonte: Inamura, K., et al., *Is the Epidermal Growth Factor Receptor Status in Lung Cancers Reflected in Clinicopathologic Features?* Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 2010. 134

Adenocarcinomas com padrão mucinoso são neoplasias que estão mais ligadas a mutações a jusante do EGFR (KRAS, BRAF) e tendem a não responder à terapia com TKI.

Todos estes achados histológicos requerem a avaliação de um patologista experiente na patologia pulmonar e embora difíceis, podem servir como primeira selecção dos pacientes para o estudo molecular do EGFR. (23, 37)

Muito importante ainda é a avaliação do patologista relativamente à percentagem de células tumorais. Neste sentido, e em casos com percentagem de células tumorais baixa (inferior a 10%), é sugerido que seja feita a microdissecção.(34)

II – OBJETIVOS

O estudo terá como principal objetivo a determinação do *status* mutacional dos exões codificantes para o domínio TK do EGFR (18-21) em pacientes diagnosticados com NSCLC no período de 2011-2012, nos diferentes tipos histológicos de NSCLC.

Para a análise serão estudados os quatro exões codificantes do domínio TK, pretendendo-se avaliar a importância de alguns passos fase pré-analítica, como a proveniência do material para estudo e a determinação da percentagem de células tumorais na amostra para um diagnóstico molecular mais eficaz e consequente orientação terapêutica de uma amostra de pacientes portugueses com NSCLC.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da amostra

A amostra do estudo foi constituída pela população de pacientes diagnosticados com NSCLC entre os anos 2011-2012.

Foram indicados para estudo molecular 1085 pacientes, com uma média de idades de 65 anos. Deste coorte foram O material utilizado para a extração de DNA tumoral e caracterização molecular foi selecionado pelo serviço de Anatomia Patológica após diagnóstico histológico. Dos 1085 estudados, 815 foram amostras provenientes de blocos de parafina, 161 foram amostras provenientes de lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina, 84 foram amostras provenientes de citologia aspirativa, 33 foram amostras provenientes de lavados brônquicos e 12 tinham outro tipo de proveniência (sangue, DNA já extraído, citologia em meio líquido ou líquido pleural). De realçar que 46 amostras possuíam mais do que um tipo de material para estudo (i.e: a mesma amostra com bloco de parafina e lavado brônquico).

Todas as amostras foram identificadas numericamente e sequencialmente, após registo no laboratório de diagnóstico genético do IPATIMUP Diagnósticos (LDG-ID) sendo deste modo assegurado e preservado o anonimato de todos os pacientes em todo o processo analítico.

3.2 Métodos

O DNA tumoral foi extraído por cromatografia em coluna de sílica, através do kit comercial AHN® da Invitex, segundo as indicações do fabricante. O DNA extraído foi seguidamente quantificado por espectrofotometria, utilizando o *Nanodrop 2001*®, procedendo-se, se necessário à sua diluição para a concentração ideal (50-100 ng/μl).

Para a amplificação foi realizada a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dos exões 18-21. Para tal foram utilizados *primers* desenhados para as regiões flangeadoras dos exões, e a *Multiplex MasterMix*, *Qiagen*, de acordo com as condições descritas na tabela X.

Tabela 5 – Condições utilizadas para a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dos exões 18-21 do EGFR

Reagente		Concentração inicial	Concentração na reação	
<i>Multiplex MasterMix Qiagen</i>		2x	1x	
<i>Q Solution</i>		5x	1x	
<i>Primers</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>		
Exão 18	5' CAAATGAGCTGGCAAGTGCCG 3'	5'GAGTTTCCCAAACACTCAGTGA 3'	100 mM	5 μM
Exão 19	5' CATGTGGCACCATCTACA 3'	5' CAGCTGGCCAGACATGAGAAA 3'	100 mM	5 μM
Exão 20	5' CGAAGCCACACTGACGTG 3'	5' TTATCTCCCTCCCGTATC 3'	100 mM	5 μM
Exão 21	TGATCTGTCCCTCACAGCA 3'	GGAAATGCTGGCTGACCTA 3'	100 mM	5 μM

O programa para a amplificação constou de uma desnaturação inicial de quinze minutos a 95°C. De seguida fez-se um *touchdown*-PCR de cinco ciclos, com uma desnaturação de 30 segundos seguido de um *annealing* de 60 segundos a começar nos 65°C e extensão de minuto e meio a 72°C. Seguem-se 30 ciclos com temperatura de *annealing* constante de 60°C e por fim uma extensão final de 10 minutos.

Após a realização da reação de PCR, a avaliação da efectividade da amplificação foi feita por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% com *Gel Red*.

Para a purificação dos produtos de PCR recorreu-se ao método enzimático *ExoSap-IT*, seguindo as indicações do fabricante.

Seguidamente, os fragmentos foram sequenciados utilizando o método de sequenciação directa com o Big Dye® Terminator da *Perkin Elmer* e purificados por filtração em gel com Sephadex a 7%.

Por fim os produtos sequenciados foram corridos no sequenciador ABI 3100 da *Applied Biosystems*®, segundo as normas do fabricante.

A análise e leitura dos electroferogramas foi feita recorrendo ao software de análise *Mutation Surveyor*.

V – RESULTADOS

Em 787 das 1085 amostras iniciais, foi realizado controlo morfológico da percentagem de células tumorais por um patologista. Destas amostras, 437 continham mais de 20% de células tumorais, 334 tinham uma representatividade de células tumorais de menos de 20% e 16 amostras tinham 20% de células tumorais. Nas restantes amostras não foi realizado controlo morfológico.

Dos casos estudados foram detetadas 205 mutações em 198 pacientes, o que representa uma frequência mutacional total de 18,25% na amostra analisada (Tabela 6 e Gráfico 1).

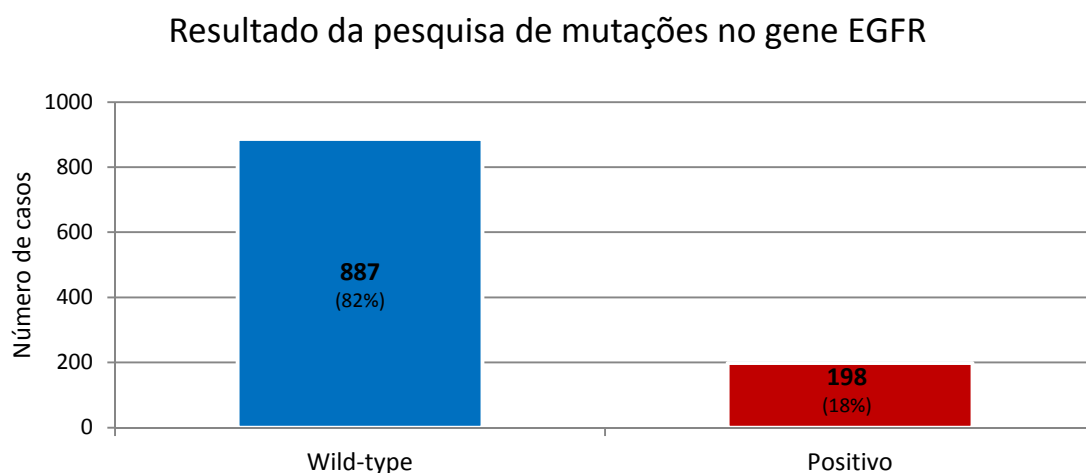


Gráfico 1 - Perfil mutacional da população em estudo entre 2011 e 2012 para o gene EGFR (N=1085)

Tabela 6 – Detalhes acerca dos casos positivos da amostra em estudo (N=1085)

Perfil mutacional		Número
Positivo	Apenas uma mutação	191
	Mais que uma mutação*	7

*Casos em que foi detetada mais que uma mutação: 1 caso em que foi detetada uma mutação no exão 18 e no exão 20; 3 casos em que foram detetadas mutações no exão 19 e no exão 20; 2 casos em que foram encontradas mutações no exão 20 e no exão 21 e 1 caso em que foram detetadas duas mutações no exão 21.

Descriminando os resultados de acordo com a natureza do material, foram encontradas mutações em 198 dos 815 casos de bloco de parafina (24,29%), 36 dos 161 casos provenientes de lâminas coradas (22,36%), 17 dos 84 casos provenientes de citologia aspirativa (20,24%) e 6 dos 45 casos em que se utilizou outro tipo de material: DNA extraído externamente, sangue, citologia em meio líquido, lavados brônquicos e líquidos pleurais (13,33%). (Gráfico 2)

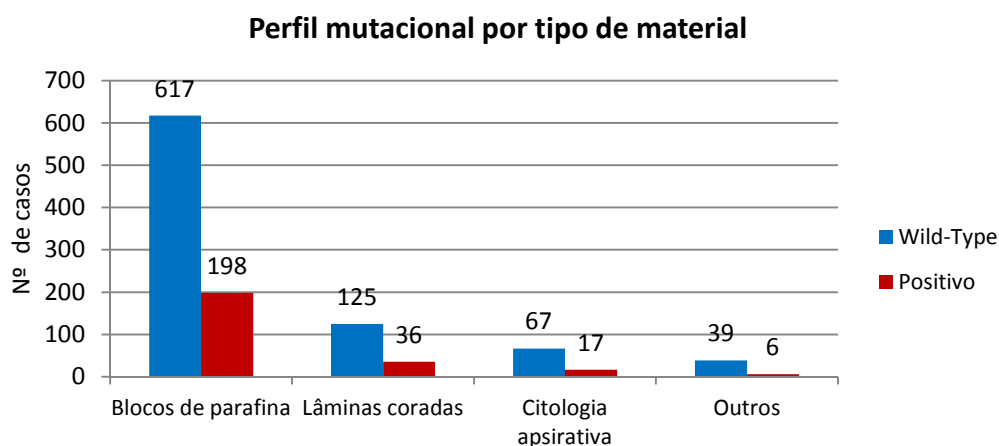


Gráfico 2 - Frequências mutacionais obtidas na amostra em estudo de acordo com a natureza do material (N=1085).

Ao analisar os dados apenas relativamente aos casos provenientes de amostras citológicas, menos celulares, foram encontradas mutações em 17 casos provenientes de citologia aspirativa (20,24%), 4 casos provenientes de lavados brônquicos (12,12%) e 1 caso proveniente de líquido pleural (10%). (Gráfico 3)

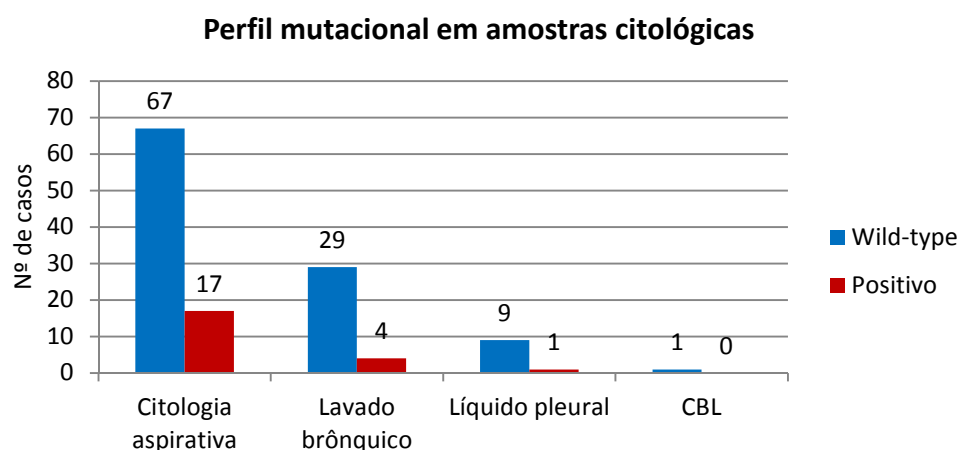


Gráfico 3 - Frequências mutacionais obtidas na amostra em estudo em amostras citológicas

No total das 205 mutações detetadas, 8 foram encontradas no exão 18 (4,39%), 104 no exão 19 (53,66%), 23 no exão 20 (9,76%), e 70 no exão 21 (32,68%). (Gráfico 4). De realçar que 7 casos apresentaram mais do que uma mutação, sendo que seis deles apresentaram mutações em diferentes exões (Tabela 6).

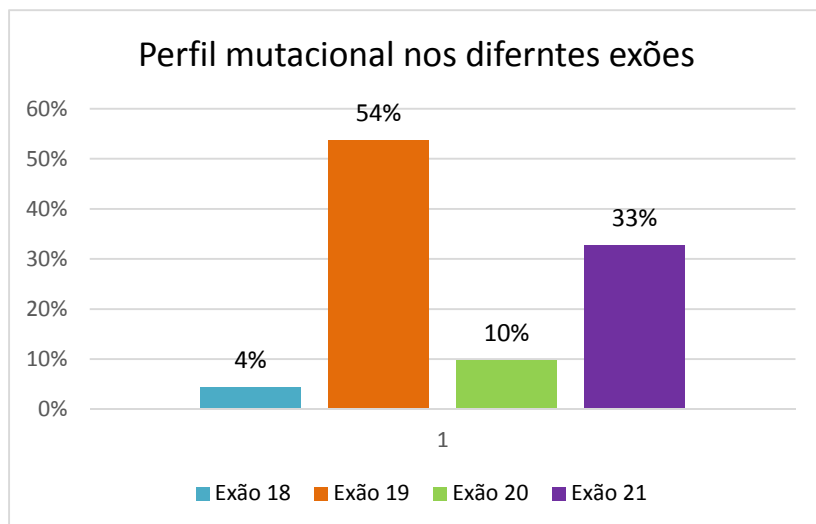


Gráfico 4 - Percentagens mutacionais encontradas nos diferentes exões na amostra em estudo (N=1085)

Na Tabela 7 estão apresentadas as quatro mutações mais frequentes em cada exão e a respectiva implicação terapêutica face à terapia com TKI.

Tabela 7 – Descrição das quatro mutações mais frequentes em cada exão e implicação na resposta à terapia com TKI

Exão 18			
Alteração nos nucleótidos	Alteração nos aminoácidos	Nº de casos	Resposta à terapia
c.2156G>C	p.Gly719Ala	5	US
c.2117T>C	p.Ile706Thr	1	US
c.2126A>C	p.Glu709Ala	1	US
c.2155G>T	p.Gly719Cys	1	PR

Exão 19			
Alteração nos nucleótidos	Alteração nos aminoácidos	Nº de casos	Resposta à terapia
c.2235_2249del15	p.Glu746_Ala750del	40	PR SD
c.2240_2257del18	p.Leu747_Pro753delinsSer	14	PR SD
c.2236_2250del15	p.Glu746_Ala750del	11	PR SD
c.2239_2248del10insC	p.Leu747_Ala750delinsPro	11	US

Exão 20

Alteração nos nucleótidos	Alteração nos aminoácidos	Nº de casos	Resposta à terapia
c.2308_2309ins9	p.Asp770delinsAlaSerValAsp	5	US
c.2327G>A	p.Arg776His	2	US
c.2303G>T	p.Ser768Ile	1	PR
c.2369C>T	p.Thr790Met	1	US

Exão 21

Alteração nos nucleótidos	Alteração nos aminoácidos	Nº de casos	Resposta à terapia
			CR
c.2573T>G	p.Leu858Arg	63	PR
			SD
			PD
c.2603A>G	p.Glu868Gly	1	US
c.2573T>A	p.Leu858Gln	1	US
c.2582T>A	p.Leu861Gln	1	R

Nota: As avaliações da resposta à terapia apresentadas foram consultadas na base de dados <http://www.egfr.org/> e de acordo com os critérios **RECIST** (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors), estabelecidos em Fevereiro de 2000 e que resultaram de uma colaboração internacional entre EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer), o National Cancer Institute dos USA e o National Cancer Institute of Canada. De acordo com estes critérios como resultado da terapia pode resultar nas lesões alvo:

CR (45) – Desaparecimento total da lesão

PR (Partial Response) – Diminuição mínima de 30% do diâmetro máximo da lesão

SD (Stable Disease) – Evolução da lesão insuficientemente para classificar como doença progressiva, ou como PR

PD (Progressive Disease) – Aumento mínimo de 20% do diâmetro máximo da lesão primária, ou aparecimento de novas lesões

Algumas das mutações não tinham descrita a avaliação à resposta à terapia. A essas mutações foi atribuída a classificação:

US (Unknown significance)

Em relação às mutações que não figuravam na base de dados <http://www.egfr.org/> foi feita uma pesquisa da avaliação à resposta na Pubmed. Às que não foi descrita ainda nenhuma relação com a terapia TKI foi atribuída a mesma classificação anteriormente descrita (US). A mutação c.2582T>A (exão 21) foi descrita como estando associada à resposta ao gefitinib, no entanto não é descrita o tipo de resposta, se parcial ou total, tendo sido atribuída a designação:

R (Response)

VI – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste estudo foram detetadas mutações em cerca de 18% dos pacientes pelo método de sequenciação direta de *Sanger*; percentagem que está de acordo com o descrito na literatura(46).

A associação entre algumas mutações mais frequentes, como as deleções no exão 19 e a mutação L858R no exão 21 e a resposta positiva a TKI, como o gefitinib e o erlotinib, está já bem estudada (46). Estas mutações foram as mais frequentes na população deste estudo (Tabela 7), estando de acordo com os dados da literatura(47). Por serem menos frequentes, as mutações nos exões 18 e 20 não estão ainda bem analisadas, contudo acredita-se que as mutações no exão 20 estão associadas a uma baixa taxa de resposta ao gefitinib (47).

Tendo em conta que as mutações neste gene, particularmente nos exões 18 a 21, estão tão relacionadas com a terapia TKI, e que esta é a única forma de tratamento disponível, atualmente, para doentes com carcinoma do pulmão em estado avançado, é crucial que uma avaliação molecular correta seja feita de forma a seleccionar os pacientes que beneficiarão com este tratamento. Assim, torna-se essencial garantir que o DNA utilizado no estudo das mutações tem quantidade e qualidade suficientes para uma análise rigorosa e resultados fidedignos (46).

O material a ser utilizado para o estudo das mutações no gene EGFR é um critério a ter em conta, sendo preferíveis, de acordo com as *guidelines* internacionais(48), amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina, tecidos a fresco ou congelados. Amostras citológicas são também aceitáveis, não podendo, contudo, ser feita microdissecção nestes casos. Neste estudo foi possível observar que as percentagens de casos positivos encontrados em amostras obtidas a partir de diferentes materiais foram muito semelhantes (Gráficos 2 e 3).

A recolha de amostras citológicas (i.e: lavados brônquicos ou citologias aspirativas) é muito menos invasiva para os doentes. Uma vez que é possível obter bons resultados a partir deste tipo de amostras, deve ser considerada este tipo de abordagem a fim de minimizar o sofrimento dos pacientes.

As *guidelines* recomendam, também, a avaliação morfológica por um médico patologista, a fim de determinar a percentagem de células tumorais numa amostra e sugerir microdissecções para aumentar a proporção de células tumorais na amostra em estudo. Cada laboratório deve estabelecer a percentagem mínima de células tumorais necessárias para a deteção de

mutações, tendo em conta a tecnologia utilizada para o estudo, sendo que deve sempre conseguir detetar mutações em amostras com pelo menos 50% de células tumorais(48).

Este estudo utilizou uma percentagem de 20% como valor mínimo de células tumorais para um diagnóstico fidedigno. Cerca de 42% das 1085 amostras em estudo tinham uma percentagem de células tumorais igual ou superior a 20%.

VII – CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível verificar que o método de sequenciação direta é sensível na detecção de mutações nos exões 18, 19, 20 e 21 do gene EGFR, quer em amostras histológicas quer em amostras citológicas. As mutações encontradas com mais frequência na população deste estudo foram concordantes com as descritas na literatura.

O cumprimento das *guidelines* internacionais para o estudo deste tipo de mutações é fundamental para assegurar que os pacientes têm um diagnóstico correto e que irão ser direcionados para a terapia mais adequada.

A adequação da metodologia utilizada e os cuidados a ter com as amostras tendo em conta o tipo de material de onde é proveniente, garante que a quantidade e qualidade de DNA extraído é suficiente para amplificação e subsequente sequenciação.

Para o método de sequenciação direta é muito importante a percentagem de células tumorais presentes na amostra, uma vez que se trata de um método com uma sensibilidade limitada. Assim, sempre que possível, deve ser feita avaliação por um patologista e determinada a percentagem de células tumorais.

Uma amostra com poucas células tumorais poderá ser alvo de estudo, contudo deve ser sempre referenciado no relatório final que a baixa percentagem de células tumorais poderá diminuir a sensibilidade do teste levando, assim, a falsos negativos. Nestes casos deverá ser sugerido uma nova recolha de material ou a realização de um teste mais sensível, como é o caso da sequenciação paralela massiva.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):21S-49S. Epub 2003/01/16.
2. Devesa S, Silverman D, Young J, Pollack E, Brown C, Horm J, et al. Cancer incidence and mortality trends among whites in the United States, 1947-84. *Journal of National Cancer Institute*. 1987;79:701-70.
3. 2008.
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinical Proc*. 2008;83(5):584-94. Epub 2008/05/03.
5. Cotran R, Fausto KA, . *Patologia*. Elsevier2005. p. 1228-36.
6. Coultas D, Samet J. Occupational lung cancer. *Clinical Chest Medicine*. 1992;13:341-54.
7. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;118(6):1136-52. Epub 1999/12/14.
8. Rekhman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(11):1628-38. Epub 2010/11/04.
9. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. The role of genetic testing in prediction of response to EGFR inhibitors in NSCLC. *Oncogene*. 2009;28:32-7.
10. Chu E, DeVita V. *Physicians Cancer Chemotherapy Drug Manual*2006.
11. Huber RM, Stratakis DF. Molecular oncology--perspectives in lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;45 Suppl 2:S209-13. Epub 2004/11/24.
12. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2010;7(9):493-507. Epub 2010/06/17.
13. Inamura K, Nimoiya H, Ishkawa Y, Matsubara O. Is the Epidermal Growth Factor Receptor Status in Lung Cancers Reflected in Clinicopathologic Features? *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2010;134.
14. Lurje G, Lenz H-J. EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology*. 2009;77:400-10.
15. Carpenter G, Lembach KJ, Morrison MM, Cohen S. Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1975;250(11):4297-304. Epub 1975/06/10.
16. Larco JD, Reynolds R, Carlberg K, Engle C, Todaro G. Sarcoma Growth Factor from Mouse Sarcoma Virus-transformed Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1980;255.
17. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*. 1984;307:521-7.
18. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82. Epub 1987/01/09.
19. Arteaga C. The Epidermal Growth Factor Receptor: From Mutant Oncogene in Nonhuman Cancer to Therapeutic Target in Human Neoplasia. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19:32-40.

20. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):361-70. Epub 2004/05/04.
21. Scaltitri M, Baselga J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2006;12:5268-72.
22. Martin P, Kelly CM, Carney D. Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer. *Cancer Control*. 2006;13(2):129-40. Epub 2006/06/01.
23. Jimeno A, Hidalgo M. Pharmacogenomics of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. *Biochimistry Biophysica Acta*. 2006;1766(2):217-29. Epub 2006/10/19.
24. Nakajima T, Yasufuku K, Suzuki M, Hiroshima K, Fujisawa T. Assessment of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *American College of Chest Physicians*. 2007;132:597-602.
25. Ciardiello F, Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *The new england journal of medicine*. 2008;358:1160-74.
26. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Modern Pathology*. 2008;21:22-6.
27. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BioMedCentral Cancer*. 2008;8:142. Epub 2008/05/23.
28. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Haber DA. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The new england journal of medicine*. 2004;350:2129-39.
29. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR Mutations in Lung Cancer Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*. 2004;304:1497-500.
30. Sasaki H, Endo K, Konishi A, Takada M, Kawahara M, Iuchi K, et al. EGFR Mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2924-9. Epub 2005/04/20.
31. Idowu MO, Powers CN. Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics - a review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;3(4):367-85. Epub 2010/05/22.
32. Eramo A, Haas TL, De Maria R. Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene*. 2010;29(33):4625-35. Epub 2010/06/10.
33. Heist RS, Christian D. EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity. *Pharmacogenomics*. 2009;10:59-68.
34. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009;28:14-23.
35. Pérez-Soler R. Individualized therapy in non-small-cell lung cancer: future versus current clinical practice. *Oncogene*. 2009;28:38-45.
36. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009;28:24-31.
37. J.Riely G, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, A.Miller V. Clinical Course of Patients with Non Small Cell Lung Cancer and Epidermal Growth Factor Receptor Exon 19 and Exon 21 Mutations Treated with Gefitinib or Erlotinib. *American Association for Cancer Research*. 2006;12:839-44.
38. Tam IY, Leung EL, Tin VP, Chua DT, Sihoe AD, Cheng LC, et al. Double EGFR mutants containing rare EGFR mutant types show reduced in vitro response to gefitinib compared with common activating missense mutations. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(8):2142-51. Epub 2009/08/13.

39. Reade CA, Ganti AK. EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: potential role of cetuximab. *Biologics*. 2009;3:215-24. Epub 2009/08/27.
40. Heideman DA, Thunnissen FB, Doeleman M, Kramer D, Verheul HM, Smit EF, et al. A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes. *Cell Oncol*. 2009;31(5):329-33. Epub 2009/09/18.
41. Sequist LV, A.Engelman J, Lynch TJ. Towards Noninvasive Genomic Sequencing of Lung Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27:2589-91.
42. Burris HA. Shortcoming of current therapies for non-small-cell lung cancer: unmet medical needs. *Oncogene*. 2009;28:4-13.
43. Amin MB, Tamboli P, Merchant SH, Ordonez NG, Ro J, Ayala AG, et al. Micropapillary component in lung adenocarcinoma: a distinctive histologic feature with possible prognostic significance. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(3):358-64. Epub 2002/02/23.
44. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, et al. Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiological factors. Evidence from p53 mutational spectra. *Am J Pathol*. 2000;157(6):2133-41. Epub 2000/12/07.
45. Shi X, Pan Y, Wang M, Wang D, Li W, Jiang T, et al. IL28B genetic variation is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus, treatment response, serum IL-28B levels in Chinese population. *PloS one*. 2012;7(5):e37054. Epub 2012/06/01.
46. de Biase D, Visani M, Malapelle U, Simonato F, Cesari V, Bellevisine C, et al. Next-Generation Sequencing of Lung Cancer *EGFR* Exons 18-21 Allows Effective Molecular Diagnosis of Small Routine Samples (Cytology and Biopsy). *PLoS ONE*. 2013;8(12):e83607.
47. Wu J-Y, Wu S-G, Yang C-H, Gow C-H, Chang Y-L, Yu C-J, et al. Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Exon 20 Mutations Is Associated with Poor Gefitinib Treatment Response. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(15):4877-82.
48. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(7):823-59. Epub 2013/04/05.

*Escolhe um **trabalho** de que gostes, e **não** terás que **trabalhar** nem um **dia** na tua vida, Confúcio*

Databasis:

<http://www.somaticmutations-egfr.info/>

<http://www.egfr.org/>