



Pedro Miguel Alcobia Lança Piedade Penedo

Licenciado em Biotecnologia

Rastreamento de mutações somáticas do gene EGFR de pacientes com CPNPC

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Eng^a.Carla Patrícia Matias Clemente, Chefe Laboratório Genética Humana, STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas.

Coorientador: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista, Professor Auxiliar com Agregação, FCT/UNL

Juri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues

Vogal: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março2013

LOMBADA



**Rastreamento de mutações somáticas do gene EGFR de pacientes com CPNPC
Pedro Penedo**

2013

Rastreamento de mutações somáticas do gene EGFR de pacientes com CPNPC

Copyright Pedro Miguel Alcobia Lança Piedade Penedo, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento é dirigido para a STAB VIDA, na pessoa do Dr.Orfeu Flores e da Eng. Carla Clemente, por me terem dado a oportunidade de realizar este estágio, pelo acompanhamento e orientação durante o decorrer do mesmo.

Ao professor Pedro Viana Baptista, por me ter aceite como co-orientando, e, acima de tudo, pela disponibilidade e orientação que sempre demonstrou.

O meu muito obrigado pela colaboração de toda a equipa da STAB VIDA – Rui, Liliana, Carlos, Vitaliy, David, Hugo e Daniela. Um obrigado especial pela amizade, disponibilidade e conhecimentos transmitidos por parte do Fábio Ferreira Carlos.

O meu maior agradecimento é para a minha família pelo apoio incondicional, e pela oportunidade que me deram em alcançar mais um objetivo da minha vida. Obrigado Pai, São, Nuno e Mãe.

Por último, o meu agradecimento mais sentido para a Susana pela força e motivação transmitida para que fosse possível concluir esta tese.

Resumo

O cancro do pulmão é a causa de morte responsável por um terço das mortes provocadas por cancro em todo o mundo. Mutações somáticas localizadas nos exões 18-21 do gene do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) têm sido associadas a pacientes com cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC). Estas mutações induzem a ativação constitutiva do domínio de tirosina quinase (TK) do recetor transmembranar e atribuem sensibilidade aos fármacos inibidores da TK gefitinib e erlotinib, enquanto as mutações no exão 20 conferem resistência. O rastreamento de mutações somáticas no gene EGFR assume, assim, uma importância extrema na decisão do tratamento, quer para seleccionar pacientes para o tratamento com inibidores da TK, quer para identificar resistência a estes inibidores.

Foram utilizadas 3 amostras diferentes para o desenvolvimento e validação deste trabalho: a) Sangue conservado em *Indicating FTA Micro Card* para amplificação por PCR convencional e Multiplex; b) gDNA com a mutação E746_A750 ao nível do exão 19 para a determinação do limite de deteção de ambas as técnicas e; c) Amostras FFPE que simulam 20 pacientes para o rastreamento de mutações somáticas no gene EGFR.

Os protocolos de amplificação e sequenciação desenvolvidos neste trabalho permitiram o rastreamento 20 amostram FFPE estudadas. Destas, apenas se obteve 1 falso positivo e duas amostras apresentaram má qualidade do DNA, pelo que não houve amplificação do material genético. A amplificação por PCR Multiplex foi testada em 4 amostras FFPE contendo mutações em pelo menos 1 exão, no entanto a mutação G719A não foi detetada.

O trabalho desenvolvido permitiu a validação analítica dos protocolos desenvolvidos neste estudo eficaz, embora ainda seja necessário otimizar o protocolo de amplificação por PCR Multiplex e validar os restantes parâmetros de qualidade de modo a integrar este serviço nos laboratórios da STAB VIDA.

Palavras-chave: EGFR;Cancro do pulmão de não-pequenas células; Inibidores da tirosina Quinase; FFPE; terapia personalizada

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death accounting for one third of all deaths from cancer worldwide. Somatic mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) have been described in patients with advanced non-small cell lung cancer, located in the exons 18-21 of the tyrosine kinase (TK) domain. These mutations induce constitutive activation of the TK domain of the receptor and confer dramatic sensitivity to TK inhibitors (TKIs) gefitinib and erlotinib, while the latter has shown to be resistance related. Screening of EGFR mutations, both for selecting patients for treatment with TKIs and for detecting the resistance mutation, is thus extremely important for treatment decision.

Three different type of samples were used for the development and validation of this work: a) blood sample on Indicating FTA Micro Card for conventional and multiplex PCR DNA amplification; b) gDNA containing the exon 19 E746_A750 deletion for limit of detection determination associated with Sanger technique and; c) FFPE samples from 20 different patients for EGFR mutation screening by direct sequencing and fragment analysis.

We have successfully developed a PCR protocol for EGFR mutation detection through direct Sanger sequencing and fragment analysis, and screened all 18 from 20. One false positive was obtained and 2 samples had poor DNA quality thus no PCR amplification was performed. Multiplex PCR procedure was successfully on 4 tested FFPE samples containing at least 1 somatic mutation in the exons 18-21, though G719A (rs28929495) mutation was not detected. 2 samples had poor DNA quality for PCR amplification.

The developed protocol for the screening of EGFR mutations using Sanger sequencing and fragment analysis has shown to be effective, though optimization is still required in sequencing samples amplified by multiplex PCR and further validation is required in order to EGFR testing to be implemented on STAB VIDAlaboratories.

Keywords: EGFR; Non-small cell lung cancer; Tyrosine Kinase Inhibitors; FFPE; targeted therapy

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O RECETOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)	1
1.1.1. <i>Estrutura e Mecanismo de ativação</i>	2
1.1.2. <i>Via de sinalização</i>	4
1.1.2.1. <i>Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR</i>	4
1.1.2.2. <i>Via de Sinalização Ras/Raf/MEK/ERK</i>	5
1.2. EGFR E O CANCRO	6
1.2.1. <i>Estádios do cancro do pulmão de não-pequenas células.</i>	7
1.2.2. <i>Tratamento para o cancro do pulmão de não-pequenas células.</i>	10
1.2.2.1. <i>Cirurgia</i>	11
1.2.2.2. <i>Quimioterapia</i>	11
1.2.2.3. <i>Radioterapia</i>	11
1.2.2.4. <i>Terapia Personalizada</i>	12
1.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS NO GENE EGFR	12
1.3.1. <i>Mutações somáticas no gene EGFR</i>	13
1.3.2. <i>Métodos para a deteção de mutações presentes no gene EGFR</i>	15
1.3.3. <i>Inibidores da Tirosina Quinase como primeira linha do tratamento do CPNPC</i>	16
1.4. OBJETIVO	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. MATERIAIS	19
2.1.1. <i>Equipamento</i>	19
2.1.2. <i>Reagentes Químicos</i>	19
2.1.3. <i>Soluções</i>	20
2.1.4. <i>Material Biológico</i>	20
2.1.4.1. <i>Oligonucleótidos</i>	20
2.1.4.2. <i>Biologia Molecular</i>	21
2.1.4.3. <i>Amostras</i>	22
2.2. MÉTODOS	23
2.2.2. <i>Preparação das soluções de gDNA contendo diferentes teores de gDNA mutado</i>	24
2.2.3. <i>Extração de DNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE)</i>	25
2.2.4. <i>Amplificação do DNA pela técnica Polymerase Chain Reaction</i>	25
2.2.4.1. <i>Amplificação do DNA através de PCR convencional</i>	25
2.2.4.2. <i>Amplificação do DNA através de PCR Multiplex</i>	26
2.2.5. <i>Eletroforese em Gel de agarose</i>	27
2.2.6. <i>Purificação dos Produtos de PCR</i>	27
2.2.7. <i>Quantificação de ácidos nucleicos</i>	28
2.2.8. <i>Sequenciação pelo método de Sanger de amostras amplificadas por PCR convencional e multiplex</i>	28
2.2.9. <i>Determinação do tamanho de deleções/inserções no gene EGFR através de Análise de Fragmentos</i>	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL DOS EXÕES 18-21 DO GENE EGFR	31
3.2. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	32
3.3. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO INERENTE ÀS TÉCNICAS DE SEQUENCIAÇÃO DE SANGER E ANÁLISE DE FRAGMENTOS	35
3.3.1. <i>Limite de deteção da técnica de sequenciação de Sanger</i>	36

3.3.2.	<i>Determinação do limite de detecção da técnica de Análise de Fragmentos para a detecção da deleção E746_750A do gene EGFR</i>	39
3.3.3.	<i>Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de sequenciação pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos</i>	45
3.4.	GENOTIPAGEM DE 20 AMOSTRAS FFPE PARA OS EXÕES 18-21 DO GENE EGFR	47
3.4.1.	<i>Extração do DNA genómico através de diferentes kits comerciais</i>	47
3.4.2.	<i>Amplificação do gDNA a partir de amostras FFPE por PCR convencional</i>	48
3.4.3.	<i>Determinação do genótipo dos exões 18-21 do gene EGFR de 20 amostras FFPE através da sequenciação pelo método de Sanger</i>	49
3.4.4.	<i>Comparação do genótipo obtido com o genótipo fornecido pela EQMN</i>	55
3.5.	OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX DOS EXÕES 18-21 DO GENE EGFR A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE CONSERVADAS EM CARTÃO FTA	57
3.5.1.	<i>Otimização do protocolo de sequenciação de produtos amplificados por PCR multiplex</i>	59
3.5.2.	<i>Amplificação por PCR multiplex e sequenciação pelo método de Sanger de diferentes amostras FFPE contendo mutações nos exões 18-21 do gene EGFR</i>	61
3.6.	VALIDAÇÃO ANALÍTICA DOS PROTOCOLOS DE GENOTIPAGEM DOS EXÕES 18-21 DO GENE EGFR DESENVOLVIDOS NESTE ESTUDO	63
4.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	67
5.	BIBLIOGRAFIA	69
	ANEXO A - A UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DA TIROSINA QUINASE (TKI) EM PRIMEIRA LINHA NO TRATAMENTO PARA O CPNPC	73
	ANEXO B - PARTICIPAÇÃO NO PROGRAMA EXTERNO DE CONTROLO DE QUALIDADE “EVALUATION OF X-MANTM DEL E746-A750 STANDARD USING SANGER SEQUENCING”	80
	ANEXO C - PARTICIPAÇÃO NO PROGRAMA EXTERNO DE CONTROLO DE QUALIDADE “PILOT EQA SCHEME FOR EGFR MUTATION TESTING IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER”	80

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura do gene EGFR.....	1
Figura 1.2 - Representação da estrutura comum dos recetores da superfamília ErbB.	2
Figura 1.3 – Dimerização do recetor EGFR.....	3
Figura 1.4 - Esquema geral da vida de sinalização PI3k/Akt/mTOR.	5
Figura 1.5 – Esquema geral da via de sinalização Ras/Raf/Mek/Erk.	6
Figura 3.1 - Esquematização do processo do desenvolvimento o protocolo para a determinação de mutações somáticas presentes nas regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR.	31
Figura 3.2 - Fotografia dos produtos de PCR obtidos através da amplificação das amostras de sangue conservadas em <i>Indicating FTA Micro Card</i>	32
Figura 3.3 – Esquema do processo de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR a partir de amostras de sangue conservadas em <i>Indicating FTA micro card</i>	34
Figura 3.4 – Resultado da amplificação do DNA genómico das soluções com diferentes teores de DNA mutado para o exão 19.	37
Figura 3.5 - Resultado da amplificação do DNA genómico das soluções com teores 50% a 1% de DNA mutado para o exão 19.	40
Figura 3.6 - Resultado da amplificação do DNA genómico das soluções com teores 1% a 0% de DNA mutado para o exão 19.....	40
Figura 3.7 - Etapas do protocolo de determinação do tamanho de fragmentos através da técnica de Análise de Fragmentos.	45
Figura 3.8 - Fotografia representativa da amplificação por PCR convencional de 5 das 20 amostras estudadas, a partir de 5 µL de gDNA extraído pelo kit comercial QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit.	48
Figura 3.9 – Quantidade de mutações no gene EGFR detetadas em função do teor de células tumorais presentes em cada amostra.	49
Figura 3.10 - Eletroferograma correspondente à amostra 01 cujo alelo mutado foi detetado pela técnica de análise de fragmentos.	52
Figura 3.11 - Eletroferograma correspondente à amostra 03 cujo alelo mutado foi detetado pela técnica de análise de fragmentos.	52
Figura 3.12 - Eletroferograma correspondente à amostra 18 cujo alelo mutado foi detetado pela técnica de análise de fragmentos.	53
Figura 3.13 - Esquema do processo de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR a partir de amostras de sangue conservadas em <i>Indicating FTA Micro Card</i>	54
Figura 3.14 – Cromatograma da amostra 11 para o exão 20 do gene EGFR.	56
Figura 3.15 – Fotografia do gel de agarose da otimização as condições do PCR, com os primers da tabela 2.2 da seção 2.1.4.1.	58

Figura 3.16 - Amplificação das regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR obtida a partir de uma amostra conservada em cartão FTA por PCR Multiplex..	58
Figura 3.17 - Amplificação das amostras FFPE 02, 03, 11 e 12 por PCR multiplex.....	61
Figura 3.18 – Etapas realizadas para a genotipagem das regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR.....	63
Figura 3.19 – Cromatogramas da amostra 13..	66
Figura A.1 - Curva de Kaplan-Meier para o marcador temporal de sobrevida livre de progressão (PFS) obtidas numa população de 950 doentes com CPNPC integrados no estudo IPASS.....	73
Figura A.2 – Curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência livre de progressão obtida a partir do estudo de 372 pacientes de origem chinesa administrados com gefitinib (n=184) ou com quimioterapia baseada nos compostos carboplatina + paclitaxel (C/P)..	74
Figura A.3 – Curva de Kaplan-Meier para a probabilidade da PFS em pacientes com mutações presentes no gene EGFR tratados com gefitinib ou com quimioterapia carboplatina + paclitaxel..	75
Figura A.4 - Curva de Kaplan-Meier para a probabilidade da PFS em pacientes sem mutações presentes no gene EGFR tratados com gefitinib ou com quimioterapia carboplatina + paclitaxel..	75
Figura A.5 – Curva de Kaplan-Meier para o marcador temporal de sobrevida livre de progressão (PFS) obtidas numa população de 584 doentes com CPNPC integrados no estudo IPASS, sem o <i>status</i> da mutação para o gene EGFR conhecido.....	76
Figura A.6 – Percentagem de pacientes com melhoramento da qualidade de vida, onde foram avaliados os parâmetros de qualidade de vida FACT-L, TOI e LCS.Registrou-se uma melhoria nos doentes tratados com gefitinib.....	77
Figura A.7 – Curva de Kaplan-Meier para o tempo decorrido até ao agravamento da doença em pacientes avaliados com o parâmetro de qualidade de vida TOI.....	78
Figura C.1 – Países participantes no ensaio “2011 (Round 2) Pilot EQA scheme for <i>EGFR</i> mutation testing in non-small cell lung cancer (European Molecular Genetics Quality Network, 2012b).....	81
Figura C.2 – Países participantes no ensaio “2011 (additional round) Pilot EQA scheme for <i>EGFR</i> mutation testing in non-small cell lung cancer”.....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Sumarização dos diferentes exames utilizados para determinar a característica das células tumorais e definir, assim, o estadiamento do tumor.....	7
Tabela 1.2 - Estádios e respetiva descrição do CPNPC de acordo com a classificação American Joint Committee on Cancer (AJCC).....	8
Tabela 1.3 – Estádios agrupados do CPNPC de acordo com a classificação do American Joint Committee on Cancer (AJCC).....	9
Tabela 1.4- Sumarização do tratamento em função do estadiamento do CPNPC.....	10
Tabela 1.5 - Mutações presentes nos exões 18, 19, 20 e 21 do gene EGFR.....	15
Tabela 1.6 - Sumário de algumas das técnicas utilizadas atualmente para detetar mutações presentes no gene EGFR. Adaptado de (Astrazeneca, n.d.).....	15
Tabela 1.7 – Terapia convencional vs Terapia com TKI.....	16
Tabela 2.1– Reagentes químicos utilizados e respetivos fabricantes.....	17
Tabela 2.2 - Sequências dos oligonucleótidos utilizados para amplificar as regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR, através da técnica de PCR Multiplex.....	18
Tabela 2.3 – Sequências dos oligonucleótidos utilizados para amplificar as regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR, através da técnica de PCR Multiplex.....	21
Tabela 2.4 - Informação disponibilizada pela EMQN relativa às amostras enviadas para o laboratório.....	22
Tabela 2.5 - Preparação das soluções contendo diferentes teores de alelos com mutação presente no exão 19 do gene EGFR.....	24
Tabela 2.6 – Quantidades e concentrações dos reagentes de PCR utilizados para amplificar DNA das várias amostras utilizadas neste estudo.....	26
Tabela 2.7 - Quantidades e concentrações dos reagentes de PCR utilizados para amplificar DNA das várias amostras utilizadas neste estudo.....	27
Tabela 2.8 – Programa da reação de sequenciação otimizado para sequenciar produtos obtidos por PCR convencional. Esta reação foi desempenhada num termociclador <i>MyCycler™ Thermal Cycler</i>	28
Tabela 2.9 - Programa da reação de sequenciação otimizado para sequenciar produtos obtidos por PCR multiplex.....	28
Tabela 3.1 - Fluorogramas das sequenciações dos produtos de PCR dos exões 18-21.....	33
Tabela 3.2 - Cromatogramas das regiões de interesse do exão 19 do gene EGFR.....	37
Tabela 3.3 - Electroferogramas obtidos através do software <i>Soft Genetics Gene Marker v.2.2.0</i> das soluções contendo 50% a 0% de células tumorais.....	41

Tabela 3.4 - Resultado do genótipo obtido através de sequenciação pelo método de Sanger para as 20 amostras FFPE usadas neste estudo.....	49
Tabela 3.5 - Mutações detetadas no gene EGFR nas 20 amostras analisadas, num total de 11 amostras FFPE em que foram detetadas mutações no gene EGFR.....	50
Tabela 3.6 - Resultado do genótipo divulgado pela EQMN correspondente às 20 amostras FFPE fornecidas neste estudo no âmbito do programa de controlo de qualidade externo “ <i>EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer</i> ”.....	55
Tabela 3.7 – Cromatogramas dos produtos de PCR purificados obtidos por PCR multiplex correspondentes às regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR.....	60
Tabela 3.8 – Cromatogramas das amostras 12 (exão 18), 03 (exão 19), 02 (exão 20) e 103 (exão21).....	62
Tabela A.1 – Efeitos secundários associados ao tratamento com Gefitinib e Carboplatina/Paclitaxel verificados em diferentes estudos IPASS.....	78
Tabela A.2 - Terapia convencional vs Terapia com TKI.....	79

Abreviaturas

Akt	<i>v-akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AR	<i>Anfiregulina</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
bp	<i>base pair</i>
CDK	<i>Ciclin Dependent Kinase</i>
CPPC	<i>Cancro do Pulmão de Pequenas Células</i>
CPNPC	<i>Cancro do Pulmão de Não-Pequenas Células</i>
CREB	<i>cAMPresponse element-binding</i>
CT	<i>Tomografia Computorizada</i>
ddNTP	<i>dideoxynucleótidos</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
dsDNA	<i>Double StrandDNA</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiaminotetraacético</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERBB	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog</i>
erbB2	<i>v-erb-b2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2</i>
erbB3	<i>v-erb-b2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 3</i>
erbB4	<i>v-erb-a Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 4</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FNA	<i>Fine Needle Aspirate</i>
GAP	<i>GTP-Activating Protein</i>
GSK	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
gDNA	<i>DNA genómico</i>
HB-EGF	<i>Heparin-Binding EGF-like Growth Factor</i>
HER1	<i>Human Epidermal Receptor 1</i>
HER2	<i>Human Epidermal Receptor 2</i>
HER3	<i>Human Epidermal Receptor 3</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
neu	<i>Neuregulin</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>

PLC- γ	<i>Phospholipase C-γ</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RAS	<i>RatSarcoma virus</i>
RAS-GAP	<i>RAS-GTPase-ActivatingProtein</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
TAE	<i>Tris-Acetato-EDTA</i>
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>

1. Introdução

1.1. O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é uma glicoproteína transmembranar, composta por uma única cadeia polipeptídica, expressa na maioria das superfícies celulares que promove a ativação das vias de sinalização celulares que incluem a proliferação, diferenciação, mobilidade e sobrevivência celulares (Higashiyama et al., 2008). Esta proteína pertence ao grupo do tipo I (ErbB1) da superfamília ErbB de recetores de tirosina-quinase (RTK), que é também composta pelos membros ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 e ErbB4 (Brandt et al., 2006).

O EGFR resulta da transcrição do gene *EGFR*, localizado no cromossoma 7p12. Este gene, com aproximadamente 200 kbp de DNA genómico, expressa uma proteína de 170 kDa constituída por 1186 aminoácidos dispostos em 28 exões, conforme representado na figura 1:

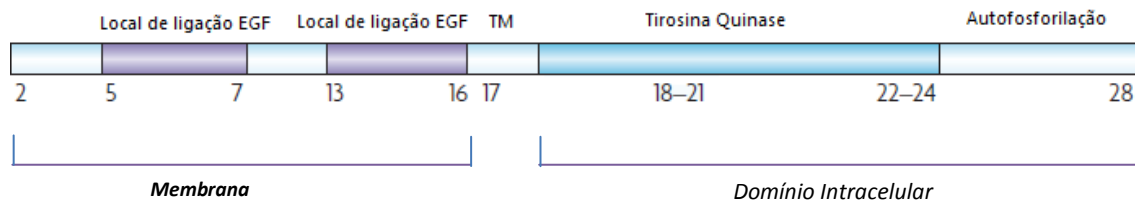


Figura 1.1 - Estrutura do gene EGFR. O gene EGFR é composto por 28 exões que codificam uma proteína com 170kDa, composta por um domínio extracelular (exões 1-16), um domínio transmembranar (exão 17) e um domínio intracelular (18-28). Adaptada de Sharma et al., 2007.

A superfamília ErbB é caracterizada por uma estrutura composta por uma região extracelular responsável pelo reconhecimento dos ligandos, uma região transmembranar única e uma região intracelular caracterizada por um domínio quinase e uma cadeia terminal de aminoácidos de tamanho variável com locais de fosforilação de tirosina que traduz o reconhecimento do complexo ligando-recetor numa resposta intracelular. Os quatro membros pertencentes a esta família partilham esta estrutura comum, à exceção do ErbB2 que não apresenta um domínio de ligação ao ligando e do ErbB3 que é desprovido de atividade quinase funcional, conforme representado na figura 1.2 (Doebele et al., 2010).

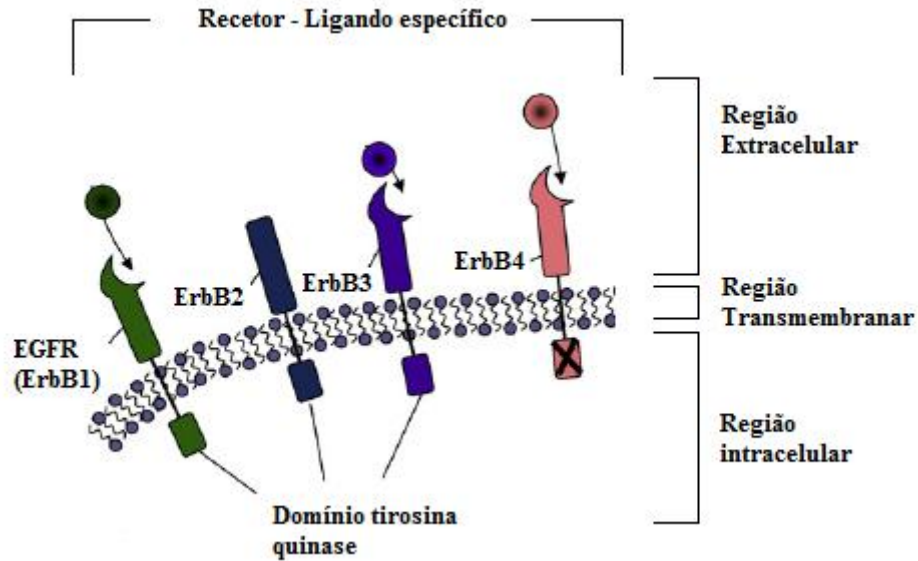


Figura 1.2 - Representação da estrutura comum dos receptores da superfamília ErbB. Os receptores apresentam uma região extracelular com um domínio de ligação dos ligandos com exceção do Erb2, uma região transmembranar e uma região intracelular contendo o domínio tirosina quinase, ativa no caso dos receptores EGFR, ErbB2 e ErbB3 e disfuncional no caso do recetor ErbB4. Adaptado de Doebele et al., 2010

1.1.1. Estrutura e Mecanismo de ativação

A região extracelular do EGFR, dividida nos subdomínios I, II, III e IV, é responsável pelo reconhecimento específico dos ligandos. Estes subdomínios estão organizados em duas regiões repetidas em *tandem*, em que os subdomínios I e III, e os subdomínios II e IV apresentam homologia entre si. Na ausência de ligando, os subdomínios II e IV interagem entre si, conferindo uma conformação fechada e autoinibida ao recetor (Leahy, 2004).

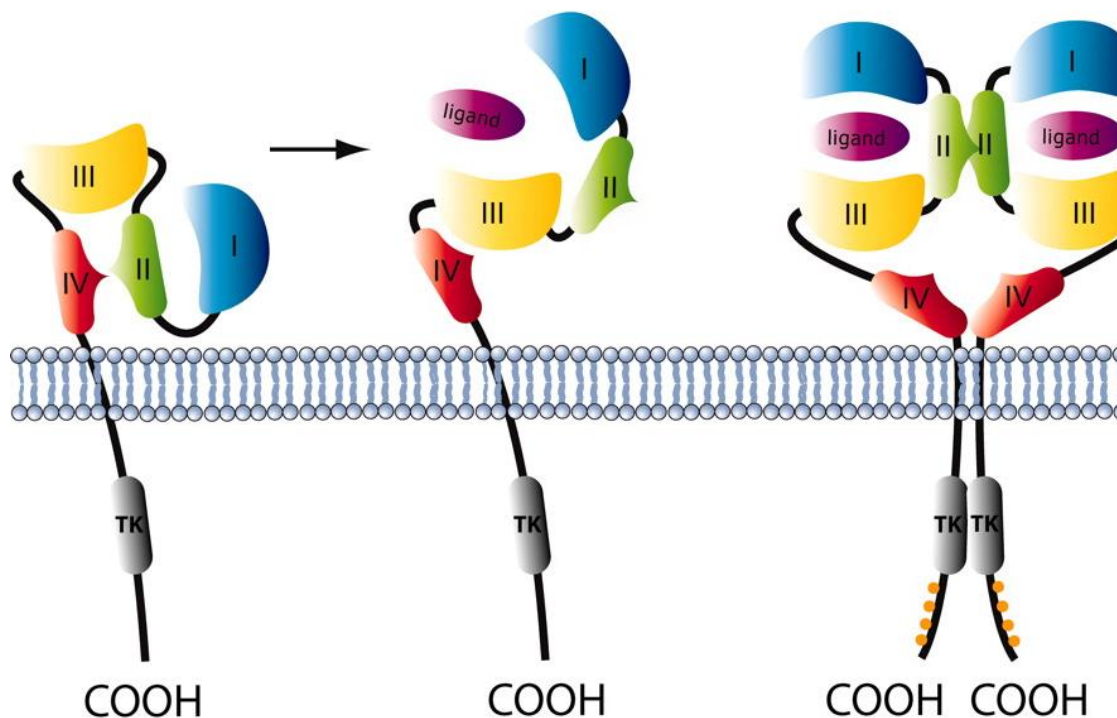


Figura 1.3 – Dimerização do recetor EGFR. O reconhecimento do ligando provoca uma mudança conformacional nos domínios extracelulares do recetor EGFR. O ligando interage com os subdomínios I (azul) e III (amarelo) que induz a quebra da ligação entre os domínios II (verde) e IV (vermelho), ficando o subdomínio II livre para integrar com o domínio homólogo de outro recetor a superfamília ErbB. Adaptado de Doebele et al., 2010.

Esta proteína é ativada quando um dos seus ligandos - EGF, fator de transformação do crescimento alfa (TGF- α), anfiregulina (AR), HB-EGF, betacelulina e diversas isoformas de heregulina/neuregulina – interage com os subdomínios I e III, provocando uma alteração da conformação da região extracelular e induz a quebra da interação entre os subdomínios IV e II. Deste modo, o subdomínio II fica livre para estabelecer uma interação com outro subdomínio homólogo de um dos membros da superfamília ErbB, formando como representado na figura 1.3 (Brandt et al., 2006; Sihto et al., 2005).

A formação deste dímero permite a ativação do domínio intracelular da tirosina quinase e desencadeia a autofosforilação de 5 resíduos de tirosina (Tyr 1153, 1148, 1086, 1068 e 992) no C-terminal catalítico. O sítio de acesso das proteínas PLC- γ , MAPK ou *ras*GAP torna-se acessível ao ATP e regista-se um aumento da atividade catalítica do recetor (Han et al. 2005; Voldborg et al. 1997). A recruta destas proteínas permite o desencadeamento da via de proliferação celular PI3K/Akt/mTOR e Ras/Raf/MEK/Erk (Brandt et al. 2006; Martin et al., 2006).

Após a ativação do complexo recetor-ligando o recetor é endocitado pela célula e, ou é degradado por ação dos lisossomas ou reciclado para a membrana plasmática. Este mecanismo permite uma regulação negativa da atividade do recetor (Voldborg et al., 1997).

1.1.2. Via de sinalização

As vias de sinalização associadas ao EGFR estão envolvidas no ciclo celular, proliferação, diferenciação, mobilidade e sobrevivência ou morte celular (Dienstmann et al., 2011), onde as vias de sinalização interna RAS/RAF/MAPK/ ERK e PI3K/AKT/mTOR são os mecanismos de sinalização mais importantes.

1.1.2.1. Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR

Esta via de sinalização regula a proliferação, crescimento, sobrevivência e mobilidade celulares (Dienstmann et al., 2011; Morgensztern e McLeod, 2005).

O reconhecimento do ligando por parte do EGFR conduz à autofosforilação dos resíduos de tirosina presentes no domínio da tirosinaquinase do recetor, ativando a PI3k. Esta proteína atua como uma quinase lipídica e converte o fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP2) a fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). A conversão de PIP3 permite o recrutamento da proteína Akt, de domínio homólogo à pleckstrina (PH), do citoplasma para a parte interior da membrana celular aproximando-a junto da quinase PDK1, que regula e promove a ativação da Akt. Esta proteína é o principal regulador da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, cuja ativação permite a sua translocação do citoplasma para o núcleo. No núcleo, a Akt regula os processos de proliferação celular e apoptose, através da inibição da atividade pro-apoptótica da proteína BAD, da caspase-9, e da ativação de substratos das vias anti-apoptóticas, tais como a quinase IKK e o fator de transcrição CREB (Morgensztern e McLeod 2005; Sharma et al., 2007).

A Akt afeta também o ciclo celular uma vez que favorece a progressão da fase G1 para a fase S através da inibição da quinase específica de serina/trionina glicogénio quinase sintase 3 (GSK), p21 e p27, e da degradação da ciclina D1. Esta proteína também estimula a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) através da expressão de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. A mTOR é também uma quinase específica de serina/trionina que controla o crescimento e proliferação celulares em resposta a fatores de crescimento (Morgensztern e McLeod 2005; Sharma et al., 2007). O sinal desencadeado pelo ligando no recetor é interrompido através da desfosforilação da PIP3 a PIP2, cuja regulação é mediada por duas fosfatases diferentes: SHIP e PTEN (Morgensztern e McLeod, 2005). A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR regula diversas funções celulares normais que são essenciais para a formação de tumores, onde frequentemente se verifica uma sobreexpressão da proteína Akt ou mutações no supressor de tumores PTEN em cancro do pulmão de não pequenas células (Morgensztern e McLeod, 2005; Sharma et al., 2007).

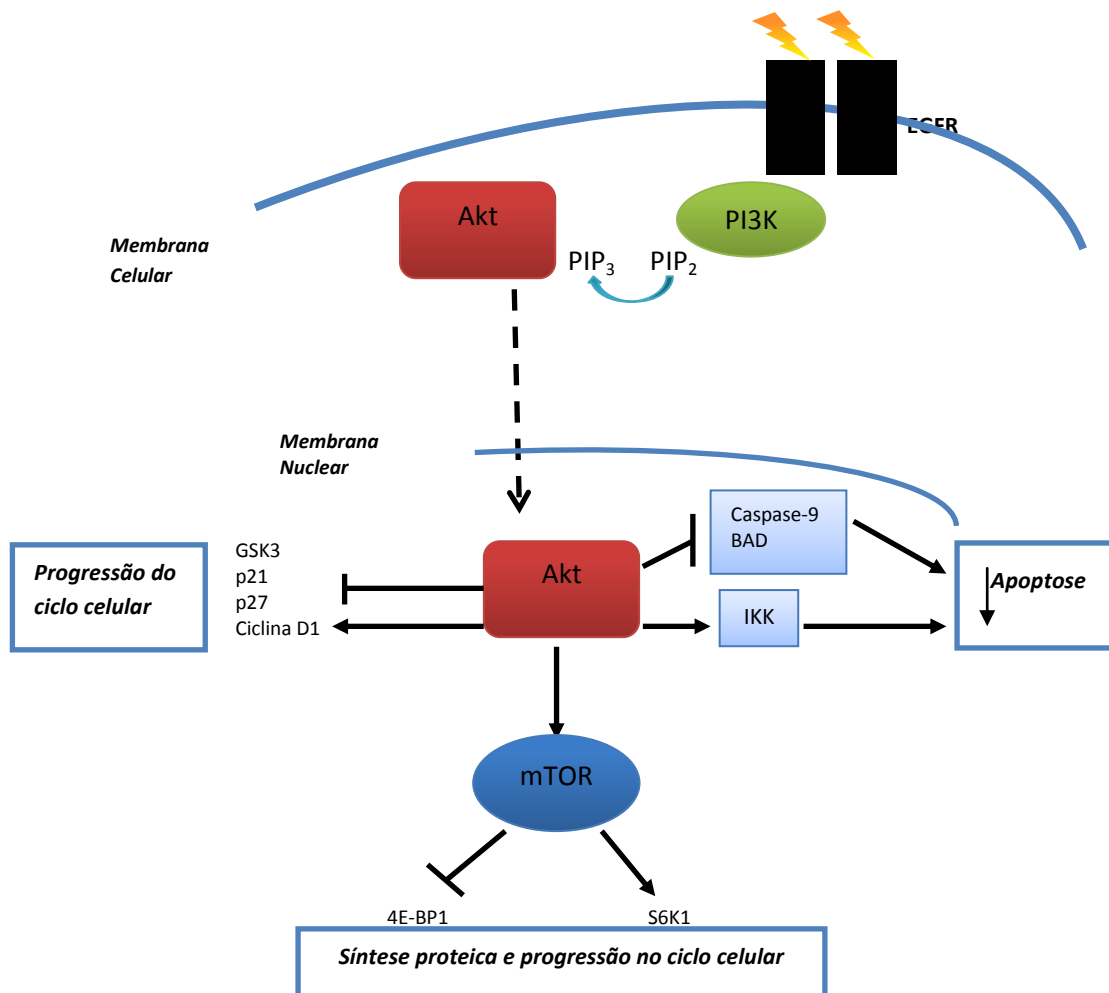


Figura 1.4- Esquema geral da via de sinalização PI3k/Akt/mTOR. A ativação do receptor EGFR resulta no recrutamento da proteína Akt (vermelho) do citoplasma para o núcleo, onde desempenha funções de regulação das vias de sinalização de proliferação, crescimento, sobrevivência e mobilidade celulares por parte da Akt (vermelho). Adaptado de Morgensztern e McLeod, 2005.

1.1.2.2. Via de Sinalização Ras/Raf/MEK/ERK

A via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares (Kolch, 2000). A estimulação do EGFR permite o reconhecimento da proteína citoplasmática GRB2 aos locais de ligação de tirosina fosfato existentes no domínio intracelular do receptor. Esta proteína transporta a SOS (*Son of Sevenless*) - fator de troca de GDP em GTP - até à membrana e converte a proteína Ras na sua conformação ativada (Kolch, 2000; Prenzel et al., 2001). Esta conformação estabelece uma ligação de alta afinidade com a proteína Raf causando a sua translocação para a membrana celular, onde desempenha a função de adaptador para as proteínas Raf (Kolch, 2000).

A ativação da proteína Erk é consequência de uma cascata de fosforilações resultantes da ativação da Raf que culmina na regulação dos fatores de transcrição Elk-1 e c-fos, que desempenham uma função importante na progressão do ciclo celular (Prenzel et al., 2001).

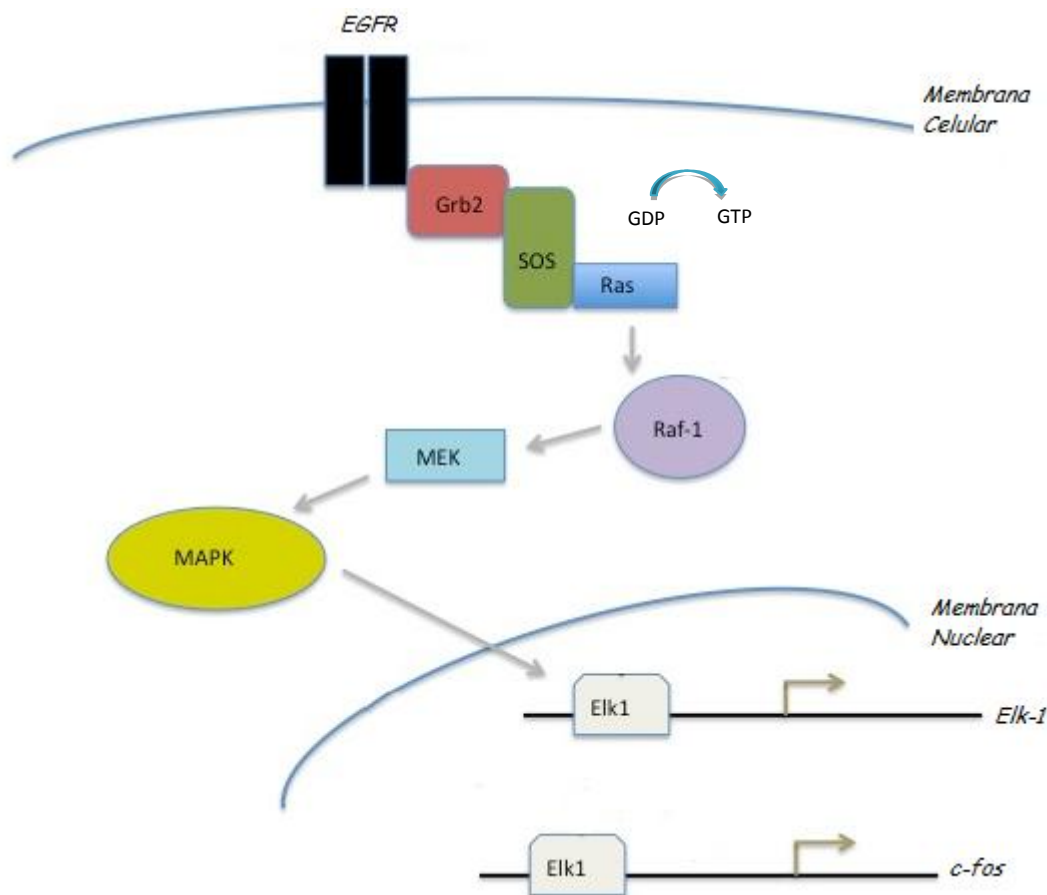


Figura 1.5– Esquema geral da via de sinalização Ras/Raf/Mek/Erk. A ativação do recetor EGFR permite o reconhecimento da proteína Grb2 (vermelho) aos low4ais de tirosina quinase e, através de uma cascada de sinalização intracelular, ativa o fator de transcrição Elk1 (branco) que regula a progressão do ciclo celular Adaptado de Kolch, 2000 e Prenzel et al., 2001.

1.2. EGFR e o cancro

O cancro do pulmão é o maior responsável pelas mortes por cancro registado em todo o mundo, sendo o tipo de cancro com maior prevalência a seguir ao cancro da mama, em mulheres, e ao cancro da próstata, nos homens (Alberg and Samet, 2012; Dempke et al., 2010). Este tipo de cancro tem origem em tumores ao nível do epitélio respiratório - brônquios, bronquíolos e alvéolos - devido à exposição ao tabagismo ou de agentes carcinogénicos presentes no ambiente, tais como compostos de arsénico, amianto ou níquel (Alberg and Samet, 2012).

As neoplasias pulmonares dividem-se em dois grupos histológicos: a) Cancro do pulmão de pequenas células (CPPC) e b) Cancro do pulmão de não-pequenas células (CPNPC). Este último é o tipo histológico mais frequente, representando aproximadamente 80% de todos os casos relatados de cancro do pulmão. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro do pulmão é dividido em 4 subtipos histológicos: carcinoma de células escamosas (30%), adenocarcinoma (50%),

carcinoma de grandes células e carcinoma de pequenas células (20%) (Y. Wang et al., 2012). Os primeiros 3 tipos histológicos são frequentemente agrupados e designados por cancro do pulmão de não-pequenas células devido ao elevado grau de semelhança no que diz respeito ao tratamento e ao estadiamento.

O EGFR é encontrado em quantidades que variam entre 2×10^4 a 2×10^5 recetores por célula. A sua sobreexpressão em valores superiores 10^6 tem sido descrita em vários tipos de cancro e está largamente associada com um prognóstico reservado da doença (Brandt et al., 2006).

A maioria dos casos de cancro de pulmão é diagnosticada numa fase adiantada da doença (estádio IIIB e IV). (Doebele et al., 2010; Martin et al., 2006; Provencio et al., 2011).

1.2.1. Estádios do cancro do pulmão de não-pequenas células.

O estadiamento do cancro do pulmão é utilizado para auxiliar o clínico no planeamento e estratégia do tratamento bem como para determinar um prognóstico da doença. Esta análise permite determinar o grau de dispersão e localização do tumor. O estadiamento é determinado de acordo com as características das células tumorais analisadas através de diferentes exames, tais como: a) exames físicos, b) exames imagiológicos, c) testes laboratoriais, d) relatórios patológicos e e) relatórios cirúrgicos.

A tabela 1.1 descreve a informação obtida através dos diferentes exames de determinação do estadiamento das células tumorais de cancro do pulmão de não-pequenas células.

Tabela 1.1-Sumarização dos diferentes exames utilizados para determinar as características das células tumorais e definir, assim, o estadiamento do tumor. Adaptado de (American Cancer Society, 2012a).

Exames físicos	Determinação da localização e tamanho do tumor, bem como a dispersão do cancro para gânglios linfáticos e/ou outros órgãos. Estes exames incluem a auscultação.
Exames Imagiológicos	Determinação da localização, tamanho e dispersão do tumor através de imagens produzidas por raio-X, tomografia computacional e ressonância magnética.
Testes laboratoriais	Testes realizados com amostras de sangue, urina e outros fluídos e tecidos recolhidos no corpo do indivíduo.
Relatórios patológicos	Análise ao microscópio que permite obter o tamanho e o crescimento tumoral, o tipo de células e o grau semelhança das células tumorais com as células normais. Estes exames permitem a confirmação do diagnóstico de cancro e determinam o estadiamento do mesmo.
Cirurgia	A recolha de material biológico durante a cirurgia permite determinar o tamanho e o aspeto do tumor, além de possibilitar uma análise ao grau de afetação dos gânglios linfáticos e dos pulmões.

O sistema TNM é atualmente utilizado pelos médicos oncologistas para classificar o crescimento e extensão do CPNPC. Este sistema de classificação foi desenvolvido pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e utiliza as letras T, N e M para descrever as características do tumor: i) **T** indica o tamanho do tumor primário e se aumentou para as áreas adjacentes; ii) **N** descreve a invasão do cancro para os nódulos linfáticos próximos ao local do tumor primário; iii) **M** indica se o cancro metastizou para outros órgãos do corpo. A seguir à classificação primária pelas letras TNM, surge um número ou letra para distinguir o estágio do tumor com mais detalhe: os números de 0 a 4 indicam a severidade e a X indica que não é possível obter uma informação exata. A tabela 1.2 sumariza os estádios do CPNPC classificados pela AJCC:

Tabela 1.2 - Estádios e respetiva descrição do CPNPC de acordo com a classificação American Joint Committee on Cancer (AJCC). Adaptado de (American Cancer Society, 2012b).

Tumor (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado, ou as células cancerígenas foram detetadas na expetoração, porém nenhum tumor pode ser encontrado.
Tis	Apresenta uma das seguintes características: <ul style="list-style-type: none"> • O cancro é apenas detetado nas camadas superficiais das células que revestem as vias aéreas; • Sem invasão de tecidos mais profundos do pulmão. Também conhecido por <i>carcinoma in situ</i>;
T0	Sem tumor primário.
T1	Tumor com ≤ 3 cm, rodeado pelo pulmão ou pela pleura visceral e não afeta os ramos principais dos brônquios.
T1a	Tumor ≤ 2 cm.
T1b	Tumor >2 cm e ≤ 3 cm.
T2	Tumor > 3 cm e < 7 cm, ou com as seguintes características: <ul style="list-style-type: none"> • Invasão da pleura visceral, envolve o brônquio principal com < 2 cm de distância distal à carina; • Entupimento das vias aéreas sem causar pneumonia ou colapso dos pulmões.
T2a	Tumor > 3 cm e ≤ 5 cm.
T2b	Tumor > 5 cm e ≤ 7 cm.
T3	Apresenta uma das seguintes características: <ul style="list-style-type: none"> • Tumor ≥ 3 cm; • Extensão até à parede torácica, diafragma, pleura mediastinal ou até ao pericárdio parietal; • Invasão dos brônquios principais e encontra-se próximo (< 2 cm) da carina, porém não a invade; • Extensão até às vias aéreas, o suficiente para causar o colapso de um pulmão ou pneumonia; • Nódulos linfáticos estão mais separados em diferentes lóbulos do mesmo pulmão.
Nódulos Linfáticos (N)	
NX	Não é possível aceder aos nódulos linfáticos próximo do tumor.
N0	Não há extensão para os nódulos linfáticos próximos do tumor.
N1	Extensão do cancro para os nódulos linfáticos dentro do pulmão e/ou à volta dos nódulos linfáticos hilares. Os nódulos linfáticos afetados encontram-se no mesmo lado do tumor primário.
N2	Extensão do cancro para os nódulos linfáticos que envolvem a carina ou no espaço mediastino.

N3	Os nódulos linfáticos afetados encontram-se no mesmo lado do tumor primário. Extensão do cancro para os nódulos linfáticos próximos à clavícula, em ambos os lados, e/ou extensão para os nódulos linfáticos hilares ou mediastinais no local oposto ao tumor primário.
Metástases (M)	
M0	Sem extensão para áreas ou órgãos distantes.
M1	Apresenta uma das seguintes características: <ul style="list-style-type: none"> • O cancro invadiu o outro pulmão; • Efusão pleural maligna; • Efusão pericárdica maligna.
M1b	Extensão para nódulos linfáticos distantes ou para outros órgãos.

Após a determinação da categoria dos estádios T, N ou M, esta informação é agrupada de acordo com o estágio 0, I, II, III ou IV. Alguns destes estádios são subdivididos em A e B. Estes estádios distinguem os cancros que apresentam prognósticos semelhantes e, por essa razão, são tratados de maneira semelhante. Os pacientes com estádios mais baixos têm um prognóstico melhor. A tabela 1.3 sumariza os estádios agrupados do CPNPC:

Tabela 1.3 – Estádios agrupados do CPNPC de acordo com a classificação do AmericanJointCommitteonCancer (AJCC). Adaptado de (American Cancer Society, 2012b).

		Taxa de Sobrevivência a 5 anos
Cancro Oculto	TX, N0 e M0	-
Estádio 0	Tis, N0 e M0	-
Estádio IA	T1a/T1b, N0, M0	49%
Estádio IB	T2a, N0, M0	45%
Estádio IIA	T1a/T1b, N1, M0 ou T2a, N1, M0 ou T2b, N0, M0	30%
Estádio IIB	T2b, N1, M0 ou T3, N0, M0	31%
Estádio IIIA	T1 a T3, N2, M0 ou T3, N1, M0 ou T4, N1/N0, M0	14%
Estádio IIIB	Qualquer T, N3, M0 ou T4, N2, M0	5%
Estádio IV	Qualquer T, qualquer N, M1a ou qualquer T, qualquer N, M1b	1%

1.2.2. Tratamento para o cancro do pulmão de não-pequenas células.

No geral, existem 4 tipos diferentes de tratamento para o cancro do pulmão: i) cirurgia; ii) radioterapia; iii) quimioterapia e; iv) terapia personalizada. A escolha do tratamento de doentes com CPNPC é decidida em função do estadiamento e extensão do tumor, bem como do estado de saúde do paciente e a condição que os pulmões apresentam para desempenhar as suas funções. As características das células tumorais são também um fator influente para o tratamento, como se verifica em doentes que apresentam mutações somáticas para o gene EGFR. A tabela 1.4 sumariza a opção de tratamento em função do estágio do CPNPC:

Tabela 1.4- Sumarização do tratamento em função do estadiamento do CPNPC. Adaptado de (National Cancer Institute, 2012).

Estádio (classificação TNM)		Opções de tratamento
Tumor oculto		Cirurgia
0		Cirurgia Terapia Endobronquial
IA/IB		Cirurgia Quimioterapia Neoadjuvante Quimioterapia Adjuvante Radioterapia
IIIA	Tumores ressecáveis ou já ressecados	Cirurgia Terapia neoadjuvante Terapia adjuvante
	Tumores não ressecáveis	Radioterapia Quimioradioterapia
	Tumores no ápice pulmonar	Apenas radioterapia Quimioterapia em conjunto com radioterapia e cirurgia Apenas cirurgia
	Tumores que invadem a caixa torácica	Cirurgia Cirurgia e radioterapia Apenas radioterapia Quimioterapia em conjunto com radioterapia e/ou cirurgia
IIIB		Quimioterapia em conjunto ou sequencial com quimioterapia e radioterapia Quimioterapia seguida de cirurgia Radioterapia
IV		Quimioterapia combinada com bevacizumab ou cetuximab Inibidores da tirosina quinase Inibidores EML4-ALK em pacientes com translocações EML4-ALK Ressecção cirúrgica de metástases cerebrais isoladas Terapia por laser ou radioterapia intersticial Cirurgia por radiação estereotáctica

1.2.2.1. Cirurgia

O objetivo deste tratamento é remover o tecido tumoral e os nódulos linfáticos próximos do local do tumor. A cirurgia é sobretudo aplicada nos estádios I e II, onde que as células tumorais ainda não se espalharam para outras partes do corpo, e quando o estado de saúde geral do doente assim o permite. A extensão da operação depende do tamanho e da localização do tumor, bem como dos nódulos linfáticos afetados, pelo que se podem realizar diferentes procedimentos tais como: a) segmentectomia, - apenas um segmento do pulmão é removido; b) lobotomia pulmonar – remoção de um lobo pulmonar por inteiro; c) pneumectomia, - remoção completa de um dos pulmões (American Cancer Society, 2012d).

A cirurgia é a opção de tratamento *standard* aplicada em doentes com tumores operáveis, sendo normalmente adjuvada com quimioterapia à base de compostos de platina.

1.2.2.2. Quimioterapia

O uso da quimioterapia para o tratamento do CPNPC permite matar as células tumorais, bem como impedir a sua reprodução ou diminuir o seu crescimento. Os compostos utilizados neste tipo de tratamento são diversos e podem ser utilizados como tratamento adjuvante após um tratamento com recurso a cirurgia ou radioterapia. O tratamento à base de compostos de platina, tais como a carboplatina (Paraplatin, Bristol-Meyers Squibb) ou paclitaxel (Taxol, Bristol-Meyers Squibb) é atualmente utilizado como primeira linha de tratamento para doentes com CPNPC (Doebele et al., 2010; Martin et al., 2006; Mok et al., 2009; Secretariat, 2010), administrados de forma cíclica em períodos de toma seguidos de períodos de interrupção do fármaco. Este tratamento é um tipo de terapia sistémica uma vez que afeta todas as células do pacientes e não apenas as células tumorais, o que implica uma série de efeitos secundários indesejados tais como a perda de cabelo ou fadiga. O tratamento com quimioterapia apresenta um ligeiro aumento na sobrevivência dos pacientes, à custa de um aumento considerável da citotoxicidade para o organismo (Sharma et al., 2007). A quimioterapia convencional à base de compostos de platina atingiu, aparentemente, um limite no que diz respeito à melhoria na eficácia do tratamento, aliado ao facto de que os seus resultados são considerados algo insatisfatórios, uma vez que a média de sobrevivência é de cerca de 10 meses (Dienstmann et al., 2011; Jackman et al., 2006; Lynch et al., 2004; Martin et al., 2006).

1.2.2.3. Radioterapia

Este tratamento consiste na utilização de um feixe de raio-X, incidido diretamente sobre o local do tumor, que promove a destruição das células tumorais e das células normais do paciente. Por esta razão, esta opção apenas pode ser considerada em casos de CPNPC precoces, onde o cancro ainda não se espalhou para outras regiões do organismo.

A radioterapia pode ser utilizada antes de proceder a uma intervenção cirúrgica para reduzir o tamanho do tumor, ou após a cirurgia de um tumor em estágio I e II, como terapia adjuvante. Em doentes com tumores no estágio IIIA e B, este tratamento é aplicado em conjunto com a quimioterapia à base de compostos de platina. No estágio IV, a radioterapia é utilizada como cuidado paliativo (American Cancer Society, 2012c).

1.2.2.4. Terapia Personalizada

Os fármacos gefitinib (Iressa, AstraZeneca) e erlotinib (Tarceva; OSI Pharmaceuticals, Genentech) são inibidores reversíveis com alta afinidade e especificidade para o local de ligação do ATP do domínio de tirosina quinase do EGFR. Estes compostos foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2003 e 2004, respetivamente, para o uso em doentes com NSCLC que não respondem à terapia convencional por quimioterapia (Martin et al., 2006; Pan et al., 2005; Sharma et al., 2007). Estes fármacos são ambos inibidores reversíveis da TK do EGFR, que foram desenhados para atuar como inibidores competitivos do local de ligação do ATP presente no domínio da tirosina quinase, inibindo deste modo a autofosforilação verificada em EGFR mutados (Takimoto and Calvo, 2008). A ação destes fármacos provoca a inibição das vias de sinalização intracelulares, em particular a via de sinalização da proliferação celular (Ras/Raf/MEK/ERK), que estão constitutivamente ativadas devido à presença de mutações no domínio tirosina quinase do gene EGFR. Cerca de 90% dos doentes com mutações ao nível do exão 19 ou ao nível do exão 21 têm sensibilidade para o gefitinib (Jackman et al., 2006; Sharma et al., 2007).

Pacientes com mutações no gene EGFR tratados com gefitinib têm um aumento significativo na taxa de resposta, tempo livre de progressão da doença, e sobrevivência quando comparados com os pacientes com quimioterapia sistemática de segunda linha. Os resultados verificados são substancialmente diferentes daqueles obtidos pela quimioterapia sistemática. O tempo médio de progressão da doença e sobrevivência dos pacientes são em média entre 8 a 10, enquanto os pacientes administrados com o inibidor da tirosina cinase gefitinib têm uma média de 2 anos (Dienstmann et al., 2011; Jackman et al., 2006; Jänne et al., 2006; Qin et al., 2011).

1.3. Diagnóstico Molecular para a deteção de mutações somáticas no gene EGFR

A identificação de mutações no gene EGFR de doentes com CPNPC tornou-se num passo preponderante para a decisão sobre o tratamento a administrar, em particular para doentes com mutações no domínio da tirosina quinase (exões 18-21). A deteção de mutações somáticas implica a extração de biopsias para a genotipagem do DNA. Para obter material suficiente para os ensaios laboratoriais é necessário isolar uma quantidade considerável de amostra, suficiente para executar diversos ensaios laboratoriais - análise histológica ou análise de biomarcadores (número de cópias do gene EGFR, sobreexpressão do EGFR e rastreamento de mutações somáticas do gene EGFR). A

procura de diagnósticos cada vez menos invasivos dificulta o processo de obtenção de amostras e monitorização do estado da doença, sendo que a amostragem a biopsias endobrônquicas, punção aspirativa por agulha fina e amostras citológicas tais como lavados bronco-alveolares ou punções aspirativas por agulha fina. Estas amostras contêm uma pequena fração de células tumorais - em média menos de 150 células tumorais por amostra - em mistura com células com DNA *wild-type* (Asano et al., 2006; Molina-Vila et al., 2008).

1.3.1. Mutações somáticas no gene EGFR

A incidência de mutações somáticas no gene EGFR em doentes com cancro do pulmão de não-pequenas células é de 30-50% dos doentes asiáticos, 10-16% em doentes norte-americanos e 8-13% em doentes europeus com histologia classificada em adenocarcinoma e não-fumadores (Bacchi et al., 2012; Sharma et al., 2007). As mutações neste gene afetam os exões 18-21 que fazem parte do domínio tirosina quinase do gene EGFR, codificado pelos exões 18-24 (Sharma et al., 2007; Sihto et al., 2005). O domínio da tirosina quinase é responsável pelo desencadeamento do mecanismo de sinalização do recetor EGFR através da ligação do ATP, que possui alta afinidade para com os resíduos de tirosina presentes neste domínio (Gu et al., 2007; Oda et al., 2005; Voldborg et al., 1997). As mutações neste domínio aumentam a atividade do recetor EGFR, conduzindo a uma hiperativação dos processos *downstream* para as vias de sobrevivência celulares. Este carácter oncogénico do gene EGFR confere uma ativação constitutiva das vias metabólicas uma vez que a ativação do domínio tirosina quinase torna-se independente do ligando para induzir a dimerização do recetor (Voldborg et al., 1997).

Aproximadamente 90% das mutações estão localizadas nos exões 19 e 21 do gene EGFR (Dempke et al., 2010; Doebele et al., 2010; Jänne et al., 2006). As deleções *in-frame* de 15 pares de base, que envolvem os aminoácidos ELREA do exão 19, representam 45% das mutações de doentes com CPNPC. Mutações neste exão envolvem sobretudo deleções de 9, 12, 15, 18 ou 24 pares de base. Mutações pontuais são verificadas ao nível do exão 21 no nucleótido 2573, com substituição de uma arginina por uma leucina no codão 858 (CTG→CGG, L858R), representado cerca de 45% das mutações no gene EGFR (Eberhard et al., 2008; Sanders et al., 2008; Sihto et al., 2005; Voldborg et al., 1997). Os restantes 10% de mutações estão distribuídos pelos exões 18, 19, 20 e 21, representadas na tabela 1.5:

Tabela 1.5 - Mutações presentes nos exões 18, 19, 20 e 21 do gene EGFR. As mutações del E746_A750 e L858R representam cerca de 90% das mutações neste gene e estão associadas com uma sensibilidade para os inibidores reversíveis da tirosina quinase do gene EGFR. Adaptado de (Astrazeneca, n.d.).

Exão 18	Exão 19	Exão 20	Exão 21
G719C	del E746_A750	T790M	L858R
G719S	delE746_T751>V delE746_T751>A	D770_N771 (ins NPG)	L861Q
G719A	del E746_T751 delL747_A750>P del L747_E749 del L747_P753>Q del L747_P753>S del L747_S752 del L747_T751>P del L747_T751 del S752_I759	D770_N771 (ins SVQ) D770_N771 (insG) S768I	

As mutações nos exões 18, 19 e 21 conferem uma sensibilidade aos inibidores de tirosina quinase gefitinib e erlotinib (Sharma et al., 2007; Sihto et al., 2005; Voldborg et al., 1997), onde cerca de 50-80% dos pacientes apresentam uma resposta positiva. A deleção E746_A750, de 15 pares de base, responde melhor ao gefitinib do que ao erlotinib, enquanto as mutações pontual no exão 21 apresenta maior sensibilidade para o erlotinib (Sharma et al., 2007).

No entanto, nem todas as mutações no domínio de tirosina quinase conferem sensibilidade do recetor aos TKI. Na maioria dos casos, as mutações no exão 20 estão associadas com resistência primária a estes fármacos, em particular na presença da mutação T790M (Godin-Heymann et al., 2008; Ma et al., 2011; Sharma et al., 2007). Esta mutação confere cerca de 100 vezes menos sensibilidade para estes inibidores, em comparação com outras mutações somáticas no gene EGFR. Cerca de 15-30% dos pacientes apresentam mutações nos exões 12 e 13 do gene KRAS, que na sua maioria verificam-se em doentes fumadores, ao contrario no que se regista em doentes com mutações ao nível do gene EGFR. As mutações neste gene estão também associadas à resistência primária aos TKI uma vez que que a sua incidência verifica-se, na maioria dos casos, em doentes com o gene EGFR *wild-type*, o que não permite esclarecer se a falta de sensibilidade para os inibidores é devida à presença de mutações no gene KRAS ou devido à ausência de mutações no gene EGFR. A ausência do supressor de tumores PTEN, presente em 70% dos pacientes com NSCLC, também constitui um fator que confere resistência aos TKI. Esta proteína exerce um efeito indireto sobre a atividade da Akt, onde esta regulação é essencial para que o recetor EGFR adquira sensibilidade para os TKI. Outros mecanismos - amplificação do alelo mutante do gene EGFR, a hiperativação das vias de sinalização *downstream*, ou mudanças celulares - provocam a atenuação dos efeitos e a biodisponibilidade dos fármacos (Sharma et al., 2007).

Apesar das respostas positivas dos TKI, descritas na seção 1.3.3, o desenvolvimento de resistência a estes fármacos ocorre após 6 a 12 meses do início da terapia, o que impede a prolongação da sobrevivência dos doentes.

1.3.2. Métodos para a detecção de mutações presentes no gene EGFR

A detecção de mutações no gene EGFR é um fator determinante para a escolha da terapia baseada em inibidores da tirosina quinase. Atualmente, estão disponíveis diversas técnicas que permitem avaliar o genótipo das células tumorais, através de metodologias que desempenham o rastreio das mutações ou detetam mutações específicas. Na tabela 1.7 estão listados alguns dos diferentes métodos de detecção utilizados em amostras de FFPE:

Tabela 1.6 - Sumário de algumas das técnicas utilizadas atualmente para detetar mutações presentes no gene EGFR. Adaptado de (Astrazeneca, n.d.).

Método	Limite de detecção (% mínima de alelos mutados num background com alelos wild-type)	Sensibilidade Analítica (% de mutações detetadas)
ARMS	Aproximadamente 1%	90-95% (Apenas deteta mutações específicas)
PNA/LNA Clamp	Aproximadamente 1%	90-95% (Apenas deteta mutações específicas)
Sequenciação/PCR	Aproximadamente 15-20%	>99% (Este método permite detetar novas mutações não descritas)
Pirosequenciação	Aproximadamente 1-10%	95% (Este método permite detetar mutações específicas e desconhecidas. Frequentemente utilizada em conjunto com a metodologia de análise de fragmentos)
Análise de Fragmentos	Aproximadamente 5%	>99% (Válido apenas para deleções no exão 19 e inserções no exão 20)

Estas técnicas possuem aspetos vantajosos e desvantajosos inerentes a cada uma das metodologias, que se revelam importantes para a escolha da tecnologia a adotar. No que diz respeito às técnicas de rastreio de mutações (Exemplo: Sequenciação de DNA) têm como vantagens: a) possibilidade de detecção de mutações desconhecidas ou de todas as variações presentes no gene; b) equipamento disponível em muitos laboratórios. Como desvantagens, este método revela: a) menor sensibilidade em relação aos métodos de detecção de mutações específicas (deteta mutações presentes em amostras heterogêneas com teor 10-30% de gDNA mutado); b) pessoal especializado; c) processo demoroso e; d) é necessário uma grande quantidade de amostra (Astrazeneca, n.d.).

Nos métodos de detecção de mutações específicas, no qual se destaca o método de ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*), as principais vantagens residem no facto de: a) Menor tempo despendido; b) A sensibilidade é maior permitindo detetar teores <1% de DNA mutado são detetados em amostras heterogêneas. As desvantagens são: a) todas as mutações que não são alvo desta técnica não são detetadas; b) os custos de execução podem ser mais elevados (Astrazeneca, n.d.).

Atualmente, a metodologia mais recorrente é a sequenciação direta pelo método de Sanger para avaliar os exões 18-21 do gene EGFR a partir DNA isolado de células cancerígenas (Pan et al., 2005).

1.3.3. Inibidores da Tirosina Quinase como primeira linha do tratamento do CPNPC

O potencial dos inibidores da tirosina quinase como primeira linha do tratamento de doentes com CPNPC face ao tratamento convencional por quimioterapia tem sido avaliado na última década através de vários estudos randomizados (tabela 1.8).

Tabela 1.7 – Terapia convencional vs Terapia com TKI. Ensaio clínico de comparação dos parâmetros taxa de resposta objetiva(ORR), tempo de sobrevivência livre de progressão da doença (PFS) e sobrevida(OS) em relação ao tratamento convencional por quimioterapia face ao tratamento com recurso a TKI, em doentes com mutações no gene EGFR (American Cancer Society, 2012d).

Estudo (Autor)	Regime	ORR (meses)	PFS (meses)	OS (meses)
First-signal Lee <i>et al.</i> , 2009 Kuet <i>et al.</i> , 2011	Cisplatina + gemcitabina vs gefitinib	38 vs 85	6,7 vs 8,4	26,5 vs 30,6
NEJ 002 Maemondo <i>et al.</i> , 2010	Carboplatina + paclitaxel vs gefitinib	31 vs 74	5,4 vs 10,8	23,6 vs 30,5
WJTOG 3405 Mitsudomi <i>et al.</i> , 2010	Cisplatina + docetaxel vs gefitinib	32 vs 62	6,3 vs 9,5	Não disponível
IPASS Fukuoka <i>et al.</i> , 2011 Mok, 2011	Carboplatina + paclitaxel vs gefitinib	47 vs 71	6,3 vs 13,1	21,9 vs 21,6
OPTIMAL Zhou <i>et al.</i> , 2011	Carboplatina + gemcitabina vs erlotinib	36 vs 83	4,6 vs 13,1	Não disponível
EURTAC Rosselet <i>et al.</i> , 2012	Platina + gemcitabina ou platina + docetaxel vs erlotinib	15 vs 58	5,2 vs 9,7	19,5 vs 19,3

Todos os estudos desenvolvidos até à data demonstram que os TKI, quando comparados com o tratamento convencional por quimioterapia, apresentam maior ORR e uma PFS mais prolongada. Estes dados demonstram que os TKI são tão ou mais eficazes do que o tratamento convencional por quimioterapia combinada.

No anexo 1 encontra-se os resultados mais detalhados obtidos no estudo IPASS, realizado entre 2006 e 2007.

1.4. Objetivo

Os principais objetivos deste trabalho consistiram no desenvolvimento de um protocolo laboratorial para a pesquisa de mutações no gene EGFR, relacionadas com o tipo de resposta terapêutica em indivíduos com cancro do pulmão de não-pequenas células, e a implementação de uma rotina laboratorial da análise molecular do gene EGFR tendo como base a legislação portuguesa e documentação da qualidade (OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing, norma ISO 15189 *Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence e* diretrizes de boas práticas em laboratórios de genética humana).

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Equipamento

- MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA)
- UV-Vis Spectrophotometer Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EUA)
- Thermal Cycler Tgradient (Biometra, Alemanha)
- GelDoc XR (Bio-Rad, EUA)
- 3730XL DNA Analyser (Applied Biosystems, EUA)
- Câmara de fluxo laminar SPACE (PBI, Itália)
- Smart2Pure Ultrapure water systems (TKA, Alemanha)
- Series 90 Mid-Range Power Supply (Thermo Scientific, EUA)
- Centrífuga Galaxy 16DH (VWR, EUA)
- VortexIKA® MS 3 digital (IKA, Alemanha)

2.1.2. Reagentes Químicos

Tabela 2.1– Reagentes químicos utilizados e respectivos fabricantes.

Reagente	Fabricante
Agarose	Lonza
Ácido acético glacial	Panreac
Ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA)	VWR, EUA
FTA Purification Reagent 500 mL	Whatman, Reino Unido
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X in water, 0,5 mL	Biotium
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, EUA
H₂O Nuclease Free	Cleaver Scientific Ltd
ROX 500	Applied Biosystems, EUA
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	AppliChem
Xileno	Analab

2.1.3. Soluções

Solução de TAE (1 L)	242g de TRIS 57,1mL ácido acético glacial 18,6g EDTA Perfazer o volume com ddH ₂ O.
Solução de ExoFast (1000 µL)	2,5µL Exonuclease I (20U/µL) 25µL FastAP (1U/µL) 972,5µL ddH ₂ O
Solução de PBS (1 L)	8g NaCl 0,2g KCl 1,44g Na ₂ HPO ₄ 0,24g KH ₂ PO ₄ Perfazer o volume com ddH ₂ O. Ajudar o pH a 7,4. Esterilizar durante 20 minutos a 120°.

2.1.4. Material Biológico

2.1.4.1. Oligonucleótidos

Tabela 2.2 - Sequências dos oligonucleótidos utilizados para amplificar as regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR, através da técnica de PCR Convencional.

Nome	Tamanho do amplicão	Sequência Nucleotídica (5' → 3')	Modificação	Temp. melting
Exão18_Fwd	248 pb	Fwd - 5' - GGCACTGCTTTCCAGCAT - 3'	-	Tm - 60°C
Exão18_Rev		Rev - 5' - TCTCATGGTCTGGTGGGG - 3'		Tm - 60°C
Exão 19_Fwd	230 bp	Fwd - 5' - CATGTGGCACCATCTCACA - 3'	-	Tm - 60°C
Exão19_Rev		Rev - 5' - TTTCTCATGTCTGGCAGCTG - 3'		Tm - 60°C
Exão20_Fwd	392 bp	Fwd - 5' - TGAAACTCAAGATCGCATTCA - 3'	-	Tm - 60°C
Exão20_Rev		Rev - 5' - GAGTTTGCCATGGGGATATG - 3'		Tm - 60°C
Exão21_Fwd	372 bp	Fwd - 5' - AGCCATAAGTCCTCGACGTG - 3'	-	Tm - 60°C
Exão21_Rev		Rev - 5' - TAACACATGCAGGGGAGGAT - 3'		Tm - 60°C
6-FAM-Exão 19_Fwd	-	Fwd-5' - GGCACTGCTTTCCAGCAT - 3'	5' - 6-FAM	Tm - 60°C

Tabela 2.3 – Sequências dos oligonucleótidos utilizados para amplificar as regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR, através da técnica de PCR Multiplex.

Nome	Tamanho do amplicão	Sequência Nucleotídica (5' →3')	Temperatura de melting
Exão18_MPX_Fwd	398 pb	Fwd - 5' - TTCCAAATGAGCTGGCAAGT - 3'	Tm - 60°C
Exão18_MPX_Rev		Rev - 5' - TCCCAAACACTCAGTGAAACA - 3'	Tm - 59°C
Exão 19_MPX_Fwd	486 bp	Fwd - 5' - CCCCAGCAATATCAGCCTTA - 3'	Tm - 60°C
Exão19_MPX_Rev		Rev - 5' - GCCAGTAATTGCCTGTTTCC - 3'	Tm - 59°C
Exão20_MPX_Fwd	313 bp	Fwd - 5' - CATTTCATGCGTCTTCACCTG - 3'	Tm - 60°C
Exão20_MPX_Rev		Rev - 5' - TTATCTCCCTCCCCGTATC - 3'	Tm - 60°C
Exão21_MPX_Fwd	564 bp	Fwd - 5' - AAGTCAAGCCCAGGTCTCA - 3'	Tm - 60°C
Exão21_MPX_Rev		Rev - 5' - CTCATTCACTGTCCCAGCAA - 3'	Tm - 60°C

2.1.4.2. Biologia Molecular

Enzimas

- SurfHot Taq (STABVIDA, Portugal)
- Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (F-549) (Thermo Scientific, EUA)
- Exonuclease I (Fermentas, Canadá)
- FastAP™ Thermo sensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, Canadá)

DNALadder

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, 250-10,000 bp (Fermentas, Canadá)
- GeneRuler™ 100 bp, DNA Ladder, ready-to-use, 100-1000 bp (Fermentas, Canadá)

Kits de extração de DNA de amostras FFPE

- blackPREP FFPE DNA Kit (Biometra, Alemanha)
- QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies, Wisconsin, EUA).
- Invisorb spin FFPE Tissue kit (3) (Invitex, Alemanha)

2.1.4.3. Amostras

- Amostra de sangue conservada em *Indicating FTA Micro Card*
- gDNA de linha celular MCF10a:
 - EGFR (+/+) Negative Control (0% mutant genotype) (HD-PAR2-003-01-200, Horizon Discovery);
 - EGFR (Δ E746-A750) Positive Control (50% mutant genotype) (Catalogue ID DH 101-010-01-020, Horizon Discovery);
- Amostras em fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPET)

Pequenos cortes de 10 μ m de espessura de material celular FFPE (fixado em formalina e embebido em parafina) foram enviadas para o laboratório no âmbito do programa de controlo de qualidade externa “EQA scheme for *EGFR* mutation testing in non-small cell lung cancer”. Este exercício teve como principal objetivo a avaliação da qualidade da análise dos diagnósticos moleculares dos laboratórios participantes para as mutações presentes no domínio tirosina quinase do gene *EGFR*. Estas amostras têm origem numa linha celular não identificada e simulam amostras de doentes reais com CPNPC. De acordo com a EQMN, 5 laboratórios independentes, cujo nome não foi revelado, foram responsáveis pela genotipagem das amostras.

Das 20 amostras, apenas 3 apresentavam dados relativos ao status fumador/não fumador do paciente, bem como a histologia da amostra e o método de recolha das células. A tabela 2.4 contém a informação fornecida pela EMQN (*The European Molecular Genetics Quality Network*):

Tabela 2.4 - Informação disponibilizada pela EMQN relativa às amostras enviadas para o laboratório. Estas amostras foram fornecidas ao laboratório no âmbito do programa “EQA scheme for *EGFR* mutation testing in non-small cell lung cancer”.

Amostra	Idade	Sexo	% Células tumorais	Status	Histologia	Amostra obtida por:
01	40	Masculino	25%	Não fumador	Adenocarcinoma	Broncoscopia
02	66	Feminino	10 %	-	-	-
03	51	Masculino	5%	-	-	-
04	60	Masculino	0%	Fumador	Adenocarcinoma	CT biópsia
05	66	Feminino	0 %	-	-	-
06	47	Masculino	0 %	-	-	-
07	59	Feminino	0 %	-	-	-
08	44	Feminino	10 %	-	-	-
09	61	Masculino	100 %	-	Adenocarcinoma	Biópsia

10	57	Masculino	25%	-	-	-
11	56	Feminino	0 %	-	-	-
12	39	Feminino	25 %	-	-	-
13	58	Masculino	10 %	-	-	-
14	49	Masculino	0 %	-	-	-
15	55	Masculino	100 %	-	-	-
16	41	Masculino	0 %	-	-	-
17	54	Masculino	0 %	-	-	-
18	46	Masculino	25%	-	-	-
19	38	Feminino	5 %	-	-	-
20	43	Feminino	10 %	-	-	-

O anexo 3 contém informação mais detalhada em relação à participação deste estudo no programa “*Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer*”.

2.2. Métodos

2.2.1.Extração de DNA a partir de *Indicating FTA Micro Card*

O procedimento de extração de DNA a partir de um cartão FTA seguiu o protocolo fornecido pelo fabricante (Whatman, Reino Unido). Foi feito um punch na zona central do círculo contendo a amostra de sangue, e transferiu-se para um tubo *ependorf* 0,2 mL. De seguida foram realizadas 3 lavagens com 150 µL de FTA Reagent (Whatman, Reino Unido), com 5 minutos de intervalo entre cada lavagem, seguido de 3 lavagens com 150 µL de H₂O Nuclease Free (Cleaver Scientific Lda, Reino Unido), também com 5 minutos de intervalo entre cada lavagem. O reagente foi descartado em cada lavagem. Após este procedimento, colocou-se o *ependorf* 0,2mL contendo o punch numa incubadora (Biocenter) durante 10 minutos, a 56 °C, para secar o punch.

Com auxílio de uma lanceta (Normal Safety-Lancet, Sarstedt, Alemanha), foi recolhida uma amostra de sangue e aplicada num *Indicating FTA Micro Card* (Whatman, Reino Unido). A gota de sangue foi aplicada na zona central do círculo do cartão, que é composta por uma matriz que permite a conservação do sangue durante largos períodos de tempo. Após este procedimento, deixou-se secar a gota de sangue durante cerca de duas horas.

Esta amostra de sangue em cartão FTA foi utilizada nos ensaios de otimização dos PCR convencional e multiplex, e também utilizada como controlo positivo nos ensaios das amostras FFPE.

2.2.2. Preparação das soluções de gDNA contendo diferentes teores de gDNA mutado

A partir dos stocks de “*wild-type* EGFR (+/+),” e “EGFR (Δ E746-A750)” foram criadas duas alíquotas contendo, respetivamente: a) 10 μ L do *vial stock* EGFR (+/+), 2,5 ng/ μ L, e b) 5 μ L do vial EGFR (Δ E746-A750), 2,5 ng/ μ L, das quais se preparam soluções compostas por diferentes teores de gDNA com a deleção E746-A750: a) 50% mutação; b) 25% mutação; c) 10% mutação; d) 5% mutação; e) 1% mutação; f) 0% mutação; g) 0,8% mutação; h) 0,5% mutação e i) 0,2% mutação. Estas soluções foram preparadas de acordo com o método de diluições sucessivas, conforme representado na tabela 2.5:

Tabela 2.5 - Preparação das soluções contendo diferentes teores de alelos com mutação presente no exão 19 do gene EGFR. Estas soluções foram preparadas através do método de diluições sucessivas a partir de dois *vials*: a) EGFR (Δ E746-750/+) e b) EGFR (+/+).

Preparação

50% Mutação	10 μ L EGFR(Δ E746-750/+)
25% Mutação	5 μ L EGFR(Δ E746-750/+) + 5 μ L EGFR(Δ E746-750/+)
10% Mutação	4 μ L Solução 25% Mutação + 6 μ L H ₂ O Nuclease Free
5% Mutação	5 μ L Solução 10% Mutação + 5 μ L H ₂ O Nuclease Free
1% Mutação	2 μ L Solução 5% Mutação + 8 μ L H ₂ O Nuclease Free
0,8% Mutação	8 μ L Solução 1% Mutação + 2 μ L H ₂ O Nuclease Free
0,5% Mutação	6,25 μ L Solução 0,8% Mutação + 3,75 μ L H ₂ O Nuclease Free
0,2% Mutação	4 μ L Solução 0,5% Mutação + 6 μ L H ₂ O Nuclease Free
0% Mutação	5 μ L EGFR (+/+)

Foram utilizadas neste estudo duas linhas celulares MCF10a: a) EGFR (Δ E746-A750) *Positive Control* (50% mutant genotype) (Catalogue ID DH 101-010-01-020, Horizon Discovery); b) EGFR (+/+) *Negative Control* (0% mutant genotype) (HD-PAR2-003-01-200, Horizon Discovery). A linha celular EGFR (Δ E746-A750) contém um dos alelos mutados para a deleção E746-A750 do exão 19 do gene EGFR. Estes gDNA padronizados foram fornecidos pela Horizon Discovery sob a forma mutante (heterozigótico) e *wild-type*. A partir destas soluções criaram-se diferentes soluções contendo teores de gDNA mutante e *wild-type* de modo a determinar o limite de deteção do método de sequenciação automática baseada no método de Sanger do sequenciador ABI 3730XL.

Estas linhas celulares foram fornecidas pela Horizon Discovery com o objetivo de determinar o limite de deteção associado às técnicas de sequenciação pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos, e inseriram-se no âmbito do programa “*Evaluation of X-MANTM del E746-A750 Standard in a EGFR Genotyping Assay*”, descrito no anexo 2.

2.2.3.Extração de DNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE)

Foram utilizados três diferentes kits comerciais para extrair DNA de amostras FFPE, com vista à análise do genótipo de 20 amostras de pacientes. Foram testados os seguintes kits: a) *blackPREP FFPE DNA Kit* (Biometra, Alemanha); b) *Invitek Spin FFPE Tissue Kit (3)* (Invitek, Alemanha) e c) *QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit* (Epicentre Biotechnologies, Wisconsin, EUA).

Para as amostras 07 e 10 foram desenvolvidos duas metodologias para aplicar o material celular nos cartões *Indicating FTA micro card*; A amostra 07 foi dissolvida em 100 µL de xileno e incubada durante 1 hora a 56°C. Após a parafina estar completamente dissolvida, a amostra, suspensa em xileno, foi aplicada diretamente num cartão FTA. A extração da amostra 10 foi feita de acordo com o artigo “*DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analysis*”. A parafina foi dissolvida através de várias lavagens com xileno e de seguida foram utilizados diferentes gradientes de etanol para rehidratar as amostras. Após este tratamento as células foram suspensas em 100 µL PBS e aplicadas num cartão *Indicating FTA Micro Card* (Whatman, Reino Unido). Após a aplicação das amostras no cartão, seguiram-se as instruções descritas em 2.2.1 para proceder ao isolamento do DNA.

2.2.4.Amplificação do DNA pela técnica Polymerase Chain Reaction

2.2.4.1. Amplificação do DNA através de PCR convencional

A técnica Polymerase Chain Reaction (PCR) foi utilizada para a amplificação das zonas de interesse dos exões 18 a 21 de todas as amostras utilizadas neste estudo. Esta técnica baseia-se na amplificação exponencial de ácidos nucleicos recorrendo a vários ciclos de temperatura que resultam na replicação de uma sequência alvo. Para tal, utilizaram-se oligonucleótidos (primers) previamente desenhados, representados na tabela 2.6.

A reação de PCR foi preparada num tubo de 0,2 mL, para um volume total de 25 µL:

Tabela 2.6 – Quantidades e concentrações dos reagentes de PCR utilizados para amplificar DNA das várias amostras utilizadas neste estudo. No caso das reações de PCR usadas em punchs de cartões FTA a ausência de um volume de gDNA foi compensado por um aumento do volume de H₂O Nuclease Free usado na reação.

Reagente	Volume (µL)	Concentração Stock
H ₂ O Nuclease Free	12,3	-
PCR Buffer	2,5	10x
MgCl ₂	2	25 mM
dNTP's	1	5 mM
Primer Fwd	1	10 µM
Primer Rev	1	10 µM
Surf Hot TaqDNA Polimerase	0,2	10 U/µL
gDNA	5	-

O protocolo de PCR aplicado consiste numa desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação 94°C durante 30 segundos, 1 minuto a 58°C (*annealing*), e uma temperatura de extensão de 72°C, e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

A análise dos produtos de PCR obtidos foi efetuada de acordo com as condições descritas na seção 2.2.5.

2.2.4.2. Amplificação do DNA através de PCR Multiplex

A técnica de PCR multiplex foi desenvolvida para a amplificação dos exões 18 a 21 do gene EGFR com o objetivo de reduzir o tempo e custos de reação. A tabela 2.7 representa a reação de amplificação otimizada para o PCR multiplex. Utilizou-se o conjunto de primers exemplificados na tabela 2.3 eo programa de PCR foi equivalente ao descrito anteriormente na seção 2.2.4.1.

Tabela 2.7 - Quantidades e concentrações dos reagentes de PCR utilizados para amplificar DNA das várias amostras utilizadas neste estudo. No caso das reações de PCR usadas em punches de cartões FTA a ausência de um volume de gDNA foi compensado por um aumento do volume de H₂O Nuclease Free usado na reação. Este protocolo foi essencialmente aplicado em amostras FFPE.

Reagente	1 x	Concentração stock
H ₂ O Nuclease Free	7,8 µl	-
Phusion® GC Reaction Buffer	4 µl	5x
dNTP's	1µl	5 mM
Primer Fwd	1 µl	10 µM
Primer Rev	1 µl	10 µM
Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (F-549)	0,2 µl	10 U
gDNA	5 µl	-

2.2.5. Eletroforese em Gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose para avaliar a amplificação da reação bem como o tamanho dos produtos obtidos. Usou-se uma percentagem de agarose (Bioron, Alemanha) de 1,5% (massa/volume) preparada em TAE 1x (0,04M Tris-Acetato; 0,01M EDTA; pH 8), com 2% de GelRed (Biotium, EUA) para permitir a visualização das bandas no gel.

O marcador padrão de *DNA GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, 250-10000bp* (Fermentas, Canadá) foi utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos amplificados obtidos.

A separação das bandas em gel de agarose foi realizada durante 30 minutos com uma potência 8,7 V/cm.

2.2.6. Purificação dos Produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada numa fase inicial com 2,5 µL da solução de *ExoFast* em 5 µL de produto PCR. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos, seguido de um período de inativação enzimático por 15 minutos a 85°C. Esta reação foi realizada num termociclador (*MyCycler™ thermal cycler*). O gel de agarose usado para a quantificação foi preparado de acordo com as mesmas condições descritas em 2.2.5.

Em ensaios para a determinação do genótipo do gene EGFR de amostras FFPE alterou-se o método purificação passando a usar o kit comercial *DNA Clean&Concentrator™-5*, seguindo-se as introduções do fabricante.

2.2.7. Quantificação de ácidos nucleicos

A quantificação dos produtos de PCR purificados foi procedido através do gel de agarose por interpolação dos dados respectivos do marcador de peso molecular *GeneRuler™ 1 kb DNALadder, ready-to-use, 250-10000bp* (ThermoScientific, Massachusetts, EUA).

2.2.8. Sequenciação pelo método de Sanger de amostras amplificadas por PCR convencional e multiplex

A determinação da sequência dos produtos de PCR purificados das amostras foi realizada por eletroforese capilar, no sequenciador ABI 3730 XL (Applied Biosystems, EUA). Para tal, preparou-se num tubo de PCR uma reação com: a) *BigDye Terminator (BDT) Mix V3.1*; b) *Primers Forward* ou *Reverse* com uma concentração final de 10 µM c) Produto de PCR purificado; e d) *H₂O Nuclease Free* até perfazer um volume final de 10 µL.

Foi necessário desenvolver dois protocolos distintos para a sequenciação de produtos amplificados por PCR convencional e por PCR Multiplex. As reações de sequenciação estão representadas na tabela 2.8 e 2.9:

Tabela 2.8 – Programa da reação de sequenciação otimizado para sequenciar produtos obtidos por PCR convencional. Esta reação foi desempenhada num termociclador *MyCycler™ ThermalCycler*.

Temperatura	Tempo	Ciclos
96 °C	1 min	1
96 °C	10 seg	
50 °C	6 seg	27
60 °C	4 min	
4 °C	∞	-

Tabela 2.9 - Programa da reação de sequenciação otimizado para sequenciar produtos obtidos por PCR multiplex. Esta reação foi desempenhada num termociclador *MyCycler™ ThermalCycler*.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	30 seg	
50 °C	20sec	60
60°C	4min	
4 °C	∞	-

Após a reação de sequenciação, os fragmentos foram purificados por *Sephadex* para remover o excesso de reagentes de PCR não consumidos, tais como excesso de sais, dNTP's, *buffer* e *primers*.

2.2.9. Determinação do tamanho de deleções/inserções no gene EGFR através de Análise de Fragmentos

A técnica análise de fragmentos foi utilizada para determinar o tamanho das deleções/inserções detetadas por sequenciação de Sanger. Apenas as amostras de gDNA (Δ E746-A750) e as amostras FFPE 01, 03 e 18 foram sujeitas à determinação do tamanho dos produtos de PCR por análise de fragmentos.

O padrão interno Rox 500 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado para obter uma reta de calibração que possibilita a determinação precisa do tamanho dos fragmentos analisados. Uma vez que os produtos de PCR de todos os exões estudados (18-21) têm entre 230bp-393bp, foi utilizado o padrão interno Rox 500, que mede fragmentos entre os 35 bp e 500 bp.

A reação para a análise de fragmentos foi preparada em placa aplicando em cada poço 12 μ L de HiDi Formamide (Applied Biosystems, EUA) + 0,5 μ L de Rox500, ao qual se adicionou 1 μ L de produto de PCR. Esta mistura é de seguida desnaturada a 95°C, durante 3 minutos, numa incubadora (MyCycler, BIO RAD, EUA). A deteção do tamanho dos fragmentos foi determinada através de eletroforese capilar, num sequenciador ABI3730 (Applied Biosystems, EUA).

O fluoróforo 6-FAM (6-Carboxifluoresceína) foi utilizado na extremidade 5' de um primer cuja sequência é idêntica ao primer Forward usado para amplificar o exão 19 do gene EGFR (tabela 2.2, seção 2.1.4.1). Este fluoróforo emite uma radiação de 520 nm, pelo que foi utilizado o filtro D para a deteção do sinal (Biosystems, 2002).

3. Resultados e Discussão

O desenvolvimento e otimização de um protocolo experimental para a detecção de mutações somáticas nas regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR foi elaborado em diferentes etapas, e com recurso a diferentes amostras. Inicialmente, foi otimizado um protocolo para a amplificação por PCR convencional através de amostras de sangue conservado em cartão *Indicating FTA Micro Card*, seguido da consequente sequenciação direta pelo método de Sanger. Este protocolo foi aplicado para comparar o limite de detecção inerente às técnicas de sequenciação direta pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos, com recurso a amostras de gDNA de uma linha celular MCF-10a contendo a mutação $\Delta E746-A750$ ao nível no exão 19.

O protocolo desenvolvido inicialmente serviu de referência para, mais tarde, otimizar um segundo protocolo para a amplificação, por PCR Multiplex, e sequenciação direta de amostras de sangue conservadas em cartão *Indicating FTA Micro Card*.

Com base nestes dois protocolos de amplificação e sequenciação foram analisadas 20 amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) com o objetivo de simular a determinação do genótipo de 20 doentes com CPNPC.

A figura 3.1 esquematiza as etapas elaboradas neste estudo:

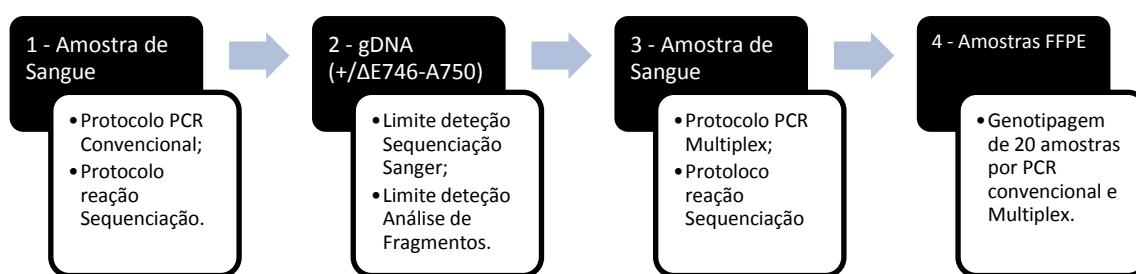


Figura 3.1-Esquemática do processo do desenvolvimento o protocolo para a determinação de mutações somáticas presentes nas regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR.

3.1. Otimização do protocolo de amplificação por PCR convencional dos exões 18-21 do gene EGFR

A otimização do protocolo para a amplificação dos exões 18-21 por PCR simples foi desenvolvida a partir das amostras de sangue conservadas em cartão *Indicating FTA Micro Card*, cuja recolha está descrita em 2.2.1. Inicialmente foi utilizado um protocolo pré-existente nos laboratórios da STAB VIDA que não revelou ser o mais adequado para a amplificação específica de todos os exões em estudo, o que implicou a adaptação de um protocolo de PCR convencional baseado no artigo “*Rapid detection of epidermal growth factor receptor mutations with multiplex PCR and primer extension in lung cancer*”, onde apenas se ajustou a temperatura de annealing para 60°C. Foram utilizados os

primers da tabela 2.2 da seção 2.1.4.1 para amplificar os quatro exões de interesse do gene *EGFR*. Os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose:

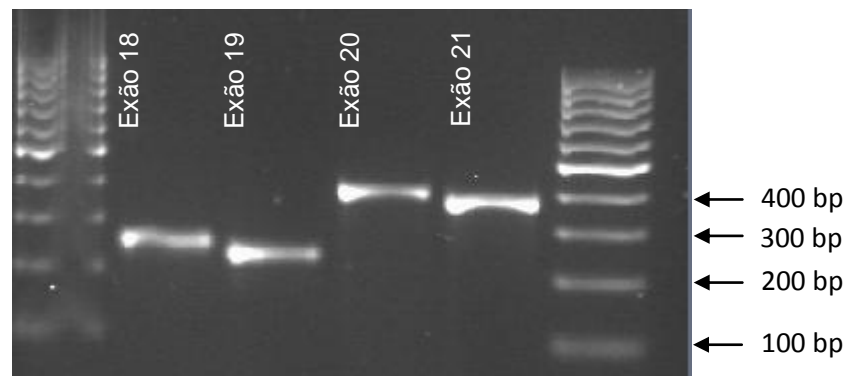


Figura 3.2- Fotografia dos produtos de PCR obtidos através da amplificação das amostras de sangue conservadas em *Indicating FTA Micro Card*. Gel agarose 1,5%, em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm.

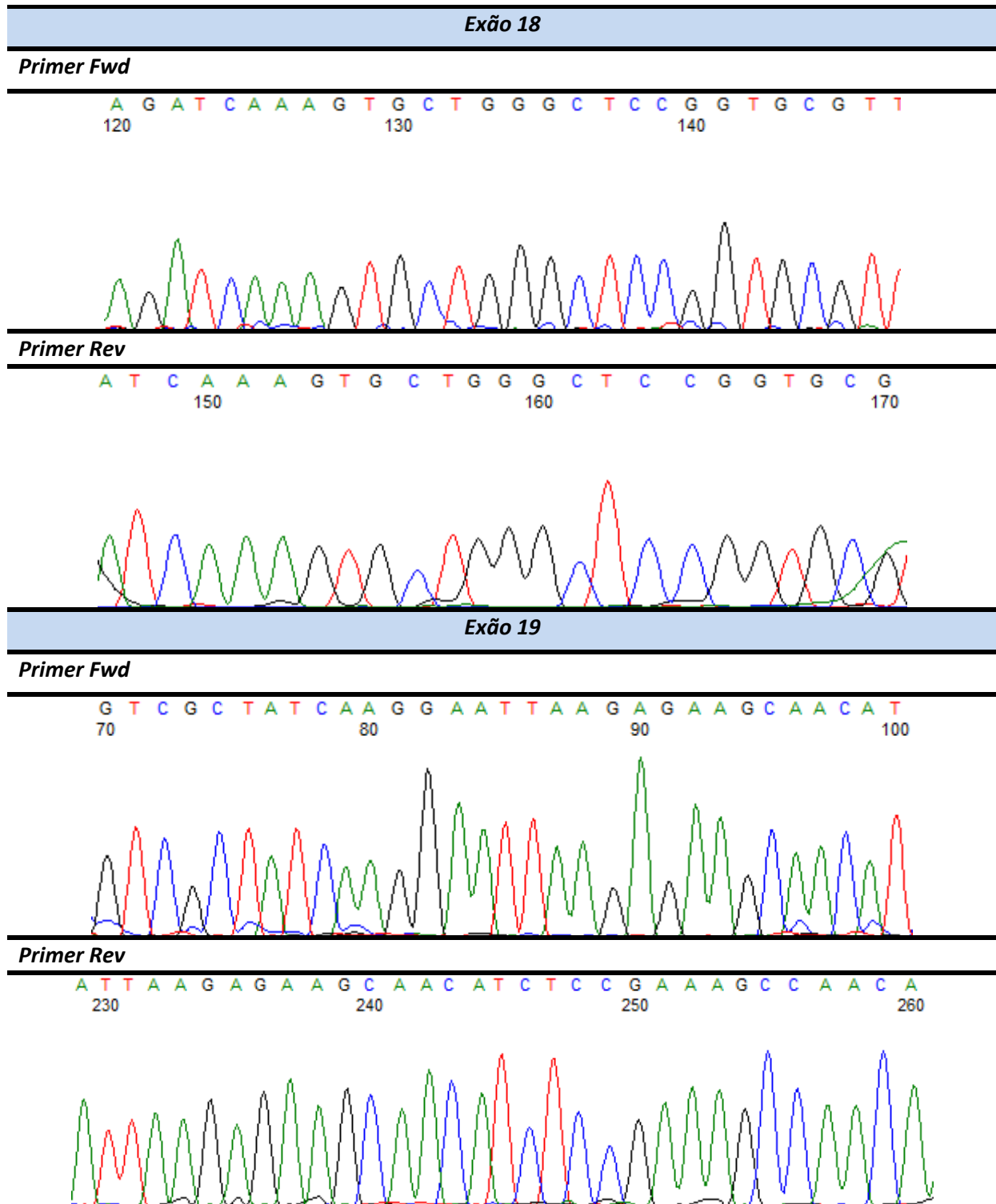
A figura 3.2 demonstra uma amplificação específica e eficiente dos produtos de PCR correspondentes à zona de interesse dos exões 18-21. A amplificação com este protocolo origina uma quantidade de produto de PCR superior a 15 ng/ μ L, o suficiente para realizar os procedimentos downstream inerentes para determinar mutações ao nível do gene *EGFR*, nomeadamente com recurso à sequenciação ou análise de fragmentos.

Os produtos obtidos neste passo foram de seguida purificados com recurso ao kit comercial *DNA Clean&ConcentratorTM*, seguindo as instruções do fornecedor.

3.2. Sequenciação dos produtos de PCR

Após a purificação dos produtos de PCR, preparou-se uma reação de sequenciação com *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems, EUA) para obter a sequência dos produtos de PCR purificados. A reação de sequenciação foi realizada a partir de 15-20 ng de produto de PCR purificado, quantificado através do gel de agarose. A sequência dos produtos foi determinada por eletroforese capilar através do sequenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, EUA).

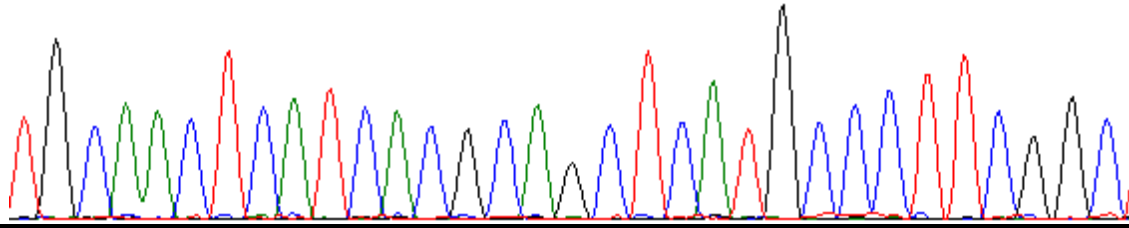
Tabela 3.1 - Fluorogramas das sequenciações dos produtos de PCR dos exões 18-21. A figura ilustra as zonas da sequência do DNA em que há uma maior incidência de ocorrência de mutações somáticas no gene EGFR associadas ao CPNPC. Estes resultados foram obtidos através de eletroforese capilar num sequenciador ABI 3730XL.



Exão 20

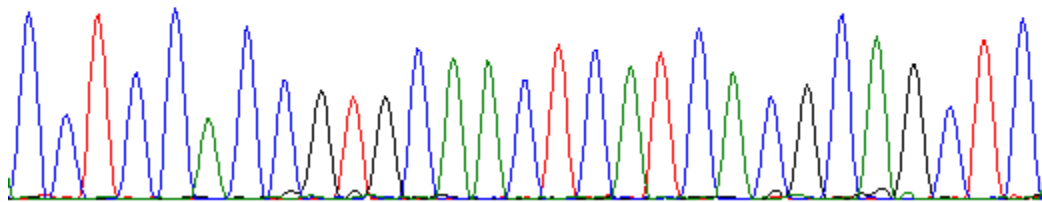
Primer Fwd

T G C A A C T C A T C A C G C A G C T C A T G C C C T T C G G C
150 160 170 180



Primer Rev

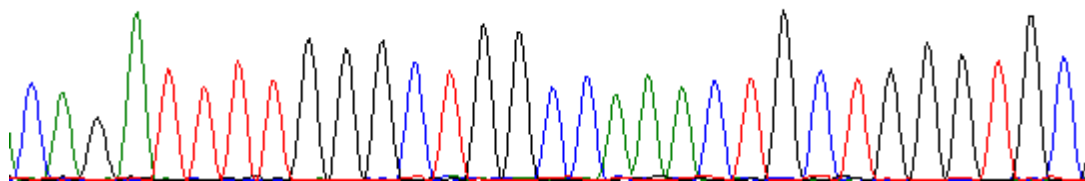
C C T C C A C C G T G C A A C T C A T C A C G C A G C T C
180 190 200



Exão 21

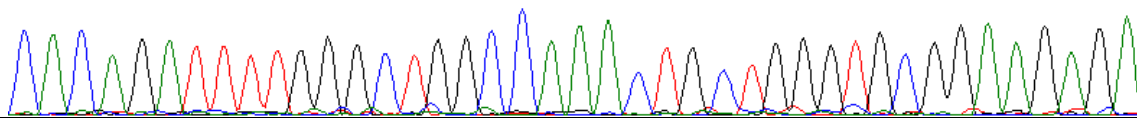
Primer Fwd

C A G A T T T T G G G C T G G C C A A A C T G C T G G G T G C
180 190 200 210



Primer Rev

C A C A G A T T T T G G G C T G G C C A A A C T G C T G G G T G C G G A A G A G A
210 220 230 240 250



Estes resultados demonstram que o protocolo de amplificação e de sequenciação desenvolvido para estas amostras de sangue conservadas em *Indicating FTA Micro Card* é adequado para amplificar as regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR.

Esta amostra não pertencia a nenhum paciente com cancro do pulmão de células não-pequenas, pelo que não foram detetadas mutações em nenhum dos produtos analisados. A figura 3.4 representa as etapas do protocolo que conduziram à genotipagem desta amostra:

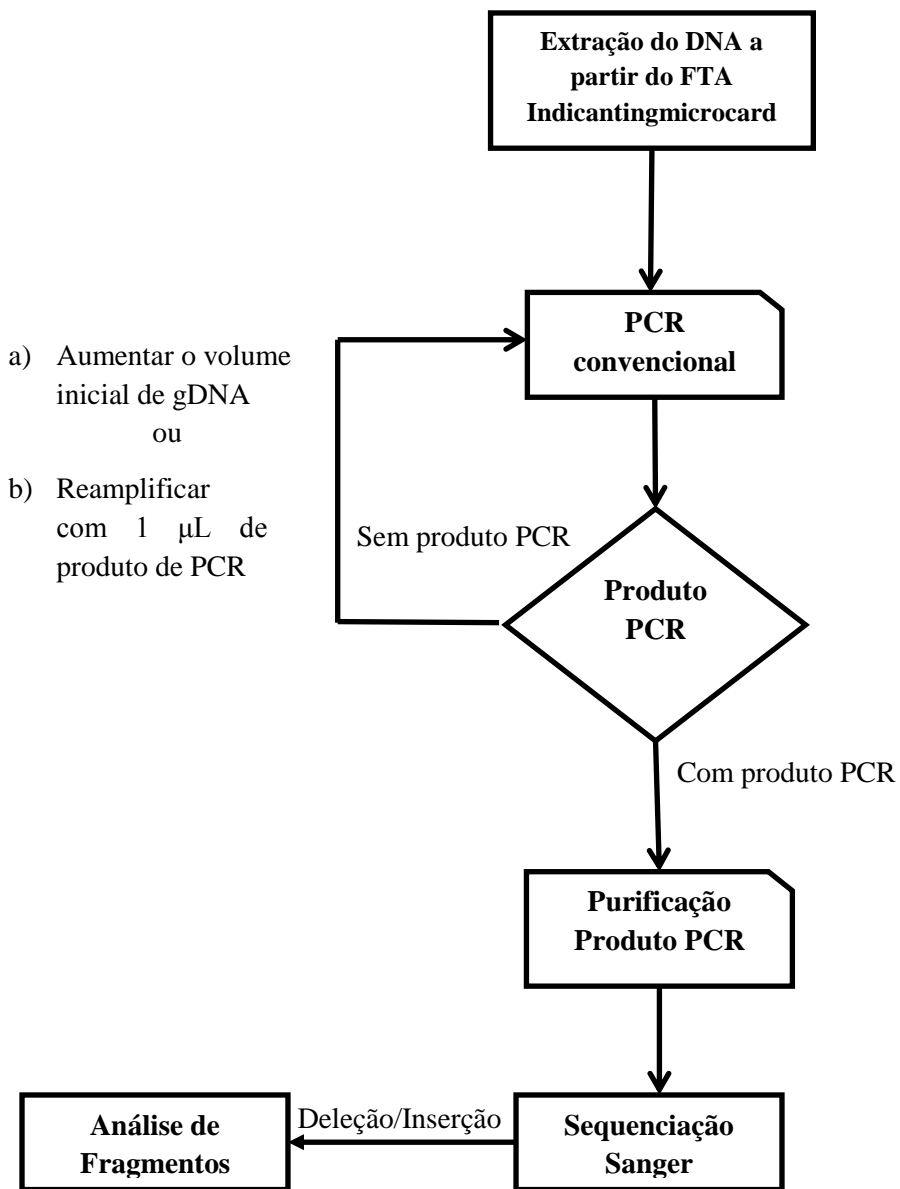


Figura 3.3 - Esquema do processo de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR a partir de amostras de sangue conservadas em *Indicating FTA micro card*.

3.3. Determinação do limite de detecção inerente às técnicas de sequenciação de Sanger e Análise de Fragmentos

A obtenção de um protocolo que amplifique especificamente as sequências correspondentes a zonas de interesse dos exões 18-21, bem como a sequenciação das mesmas, permitiu avançar este estudo para uma nova etapa que consistiu na determinação dos limites de detecção associados à técnica de sequenciação pelo método de Sanger e por Análise de Fragmentos.

A determinação da sensibilidade dos métodos utilizados representa uma etapa importante neste estudo, uma vez que as amostras mais frequentemente utilizadas para determinar o genótipo do gene EGFR são obtidas através de biopsias compostas por uma população heterogénea com baixo teor em células com mutações somáticas.

Os ensaios de determinação da sensibilidade dos métodos utilizados para a detecção de mutações presentes no gene EGFR foram realizados com amostras de gDNA de uma linha celular MCF10a. Este material genético contém um dos alelos mutados para o exão 19 com a deleção $\Delta E746-A750$. A sequenciação e a análise de fragmentos foram realizadas no sequenciador automático ABI 3730XL, no laboratório de genómica da STAB VIDA.

3.3.1. Limite de detecção da técnica de sequenciação de Sanger

A partir de soluções preparadas de acordo com as condições descritas na seção 2.2.2 dos materiais e métodos, foi determinado o limite de detecção associada à técnica de sequenciação pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos. Para tal, procedeu-se à amplificação do DNA genómico por PCR convencional seguindo as instruções descritas na seção 2.2.4.1 cuja resultado se encontra representado na figura 3.4:

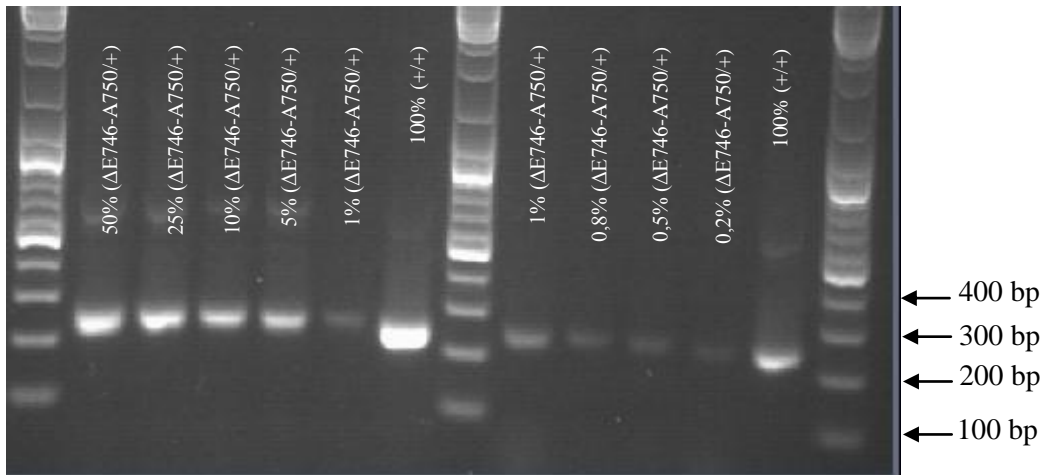
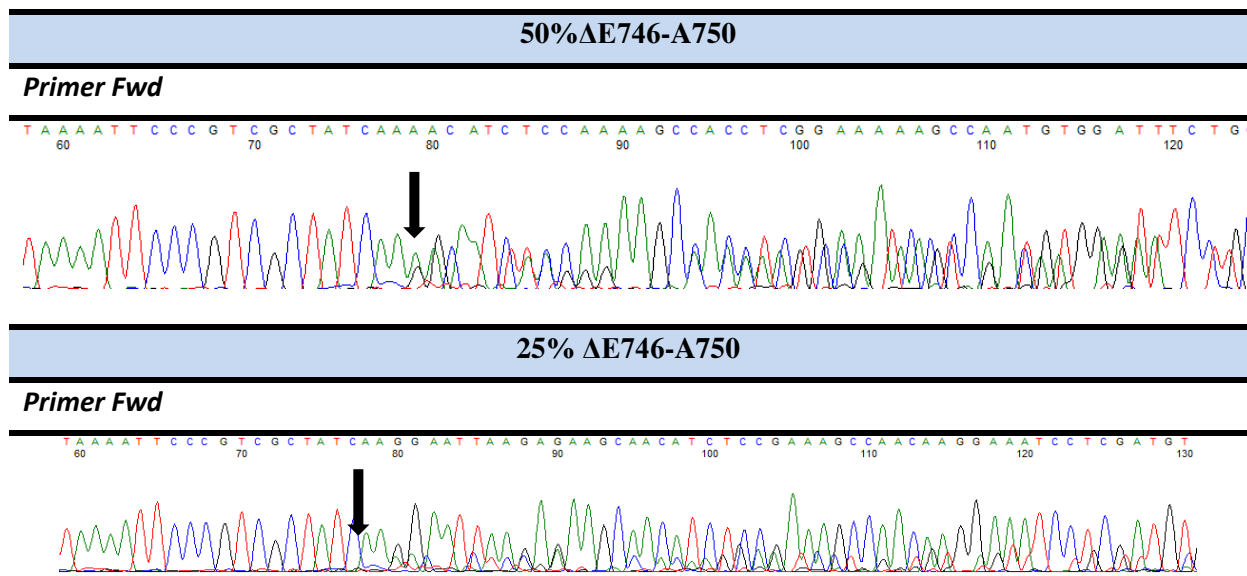


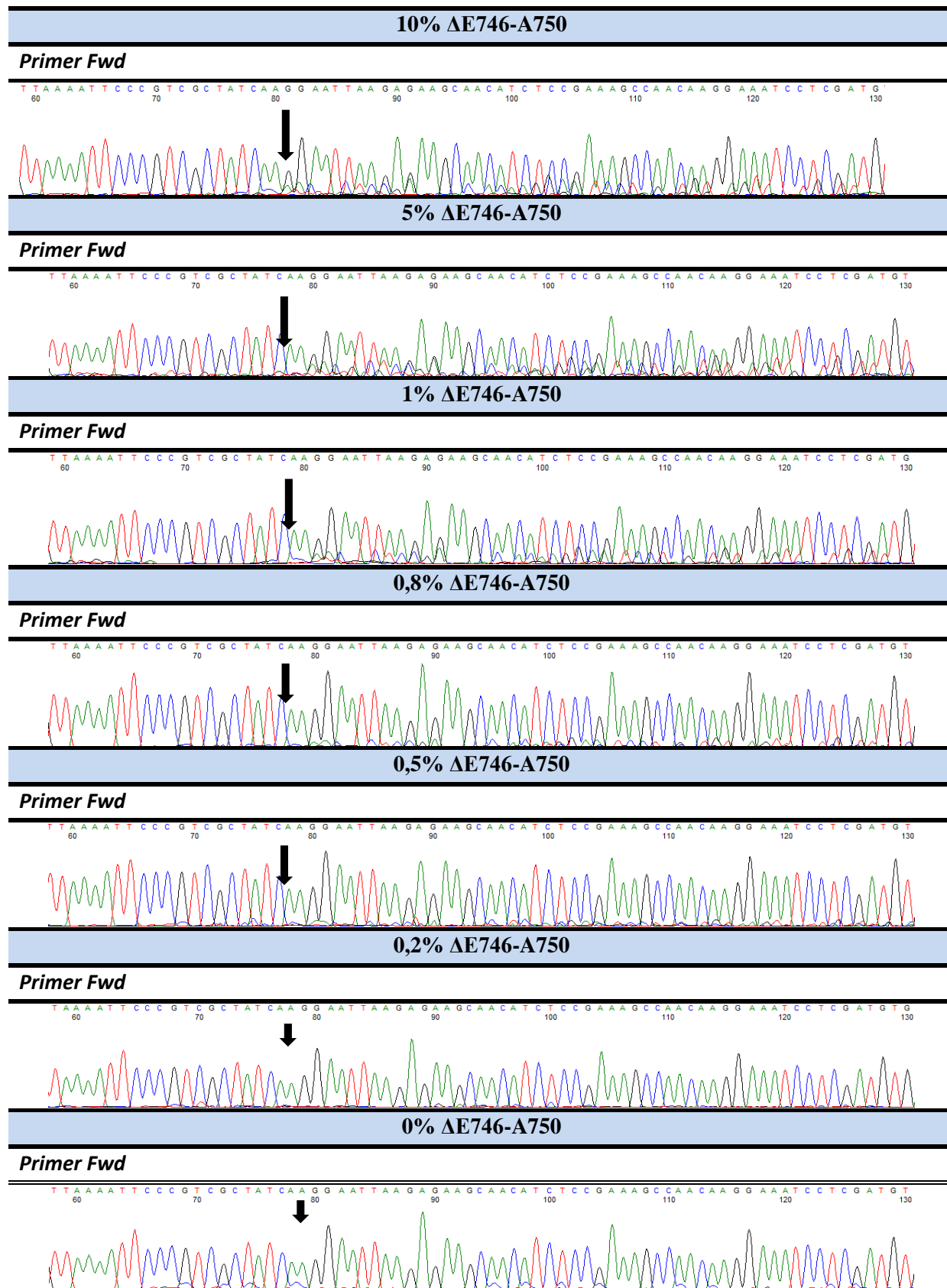
Figura 3.4 – Resultado da amplificação do DNA genómico das soluções com diferentes teores de DNA mutado para o exão 19. Estas soluções foram preparadas de acordo com o método de diluições sucessivas no qual se misturou um volume de DNA *wild-type* para o gene EGFR em diferentes proporções de DNA com uma deleção de 15 bp no exão 19. Os produtos de PCR foram revelados num gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm.

Todas as reações de PCR originaram um produto de PCR de 230 bp, que corresponde ao amplificação esperado, embora tenha também ocorrido, em algumas reações, amplificação inespecífica de um produto com cerca de 600-700 bp.

Uma vez amplificados os produtos de todas as soluções procedeu-se à purificação e sequenciação dos mesmos. A figura 3.2 apresenta os cromatogramas obtidos:

Tabela 3.2 - Cromatogramas das regiões de interesse do exão 19 do gene EGFR. Estas sequências foram obtidas a partir dos produtos de PCR purificados das soluções contendo uma deleção de 15 pares de bases no exão 19. As amostras contêm DNA heterogéneo com teores de DNA mutado de 50% até 0%, em *background* com DNA *wild-type*. Verifica-se uma sobreposição de bases a partir da deleção E746-A750 (rs12913421), indicada pela seta.





O protocolo de sequenciação aplicado permitiu sequenciar todos os produtos de PCR amplificados a partir das soluções preparadas. De acordo com os resultados obtidos, os produtos

inespecíficos obtidos no gel da figura 3.4 não interferiram com a sequenciação das sequências alvo, uma vez que a sequencia obtida coincide com a sequência alvo que contém a deleção E746-A750.

Os resultados dos cromatogramas permitiram detetar a deleção presente até um teor de 0,5% de DNA mutado em solução com DNA *wild-type*. O limite de deteção foi bastante mais sensível do que o esperado e descrito na bibliografia para esta técnica, uma vez que o limite de deteção relatado é entre 15%-25% de DNA mutado numa mistura heterogénea (Astrazeneca, n.d.; Qin et al., 2011).

Verifica-se uma diminuição do sinal das sequências contendo a deleção no exão 19 à medida que o teor em DNA mutado diminui. Isto deve-se ao facto de o número de cópias com mutação presentes na solução diminuir face às sequências não mutadas, à medida que o teor em DNA mutado diminui. Isto resulta numa menor emissão de fluorescência das sequências de DNA mutado em relação ao sinal emitido pelas sequências *wild-type*.

A força do sinal de todos os cromatogramas foi >1000, e no caso das sequenciações dos produtos de PCR das soluções com 1%, 0,8%, 0,5% e 0,2%, foi > 10000. Estes valores de sinal permitem ter algum grau de confiança nos resultados obtidos, nomeadamente nos cromatogramas dos produtos de PCR provenientes das soluções com valores inferiores a 1% de cópias EGFR Δ E746-A750.

3.3.2. Determinação do limite de deteção da técnica de Análise de Fragmentos para a deteção da deleção E746_750A do gene EGFR

Com recurso às mesmas soluções preparadas na seção 2.2.2, realizaram-se ensaios para a determinação do limite de deteção da técnica de Análise de Fragmentos para a deteção de deleções no exão 19 do gene EGFR. O DNA genómico foi amplificado por PCR convencional, nas condições de reação descritas na tabela 2.3 da seção 2.2.4.1 e usando os primers da tabela 2.2 da mesma seção. A figura 3.5e 3.6 ilustram o resultado da amplificação obtida para as soluções com 50% a 1%, e 1% a 0% respetivamente, de DNA mutado:

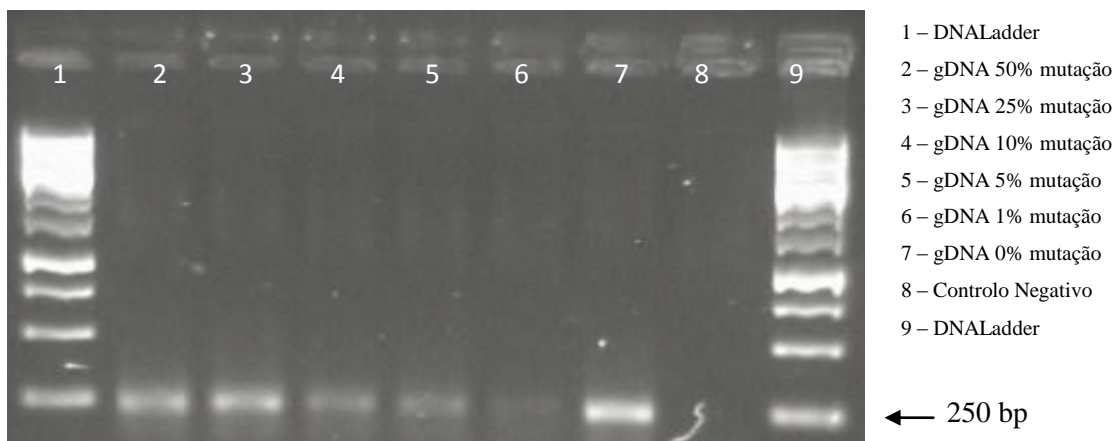


Figura 3.5 -Resultado da amplificação do DNA genómico das soluções com teores 50% a 1% de DNA mutado para o exão 19. Estas soluções foram preparadas de acordo com o método de diluições sucessivas no qual se misturou um volume de DNA *wild-type* para o gene EGFR em diferentes proporções de DNA com uma deleção de 15 bp no exão 19. Os produtos de PCR foram revelados num gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm.

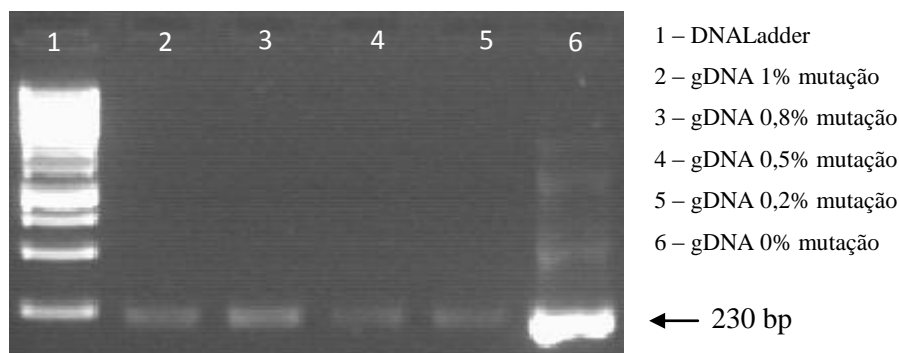
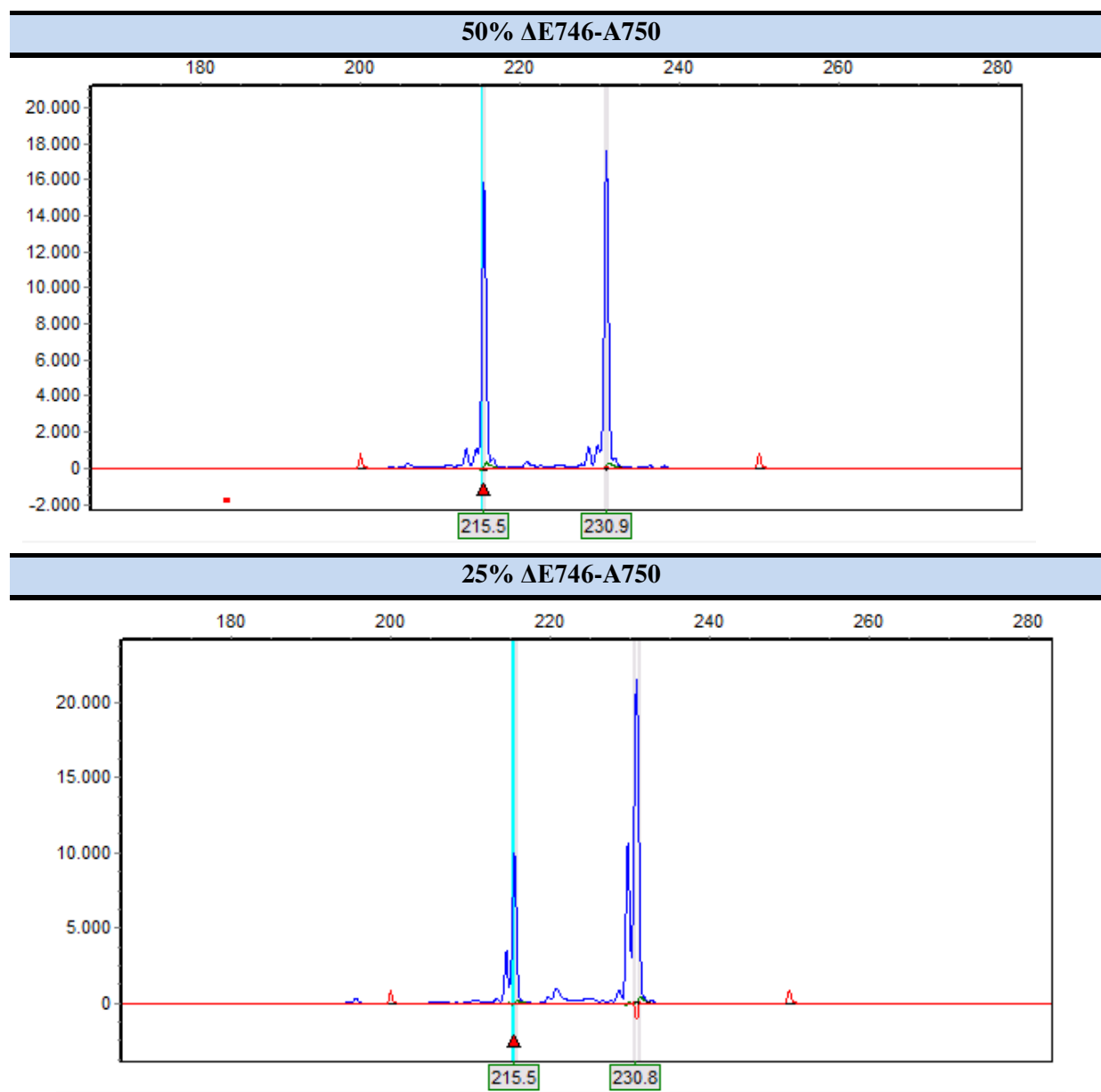


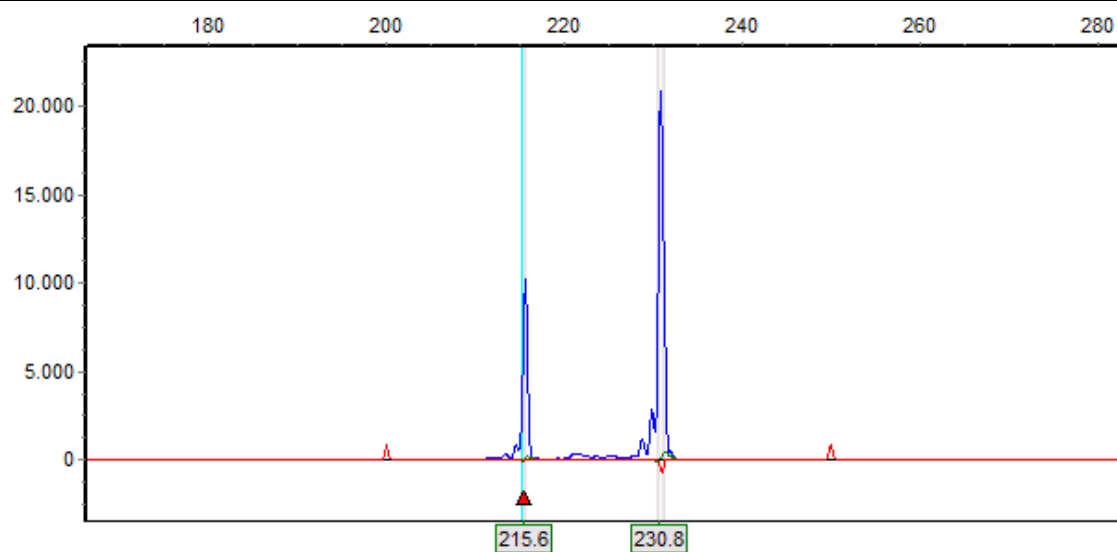
Figura 3.6 - Resultado da amplificação do DNA genómico das soluções com teores 1% a 0% de DNA mutado para o exão 19. Estas soluções foram preparadas de acordo com o método de diluições sucessivas no qual se misturou um volume de DNA *wild-type* para o gene EGFR em diferentes proporções de DNA com uma deleção de 15 bp no exão 19. Os produtos de PCR foram revelados num gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm.

A amplificação foi eficiente para todas as reações o que permitiu realizar os ensaios de análise dos fragmentos dos produtos de PCR. Após a amplificação do DNA genómico, procedeu-se à desnaturação das cadeias em solvente de injeção *HiDi Formamide*, de acordo com as instruções descritas na seção 2.2.9. Na tabela 3.3 estão representados todos os resultados obtidos:

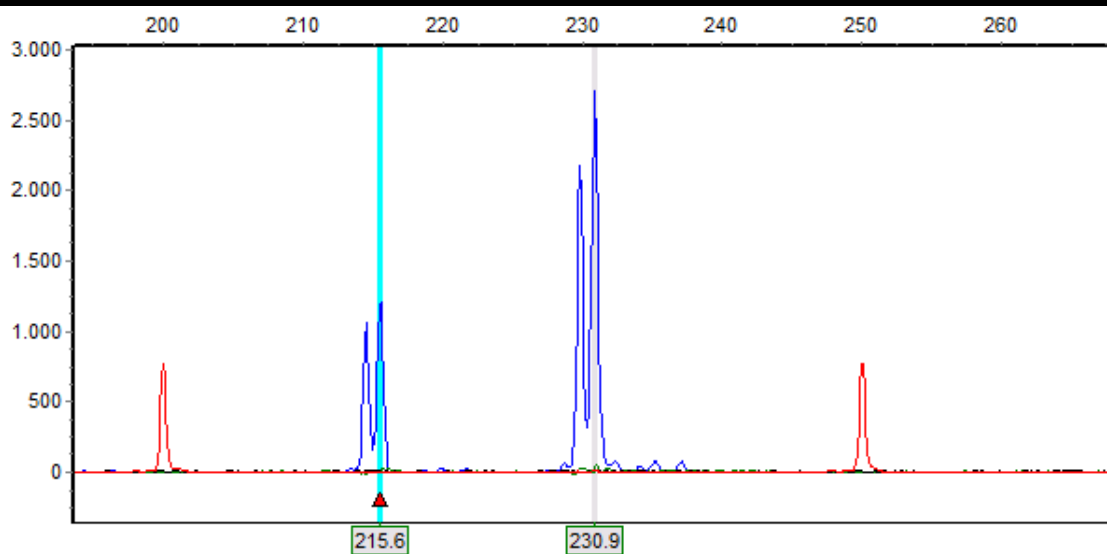
Tabela 3.3 - Electroferogramas obtidos através do software *Soft Genetics Gene Marker v.2.2.0* das soluções contendo 50% a 0% de células tumorais. O pico com 215 bp corresponde aos produtos com a deleção $\Delta E746-A750$ de 15 bp no exão 19 do gene EGFR. A técnica de análise de fragmentos detetou mutações até um teor mínimo de 0,5% de células tumorais.



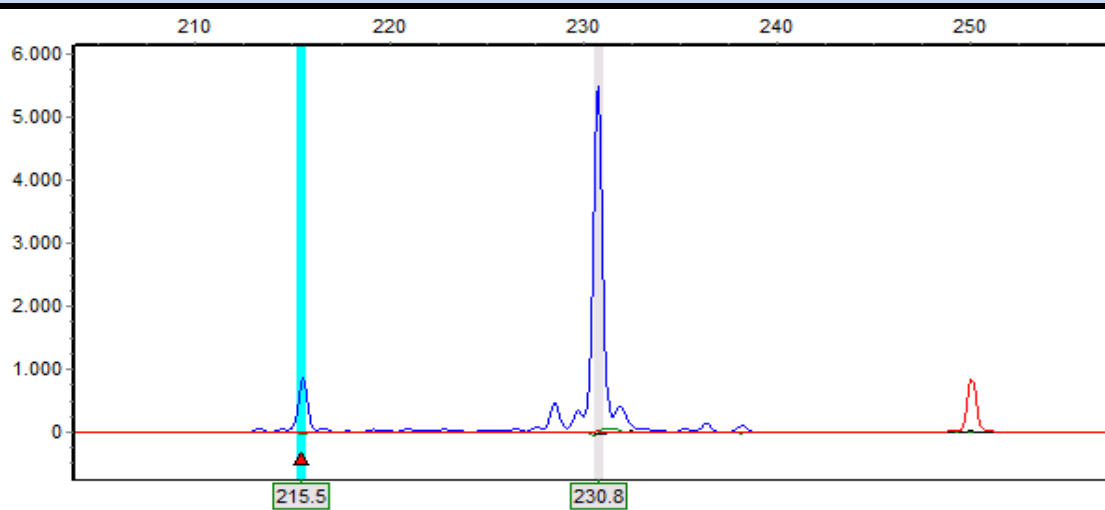
10% $\Delta E746-A750$



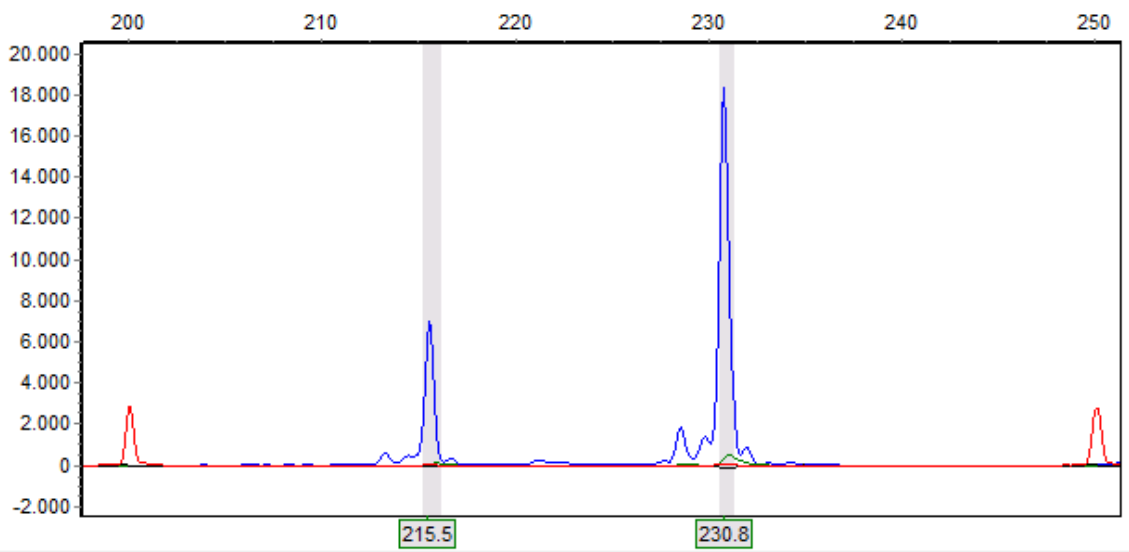
5% $\Delta E746-A750$



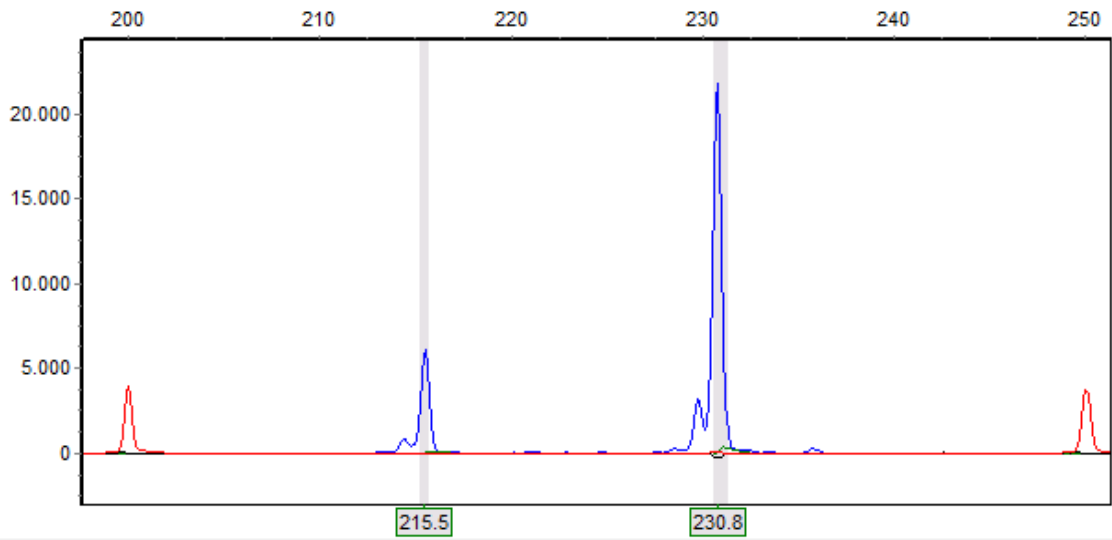
1% $\Delta E746-A750$



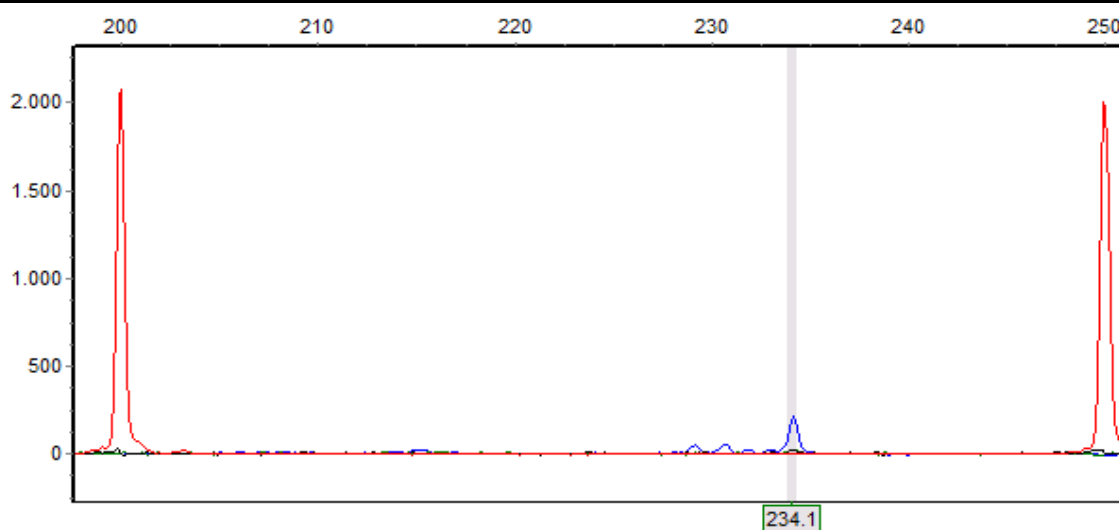
0,8% ΔE746-A750



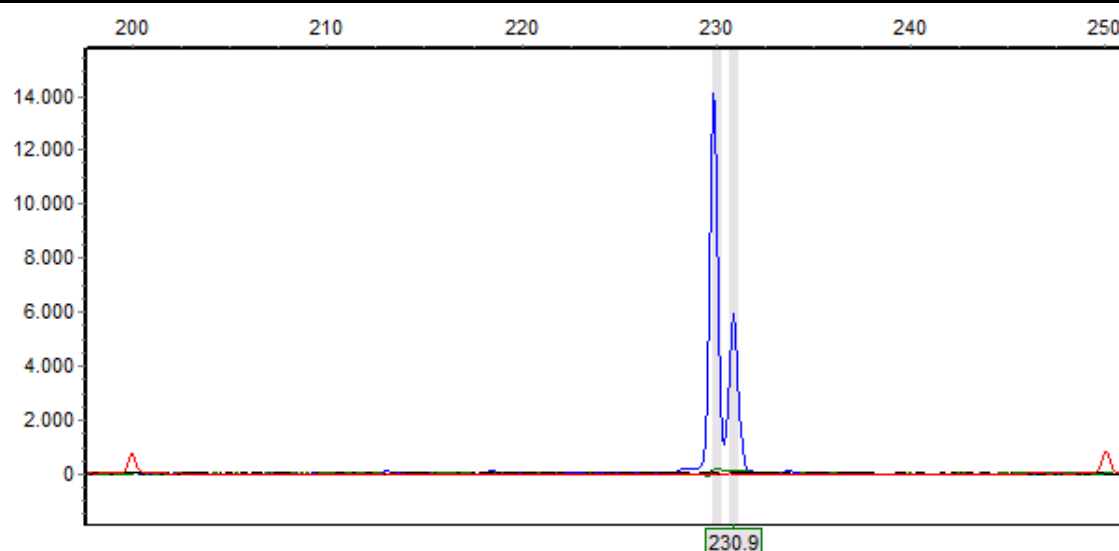
0,5% ΔE746-A750



0,2% Δ E746-A750



0% Δ E746-A750



Através destes resultados verificar-se que foi detetado em todos os eletroferogramas um fragmento de 230 bp correspondente ao produto de DNA não mutado EGFR (+/+). A presença de fragmentos com 215 bp nas soluções de 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, 0,8% e 0,5% corresponde às cópias do alelo com a deleção E746-750A de 15 pares de base. Através desta técnica foram detetadas mutações até 0,5% de DNA com o alelo mutado diluição até 0,5% de DNA com o alelo mutado. O limite de deteção obtido foi além do esperado (1%-5%) (25), o que revela que o recurso à técnica de sequenciação direta pelo método de Sanger é adequado para detetar pequenas quantidades de DNA com a deleção E746_A750 do gene EGFR.

A solução com 0,2% do alelo mutado apresenta um sinal bastante fraco o que pode indicar que houve um erro leitura desta solução. De acordo com a tabela 3.3, a amplificação do DNA desta solução foi eficiente e suficiente para desnaturar os fragmentos e proceder a consequente leitura no

sequenciador ABI 3730XL. O sinal esperado do alelo *wild-type* seria próximo dos valores registrados nas restantes soluções, o que não se constatou para o referido caso.

A figura 3.7 esquematiza as etapas realizadas para determinar o tamanho dos fragmentos das várias soluções:



Figura 3.7- Etapas do protocolo de determinação do tamanho de fragmentos através da técnica de Análise de Fragmentos.

3.3.3. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de sequenciação pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos

As técnicas de sequenciação pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos mostraram ser uma importante ferramenta na detecção de mutações presentes no exão 19 do gene *EGFR*, uma vez que ambas permitiram detetar o alelo mutado até um mínimo de 0,5% em *background* com o alelo *wild-type*.

Através da quantidade mínima detetada em ambas as técnicas, verifica-se que o limite de detecção obtido foi idêntico. Este valor é um importante indicador da capacidade de detecção das duas metodologias, pois permite obter um valor de referência em resultados obtidos para amostras cujo genótipo é desconhecido. No entanto, é necessário ter em conta que o limite de detecção para amostras FFPE pode não ser tão sensível uma vez que o estado das amostras é caracterizado por uma elevada degradação do DNA devido à ação da formalina, o que pode dificultar a análise correta do genótipo (Astrazeneca, n.d.; da Cunha Santos et al., 2010; Jänne et al., 2006).

No caso da técnica de sequenciação pelo método de Sanger, o limite esperado seria de 15%-25% (Astrazeneca, n.d.; Qin et al., 2011), de DNA mutado num *background* com DNA *wild-type*, porém os resultados obtidos foram bastante mais sensíveis uma vez que foi possível detetar a mutação até à diluição contendo 0,5%. No caso do limite de detecção obtido para a técnica de Análise de Fragmentos, foi também detetado o alelo mutação até um teor de DNA mutado de 0,5%, sendo este um resultado mais satisfatório do que o esperado.

Estas duas técnicas podem ser usadas em conjunto para a determinação do tamanho e localização de uma inserção/deleção nos exões 19 ou 20; a sequenciação permite obter a localização da base na qual se dá o início da mutação e, por outro lado, através da técnica de análise de fragmentos é possível determinar o tamanho da inserção/deleção. No caso das amostras utilizadas, o genótipo era previamente conhecido pelo que o estudo realizado foi executado com o objetivo de determinar o limite de detecção associado à técnica. No entanto, para a genotipagem de amostras cujo genótipo é

desconhecido o recurso a estas duas técnicas é uma opção válida para determinar com exatidão deleções no exão 19 ou inserções no exão 20 do gene EGFR.

Os resultados aqui descritos não são sinónimo de que este protocolo, bem como as técnicas utilizadas neste estudo, permitam a deteção de mutações somáticas no gene EGFR para os restantes exões 18, 20 e 21 em amostras de gDNA com a mesma sensibilidade verificada para a mutação estudada. Além de se tratar de regiões diferentes do DNA, as mutações somáticas mais frequentemente verificadas para os restantes exões são polimorfismos que afetam apenas uma base da sequência, e não deleções. O limite de deteção para estes exões não foi testado devido à indisponibilidade de material biológico.

Outro aspeto importante de realçar reside no fato de a sensibilidade obtida para este tipo de amostra poder não ser reprodutível com a sensibilidade obtida a partir de amostras FFPE; O material utilizado para este ensaio é, de acordo com o fabricante, apropriado para a validação final da sensibilidade e reprodutibilidade do diagnóstico molecular para a deteção de mutações somáticas no exão 19, o que contrasta com as condições do DNA extraído das amostras FFPE que muitas das vezes se encontra bastante degradado e dificulta a genotipagem correta dos exões 18-21 do gene EGFR (Horizon Discoveries, 2011b).

O método das diluições sucessivas utilizado neste ensaio para preparar as diferentes soluções possui um considerável grau de incerteza no que diz respeito ao teor exato de DNA mutado presente em solução. Esta incerteza é importante quando se realizam estudos de sensibilidade para valores abaixo de 1%, o que significa que o valor de 0,5% determinado para o limite de deteção obtido neste estudo possa não corresponder a um valor preciso, mas sim um valor aproximado.

O avanço da tecnologia dos equipamentos e reagentes utilizados hoje em dia em sequenciação a constituem um importante aspeto a considerar para justificar a diferença da sensibilidade obtida em relação ao previsto pela literatura.

Estes resultados permitem obter uma referência em relação ao limite de deteção que a técnica de sequenciação direta pelo método de Sanger permite alcançar a partir de uma amostra de gDNA com elevado grau de pureza.

3.4. Genotipagem de 20 amostras FFPE para os exões 18-21 do gene EGFR

Este estudo integrou o programa externo de controlo de qualidade EQMN (*European Molecular Genetics Quality Network*) onde foram fornecidas amostras de células fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) contendo diferentes percentagens de células tumorais com mutações nos exões 18-21 do gene EGFR. O objetivo deste programa consistiu em determinar o genótipo desconhecido de 20 amostras provenientes de uma linha celular desconhecida que simulam amostras de doentes reais.

3.4.1.Extração do DNA genómico através de diferentes kits comerciais

Foram utilizados 4 métodos diferentes de extração do DNA, descritos na seção 2.2.3, para determinar qual o kit comercial com maior rendimento ao nível da extração de DNA, tempo consumido e preço do kit. Nas primeiras 10 amostras analisadas (amostras 01 a 10) foram testados todos os kits: As amostras 01 e 04 foram extraídas recorrendo ao *kit blackPREP FFPE DNA*; as amostras 05 e 06 foram extraídas com o *Invitex SPIN FFPE Tissue kit*; as amostras 102, 103, 108 e 109 com o *QuickExtract FFPE DNA kit*; as amostras 107 e 110 foram aplicadas num cartão FTA e a sua extração seguiu o protocolo descrito na seção 2.2.3. Devido ao maior rendimento obtido com o *QuickExtract FFPE DNA kit* e pela simplicidade do protocolo de extração, optou-se por amplificar as amostras 11-20 com este kit comercial.

Um dos principais passos limitantes da genotipagem de amostras FFPE consiste na extração e purificação do DNA em qualidade suficiente para a consequente amplificação do material genético (Da Cunha Santos et al., 2010; Sidorova et al., 2012). A formalina utilizada para fixar estas amostras é um agente indutor da formação de cross-links DNA-DNA, DNA-proteína e RNA-proteína. As baixas concentrações salinas, presença de ácido fórmico, altas temperaturas e baixo pH utilizados na fixação das amostras provocam a dissociação das pontes de hidrogénio dos nucleótidos emparelhados devido à protonação dos grupos aminas, o que resulta numa abrupta e irreversível desnaturação da cadeia dupla do DNA. Estes fatores em conjunto provocam uma despolimerização e alterações estruturais na cadeia do DNA dificultando deste modo a amplificação do DNA genómico (Da Cunha Santos et al., 2010; Yost et al., 2012).

Estas amostras são obtidas a partir de biopsias humanas e são frequentemente utilizadas para análises histológicas ou para a deteção de células tumorais, constituindo assim a fonte mais comum para determinar o genótipo do gene EGFR para doentes com CPNPC.

3.4.2. Amplificação do gDNA a partir de amostras FFPE por PCR convencional

Com base no protocolo otimizado a partir de amostras de sangue conservadas em *Indicating FTA Micro Card*, foram analisadas as 20 amostras FFPE da tabela 2.4 na seção 2.1.4.3 para a determinação de mutações presentes nos exões 18-21 do gene *EGFR*. A extração do DNA foi feita com recurso ao kit comercial QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit, de acordo com as instruções descritas no fabricante. Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas a uma amplificação por PCR convencional, seguindo o protocolo descrito na seção 2.2.4.1. A figura 3.8 representa uma fotografia que exemplifica o resultado do PCR, para 5 amostras:

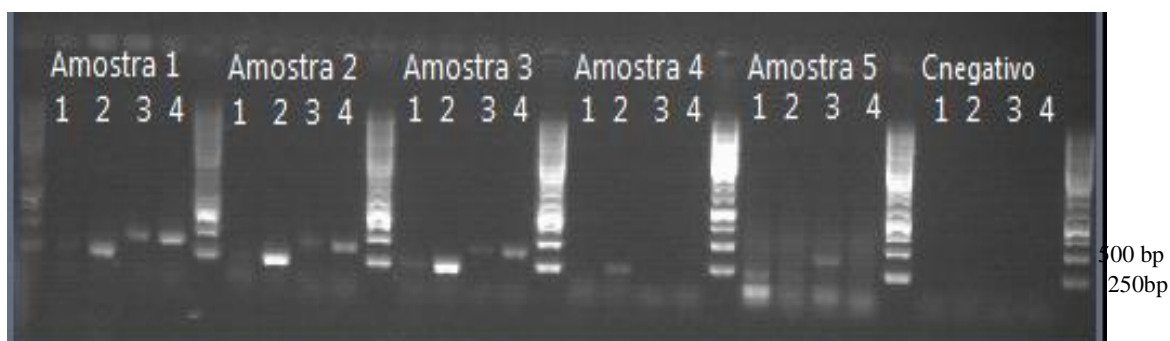


Figura 3.8 - Fotografia representativa da amplificação por PCR convencional de 5 das 20 amostras estudadas, a partir de 5 μ L de gDNA extraído pelo kit comercial QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit. Apesar de ter sido utilizado o mesmo protocolo de amplificação para todas as amostras, a quantidade de produto amplificado varia entre as amostras; As amostras 1 e 2 tiveram uma amplificação de todos os exões, enquanto que as amostras 4 e 5 falharam na amplificação em mais do que 1 exão. Os produtos de PCR foram revelados num gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm. 1- Exão 18; 2 – Exão 19; 3 - Exão 20 e 4 – Exão 21.

Embora o protocolo de amplificação tivesse sido o mesmo utilizado na otimização da reação de PCR a partir de uma amostra de sangue em cartão FTA, a eficiência do PCR para as amostras FFPE não foi reprodutível entre as várias amostras, tal como se pode verificar pela figura 3.8. Este facto constituiu o primeiro obstáculo para a continuação da genotipagem do gene *EGFR* destas amostras, uma vez que em caso de uma amplificação com baixo rendimento, a quantidade de produto disponível não seria suficiente para sequenciar os produtos de PCR (mínimo de 15 ng/ μ L). Para contornar este problema adotou-se um dos seguintes procedimentos: a) aumentar o volume de gDNA extraído na reação de PCR; b) executar uma re-amplificação a partir de 1 μ L de produto de PCR, com o protocolo descrito na seção 2.2.4.1. No entanto, as amostras 19 e 20 obtiveram um rendimento baixo na amplificação por PCR convencional pelo que não foi possível determinar o seu genótipo.

Após a amplificação dos produtos, estes foram purificados com recurso ao kit comercial DNA Clean&Concentrator™-5, seguindo as instruções do fornecedor.

3.4.3. Determinação do genótipo dos exões 18-21 do gene EGFR de 20 amostras FFPE através da sequenciação pelo método de Sanger.

Após a obtenção de uma quantidade mínima de 15 ng/μL de produto de PCR purificado, a genotipagem das amostras FFPE foi feita com recurso à técnica de sequenciação direta pelo método de Sanger. O genótipo de todas as amostras era desconhecido à data da realização dos ensaios para a determinação de mutações nos exões 18-21 do gene EGFR, pelo que este ensaio foi uma importante simulação para averiguar a capacidade do protocolo de amplificação e sequenciação otimizado anteriormente em determinar o genótipo para os exões de interesse do gene EGFR, através duma simulação o mais próxima possível da realidade. As amostras FFPE são o tipo de amostras que mais se recorrem hoje em dia para a genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR (Pikor et al., 2011).

Na tabela 3.4 estão representados os resultados do genótipo para as amostras FFPE analisadas neste estudo:

Tabela 3.4 - Resultado do genótipo obtido através de sequenciação pelo método de Sanger para as 20 amostras FFPE usadas neste estudo. As amostras 19 e 20 obtiveram uma fraca amplificação pelo que não foi possível executar os processos *downstream* do PCR.

Nº Amostra	% Células tumorais	Exão 18	Exão 19	Exão 20	Exão 21
01	25	-	c.2235_2249del	-	-
02	10	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
03	5	-	c.2235_2249del	-	-
04	0	-	-	-	-
05	0	-	-	-	-
06	0	-	-	-	-
07	0	-	-	-	-
08	10	c.2155 G>A	-	-	-
09	100	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
10	25	c.2155 G>A	-	-	-
11	0	-	-	c.2369 C>T	-
12	25	c.2155 G>A	-	-	-
13	10	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
14	0	-	-	-	-

15	100	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
16	0	-	-	-	-
17	0	-	-	-	-
18	25	-	c.2235_2249del		
19	5	Falhou	Falhou	Falhou	Falhou
20	10	Falhou	Falhou	Falhou	Falhou

Foram detetadas mutações no gene EGFR em 11 das 20 amostras analisadas: a) 3 mutações no exão 18; b) 3 mutações no exão 19; c) 5 mutações no exão 20 e; d) 4 mutações no exão 21 (Figura 3.5). Foram detetadas mutações em todos os exões de interesse deste gene, quer deleções no exão 19 como SNP nos exões 18, 20 e 21. A amplificação das amostras 19 e 20 falhou em todos os PCR realizados. Este resultado pode eventualmente estar associado a uma elevada degradação do DNA destas amostras devido ao processo de fixação das células em parafina.

Tabela 3.5 - Mutações detetadas no gene EGFR nas 20 amostras analisadas, num total de 11 amostras FFPE em que foram detetadas mutações no gene EGFR.

	Exão 18	Exão 19	Exão 20	Exão 21
Nº Mutações	3	3	5	4

As amostras FFPE eram constituídas por uma mistura de células contendo um teor de células tumorais. Esta mistura foi também um importante indicador da capacidade de deteção das técnicas aplicadas neste estudo. A figura 3.9 esquematiza as mutações detetadas em função do teor de células tumorais presentes nas amostras:

Quantidade de mutações detetadas em função da % de células tumorais

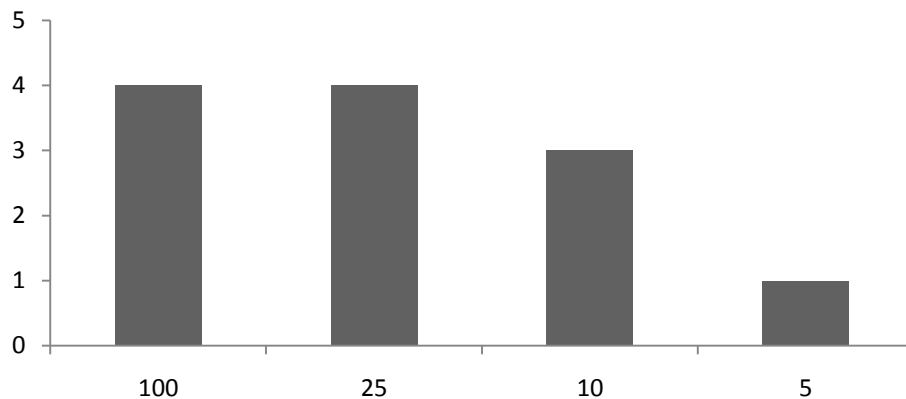


Figura 3.9 – Quantidade de mutações no gene EGFR detetadas em função do teor de células tumorais presentes em cada amostra. Foram detetadas mutações em amostras cujo teor é inferior a 10%, o que foi um resultado mais sensível do que o esperado.

Pela análise da figura 3.10 pode-se verificar que a técnica de sequenciação direta pelo método de Sanger detetou células tumorais até um teor mínimo de 5%. Estes resultados revelaram ser bastante satisfatórios no que diz respeito ao limite de detecção, uma vez que foi obtida uma sensibilidade superior ao esperado e relatado para esta técnica quando se utilizam este tipo de amostras FFPE (Wang *et al.*, 2012). A EQMN incluiu as amostras 2, 3 e 8 com o intuito de “testar o limite de detecção dos laboratórios que usam a técnica de sequenciação” onde seria de esperar que “os laboratórios que usam a sequenciação de DNA como método de detecção não detetassem a presença de mutações num conteúdo tão baixo de células tumorais”. Posto isto, pode-se concluir que a sensibilidade do protocolo desenvolvido foi bastante sensível, uma vez que foram detetadas mutações em todas as amostras amplificadas e sequenciadas que continham um teor de células tumorais <10%.

As amostras onde foram detetadas deleções no exão 19 foram submetidas a análise de fragmentos com o objetivo de confirmar o tamanho da deleção presente que permitisse esclarecer o tipo de mutação presente. Foram detetadas deleções no exão 19 das amostras 01, 03 e 18.

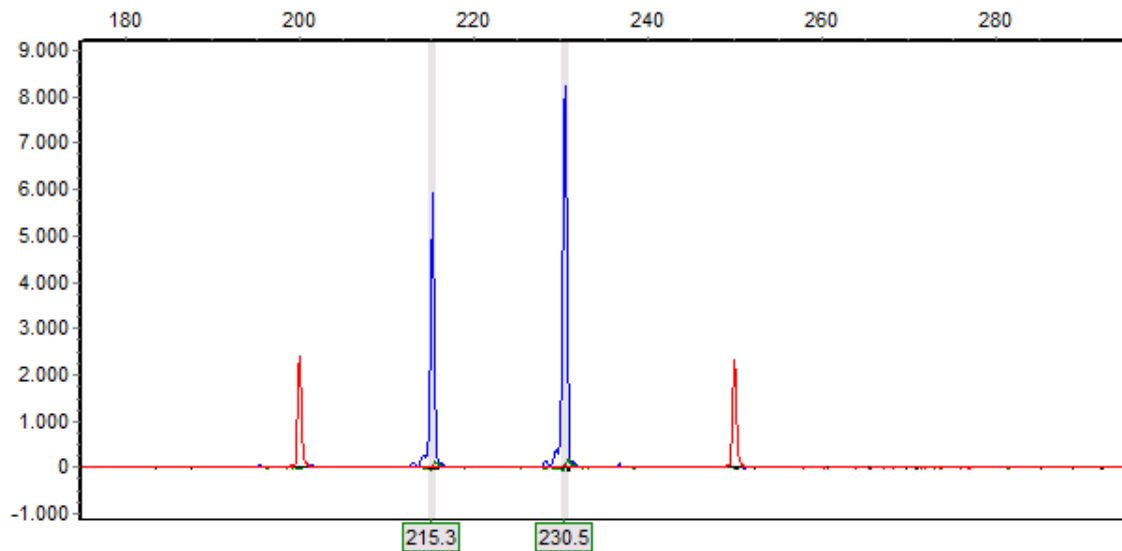


Figura 3.10 Eletroferograma correspondente à amostra 01 cujo alelo mutado foi detetado pela técnica de análise de fragmentos. O fragmento com 215 bp corresponde ao alelo mutado que contém a deleção de 15 bp.

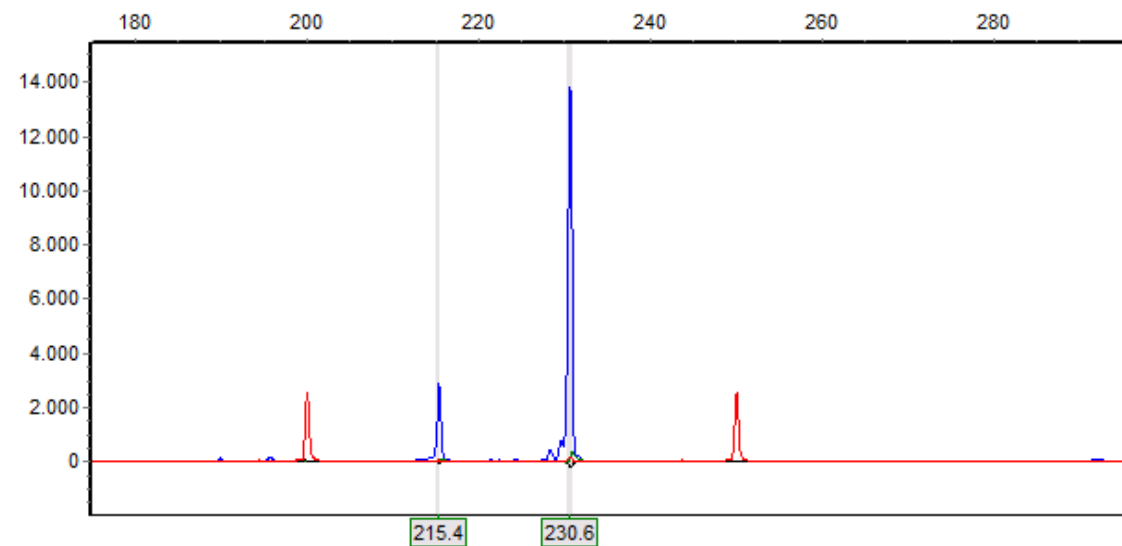


Figura 3.11- Eletroferograma correspondente à amostra 03 cujo alelo mutado foi detetado pela técnica de análise de fragmentos. O fragmento com 215 bp corresponde ao alelo mutado que contém a deleção de 15 bp.

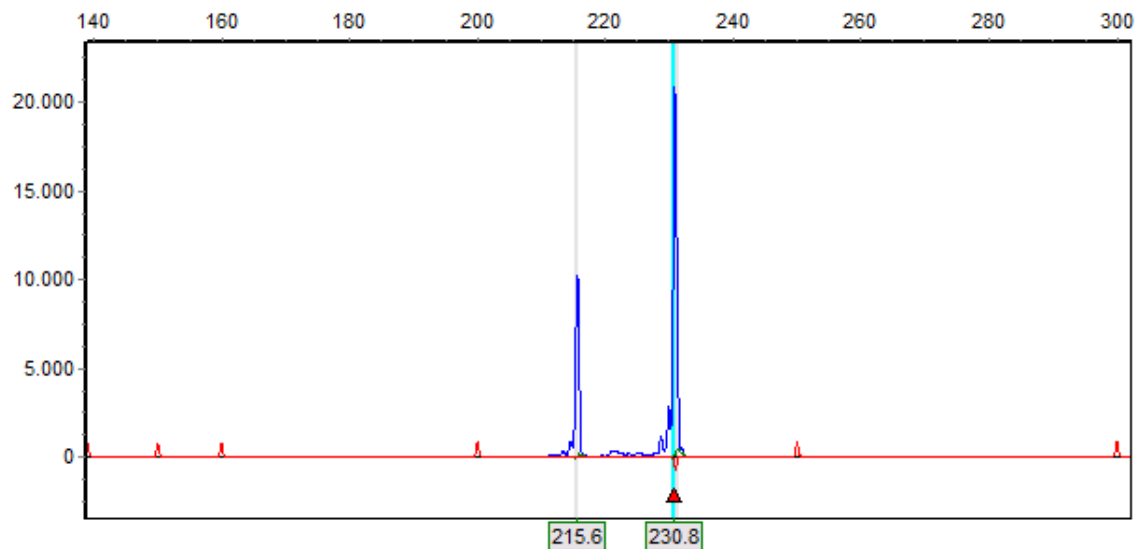


Figura 3.12- Eletroferograma correspondente à amostra 18 cujo alelo mutado foi detetado pela técnica de análise de fragmentos. O fragmento com 215 bp corresponde ao alelo mutado que contém a deleção de 15 bp.

Todos os métodos de extração e purificação do DNA a partir de amostras FFPE utilizados permitiram obter DNA suficiente para realizar a reação de PCR e consequente determinação do genótipo através da sequenciação de Sanger ou Análise de Fragmentos, com exceção das amostras 19 e 20. As amostras 07 e 10 foram aplicadas em cartão *Indicating FTA Micro Card* foi inclusivamente determinado o seu genótipo de forma correta. No entanto, a utilização destes cartões como método de extração e purificação de amostras FFPE contendo uma percentagem baixa de células tumorais é desaconselhada uma vez que a análise é feita a partir de um punch de 1,2 mm que não é representativo da totalidade das células presentes. Assim existe uma probabilidade elevada de o punch analisado não conter uma quantidade de células suficientes, levando a que se determine um genótipo incorreto. A figura 3.13 representa as etapas executadas neste protocolo:

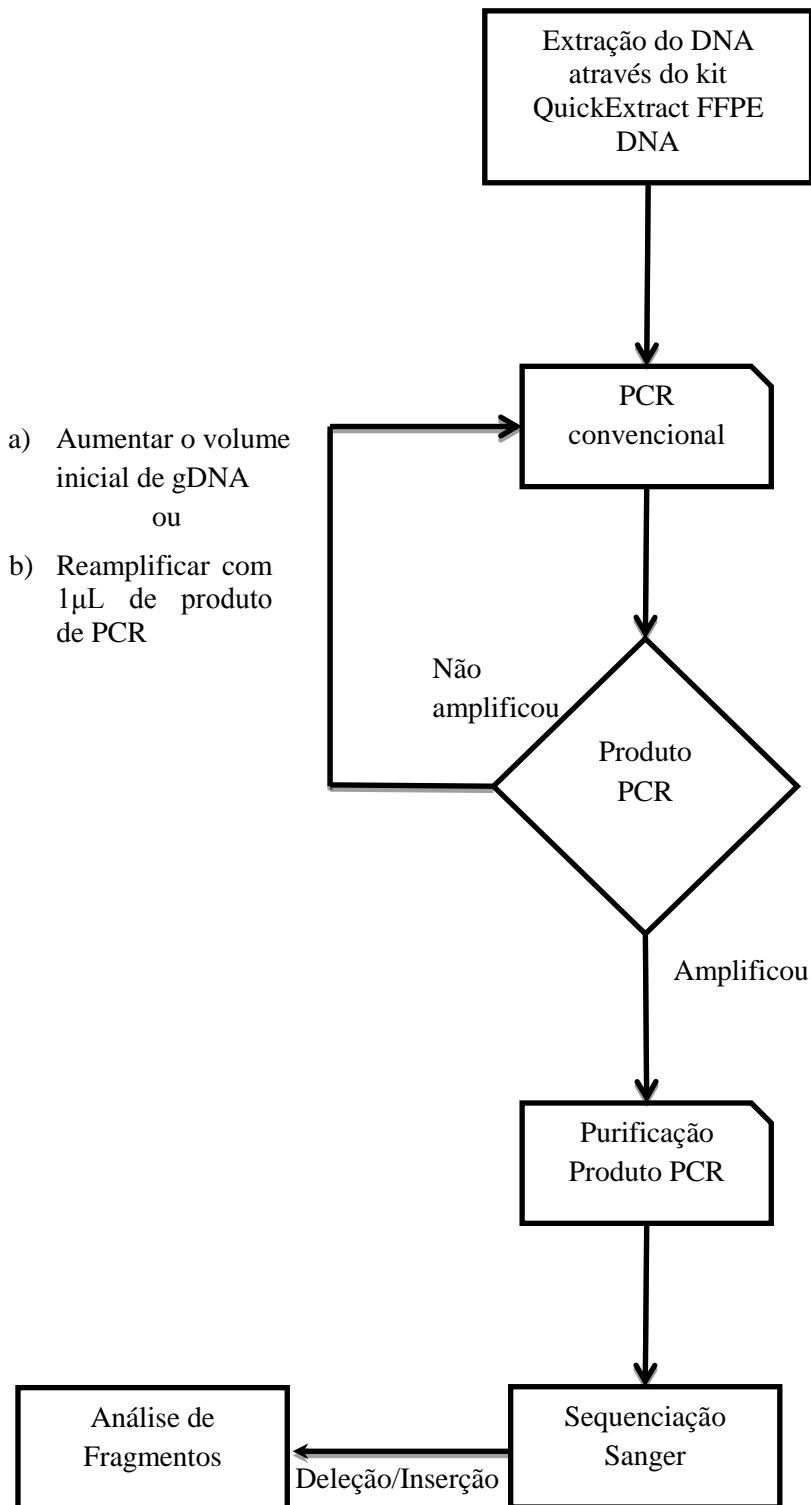


Figura 3.13 - Esquema do processo de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR a partir de amostras de sangue conservadas em *Indicating FTA Micro Card*.

3.4.4. Comparação do genótipo obtido com o genótipo fornecido pela EQMN

À data da realização dos ensaios, o genótipo de todas as amostras era desconhecido. Esta informação apenas foi fornecida após a submissão dos resultados obtidos neste estudo à entidade EQMN. A comparação dos resultados permitiu averiguar a qualidade e validar o protocolo de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR. Na tabela 3.5 estão representados o genótipo fornecido pela EQMN para as 20 amostras analisadas neste estudo:

Tabela 3.6 - Resultado do genótipo divulgado pela EQMN correspondente às 20 amostras FFPE fornecidas neste estudo no âmbito do programa de controlo de qualidade externo “EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer”. As amostras 19 e 20 obtiveram uma fraca amplificação pelo que não foi possível executar os processos *downstream* do PCR. Os campos preenchidos a verde indicam os genótipos corretamente identificados neste estudo; a amarelo os falso positivos e a vermelho as amostras em que não se determinou o genótipo devido a uma ampliação insuficiente do DNA genómico.

Nº Amostra	% Células tumorais	Exão 18	Exão 19	Exão 20	Exão 21
01	25	-	c.2235_2249del	-	-
02	10	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
03	5	-	c.2235_2249del	-	-
04	0	-	-	-	-
05	0	-	-	-	-
06	0	-	-	-	-
07	0	-	-	-	-
08	10	c.2155 G>A	-	-	-
09	100	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
10	25	c.2155 G>A	-	-	-
11	0	-	-	-	-
12	25	c.2155 G>A	-	-	-
13	10	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
14	0	-	-	-	-
15	100	-	-	c.2369 C>T	c.2573 T>G
16	0	-	-	-	-
17	0	-	-	-	-

18	25	-	c.2235_2249del	-	-
19	5	-	c.2235_2249del	-	-
20	10	2155 G>A	-	-	-

Das 18 amostras amplificadas, obtiveram-se 72 sequenciações correspondentes às zonas alvo dos exões 18-21 do gene EGFR. Apenas o exão 20 da amostra 11 obteve um falso positivo, numa amostra em que o conteúdo de células tumorais é de 0%. A figura 3.14 corresponde ao cromatograma da amostra 11, onde é possível verificar a SNP correspondente à mutação c.2369C>T (p.Thr790Met) rs121434569:

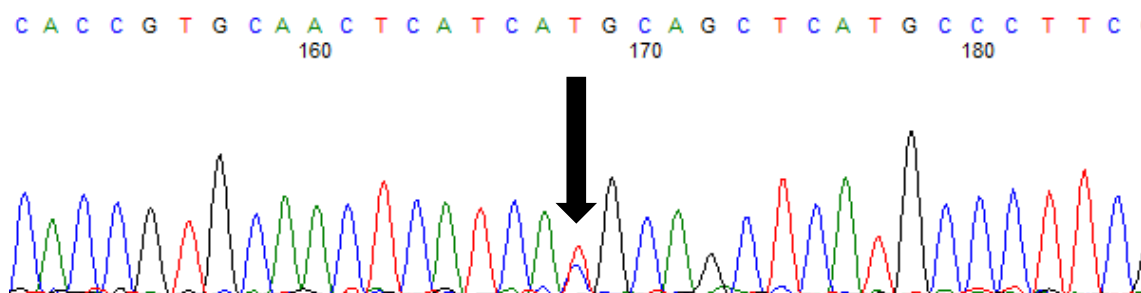


Figura 3.14 – Cromatograma da amostra 11 para o exão 20 do gene EGFR. Este resultado corresponde a um falso positivo, com um sinal bastante equilibrado entre as bases C e T.

O sinal das cadeias contendo a base T possui uma intensidade de sinal algo semelhante ao sinal das cadeias com a base C. Tal facto sugere que poderá ter ocorrido uma contaminação, nomeadamente da amostra 09 ou 15 uma vez que o teor em células tumorais é de 100%, o que justifica o equilíbrio de sinal obtido na região indicada pela seta, na figura 3.14.

A avaliação do primeiro ensaio 2011 - (*Round 2*) *Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer* – foi de 1,25 (em 2 valores) pelo fato de não ter sido determinado, até à data limite de entrega dos resultados, o genótipo dos exões 18 e 20 das amostras 01 a 10. No segundo ensaio, foi atribuída uma classificação de 1,4 (em 2) pelos resultados apresentados, onde foram penalizados o falso negativo obtido e a não determinação do genótipo das amostras 19 e 20. De acordo com o relatório fornecido, “é necessário proceder a uma revisão dos procedimentos e ensaios realizados de modo a determinar a causa dos problemas ocorridos, e assim, tomar ações preventivas para minimizar o risco destes problemas ocorrerem em amostras reais”, sugerindo portanto uma revalidação do protocolo utilizado para aplicações futuras.

3.5. Otimização do protocolo de amplificação por PCR Multiplex dos exões 18-21 do gene EGFR a partir de amostras de sangue conservadas em cartão FTA

Após o desenvolvimento de um protocolo de amplificação por PCR convencional e de um protocolo de sequenciação pela metodologia de Sanger foi elaborado um protocolo de amplificação do material genético por PCR Multiplex. Esta técnica tem a vantagem de ter custos mais reduzidos em relação ao PCR convencional uma vez consome menos reagentes, e implica menor tempo de bancada uma vez que o mesmo tubo de reação pode amplificar as diferentes regiões de interesse, em simultâneo. No entanto, a principal vantagem em adotar a técnica de PCR multiplex prende-se com o escasso volume obtido quando se extrai o DNA das amostras FFPE, o que limita o número de ensaios por amostra. Em algumas amostras foi necessário utilizar um volume de 5 μ L ou 10 μ L por reação para amplificar as regiões de interesse correspondentes a cada exão. O PCR multiplex permite amplificar todos os alvos usando o volume de DNA genómico utilizado para amplificar apenas uma região de interesse por PCR convencional, o que constitui uma grande vantagem.

Foram desenhados os primers da tabela 2.3 da seção 2.1.4.1, uma vez que os primers utilizados no PCR convencional originavam produtos com tamanho muito semelhante entre si entre os produtos dos exões 18 e 19 e entre os exões 20 e 21 (vide tabela 2.2, seção 2.1.4.1), o que resultava numa resolução insuficiente que distinguisse todos os 4 produtos, A temperatura de annealing dos primers foi determinada através da realização de ensaios com gradientes de temperaturas dos 50°C aos 60°C, num intervalo de 2°C. Estes ensaios foram otimizados, numa primeira instância, em PCR convencional de modo a facilitar a visualização de eventuais bandas inespecíficas no gel de agarose. O DNA foi extraído tal como descrito na seção 2.2.1 e, utilizando o protocolo de amplificação descrita na seção 2.2.4.1 obtiveram-se os seguintes resultados:

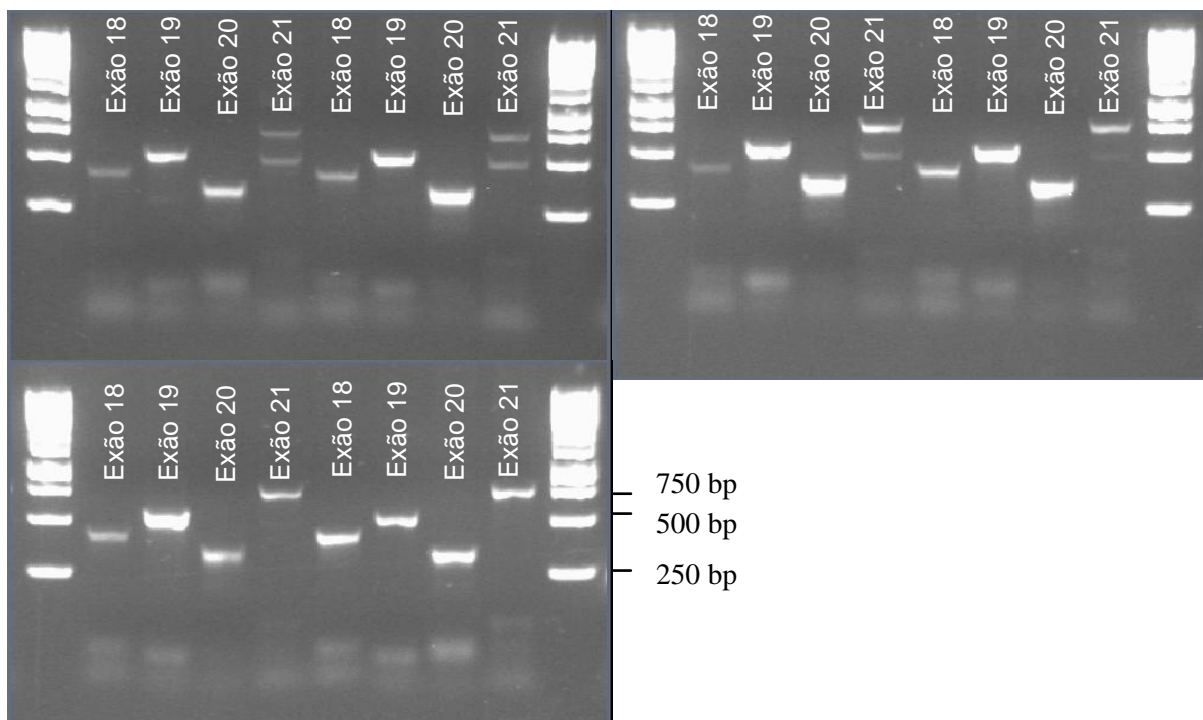


Figura 3.15– Fotografia do gel de agarose da otimização as condições do PCR, com os primers da tabela 2.2 da seção 2.1.4.1. Através da comparação dos resultados do gradiente de temperatura verifica-se que o aumento da temperatura de annealing permite a obtenção de produtos mais específicos. A 60°C os primers ligam-se apenas às regiões de interesse, amplificando 4 produtos específicos. Verifica-se também um aumento do rendimento em todos os produtos a reação à medida que a temperatura de annealing aumenta.

Após a determinação da temperatura de annealing, amplificou-se os mesmos produtos por PCR multiplex utilizando as condições descritas na tabela 2.7 da seção 2.2.4.2. Para amplificar por PCR multiplex utilizou-se a enzima *Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (F-549)*. A figura 3.16 exemplifica os resultados obtidos:

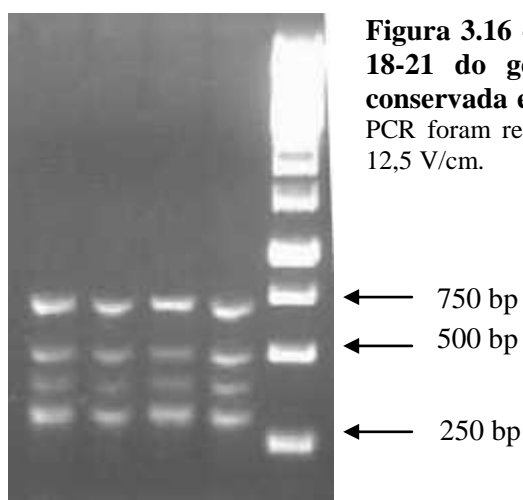


Figura 3.16 - Amplificação das regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR obtida a partir de uma amostra conservada em cartão FTA por PCR Multiplex. Os produtos de PCR foram revelados num gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm.

Tal como na amplificação conseguida através de PCR convencional, os primers utilizados originaram os produtos esperados correspondentes aos amplicões das regiões de interesse do gene EGFR. A resolução do gel de agarose 1,5% permite distinguir e diferenciar os 4 produtos possibilitando assim averiguar o rendimento de amplificação de cada produto.

A enzima *Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (F-549) foi utilizada para as reações de amplificação por PCR multiplex uma vez que apresentou melhores resultados ao nível do rendimento de amplificação relativamente à enzima *Surf Hot Taq DNA Polimerase*. Esta enzima foi inclusivamente utilizada em amostras cuja amplificação foi insuficiente para possibilitar o genótipo, permitindo contornar, em alguns casos, a fraca amplificação dos produtos.

Após a amplificação dos produtos, procedeu-se à purificação dos mesmos recorrendo ao kit comercial *DNA Clean&Concentrator™-5*, preparando assim os produtos para a sequenciação pelo método de Sanger.

3.5.1.Otimização do protocolo de sequenciação de produtos amplificados por PCR multiplex

Após o desenvolvimento de um protocolo para a amplificação por PCR multiplex, foi necessário desenvolver um protocolo para sequenciar dos produtos obtidos. As condições da reação de sequenciação foram ajustadas ao nível do tempo de desnaturação, *annealing* e extensão que culminaram no programa de sequenciação descrito na tabela 3.7 da seção 2.2.4.2. Foram obtido os seguintes cromatogramas:

3.5.2. Amplificação por PCR multiplex e sequenciação pelo método de Sanger de diferentes amostras FFPE contendo mutações nos exões 18-21 do gene EGFR

Para testar a capacidade deste protocolo de amplificação e sequenciação em detetar mutações nos exões 18-21 do gene EGFR foram utilizadas as amostras FFPE 02, 03, 11 e 12 por possuírem mutações em cada exão. Apenas foram genotipadas estas amostras devido à indisponibilidade de volume de todas as amostras, pelo que se optou por aplicar este protocolo nestas 4 amostras uma vez que, no global, continham mutações somáticas nos 4 exões de interesse do gene EGFR. O resultado da amplificação está representado na figura 3.17:

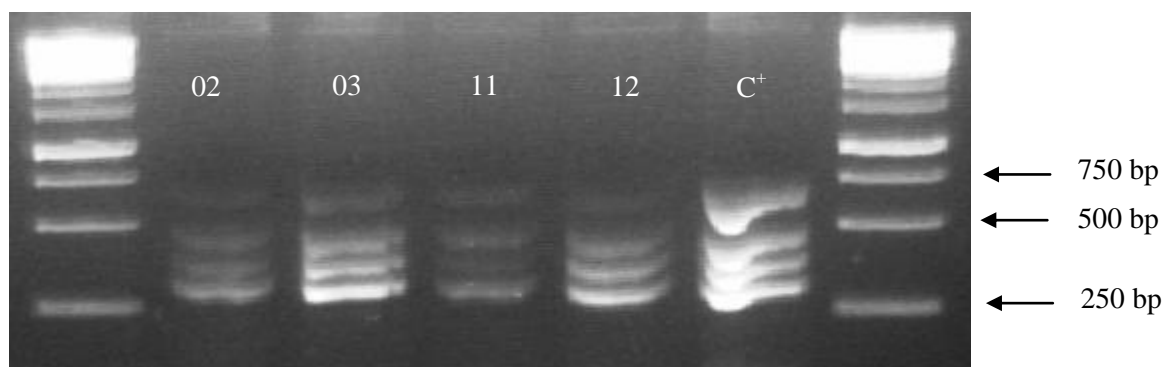


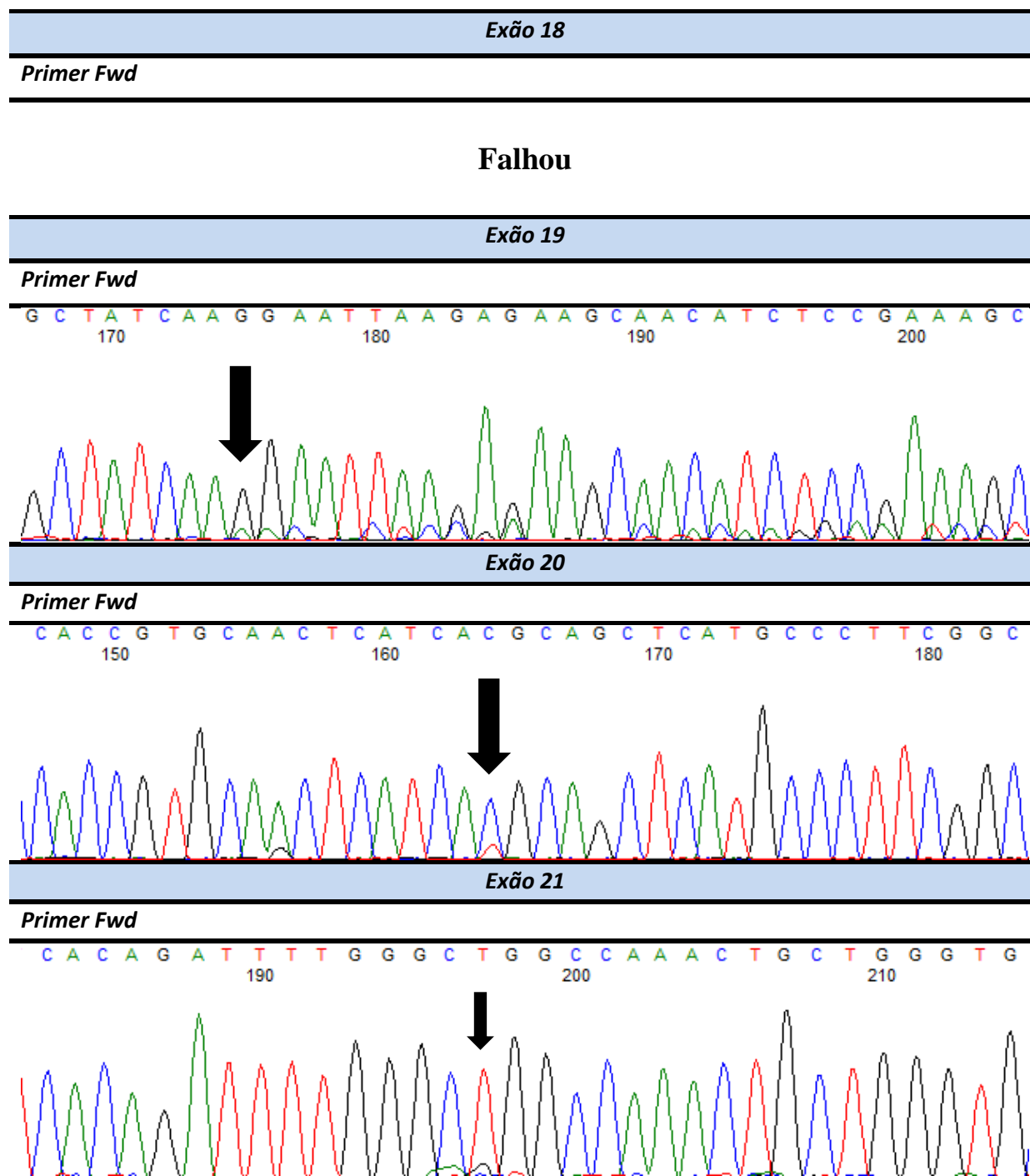
Figura 3.17 - Amplificação das amostras FFPE 02, 03, 11 e 12 por PCR multiplex. Os produtos de PCR foram revelados num gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x, 12,5 V/cm.

Verifica-se que houve amplificação específica de todas as amostras, embora com rendimentos diferentes entre os 4 produtos. A utilização do kit de purificação *DNA Clean&ConcentratorTM-5* permitiu concentrar o DNA de todas as amostras e obter assim uma quantidade adequada de produto para a sequenciação.

O protocolo de amplificação por PCR multiplex desenvolvido a partir de amostras de sangue conservadas em cartão *Indicating FTA Micro Card* permitiu obter uma amplificação adequada do material genético a partir de amostras FFPE. A diferença da intensidade das bandas do controlo positivo e das amostras FFPE revela o estado do material inicial extraído da parafina; o DNA das amostras FFPE possui um estado de degradação mais elevado relativamente às amostras conservadas no cartão FTA, que se reflete no rendimento de amplificação obtido. Este facto justifica a diferença entre o rendimento de amplificação das várias amostras uma vez que não se verifica uma uniformidade na intensidade das bandas entre as diferentes amostras FFPE e o controlo positivo.

Após a purificação dos produtos de PCR procedeu-se à reação de sequenciação de acordo com as condições descritas na tabela 2.9 da seção 2.2.8. Os cromatogramas obtidos para estas amostras encontram-se na tabela 3.8:

Tabela 3.8 – Cromatogramas das amostras 12 (exão 18), 03 (exão 19), 02 (exão 20) e 03 (exão 21). Foi possível detetar mutações em todos os exões, à exceção do exão 18 devido ao sinal fraco obtido. A repetição deste ensaio não foi repetida, uma vez que este se realizou na etapa final deste estudo.



Através do protocolo desenvolvido foi possível obter a sequenciação dos exões 19, 20 e 21. O cromatograma obtido para o exão 18 da amostra 12 apresentou um sinal bastante fraco pelo que não foi possível identificar a mutação rs28929495: c.2155G>A (p.Gli719Ser). Estes ensaios foram realizados já na etapa final deste estudo, pelo que não foram repetidos até obter uma boa sequenciação deste produto. No entanto, uma vez que a sequenciação da região de interesse do exão 18 foi

conseguida em amostras de sangue em cartão *Indicating FTA Micro Card*, é de esperar obter bons resultados.

A figura 3.18 esquematiza as etapas necessárias para a determinação do genótipo em amostras FFPE, através de uma amplificação por PCR Multiplex.

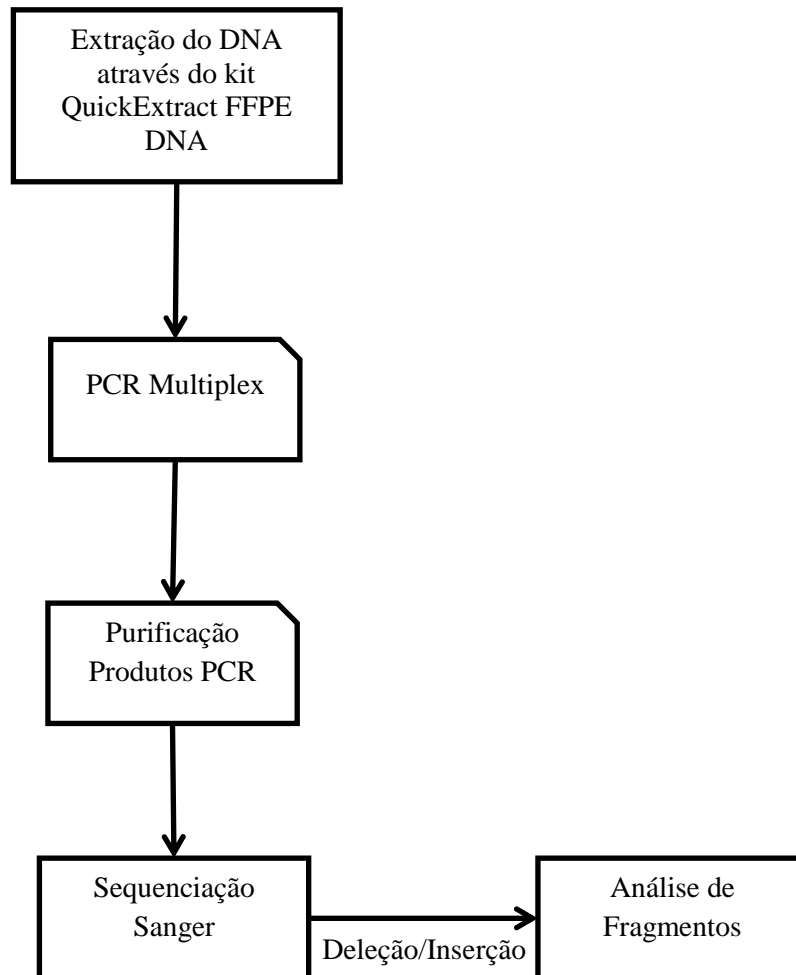


Figura 3.18 – Etapas realizadas para a genotipagem das regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR.

3.6. Validação analítica dos protocolos de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR desenvolvidos neste estudo

Um dos objetivos deste trabalho experimental consistia na validação deste protocolo de acordo com as documentações da qualidade: norma ISO 15189 – *Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence*, OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetics Testing e diretrizes de boas práticas em laboratórios de genética humana.

A otimização deste protocolo de genotipagem dos exões 18-21 do gene EGFR foi desenvolvida a partir de amostras de sangue em cartão *Indicating FTA Micro Card*, onde foram determinadas as

condições mais adequadas para amplificar e sequenciar os produtos PCR. As amostras de gDNA da linha celular MCF-10a permitiram validar o parâmetro do limite de deteção associado aos métodos de sequenciação direta pelo método de Sanger, tendo sido alcançados resultados bastante otimistas. A validação do limite de deteção foi feita com recurso a soluções com teores 50% até 0,2% de DNA genómico contendo um alelo mutado para o exão 19. Este material foi fornecido pela Horizon Discovery com o intuito de avaliar o limite de deteção das técnicas de sequenciação pelo método de Sanger e por Análise de Fragmentos.

O protocolo de amplificação e sequenciação de amostras FFPE foi validado com 20 amostras FFPE fornecidas no âmbito do programa de controlo de qualidade externa “*Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small lung cancer*”. Este número de amostras permitiu avaliar a robustez do método, uma vez que as diferentes amostras apresentavam rendimentos de amplificação diferentes entre si. Este facto permite concluir que o método aqui relatado não apresenta ainda a robustez necessária para avaliar com um grau de confiança elevado o genótipo dos exões 18-21 do gene EGFR. As diferenças entre o estado das amostras limitam a robustez de todo o protocolo, sendo que este ponto representa um dos principais aspetos a melhorar no futuro.

Por outro lado, o limite de deteção foi um dos parâmetros que apresentou resultados bastante satisfatórios, quer para as amostras de gDNA isolado, quer para as amostras FFPE. A sensibilidade alcançada foi além dos valores descritos na bibliografia (15%-25%) (Astrazeneca, n.d.; Qin et al., 2011) o que permite afirmar que as técnicas aplicadas neste estudo são adequadas para analisar amostras heterogéneas, em que o conteúdo de células tumorais pode ser extremamente baixo.

No entanto, foi detetado um falso positivo para a amostra 11, provavelmente por contaminação de outra amostra, tal como discutido na seção 3.4.4. Este resultado sugere que ainda são necessárias alterações ao nível do manuseamento das amostras para evitar que casos destes ocorram com amostras de pacientes reais. Este resultado foi penalizado na avaliação atribuída pela EQMN.

Em 72 produtos sequenciados, foram identificadas e confirmadas pelo relatório fornecido pela EQMN 14 mutações distribuídas pelos exões 18 a 21 (verdadeiros positivos) e foi detetado um falso positivo (amostra 11, exão 20). Com estes dados determinou-se a sensibilidade e especificidade do protocolo desenvolvido. A sensibilidade mede a capacidade de um método de diagnóstico molecular em identificar os verdadeiros positivos em amostras que de facto contém mutações. Este parâmetro foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\textit{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

VP= Verdadeiro Positivo

FN = Falso Negativo

NV = Verdadeiro Negativo

FP = Falso Positivo

$$\textit{Sensibilidade} = \frac{14}{14 + 0} \times 100 = 100\%$$

A sensibilidade obtida foi de 100% o que significa que este protocolo tem a capacidade de identificar amostras que de facto contêm mutações.

Por outro lado, a especificidade representa a capacidade do protocolo em identificarmos verdadeiros negativos nas amostras em que não há alterações no genótipo. Neste estudo foram identificados 57 verdadeiros negativos e 1 falso positivo.

$$\textit{Especificidade} = \frac{VN}{FP + VN} \times 100$$

VP= Verdadeiro Positivo

FN = Falso Negativo

NV = Verdadeiro Negativo

FP = Falso Positivo

$$\textit{Especificidade} = \frac{57}{1 + 57} \times 100 = 98,27\%$$

Apesar de se ter obtido apenas um resultado errado em 72 produtos sequenciados, este assume maior importância uma vez que, caso este protocolo fosse aplicado para analisar amostras de doentes reais, o seu resultado ajudaria o clínico a tomar uma decisão relativa ao tratamento com base num resultado errado dado pelo laboratório. Os resultados falsos positivos, bem como os falsos negativos, assumem por isso grande importância e é imperativo que a sua taxa de ocorrência seja eliminada.

O limite de deteção alcançado neste trabalho constitui um dos principais pontos positivos, uma vez que ultrapassou o descrito na literatura (Astrazeneca, n.d.; Medical Advisory Secretariat, 2010b; Qin et al., 2011). A capacidade em detetar DNA de células tumorais em baixas quantidades (5%) constitui um importante ponto de mais-valia associado ao protocolo desenvolvido. No entanto, a robustez deste protocolo é um parâmetro que deverá ser melhorado no futuro. A principal dificuldade deste estudo residia em amplificar as amostras FFPE em quantidade suficiente para a reação de sequenciação. Para contornar este obstáculo optou-se por realizar uma re-amplificação dos produtos de PCR, com o intuito de otimizar o volume de DNA genómico extraído e assim permitir a realização de um maior número de ensaios por amostra. No entanto, a realização deste procedimento tem a desvantagem de diluir o conteúdo do número de cópias contendo a mutação que se pretende detetar,

uma vez que a proporção de DNA não mutado aumenta com a nova reação de PCR em relação às cópias com DNA mutado. Este facto foi evidenciado no exão 21 da amostra 13:

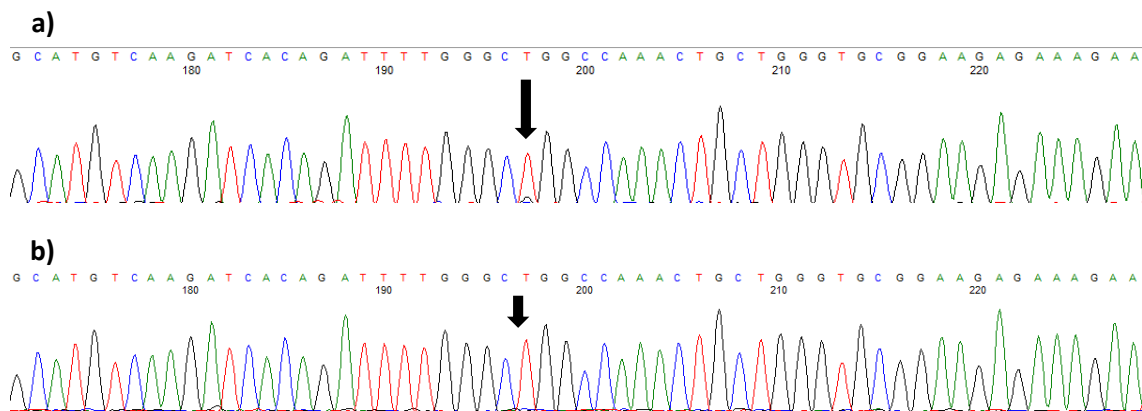


Figura 3.19 – Cromatogramas da amostra 13. Esta amostra foi submetida a re-amplificação do produto de PCR para a confirmação do seu genótipo originando dois genótipos diferentes. a) A mutação c.2573 T>G p.Leu858Arg (rs121434568) foi detetada quando o DNA genómico foi amplificado pela primeira vez por PCR; b) cromatograma do produto de PCR purificado re-amplificado por PCR convencional, cuja mutação foi diluída e não foi detetada.

A re-amplificação originou um resultado em que não foi possível detetar o SNP obtido no cromatograma anterior. Este resultado demonstra que a opção de utilizar a re-amplificação de produtos de PCR para aumentar a quantidade de produto não é uma opção válida uma vez que poderá originar falsos negativos, devido à diluição do número de produtos de PCR contidos no tubo de reação. Nestes casos, deverá ser aumentado o volume de DNA genómico utilizado na reação de PCR, ou desenvolver reações de amplificação que utilizem, por exemplo, outras enzimas (exemplo: Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (F-549)).

4. Conclusão e perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido neste estudo culminou no desenvolvimento de um protocolo de amplificação de DNA de amostras FFPE por PCR convencional e por PCR Multiplex, e respetiva sequenciação das regiões de interesse dos exões 18-21 do gene EGFR. Este protocolo permitiu sequenciar 72 produtos de PCR, correspondentes a 18 amostras FFPE, com alta especificidade, sensibilidade e limite de deteção. Foram detetadas as mutações somáticas mais importantes - G719A (rs28929495); del E746_759A (rs12913421); T790M (rs121434569) e L858R (rs121434568) no exão 18, 19, 20 e 21, respetivamente - do gene EGFR até um teor mínimo de 5% de células tumorais, o que revela o potencial e capacidade das técnicas de sequenciação de Sanger e Análise de Fragmentos para o rastreamento de mutações somáticas no gene EGFR. A amplificação por PCR convencional foi utilizada para amplificar as 18 amostras FFPE, enquanto a amplificação por PCR Multiplex apenas foi aplicada nas amostras 02, 03, 11 e 12. Este último protocolo foi desenvolvido na parte final deste estudo e, devido ao escasso volume de amostras disponível, não foi possível proceder ao rastreamento de todas as amostras, pelo que apenas as referidas amostras foram selecionadas para avaliar a capacidade e sensibilidade do protocolo multiplex em determinar as mutações mais importantes presentes nos exões 18-21 do gene EGFR; foram determinadas as mutações no exão 19, 20 e 21.

O limite de deteção obtido neste trabalho foi além do esperado, quer no estudo com recurso ao gDNA da linha celular MCF-10a contendo a mutação E746_A750 num dos alelos, quer no estudo com amostras FFPE, onde se detetaram mutações com um teor mínimo de 0,5% e 5%, respetivamente. Estes dados, em conjunto com os valores obtidos para a especificidade (100%) no estudo do rastreamento de amostras FFPE, permitem encarar o rastreamento do gene EGFR com recurso à técnica de sequenciação pelo método de Sanger com otimismo, pois a capacidade de obter resultados precisos pesa na decisão do clínico em administrar o tratamento para o cancro do pulmão de não-pequenas células com recurso à terapia com inibidores da tirosina quinase.

Apesar dos resultados obtidos, são necessários desenvolver mais estudos para este diagnóstico molecular estar de acordo com as normas em vigor nos laboratórios da STAB VIDA. A robustez deste protocolo constitui um aspeto a melhorar no futuro, sendo o principal ponto negativo deste estudo. São necessárias amostras de doentes reais com CPNPC, e em maior quantidade em relação às testadas neste estudo, para validar os restantes parâmetros de qualidade exigidos pela legislação portuguesa e pelas normas adotadas pelos laboratórios da STAB VIDA (*OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing*, norma ISO 15189 *Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence* e diretrizes de boas práticas em laboratórios de genética humana). Como tal, não foi atingido o objetivo inicial de implementar o diagnóstico molecular para o rastreamento de mutações somáticas nas regiões de interesse do gene EGFR em doentes com cancro do pulmão de não-pequenas células nos laboratórios da STAB VIDA.

5. Bibliografia

- Alberg, Anthony J., and Jonathan M. Samet, 2012. "Epidemiology of Lung Cancer." *American College of Chest Physicians* 123:21S–49S.
- American Cancer Society, 2012a. "How is non-small cell lung cancer diagnosed?" Retrieved (<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-diagnosis>).
- American Cancer Society, 2012b. "How is non-small cell lung cancer staged?" Retrieved (<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-staging>).
- American Cancer Society, 2012c. "Radiation for therapy for non-small cell lung cancer." *American Cancer Society*. Retrieved (<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-treating-radiation-therapy>).
- American Cancer Society, 2012d. "Surgery for non-small cell lung cancer." *American Cancer Society*. Retrieved (<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-treating-surgery>).
- Asano, Hiroaki et al., 2006. "Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay." *Clinical cancer research* □ : an official journal of the American Association for Cancer Research 12(1):43–48. Retrieved December 11, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397022>).
- Astrazeneca, Whilst, n.d. "Methodologies for EGFR Mutation Detection."
- Bacchi et al., 2012. "Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in Brazilian lung cancer patients." *Clinics* 67(5):419–24.
- Biosystems, Applied, 2002. "GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD."
- Brandt, et al., 2006. "Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response." *Clinical cancer research* □ : an official journal of the American Association for Cancer Research 12(24):7252–60. Retrieved October 28, 2012
- Brodsky, J. B., and E. Cohen, 2000. "Video-assisted thoracoscopic surgery." *Current opinion in anaesthesiology* 13(1):41–45.
- Chernecky, Cynthia C., and Barbara J. Berger, 2008. *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*. 5th ed. Saunders.
- Collura, Chey V et al., 2008. "Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells."
- Da Cunha Santos, Gilda et al., 2010. "Detection of EGFR and KRAS mutations in fine-needle aspirates stored on Whatman FTA cards: is this the tool for biobanking cytological samples in the molecular era?" *Cancer cytopathology* 118(6):450–56.
- Dempke, et., 2010. "Targeted therapies for non-small cell lung cancer." *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 67(3):257–74.

- Dienstmann, et al., 2011. "Personalizing Therapy with Targeted Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Abstract:" 2(3):165–77.
- Doebele, et al., 2010. "New strategies to overcome limitations of reversible EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy in non-small cell lung cancer." *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 69(1):1–12.
- Eberhard, et al., 2008. "Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(6):983–94.
- European Molecular Genetics Quality Network, 2012a. "2011 (additional round) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small small cell lung cancer." (July):1–7.
- European Molecular Genetics Quality Network, 2012b. *Final Report - 2011 (Round 2) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer.*
- Godin-Heymann, Nadia et al., 2008. "The T790M 'gatekeeper' mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor." *Molecular cancer therapeutics* 7(4):874–79.
- Gu, Dongqing et al., 2007. "Database of Somatic Mutations in EGFR With Analyses Revealing Indel Hotspots But No Smoking- Associated Signature." 28(April):760–70.
- Han, Sae-Won et al., 2005. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream molecules as response predictive markers for gefitinib (Iressa, ZD1839) in chemotherapy-resistant non-small cell lung cancer." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 113(1):109–15.
- Higashiyama, Shigeki et al., 2008. "Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands." *Cancer science* 99(2):214–20. Retrieved November 11, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18271917>).
- Horizon Discoveries, 2011a. "Genesis gene targeting." Retrieved (<http://horizon.ehclients.com/technology/gene-targeting//?genesis/>).
- Horizon Discoveries, 2011b. "Horizon Xman Genesis faqs." Retrieved (<http://horizon.ehclients.com/uploads/horizon-downloads/horizon-xman-genesis-faqs.pdf>).
- Jackman, David M. et al., 2006. "Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib." *Clinical cancer research* : an official journal of the American Association for Cancer Research 12(13):3908–14.
- Jänne, Pasi a et al., 2006. "A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening." *Clinical cancer research* : an official journal of the American Association for Cancer Research 12(3 Pt 1):751–58. Retrieved November 6, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467085>).

- Kolch, W., 2000. "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." *The Biochemical journal* 351 Pt 2:289–305.
- Leahy, By Daniel J., 2004. "Structure and Function of the Epidermal Growth Factor (EGF/ErbB) Family of Receptors." *Advances in Protein Chemistry* 68:1–27.
- Lynch, Thomas J. et al., 2004. "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib." *The New England Journal of Medicine* 350:2129–39.
- Ma, C. et al., 2011. "T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports." *Journal of thoracic disease* 3(1):10–18.
- Martin, P. et al., 2006. "Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer." *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center* 13(2):129–40.
- Medical Advisory Secretariat, 2010a. *Epidermal Growth Factor Receptor Mutation (EGFR) Testing for Prediction of Response to EGFR-Targeting Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Drugs in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: An Evidence-Based Analysis.*
- Medical Advisory Secretariat, 2010b. *Epidermal Growth Factor Receptor Mutation (EGFR) Testing for Prediction of Response to EGFR-Targeting Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Drugs in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: An Evidence-Based Analysis.*
- Mok, Tony et al., 2009. "Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pumanary Adenocarcinoma." *The New England Journal of Medicine* 361:947–57.
- Molina-Vila, Miguel A. et al., 2008. "A Sensitive Method for Detecting EGFR Mutations in Non-small Cell Lung Cancer Samples with Few Tumor Cells." *Journal of Thoracic Oncology* 3(11):1224–35.
- Morgensztern, Daniel, and Howard L. McLeod, 2005. "PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy." *Anti-cancer drugs* 16(8):797–803.
- National Cancer Institute, 2012. "Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®)." Retrieved (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/Patient/page5>).
- Oda, K. et al., 2005. "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling." *Molecular systems biology* 1:2005.0010. Retrieved November 5, 2012.
- Pagana, KD, and TJ Pagana., 2010. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. 4th ed. St. Louis: Mosby.
- Pan, Q. et al., 2005. "Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas." *The Journal of molecular diagnostics* □ : *JMD* 7(3):396–403.
- Pikor, L. et al., 2011. "DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses." *Journal of visualized experiments* □ : *JoVE*(49):3–5.
- Prenzel, N.et al., 2001. "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." *Endocrine-related cancer* 8(1):11–31.

- Provencio, M. et al., 2011. "Inoperable stage III non-small cell lung cancer: Current treatment and role of vinorelbine." *Journal of thoracic disease* 3(3):197–204.
- Qin, L. et al., 2011. "Comparison of three methods for detecting epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer." *Chinese Medical Journal* 124(6):887–91.
- Sanders, Heather R. et al., 2008. "A sensitive and specific method for detection of mutations in Exons 19 and 21 of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in the plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients." 6:793–804.
- Sequist, Lecia V et al., 2008. "First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations." *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology 26(15):2442–49.
- Sharma, Sreenath V. et al., 2007. "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." *Nature reviews. Cancer* 7(3):169–81.
- Shaw, A., 2011. "The Importance of Histology and Molecular Testing (EGFR and EML4-ALK) in the Initial Evaluation of Advanced Non-small Cell Lung Cancer." *Histology and Molecular Testing* 292–98.
- Sidorova, Julia V. et al., 2012. "A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays." *Experimental dermatology* 21(1):57–60.
- Sihto, Harri et al., 2005. "Epidermal growth factor receptor domain II, IV, and kinase domain mutations in human solid tumors." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83(12):976–83.
- Takimoto, Chris H., and Emiliano Calvo,. 2008. "Principles of Oncologic Pharmacotherapy." in *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. Oncology.
- Torrance, C. J. et al., 2001. "Use of isogenic human cancer cells for high-throughput screening and drug discovery." *Nature biotechnology* 19(10):940–45.
- Voldborg, B. Rude,et al., 1997. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials." *Annals of Oncology* 8:1197–1206.
- Wang et al., 2012. "Animal models of lung cancer characterization and use for chemoprevention research." *Progress in molecular biology and translational science* 105:211–26.
- Wu et al., 2012. "Phase III, randomized, open-label, first-line study in Asia of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer: evaluation of patients recruited from mainland China." *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 8(3):232–43.
- Yost, Shawn E. et al., 2012. "Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens." *Nucleic acids research* 40(14):e107.

Anexo A - A utilização de Inibidores da Tirosina Quinase (TKI) em primeira linha no tratamento para o CPNPC.

O IPASS (IRESSA Pan-AsianStudy) foi um estudo realizado entre 2006 e 2007 onde foi testado o TKI gefitinib (Iressa, AstraZeneca, Macclesfield, Reino Unido) em comparação com a combinação de compostos à base de platina carboplatina (Paraplatin, Bristol-MyersSquibb)/paclitaxel (Taxol, Bristol-MyersSquibb), como tratamento de primeira linha em pacientes com CPNPC. Este estudo randomizado de fase III teve a participação de 1217 pacientes não fumadores (<100 cigarros fumados durante a vida) ou ex-fumadores leves (≤ 10 maços de cigarros por ano e pararam de fumar ≥ 15 anos) com CPNPC avançado e com histologia classificada em adenocarcinoma (Jänne et al., 2006; Mok et al., 2009).

O principal objeto de estudo foi a avaliação do tempo de sobrevivência livre de progressão da doença (PFS) e como parâmetros secundários foram avaliados a sobrevida (OS), a taxa de resposta objetiva (percentagem combinada de doentes cujos tumores responderam parcialmente ou completamente ao tratamento, ORR), qualidade de vida, redução de sintomas, segurança e ocorrência de efeitos adversos (Mok et al., 2009; Wu et al., 2012). Neste parâmetro foram avaliados 950 pacientes, nos quais: a) 208 pacientes apresentavam mutações somáticas ao nível do exão 18-21 do gene EGFR; b) 158 pacientes não continham mutações somáticas nos exões 18-21 do gene EGFR e; c) 584 pacientes cujo genótipo para os exões 18-21 do gene EGFR era desconhecido.

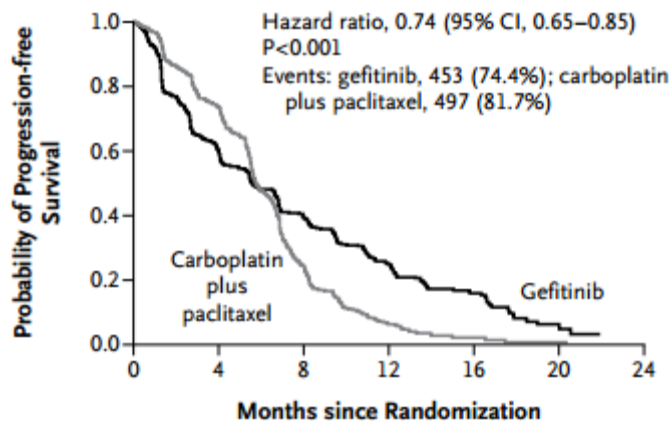


Figura A.1- Curva de Kaplan-Meier para o marcador temporal de sobrevida livre de progressão (PFS) obtidas numa população de 950 doentes com CPNPC integrados no estudo IPASS. Adaptado de Mok et al., 2009.

A PFS média foi de 6 meses, idêntica para os dois grupos de estudo. Ao fim de 12 meses, 24,9% dos doentes tratados com gefitinib não apresentavam progressão da doença, enquanto apenas 6,7% dos doentes não apresentava eventos de progressão da doença (Mok et al., 2009). Estes resultados demonstraram que o gefitinib não apresenta inferioridade face ao tratamento convencional à base de composto de platina, e que apresenta um maior tempo de sobrevivência livre de doença. Tal

como se pode verificar no gráfico da figura 2, nos primeiros 6 meses a probabilidade do tempo de sobrevida livre de progressão é ligeiramente maior com o tratamento baseado em compostos de platina, porém nos 16 meses seguintes, o TKI gefitinib demonstrou maior PFS. Estes resultados foram também obtidos num outro estudo (Wu et al., 2012) randomizado de fase III realizado em 372 pacientes com CPNPC em fase avançada, conforme demonstra a figura 7.

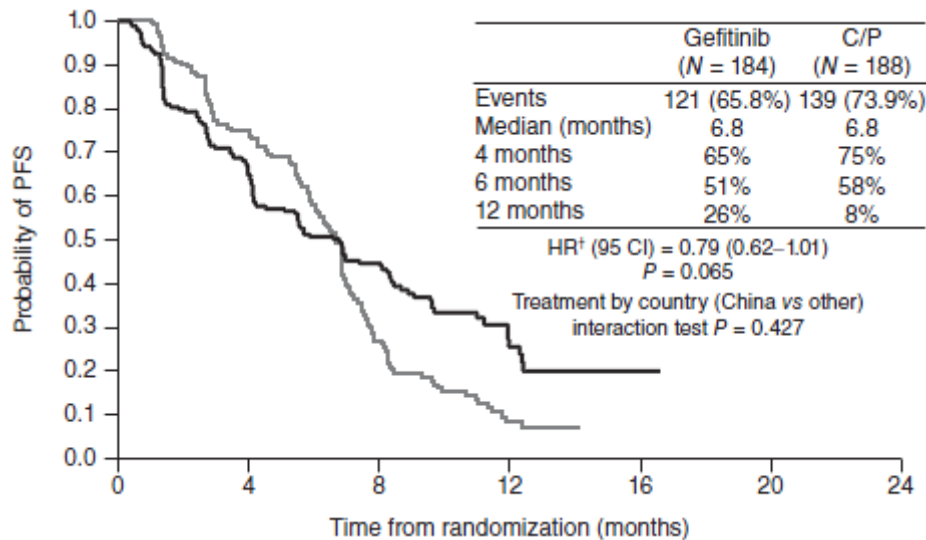


Figura A.2– Curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência livre de progressão obtida a partir do estudo de 372 pacientes de origem chinesa administrados com gefitinib (n=184) ou com quimioterapia baseada nos compostos carboplatina + paclitaxel (C/P). A PFS apresentou melhores resultados nos pacientes tratados com gefitinib (26% vs 8%). Adaptado de Wu et al., 2012.

Outro aspeto demonstrado neste estudo foi o facto de haver uma associação significativa entre o tratamento administrado com o gefitinib e as mutações somáticas presentes nos exões 18-21 do gene EGFR. O tempo de sobrevivência livre de progressão foi significativamente mais prolongado entre os pacientes que receberam tratamento com este TKI em relação aos pacientes que receberam tratamento com quimioterapia baseada em compostos de platina.

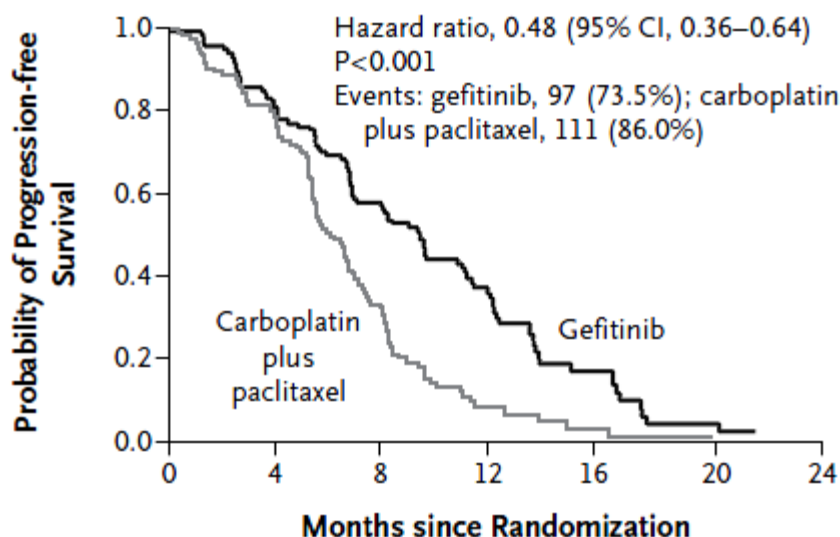


Figura A.3 – Curva de Kaplan-Meier para a probabilidade da PFS em pacientes com mutações presentes no gene EGFR tratados com gefitinib ou com quimioterapia carboplatina + paclitaxel. A PFS é mais prolongada em doentes tratados com gefitinib. Adaptado de Mok et al., 2009.

Por outro lado, em pacientes sem mutações somáticas no genótipo a PFS foi significativamente mais reduzida para pacientes tratados com gefitinib do que em doentes administrados com quimioterapia, conforme ilustrado no gráfico da figura 1.9:

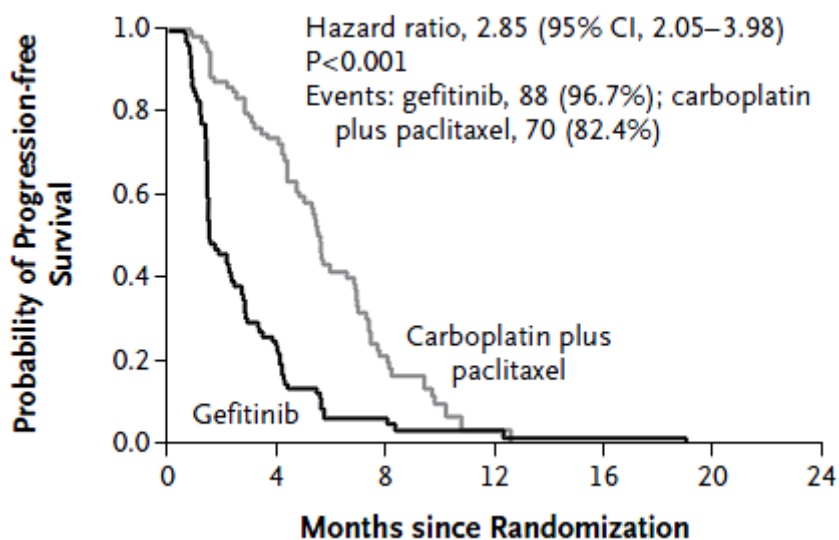


Figura A.4 - Curva de Kaplan-Meier para a probabilidade da PFS em pacientes sem mutações presentes no gene EGFR tratados com gefitinib ou com quimioterapia carboplatina + paclitaxel. A PFS é mais prolongada em doentes tratados com carboplatina + paclitaxel. Adaptado de Mok et al., 2009.

A ORR de doentes tratados com gefitinib foi apenas de 1,1% o que significa que este tratamento não provocou uma diminuição da redução do tamanho do tumor pelo que os resultados com carboplatina + paclitaxel apresentam uma PFS superior ao tratamento com gefitinib (Mok et al., 2009). Este dado evidencia a ineficácia que estes TKI possuem face a pacientes sem mutações

somáticas ao nível dos exões 18-21 do gene EGFR. O facto de o gefitinib não prolongar a PFS de doentes sem mutações somáticas justifica a interseção das curvas do gráfico da figura 2, onde a inferioridade inicial da PFS do tratamento por gefitinib é devida aos doentes sem mutações somáticas no gene EGFR. Assim, os doentes sem mutações somáticas beneficiaram do tratamento com compostos à base de platina, o que se traduziu numa maior PFS inicial, enquanto os doentes com mutações somáticas no gene EGFR apresentaram uma PFS mais prolongada. A ORR em doentes tratados com gefitinib foi de 71,2% em doentes com mutações somáticas no gene EGFR, o que traduz de forma evidente o benefício deste tratamento para este grupo de doentes.

A figura 1.10 ilustra a PFS dos restantes 584 pacientes, cujo genótipo para os exões 18-21 do gene EGFR não foi determinado, onde apresenta resultados bastante idênticos aos resultados obtidos para a PFS geral.

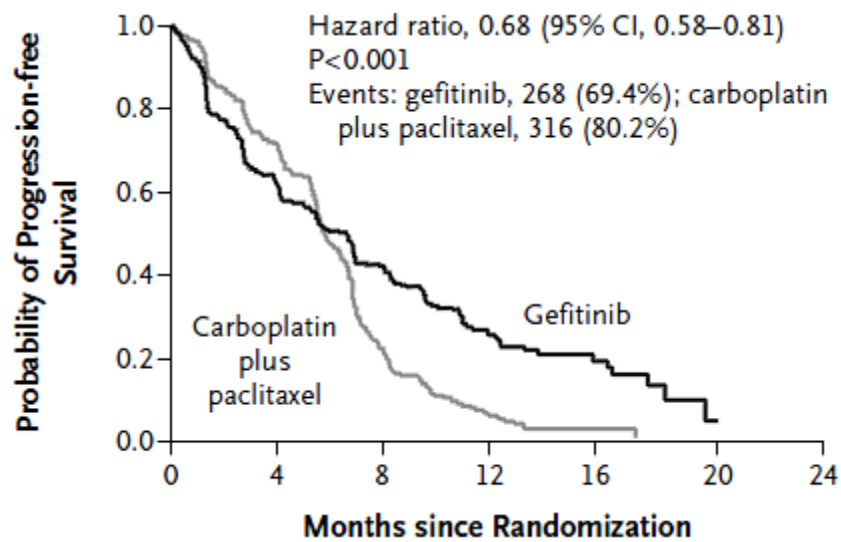


Figura A.5 – Curva de Kaplan-Meier para o marcador temporal de sobrevida livre de progressão (PFS) obtidas numa população de 584 doentes com CPNPC integrados no estudo IPASS, sem o *status* da mutação para o gene EGFR conhecido. Adaptado de Mok et al., 2009.

No que diz respeito aos parâmetros de qualidade de vida, verificou-se um aumento significativo em pacientes tratados com gefitinib do que nos pacientes tratados com carboplatina/paclitaxel (Mok et al., 2009).

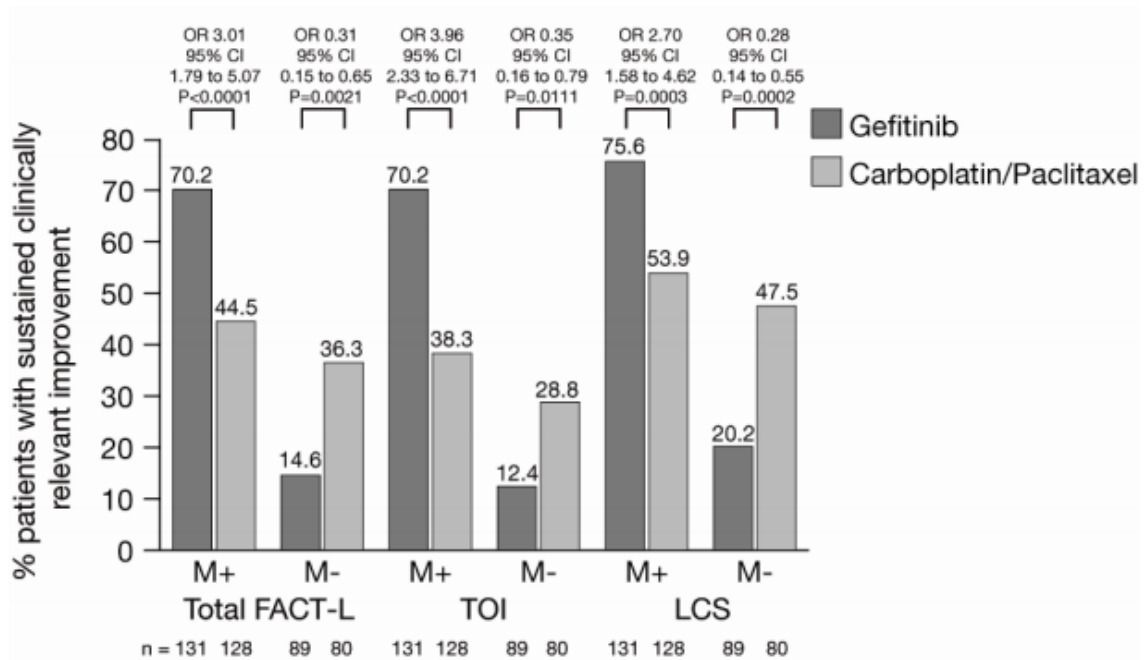


Figura A.6 – Percentagem de pacientes com melhoramento da qualidade de vida, onde foram avaliados os parâmetros de qualidade de vida FACT-L, TOI e LCS. Registrou-se uma melhoria nos doentes tratados com gefitinib. Adaptado de Mok et al., 2009.

Os pacientes sujeitos a monoterapia com gefitinib demonstraram um aumento significativo na qualidade de vida nos parâmetros FACT-L (*Functional Assessment of Cancer Therapy-Lung*), TOI (*Trial Outcome Index*) e LCS (*Lung-cancer subscale*), para todos os subgrupos (5,6). Verifica-se também neste caso uma associação entre a presença de mutações somáticas no gene EGFR e o benefício do gefitinib face ao tratamento por carboplatino + paclitaxel. Estes parâmetros foram determinados de acordo com o *score* obtido nos questionários elaborados pelo CDC (*Centre for Disease Control and Prevention*) (Mok et al., 2009). O período de tempo decorrido até ao agravamento da doença foi também mais longo, conforme demonstram os dados representados na figura 1.12:

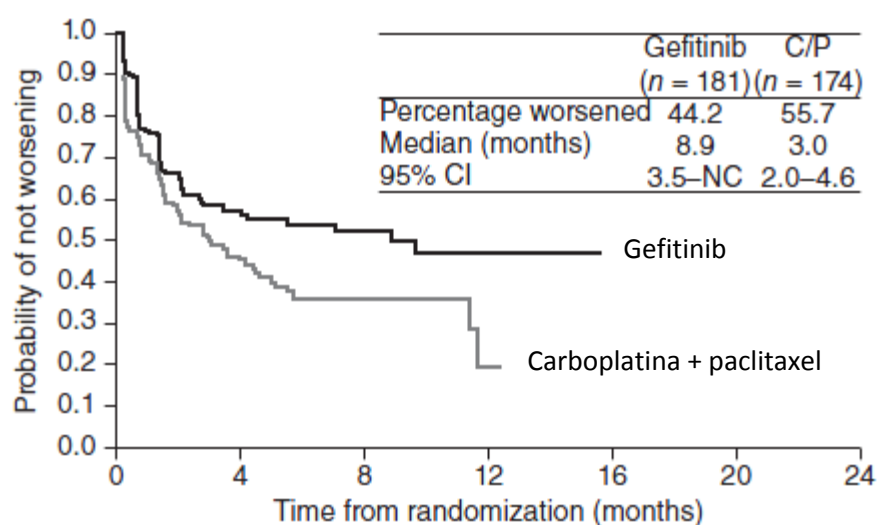


Figura A.7 – Curva de Kaplan-Meier para o tempo decorrido até ao agravamento da doença em pacientes avaliados com o parâmetro de qualidade de vida TOI. Os pacientes tratados com gefitinib apresentam um período mais prolongado até se registar o agravamento da doença Mok et al., 2009.

Os doentes tratados com gefitinib apresentaram também melhorias ao nível dos efeitos tóxicos onde se verificou uma diminuição da incidência de alopecia, náuseas, fadiga, vômitos, anorexia, sintomas neurotóxicos e mielossupressão associada aos tratamentos com carboplatina. No entanto, a incidência de acne, pele seca e diarreia foi mais elevada nos doentes tratados com gefitinib (Mok et al., 2009; Sequist et al., 2008; Wu et al., 2012).

Tabela A.5.1 – Efeitos secundários associados ao tratamento com Gefitinib e Carboplatina/Paclitaxel verificados em diferentes estudos IPASS. Adaptado de (Mok et al., 2009; Sequist et al., 2008; Wu et al., 2012).

Gefitinib	Carboplatina/Paclitaxel
Acne/irritação cutânea	Fadiga
Pele seca	Vômitos
Diarreia	Náuseas
	Alopecia
	Anorexia
	Neurotoxicidade
	Mialgia
	Mielossupressão

Os resultados do estudo IPASS demonstraram que tratamento de primeira linha com o TKI gefitinib é mais eficaz que o tratamento com carboplatina/paclitaxel, para uma população selecionada de pacientes asiáticos com CPNPC. A etnia, tabagismo e alterações histológicas são fatores que influenciam a probabilidade dos pacientes conterem mutações somáticas no gene EGFR. O rastreamento de mutações somáticas nos exões 18-21 do gene EGFR deve ser feito, sempre que possível, antes de iniciar o tratamento para adenocarcinomas pulmonares. Os pacientes asiáticos do sexo feminino, não fumadores ou ex-fumadores, com grupo histológico classificado como

adenocarcinoma sujeitos ao tratamento de primeira linha com gefitinib demonstraram uma PFS mais prolongada, um aumento da taxa de resposta, diminuição dos efeitos tóxicos associados aos compostos usados no tratamento e um aumento a qualidade de vida dos pacientes. A presença de mutações nos exões 18-21 do gene EGFR é um forte preditivo do melhoramento da PFS em doentes tratados com gefitinib, em comparação com carboplatina/paclitaxel, e de um aumento da resposta objetiva ao tratamento com este TKI o que significa que os pacientes que possuam mutações no gene EGFR poderão ter um maior benefício com um tratamento de primeira linha com gefitinib(Mok et al., 2009; Wu et al., 2012).

Além deste estudo IPASS, outros estudos foram realizados para demonstrar a resposta dos TKI face aos métodos de tratamento convencionais por quimioterapia. Estes estudos estão sumarizados na tabela 1.8:

Tabela A.5.2 – Terapia convencional vs Terapia com TKI. Ensaios clínicos de comparação dos parâmetros ORR, PFS e OS em relação ao tratamento convencional por quimioterapia face ao tratamento com recurso a TKI, em doentes com mutações no gene EGFR (American Cancer Society, 2012d).

Estudo (Autor)	Regime	ORR (meses)	PFS (meses)	OS (meses)
First-signal <i>Lee et al., 2009</i> <i>Kuet al., 2011</i>	Cisplatina + gemcitabina Vs gefitinib	38 vs 85	6,7 vs 8,4	26,5 vs 30,6
NEJ 002 <i>Maemondo et al., 2010</i>	Carboplatina + paclitaxel vs gefitinib	31 vs 74	5,4 vs 10,8	23,6 vs 30,5
WJTOG 3405 <i>Mitsudomiet al., 2010</i>	Cisplatina + docetaxel vs gefitinib	32 vs 62	6,3 vs 9,5	Não disponível
IPASS <i>Fukuoka et al., 2011</i> <i>Mok, 2011</i>	Carboplatina + paclitaxel Vs gefitinib	47 vs 71	6,3 vs 13,1	21,9 vs 21,6
OPTIMAL <i>Zhou et al., 2011</i>	Carboplatina + gemcitabina vs erlotinib	36 vs 83	4,6 vs 13,1	Não disponível
EURTAC <i>Rosset al., 2012</i>	Platina + gemcitabina ou platina + docetaxel vs erlotinib	15 vs 58	5,2 vs 9,7	19,5 vs 19,3

Todos os estudos desenvolvidos até à data demonstram que os TKI, quando comparados com o tratamento convencional por quimioterapia, apresentam maior ORR e uma PFS mais prolongada. Estes dados demonstram que os TKI são tão ou mais eficazes do que o tratamento convencional por quimioterapia combinada.

Anexo B - Participação no programa externo de controlo de qualidade “*Evaluation of X-MANTM del E746-A750 Standard using Sanger Sequencing*”

Este estudo participou no programa de controlo externo de qualidade “*Evaluation of X-MANTM del E746-A750 Standard using Sanger Sequencing*”, onde o principal objetivo foi a validação da sensibilidade e reprodutibilidade inerente às técnicas de sequenciação pelo método de Sanger e Análise de Fragmentos, usadas na deteção de mutações nos exões 18-21 do gene EGFR. Foram fornecidas duas soluções provenientes da linha celular MCF-10a, descritas na seção 2.1.4.3.

As soluções foram preparadas com recurso à tecnologia GENESISTM que consiste numa tecnologia de recombinação homóloga mediada por vírus, mais eficiente na alteração no *gene-targeting* em relação aos métodos que utilizam plasmídeos (Horizon Discoveries, 2011a). Estes vetores introduzem o gene mutado sob a forma de cadeia simples, o que induz recombinação homóloga em cadeia simples, em vez de em cadeia dupla. A utilização de vetores de recombinação associada a adenovírus (rAAV) afeta células com e sem capacidade de divisão, e persistem num estado extracromossomal sem que integrem o genoma da célula hospedeira, o que torna este vírus uma opção viável e vantajosa para a criação de modelos isogénicos de doenças humanas (Horizon Discoveries, 2011a; Torrance et al., 2001). A tecnologia GENESISTM tem sido utilizada em genes *knock-out*, incluindo o gene do supressor de tumores p53, PTEN, e BRCA2, e também utilizada em genes *knock-in* de oncogenes mutantes ativados tais como o K-RAS, PI3K e o EGFR, usado neste estudo (Horizon Discoveries, 2011a, 2011b).

Estas alterações no DNA foram feitas nos genes endógenos das células, simulando o mais próximo possível da realidade as alterações genéticas que conduzem às mutações somáticas presentes em doentes com CPCNP.

Anexo C - Participação no programa externo de controlo de qualidade “*Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer*”

A participação deste estudo no programa externo de controlo de qualidade EQMN (*European Molecular Genetics Quality Network*) permitiu realizar ensaios referentes à validação analítica do protocolo de deteção de mutações presentes nos exões 18-21 do gene EGFR desenvolvido neste estudo. Este programa teve a colaboração entre o *European Molecular Genetics Quality Network* (EMQN), a *European Society of Pathology* (ESP), o *European Thoracic Oncology Platform* (ETOP) e o *European Society of Medical Oncology* (ESMO). Estes ensaios tiveram o objetivo de analisar a qualidade do rastreamento de mutações do domínio da tirosina quinase do gene EGFR, a interpretação e a divulgação dos resultados feitos por diversos laboratórios. Foram fornecidos a todos os participantes pequenos cortes de 10 µL de material celular embebido em parafina (FFPE), desenhados para simular amostras reais de pacientes. Estas amostras foram preparadas no ESP (*European Society*

of Pathology) e enviadas para a EQMN, de onde foram enviadas para os laboratórios participantes. Trata-se de material celular proveniente de uma linha celular, não divulgada pela EQMN. O genótipo para as alterações nas sequências de DNA do domínio de tirosina quinase do gene EGFR foi validado anteriormente à realização dos ensaios, em cinco laboratórios independentes e usando o mesmo material. Todos os participantes deste exercício foram solicitados a determinar o genótipo de todas as amostras, e relatar os resultados à EMQN.

No primeiro ensaio participaram neste estudo 117 laboratórios provenientes de 30 países diferentes (figura 1.13), e no segundo ensaio 18 laboratórios de 13 países diferentes.

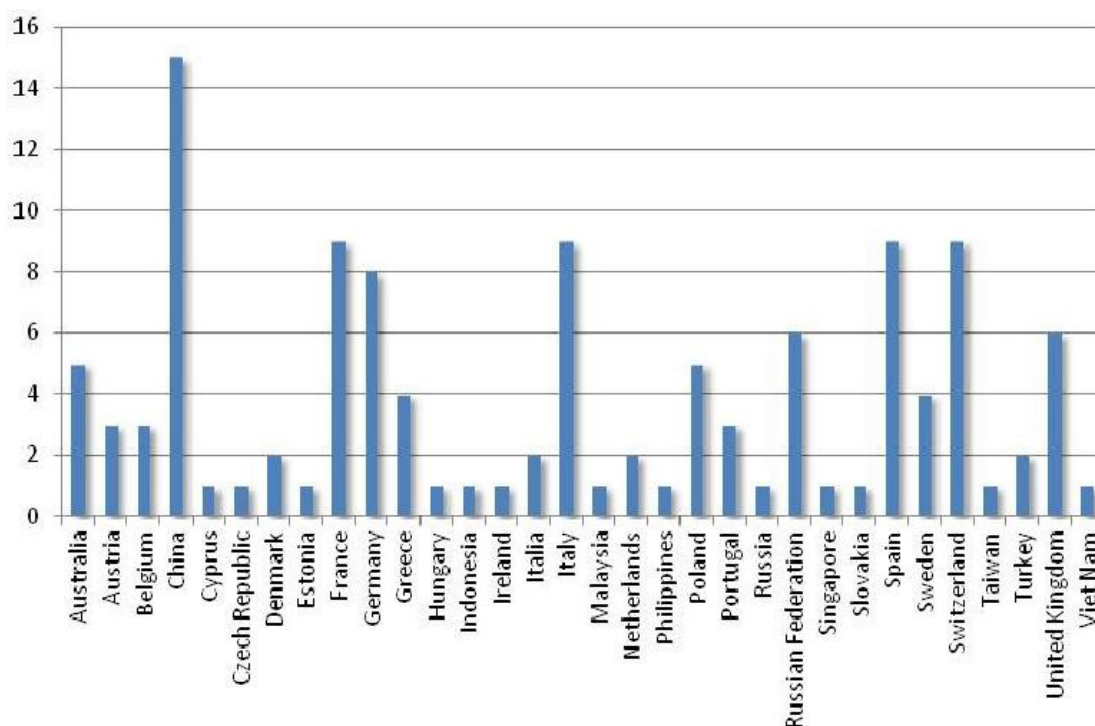


Figura C.1– Países participantes no ensaio “2011 (Round 2) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer (European Molecular Genetics Quality Network, 2012b).

O presente estudo esteve envolvido em dois exercícios diferentes da EMQN para a avaliação da qualidade do rastreamento de mutações do domínio da tirosina quinase do gene EGFR: a) “2011 (Round 2) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer”, realizado em Janeiro de 2012 e; b) “2011 (additional round) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer”, realizado em Maio de 2012. No primeiro exercício apenas foi determinado o genótipo para os exões 19 e 21 do gene EGFR, pelo que foi atribuído um fraco desempenho aos resultados apresentados – 1,25 em 2 valores. Apesar das mutações presentes nestes 2 exões representarem cerca de 90% das mutações no gene EGFR em doentes com CPCNP, é importante a deteção de mutações nos restantes exões para prever a sensibilidade ou resistência aos TKI. Devido ao

desempenho obtido na primeira ronda de ensaios foram fornecidas 10 amostras adicionais, idênticas às anteriormente analisadas, onde apenas variou a identificação do paciente e o código da amostra. Assim, foi possível determinar se houve uma melhoria no método de diagnóstico para o rastreamento de mutações somáticas no gene EGFR, ou, se por outro lado, foram cometidos os erros verificados na primeira ronda. Neste segundo exercício, onde participaram 18 laboratórios (figura 1.9, registou-se uma ligeira melhoria da avaliação dada pela EQMN – 1,4 em 2 valores.



Figura C.2 – Países participantes no ensaio “2011 (additional round) Pilot EQA scheme for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer”. Adaptado de (European Molecular Genetics Quality Network, 2012a).