

• C •

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Sérgio Filipe de Jesus Portovedo**

## **Caraterização do perfil genómico do carcinoma pulmonar**

Dissertação de mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Joana B. Melo, Professora Doutora Isabel Marques Carreira e pelo Professor Doutor Luís Almeida, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2013

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Joana Barbosa Melo, pelo imprescindível e valioso apoio em todas as etapas desta dissertação. A sua forma exigente, crítica e construtiva direcionou esta dissertação, facilitando o cumprimento dos meus objetivos.

À Professora Doutora Isabel Carreira pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por toda a orientação científica, pedagógica e análise crítica.

Ao Professor Doutor Luís Almeida pelo apoio institucional, rigor científico e disponibilidade.

A toda a equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. À Ilda, José, Miguel, Susana, Cláudia e Patrícia por toda a disponibilidade, atenção, ajuda, orientação científica e suporte laboratorial indispensáveis para a conclusão desta dissertação. À Ana, João S., João F., Mariana A., Mariana V., Roberta, Liliana e Hélder pela amizade, companheirismo, entreaajuda e incentivo.

À Professora Doutora Iola Duarte e Mestre Cláudia Rocha, da Universidade de Aveiro, pela disponibilidade, orientação científica e colaboração na cedência de dados e amostras, sem os quais este estudo não teria sido conseguido.

Aos meus colegas de mestrado, Filipa, Rita V., João, Sandra, Liliana, Rita M., Alexandre, Vanessa, Andreia, Paulo e Marcelo pela amizade e companheirismo nestes dois últimos anos.

À Inês, Rafa, Freches, Joana C., Abraços, Joana G., Dércia, Sílvio, Vasco, Crato, Nuno, Espinha, Madalena, André, Ana, Cláudia e Samuel, pela amizade, companhia, ajuda e por todos os bons momentos partilhados.

Aos meus amigos de sempre: Nelson, Edu, Ju, Jorge, Joana C., Joana O., Safira, Diana, Bruce, Andreia, Inês V., Bruna, Rafa, Gui, Mara, Ema, André, Margarida, Nuno, Bruno, Goreti, Ricardo, Joca, Inês C., Miguel, Januário, Fábio, Alex, João, Álvaro, Luís, Valter, Jessica, Cristina, Hugo, Angélica e Renato, pela lealdade, companheirismo, ajuda, paciência, apoio, incentivo e amizade de anos.

Aos meus pais, irmão e restante família, pela oportunidade, carinho, respeito e admiração.



## Índice Geral

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>i</b>
<b>Índice Geral.....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xix</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Carcinoma Pulmonar.....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Epitélio pulmonar.....	4
1.1.2 Epidemiologia e etiologia moleculares.....	6
1.1.3 Histologia do cancro do pulmão.....	8
1.1.3.1 Carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC).....	8
1.1.3.1.1 Carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE).....	8
1.1.3.1.2 Adenocarcinoma (ADC).....	10
1.1.3.2 Carcinoma de pequenas células (CPPC).....	10
1.1.4 Estadiamento anatómico do carcinoma pulmonar.....	11
1.1.5 Diagnóstico e Tratamento.....	11
1.1.6 Biologia Molecular do Cancro do Pulmão.....	13
1.1.6.1 Carcinogénese.....	13
1.1.6.2 Instabilidade genómica: alterações cromossomais e perda de heterozigotia.....	14
1.1.6.3 Protooncogenes e oncogenes / Sinalização de fatores de crescimento.....	15
1.1.6.3.1 Alteração dos recetores de fatores de crescimento e dos fatores de crescimento.....	17
1.1.6.3.2 Proteínas transdutoras de sinais codificadas por oncogenes.....	19
1.1.6.3.3 Transformação da expressão génica desencadeada por fatores de transcrição.....	21
1.1.6.3.4 Evasão à apoptose.....	22

1.1.6.4	Genes supressores de tumores /Sinalização de inibidores de crescimento.....	23
1.1.6.5	Imortalização celular e ativação da telomerase.....	26
1.1.7	Ferramentas moleculares utilizadas para a caracterização do perfil genómico do Carcinoma Pulmonar.....	27
1.1.7.1	Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH).....	27
1.1.7.2	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).....	30
1.1.7.3	Fluorescence in situ Hybridization (FISH).....	31
2.	Objetivos.....	33
3.	Materiais e Métodos.....	37
3.1	População em estudo.....	39
3.2	Extração, quantificação e análise da integridade de DNA.....	39
3.3	Análise por aCGH.....	41
3.4	Análise por MLPA.....	42
3.5	Expansão de células em cultura.....	44
3.6	Análise por Touch FISH.....	45
3.7	Análise Estatística.....	46
4.	Resultados e Discussão.....	47
4.1	Caraterização da amostra em estudo.....	49
4.2	Extração, quantificação e avaliação da integridade do DNA das amostras.....	49
4.3	Resultados obtidos por aCGH.....	52
4.3.1	aCGH em Adenocarcinomas.....	53
4.3.2	aCGH em Carcinomas Epidermóides.....	57
4.3.3	Comparação dos resultados obtidos por aCGH em Adenocarcinomas e Carcinomas Epidermóides.....	65
4.4	Resultados obtidos por MLPA.....	75
4.4.1	MLPA em Adenocarcinomas.....	78
4.4.2	MLPA em Carcinomas Epidermóides.....	80
4.4.3	Comparação dos resultados obtidos por MLPA em Adenocarcinomas e Carcinomas Epidermóides.....	82

<b>4.5</b>	<b>Comparação dos resultados obtidos por aCGH e MLPA.....</b>	<b>88</b>
<b>4.6</b>	<b>Comparação do perfil genómico do tecido tumoral com o perfil genómico da cultura, através de MLPA.....</b>	<b>91</b>
<b>4.7</b>	<b>Resultados obtidos por <i>Touch FISH</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>4.8</b>	<b>Correlação do perfil genómico com o perfil metabonómico.....</b>	<b>99</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Glicólise e Glutaminólise.....</b>	<b>100</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>103</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>109</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do epitélio bronquial, bronquiolar e alveolar.....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Taxas de incidência (A) e mortalidade (B) mundiais de CP, em ambos os sexos e para todas as idades, estimadas em 2008.....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Subtipos histológicos do CP.....	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Adaptações fisiológicas ocorridas nas células tumorais durante o desenvolvimento neoplásico.....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática, de acordo com as diferentes referências bibliográficas, das posições cromossómicas dos oncogenes (a laranja) e dos genes supressores tumorais (a castanho) com relevância terapêutica para o CP.....	<b>16</b>
<b>Figura 6.</b> Vias de transdução do sinal desencadeadas por RTC.....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Via da RAS.....	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Via da p53.....	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b> Papel da via Rb na regulação do ciclo celular.....	<b>25</b>
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática da técnica de <i>array-CGH</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> Descrição geral das etapas envolvidas na reação de MLPA.....	<b>31</b>
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo do princípio da técnica de FISH.....	<b>32</b>
<b>Figura 13.</b> Exemplos de formatos <i>Agilent Human Genome microarray</i> (Agilent Technologies), correspondendo a lâmina de 180K ao formato utilizado neste estudo.....	<b>41</b>
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática das posições cromossómicas das sondas para deteção do número de cópias (a cinza), de mutação (a verde) e de referência (a roxo), utilizando o painel <i>SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung Cancer</i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 15.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v) para os tecidos tumorais (T) e não tumorais (N) dos doentes 1, 4, 7, 9, 15, 18 e 22, bem como para os tecidos obtidos da cultura (C) dos doentes 1, 4, 7, 9 e 15, todos extraídos pelo método <i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 16.</b> (A) Eletroferograma correspondente ao tecido não tumoral do doente 19 e (B) eletroferograma correspondente ao tecido tumoral do doente 20, através da aplicação da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas <i>SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer</i> , recorrendo ao <i>software GeneMapper</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 17.</b> Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 1, 2, 3, 4 e 5, diagnosticados com CP, histologia ADC, estadio IB.....	<b>54</b>



<b>Figura 18.</b> Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 6, 7 e 8, diagnosticados com CP, histologia ADC, estadio IIA e IIB.....	<b>56</b>
<b>Figura 19.</b> Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 9 e 10, diagnosticados com CP, histologia ADC, estadio IIIA.....	<b>58</b>
<b>Figura 20.</b> Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 11, 12, 13, 14, 15 e 16, diagnosticados com CP, histologia CPCE, estadio IA e IB.....	<b>60</b>
<b>Figura 21.</b> Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 17, 18, 19 e 20, diagnosticados com CP, histologia CPCE, estadio IIA e IIB.....	<b>62</b>
<b>Figura 22.</b> Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 21 e 22 diagnosticados com CP, histologia CPCE, estadio IIIA.....	<b>64</b>
<b>Figura 23.</b> Representação de todas as alterações identificadas por aCGH em ADC.....	<b>66</b>
<b>Figura 24.</b> Representação de todas as alterações verificadas por aCGH em CPCE.....	<b>67</b>
<b>Figura 25.</b> Análise das alterações de genes já reportados na literatura como fortemente associadas ao CP. ....	<b>73</b>
<b>Figura 26.</b> (A) Eletroferograma correspondente ao tecido não tumoral do doente 9 e (B) eletroferograma correspondente ao tecido tumoral do doente 9, através da aplicação da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas <i>SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer</i> , recorrendo ao <i>software GeneMapper</i> .....	<b>77</b>
<b>Figura 27.</b> Alterações encontradas no número de cópias em todos os genes analisados por MLPA, em ADC e CPCE.....	<b>82</b>
<b>Figura 28.</b> Mutações encontradas no gene <i>EGFR</i> , em CP.....	<b>84</b>
<b>Figura 29.</b> Resultados obtidos por aCGH e MLPA, analisados pelos <i>softwares Agilent Genomic Workbench</i> e <i>GeneMapper</i> , respetivamente.....	<b>92</b>
<b>Figura 30.</b> Imagens de <i>Touch FISH</i> em células interfásicas representativas dos resultados obtidos para o doente 10 (ADC, estadio IIIA), com o conjunto de sondas <i>LAVysion</i> .....	<b>96</b>
<b>Figura 31.</b> Imagens de <i>Touch FISH</i> em células interfásicas representativas dos resultados obtidos para o doente 15 (CPCE, estadio IB), com o conjunto de sondas <i>LAVysion</i> .....	<b>97</b>

<b>Figura 32.</b> Imagens de <i>Touch FISH</i> em células interfásicas representativas dos resultados obtidos para o doente 20 (CPCE, estadio IIB), com o conjunto de sondas <i>LAVysion</i> .....	<b>98</b>
<b>Figura 33.</b> Representação genérica da organização e interação entre os diferentes níveis no interior da célula.....	<b>99</b>
<b>Figura 34.</b> Glicólise e reprogramação metabólica na proliferação de células neoplásicas.....	<b>102</b>



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação histológica do CP.....	<b>9</b>
<b>Tabela 2.</b> Sistema de Estadiamento Internacional para o CP.....	<b>12</b>
<b>Tabela 3.</b> Alterações cromossómicas frequentemente encontradas no CP.....	<b>15</b>
<b>Tabela 4.</b> Caraterísticas clínicas dos doentes incluídos no estudo.....	<b>40</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores referentes à quantidade e qualidade de DNA extraído a partir de tecidos tumorais e não tumorais de doentes com diagnóstico de CP, utilizando o <i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos para as 10 amostras dos doentes com ADC, referentes às alterações presentes no tecido tumoral, utilizando o painel de sondas <i>SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer</i> .....	<b>79</b>
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos para as 12 amostras com CPCE, referentes às alterações presentes no tecido tumoral, utilizando o painel de sondas <i>SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer</i> .....	<b>81</b>
<b>Tabela 8.</b> Resultados obtidos pelos testes exatos de <i>Fisher</i> e qui-quadrado com recurso a simulação de <i>Montecarlo</i> , usando 10000 amostras.....	<b>86</b>
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos para os 22 casos, referentes às alterações presentes no tecido tumoral, utilizando as técnicas de aCGH e MLPA.....	<b>89</b>
<b>Tabela 10.</b> Resultados obtidos para os casos 1, 4 7, 9 e 15, referentes às alterações presentes no tecido tumoral e nas culturas celulares, utilizando o painel de sondas <i>SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer</i> .....	<b>94</b>
<b>Tabela 11.</b> Resultados obtidos pela técnica de <i>Touch FISH</i> para o caso 10 (ADC, estadio IIIA), utilizando o conjunto de sondas <i>LAVysion</i> .....	<b>96</b>
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos pela técnica de <i>Touch FISH</i> para o doente 15 (CPCE, estadio IB), utilizando o conjunto de sondas <i>LAVysion</i> .....	<b>97</b>
<b>Tabela 13.</b> Resultados obtidos pela técnica de <i>Touch FISH</i> para o doente 20 (CPCE, estadio IB), utilizando o conjunto de sondas <i>LAVysion</i> .....	<b>98</b>



## Lista de abreviaturas

### Geral

**<sup>1</sup>H-NMR** – Proton Nuclear Magnetic Resonance

**aCGH** – array Comparative Genomic Hybridization

**ADC** – Adenocarcinoma

**ATP** – Adenosine-5'-triphosphate

**BAX** – BCL2-Associated X protein

**BCL2** – B-Cell Lymphoma 2

**CEP6** – Chromosome Enumeration Probes, Centromere 6

**CNPGC** – Carcinoma Neuroendócrino Pulmonar de Grandes Células

**CNV** – Copy-Number Variation

**CP** – Carcinoma Pulmonar

**CPCE** – Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas, Carcinoma Epidermóide

**CPGC** – Carcinoma Pulmonar de Grandes Células

**CPNPC** – Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células

**CPPC** – Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células

**DDR** – Discoidin Domain Receptor

**DNA** – Deoxyribonucleic Acid

**E2FI** – E2F transcription factor 1

**EML4-ALK** – Echinoderm Microtubule associated protein Like 4 - Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase

**EPH** – Ephrin receptor

**FDA** – Food and Drug Administration

**FGF** – Fibroblast Growth Factor

**FISH** – Fluorescence In Situ Hybridization

**Grb2** – Growth Factor Receptor-Bound protein 2

**HGF** – Hepatocyte Growth Factor

**HGFR** – Hepatocyte Growth Factor Receptor

**LOH** – Loss of Heterozigosity

**MAPK** – Mitogen-Activated Protein Kinase

**MAX** – Partner Protein MYC-Associated Factor X

**Mdm2** – Murine Doble Minute 2

**MLPA** – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

**mRNA** – messenger Ribonucleic Acid

**mTOR** – mammalian Target Of Rapamycin

**NADH** – Nicotinamide Adenine Dinucleotide

**p** – braço curto do cromossoma

**PCR** – Polymerase Chain Reaction

**PDGF** - Platelet-Derived Growth Factor

**PI3K** - Phosphatidylinositide 3-Kinase

**q** – braço longo do cromossoma

**SFC** – Fibroblast-Like Synoviocytes

**SNP** – Single Nucleotide Polymorphism

**SOS** – Son Of Sevenless protein

**STAT** – Signal Transducer and Activator of Transcription

**TSC1/TSC2** – Tuberous Sclerosis 1 / 2

### Lista de genes

**AKT1** – v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1

**BCL2L11** – BCL2-Like 11 (apoptosis facilitator)

**BRAF** – v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

**CDK4** – Cyclin-Dependent Kinase 4

**CDKN2A** – Cyclin-Dependent Kinase 2A

**CDKN2B** – Cyclin-Dependent Kinase 2B

**DDR1** – Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1

**DDR2** – Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2

**EDAR** – Ectodysplasin A Receptor

**EGFR** – Epidermal Growth Factor Receptor

**EPHA3** – EPH receptor A3

**EPHA5** – EPH receptor A5

**EPHA7** – EPH receptor A7

**EPHB1** – EPH receptor B1

**EPHB6** – EPH receptor B6

**ERBB2** – v-Erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

**ERBB3** – v-Erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3

**ERBB4** – v-Erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4

**ERCCI** – Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 1

**FGFR1** – Fibroblast Growth Factor Receptor 1

**FHIT** – Fragile Histidine Triad

**FKBP8** – FK506 Binding Protein 8

**KCNJ6** – Potassium Inwardly-Rectifying Channel, subfamily J, member 6

**KIT** – v-KIT-Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

**KRAS** – Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog

**LAT** – Linker for Activation of T cells

**MAP2K1** – Mitogen-Activated Protein Kinase 1

**MET** – MET proto-oncogene

**MPV17** – MpV17 mitochondrial inner membrane protein

**MYBPC3** – Myosin Binding Protein C, cardiac

**MYC** – v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

**MYO5B** – Myosin VB

**NKX2-1** – NK2 homeobox 1

**NPC2** – Niemann-Pick disease, type C2

**NRXN1** – Neurexin 1

**PIK3CA** – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic subunit Alpha

**PKHD1** – Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1 (autosomal recessive)

**PPIL2** – Peptidylprolyl Isomerase (cyclophilin)-Like 2

**PTEN** – Phosphatase and Tensin Homolog

**RARB** – Retinoic Acid Receptor, Beta

**RASSF1A** – Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1A

**RBI** – Retinoblastoma 1

**SEMA3B** – Sema Domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B

**SEMA3F** – *Sema Domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F*

**SETX** - *Senataxin*

**SOX2** – *SRY (sex determining region Y)-Box 2*

**STK11** – *Serine/Threonine Kinase 11*

**TP53** – *Tumor Protein p53*

**TUSC2** – *Tumor Suppressor Candidate 2*

**ZNF25** – *Zinc Finger Protein 25*





## Resumo

O carcinoma pulmonar (CP) é a neoplasia mais comum em todo o mundo, e também a principal causa de morte por cancro. Aproximadamente 85% dos tumores do pulmão diagnosticados correspondem a carcinomas de não pequenas células (CPNPC) e destes, aproximadamente, 30% são carcinomas de células escamosas (CPCE), e 50% adenocarcinomas (ADC). A deteção destes tumores em estadios iniciais e a identificação de alterações associadas a um elevado risco de recidiva, ou que permitam prever a progressão clínica, permanecem como questões desafiantes na prática clínica. Deste modo, pretendeu-se com este estudo caracterizar o perfil genómico do CP, de forma a contribuir nomeadamente para o desenvolvimento de soluções de diagnóstico, direccionamento e personalização do tratamento, procurando reduzir o número de mortes por CP e os custos de saúde associados a esta doença. Neste estudo foram identificadas diversas alterações genómicas concordantes com as alterações descritas na literatura como associadas ao CP, bem como algumas regiões cromossómicas e/ou genes com forte possibilidade de estarem envolvidos na carcinogénese pulmonar. Por aCGH, embora os ADC não tenham revelado correspondência em termos de alterações genómicas nos diferentes estadios TNM, nos CPCE foram detectadas alterações concordantes em ganho em 3q, 5p, 7, 8q, 12, 15q, 17q, 19, 20 e 22q e, em perda, em 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, Xp e Y, que poderão ter potencial para diagnóstico. Os genes *PIK3CA*, *SOX2* e *MYC* revelaram, por aCGH, ser os genes mais alterados em CP. Os resultados obtidos com a técnica de MLPA permitiram, na generalidade, comprovar os resultados obtidos por aCGH. Foram identificadas alterações em elevado número de cópias nos genes *PIK3CA*, *FGFR1* e *PTEN*, por MLPA, no CPCE. Para além disso, o gene *FKBP8* apresentou a percentagem de alteração mais elevada, por MLPA, revelando ter potencial como um futuro biomarcador no CP. A análise, através destas duas metodologias, permitiu diferenciar ADC de CPCE, exibindo este último um maior número de alterações. Alterações em ganho e em perda dos genes *PIK3CA* e *PTEN*, respectivamente, parecem ser características de CPCE. A estratégia direccionada de *Touch FISH* permitiu validar o aCGH e o MLPA, revelando ser eficaz na deteção de regiões específicas associadas ao CP. O conhecimento prévio do perfil metabonómico dos tipos histológicos analisados foi correlacionado de forma exploratória com o perfil genómico obtido neste estudo, destes mesmos tumores. A sobre-expressão aumentada dos oncogenes *MYC*, *PIK3CA* e *AKT1* parece estar envolvida na glicólise e glutaminólise, dado o aumento de lactato e glutamina verificados previamente nestes casos.

**Palavras-chave:** Adenocarcinoma pulmonar; Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas; Alterações genéticas; aCGH; MLPA; *Touch* FISH; Metabonómica.

## Abstract

Lung Cancer (LC) is the most common malignancy in the world and the leading cause of cancer death. Approximately 85% of lung tumors are Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), and of these, approximately 30% are Squamous Cell Lung Cancer (SCLC) and 50% Adenocarcinomas (ADC). The detection of these tumors in early stages and the identification of characteristics associated with a high risk of recurrence or with the prediction of clinical progression, remain challenging issues in clinical practice. Therefore, the aim of this study was to characterize the genomic profile of LC in order to contribute to the development of diagnostic solutions, targeted and personalized treatment, ultimately seeking to reduce the number of deaths from lung cancer and health costs associated with this disease. This study identified several genomic alterations consistent with the changes described in literature as being associated to LC, as well as certain chromosomal regions and/or genes with strong possibility of being involved in pulmonary carcinogenesis. Although ADC have not shown any correspondence in terms of genomic changes in different TNM stages, with aCGH, the SCLC alterations were consistent for gains in 3q, 5p, 7, 8q, 12, 15q, 17q, 19, 20 and 22q, and losses in 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, Xp and Y, which may have diagnostic potential. The *PIK3CA*, *SOX2* and *MYC* genes were revealed, by aCGH, to be the most altered genes in LC. The results obtained with MLPA technique allowed, in general, to demonstrate the results obtained by aCGH. Changes of copy numbers were identified in *PIK3CA*, *FGFR1* and *PTEN* genes, by MLPA in SCLC. In addition, the gene *FKBP8* presented the highest percentage change by MLPA, revealing potential as a biomarker of LC in the future. The analysis through these two methods, allowed to distinguish ADC from SCLC, being SCLC the one that showed a larger number of changes. Alterations in gain and loss of genes *PIK3CA* and *PTEN*, respectively, seem to be characteristic of SCLC. The targeted strategy of Touch FISH allowed us to validate the aCGH and MLPA results, proving to be effective in the detection of changes in specific regions associated with LC. Previous knowledge of the metabonomics profile of histological types was correlated in an exploratory manner with the genomic profile obtained in this study, of these same tumors. Overexpression of *MYC*, *AKT1* and *PIK3CA* oncogenes could be correlated with the increase in lactate and glutamine previously recorded in these cases.

**Keywords:** Lung Adenocarcinoma, Squamous Cell Lung Cancer, Genomic alterations; aCGH, MLPA; Touch FISH; Metabonomics.



# I. INTRODUÇÃO



## I. Introdução

A mortalidade global por cancro continua a ser um dos maiores problemas enfrentados na saúde pública, integrando um desafio clínico e molecular para todos os envolvidos na elucidação dos fenómenos que conduzem ao desenvolvimento tumoral.

Tradicionalmente, os doentes são seguidos com base num diagnóstico histopatológico, assente na avaliação macroscópica de amostras de tecidos tumorais, de uma forma integrada com a história clínica do doente e outros dados laboratoriais correntes.

Atualmente sabe-se que estas aproximações apresentam algumas limitações. A introdução da Biologia Molecular e da Genética na Oncologia veio contribuir para o ultrapassar de algumas destas limitações. Cada vez mais um bom acompanhamento do doente oncológico envolve estudos moleculares, quer a nível do diagnóstico, quer do prognóstico, seleção da terapia mais adequada ao doente e deteção atempada de recidivas.

São muitos os fatores que contribuem para o cancro, e o processo desta doença difere da localização geográfica e do estilo de vida em que as pessoas estejam inseridas. Uma percentagem significativa dos casos de cancro poderia ser evitada através da implementação de medidas preventivas adequadas, incluindo a vacinação e o tratamento, e de medidas preventivas relacionadas com os estilos de vida, como cessar o uso de tabaco, evitar o consumo excessivo de álcool, ter uma atividade física regular e adotar hábitos alimentares saudáveis [1-2].

O cancro é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento [1]: cerca de 12.7 milhões de pessoas são diagnosticadas com cancro todos os anos e cerca de 7.6 milhões morrem anualmente devido a esta patologia [3]. Atendendo à relação entre a esperança média de vida e o risco para cancro e usando como referência a população mundial do ano 2000, estima-se que em 2015 haja um aumento significativo da taxa de incidência de cancro, uma vez que o número de indivíduos de 65 e 80 anos de idade será 22 e 50% superior, respetivamente. Desta forma, admite-se que as taxas de incidência de cancro poderão acompanhar o aumento da esperança média de vida [4].

Segundo o *World Cancer Report*, de 2008, prevê-se que, até 2030, os novos casos de cancro subam anualmente de 13 milhões para quase 27 milhões. Nessa altura, o cancro matará 17 milhões de pessoas por ano [5].

O cancro é uma doença heterogénea, com diferente etiologia e história natural, que se desenvolve através da interação entre factores ambientais e genéticos. Trata-se de uma doença multifactorial complexa, cujo processo de desenvolvimento é lento e envolve a



ocorrência de múltiplos eventos sequenciais. Este comportamento anómalo resultante faz com que massas expansivas de células anormais destruam o tecido normal circundante e que se possam espalhar para órgãos vitais, resultando em disseminação da doença [6-7].

Geralmente, o balanço entre a proliferação e a morte celular programada é altamente regulado, garantindo a integridade dos órgãos e tecidos. No entanto, nas neoplasias ocorre uma alteração no equilíbrio crescimento/morte celular que se poderá dever a alterações no genoma humano, especialmente em genes envolvidos na regulação do ciclo celular [8].

## **I.1. Carcinoma Pulmonar**

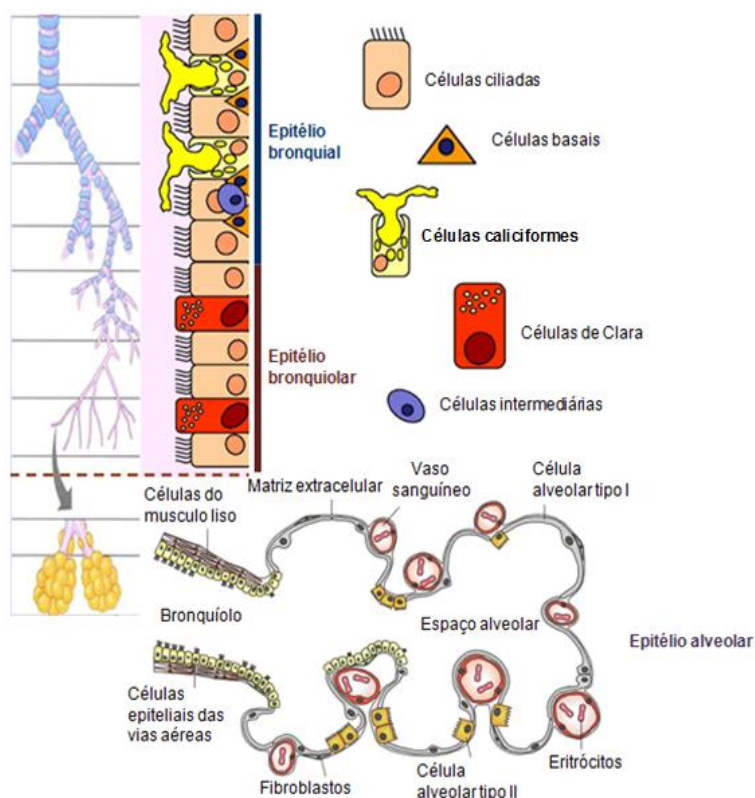
### **I.1.1. Epitélio pulmonar**

O sistema respiratório compreende as vias aéreas condutoras, as vias respiratórias, os pulmões e os músculos respiratórios do tórax e do abdómen responsáveis pelo movimento do ar, para dentro e para fora dos pulmões. As vias aéreas condutoras transportam o ar para as vias respiratórias e incluem as fossas nasais, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os bronquíolos, e são responsáveis pelo humedecimento, filtração e aquecimento do ar. A troca de gases entre o ar inspirado e o sangue é desencadeada pelas vias respiratórias. Estas vias são constituídas por bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos [9-10].

O interior das vias aéreas e respiratórias é envolvido por um epitélio que atua como uma barreira entre o organismo e o meio exterior [10]. Este epitélio desempenha papéis fundamentais na manutenção da homeostasia pulmonar: protege o pulmão contra agentes patogénicos inalados e é o principal mediador da resposta inflamatória quando estes agentes são capazes de colonizar o sistema respiratório. Paralelamente, é também importante na regulação do equilíbrio de fluidos do pulmão. Quando danificado reage eficaz e rapidamente, restabelecendo a sua estrutura e funções normais [11].

O epitélio das vias aéreas condutoras é composto por um conjunto de células especializadas: células ciliadas, basais, calciformes, células de Clara e células intermediárias [9-10,12]. A distribuição dos diferentes tipos de células no interior do epitélio varia ao longo das vias aéreas [12]. As células ciliadas, tipo de célula predominante nas vias aéreas, possuem organelos especializados, designados por cílios móveis, na sua superfície apical. Estes organelos permitem que o muco e partículas estranhas sejam conduzidos em direção à faringe, onde são posteriormente removidos do sistema respiratório por deglutição ou expectoração [9,11]. As células calciformes, também chamadas de células mucosas, são responsáveis pela produção de muco, capaz de lubrificar a superfície apical da camada

epitelial, humidificando o ar inalado e ajudando deste modo a reter partículas estranhas potencialmente nocivas. As células basais são células indiferenciadas, responsáveis pela adesão do epitélio à membrana basal e pela manutenção da homeostasia do epitélio normal, funcionando como células estaminais. As células de Clara são células não-ciliadas, em forma de cúpula, capazes de secretar e absorver substâncias glicoproteicas que revestem e protegem o epitélio bronquiolar. Além de degradarem certas substâncias tóxicas que são inaladas, estas células comportam-se como células estaminais, capazes de reconstruir o epitélio bronquiolar [9]. Finalmente, células intermediárias foram também detetadas no epitélio das vias aéreas. Têm microvilosidades na superfície celular apical e, embora a sua função permaneça pouco elucidada, estas células parecem ser responsáveis pela deteção de compostos estranhos no fluido que reveste as vias aéreas [9-10]. Na figura 1 está representado o epitélio bronquial, bronquiolar e alveolar e todas as células especializadas que o constituem.



**Figura 1 – Representação esquemática do epitélio bronquial, bronquiolar e alveolar (adaptado de [10,12]).**

As células especializadas que constituem o epitélio estão dispostas sobre uma membrana basal comum. O epitélio das vias aéreas condutoras é composto essencialmente por células ciliadas, células basais e por uma percentagem menor de células caliciformes e intermediárias. Em brônquios e bronquíolos, há predominância de células ciliadas; as células caliciformes e basais são gradualmente reduzidas até ao epitélio bronquiolar, onde predominam, posteriormente, em conjunto com as células ciliadas e células de Clara [9-10,12]. O epitélio alveolar, mais fino, contém uma camada contínua de dois tipos de células principais: células do tipo I (também chamadas de pneumócitos tipo I), que são achatadas, laminadas e recobrem a maioria da superfície alveolar, e por células tipo II (pneumócitos tipo II), arredondadas. As células tipo II são a fonte de surfactante pulmonar e estão envolvidas na conservação do epitélio alveolar após destruição de células tipo I [9].

O cancro do pulmão (CP), uma das neoplasias mais insidiosas e agressivas, é na vasta maioria dos casos de origem epitelial e, como tal, é classificado como carcinoma. Os carcinomas pulmonares surgem normalmente no epitélio dos brônquios principais (tumor central) ou em pequenos brônquios, bronquíolos, ou alvéolos (tumores periféricos) [13].

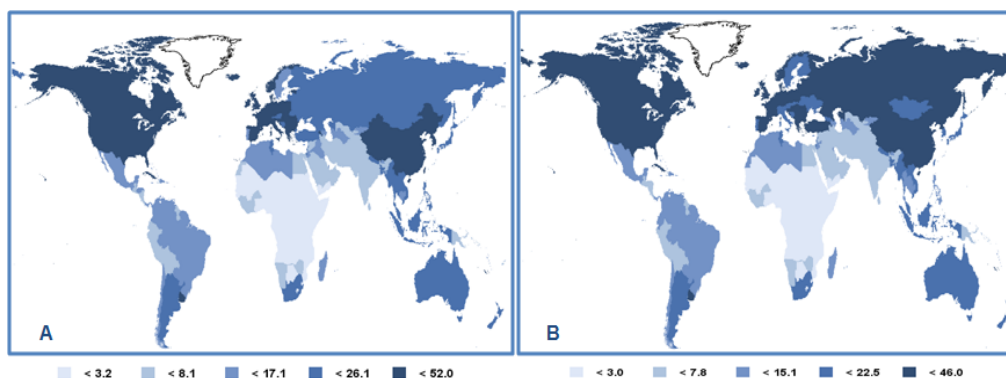
### **1.1.2. Epidemiologia e etiologia moleculares**

O CP é a neoplasia mais comum em todo o mundo. Estima-se que 228.190 novos casos de CP surgirão em 2013, representando cerca de 14% do total dos carcinomas. O CP é também a principal causa de morte por cancro, e em 2013, são esperados em todo o mundo 159.480 óbitos, representando cerca de 27% do total de mortes por cancro [2].

O CP é mais frequentemente diagnosticado em homens e a principal causa de morte; nas mulheres é o quarto carcinoma mais diagnosticado e a segunda principal causa de morte [1,3-4]. As diferenças de género nos padrões de mortalidade por CP podem refletir diferenças históricas entre homens e mulheres na assimilação e redução do consumo de tabaco nos últimos 50 anos [1]. As taxas de incidência e mortalidade têm vindo a diminuir nos homens ao longo das duas últimas décadas, mas só recentemente começaram a diminuir nas mulheres [2].

A prevalência da doença ao final de um ano aumentou de 37% (de 1975-1979) para 44% (de 2005-2008), em grande parte devido a melhorias nas técnicas cirúrgicas e terapias combinadas [2]. Contudo, a esperança média de vida para os doentes com esta patologia é extremamente baixa. Apenas 15% dos doentes com CP estão vivos cinco anos após o diagnóstico [14].

Entre nós, a situação não deixa de ser igualmente alarmante, particularmente em relação ao sexo masculino, pois é a neoplasia líder em termos de mortalidade, e a terceira mais incidente, seguida da próstata e do colo-rectal. No que diz respeito ao sexo feminino, a situação não apresenta o mesmo cenário, sendo o quarto carcinoma mais mortal e o sétimo mais incidente. Em Portugal, o CP é o quarto mais frequente em ambos os sexos, representando cerca de 7.6% do total dos carcinomas. É o segundo mais fatal, seguido do colo-rectal, apresentando uma mortalidade de 13.7%, e uma prevalência ao final de 5 anos de 3.2% [1,3].



**Figura 2 – Taxas de incidência (A) e mortalidade (B) mundiais de CP, em ambos os sexos e para todas as idades, estimadas em 2008 (adaptado de GLOBOCAN 2008).** A maioria dos casos de CP ocorre em países desenvolvidos. A maior taxa de incidência é observada na Europa, seguida da América do Norte e da China, e a menor, na África Oriental. Em termos de mortalidade, é observada uma taxa superior na Europa, América do Norte e Oriente Asiático [1]. As escalas utilizadas na figura estão organizadas de modo a que cada uma das 5 classes tenha o mesmo número de países. As 5 classes são calculadas através da diferença entre o valor máximo e mínimo, sendo depois dividido por 5.

Os sintomas do CP podem incluir tosse persistente, expectoração com sangue, dor constante no peito, falta de ar, asma, rouquidão, problemas recorrentes como pneumonia ou bronquite, perda de apetite ou de peso e fadiga [2].

Atualmente existem vários fatores de risco associados ao CP, entre eles, o tabagismo, a exposição ocupacional e/ou ambiental e a suscetibilidade genética. O tabagismo é responsável por 80% da carga mundial de CP nos homens e aproximadamente 50% nas mulheres [1]. Este importante fator de risco para o CP aumenta com a quantidade e duração do hábito de fumar. Além da nicotina, causadora da dependência, já se isolaram cerca de 4000 substâncias diferentes no fumo do tabaco, que, por vários processos, agem deletariamente. A grande maioria destas substâncias que fica retida nos pulmões (50-97%) pode ser dividida em três grupos principais: substâncias carcinogénicas, substâncias irritantes e substâncias com ação sobre os sistemas nervoso e cardiovascular. Dentro do grupo das substâncias carcinogénicas encontram-se iniciadores tumorais, promotores tumorais e aceleradores carcinogénicos. Os iniciadores tumorais são diretamente responsáveis pelo carcinoma. São exemplos destas substâncias hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de elevado peso molecular. Os promotores tumorais tornam mais ativa a ação dos iniciadores, sendo exemplos destes os fenóis voláteis, ácidos gordos livres e ésteres de ácidos gordos. Os aceleradores carcinogénicos são substâncias que aceleram a ação dos iniciadores e promotores tumorais [2]. A exposição ocupacional ou ambiental ao fumo passivo, amianto (especialmente entre os fumadores), certos metais (crómio, arsénio, cádmio), alguns produtos químicos orgânicos, radiação, poluição atmosférica e pintura (ocupacional) são outros fatores que desencadeiam esta patologia. O risco para o CP tem aumentado entre

peessoas com uma história clínica de tuberculose. A suscetibilidade genética contribui também para o desenvolvimento de CP, especialmente nos que desenvolvem a doença numa idade mais jovem [1-2].

### **1.1.3. Histologia do cancro do pulmão**

O CP pode ser diagnosticado patologicamente ou por uma abordagem histológica ou citológica (tabela 1). Contudo, a classificação histológica do CP e o seu estadiamento são críticos para a avaliação do tratamento e para o diagnóstico definitivo [15].

O CP pode ser categorizado em dois grandes grupos primários, uma vez que existem diferenças clínicas na apresentação dos tecidos, na disseminação metastática, e na resposta à terapia: carcinoma do pulmão de pequenas células (CPPC) e carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC) [15-17].

O CPPC é menos comum, representando 15-20% do total dos casos, cresce mais rapidamente, é na maioria das vezes metastático e tem alta resposta inicial à quimioterapia. O CPNPC representa 80-85% do total dos casos e não é tão metastático e não responde tão eficazmente [18]. Este último pode ser histologicamente subdividido em adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (CPCE), carcinoma de grandes células (CPGC), incluindo o carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNPGC), carcinoma bronquioloalveolar, e outros tipos histológicos mistos, uma vez que pode haver misturas de padrões histológicos no mesmo carcinoma [15]. Estes tipos histológicos principais podem ser subclassificados em mais subtipos específicos, como apresentado na tabela 1. Neste estudo serão abordados os dois subtipos histológicos mais frequentes em CPNPC: ADC e CPCE.

#### **1.1.3.1. Carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC)**

##### **1.1.3.1.1. Carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE)**

O CPCE, também chamado de epidermóide ou pavimentoso, representa cerca de 25-30% de todos os tumores do pulmão e ocorre maioritariamente em homens. Está fortemente relacionado com um historial tabágico (mais de 90% do total do CPCE). No entanto, ainda que os hábitos de fumar não tenham mudado consideravelmente, a incidência do CPCE tem vindo a decrescer em relação ao ADC, provavelmente devido a alterações nos constituintes do tabaco.

**Tabela I – Classificação histológica do CP (adaptado de [15]).** Classificação de acordo com a classificação da OMS, de 2004, de CP e com a classificação de ADC pulmonares, de 2011, da *International Association for the Study of Lung Cancer*, *American Thoracic Society* e *European Respiratory Society*.

- **Lesões pré-neoplásicas:**
  - Displasia escamosa / *Carcinoma in situ* (CIS)
  - Hiperplasia adenomatosa atípica (HAA)
  - Adenocarcinoma *in situ* (AIS)
    - Mucinoso (raro) e não mucinoso
    - Misto (mucinoso e não mucinoso)
  - Hiperplasia difusa de células pulmonares neuroendócrinas (HDCPN)
- **Carcinoma de células escamosas (CPCE):**
  - Papilar
  - Células claras
  - Células pequenas
  - Basalóide
- **Carcinoma de pequenas células (CPCP):**
  - Carcinoma combinado de pequenas células
- **Adenocarcinoma (ADC):**
  - ADC minimamente invasivo (MIA) ( $\leq 3$  cm, tumor predominantemente lepidico com  $\leq 5$  mm de invasão)
    - Mucinoso (raro) e não mucinoso
    - Misto (mucinoso e não mucinoso)
  - ADC invasivo
    - Predominantemente lepidico (antigo carcinoma bronquioloalveolar (ACB) não mucinoso,  $>5$  mm de invasão)
    - Predominantemente acinar
    - Predominantemente papilar
    - Predominantemente micropapilar
    - Predominantemente sólido com mucosecreção
  - Variantes do ADC invasivo
    - ADC mucinoso invasivo (ACB mucinoso)
    - Colóide
    - Fetal (baixo e alto grau)
    - Entérico
- **Carcinoma de grandes células (CPGC):**
  - Carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNPGC)
    - CNPGC combinado
  - Carcinoma basalóide
  - Carcinoma linfoepitelioma-like
  - Carcinoma de células claras
  - Carcinoma de grandes células com fenótipo rabdóide
- **Carcinoma adenoescamoso**
- **Carcinoma sarcomatóide**
  - Carcinoma pleomórfico
  - Carcinoma de células fusiformes
  - Carcinoma de células gigantes
  - Carcinosarcoma
  - Blastoma pulmonar
  - Outros
- **Carcinóide (Típico e Atípico)**
- **Carcinoma de glândula salivar:**
  - Carcinoma mucoepidermóide
  - Carcinoma adenóide cístico
  - Carcinoma epimioepitelial

O CPCE é um tumor de crescimento lento, que pode levar anos para evoluir para cancro invasivo. Metástases para órgãos distantes são muito menos frequentes do que em ADCs ou outros subtipos histológicos de CP. Tumores com histologia pouco diferenciada podem metastizar no início de seu curso clínico para órgãos como o cérebro, fígado, glândulas suprarrenais, trato gastrointestinal e nódulos linfáticos [15-17,19].

Histologicamente é visualizado neste tumor alguma diferenciação com pontes intercelulares, queratinização que pode tomar a forma de pérolas escamosas, células grandes e achatadas e citoplasma eosinófilo abundante (figura 3A). Embora, no passado, a maioria destes tumores surgisse centralmente em brônquios segmentares ou subsegmentares, a incidência na periferia do pulmão tem vindo a aumentar [15]. A produção de mucina não está presente no CPCE puro; a sua presença pode indicar a possibilidade de carcinoma adenoescamoso [15-17,19].

### **1.1.3.1.2. Adenocarcinoma (ADC)**

O ADC é o tumor epitelial maligno mais frequente de CP, representando 30-50% dos CPNPCs [15]. É mais comum em mulheres e em não-fumadores, estando, por isso, menos associado a um historial tabágico. É caracterizado por diferenciação glandular ou produção de mucina (80% contêm mucina) pelas células tumorais (ver figura 3B). Os ADCs têm vários padrões de crescimento, tanto puros como, na maioria dos casos, mistos.

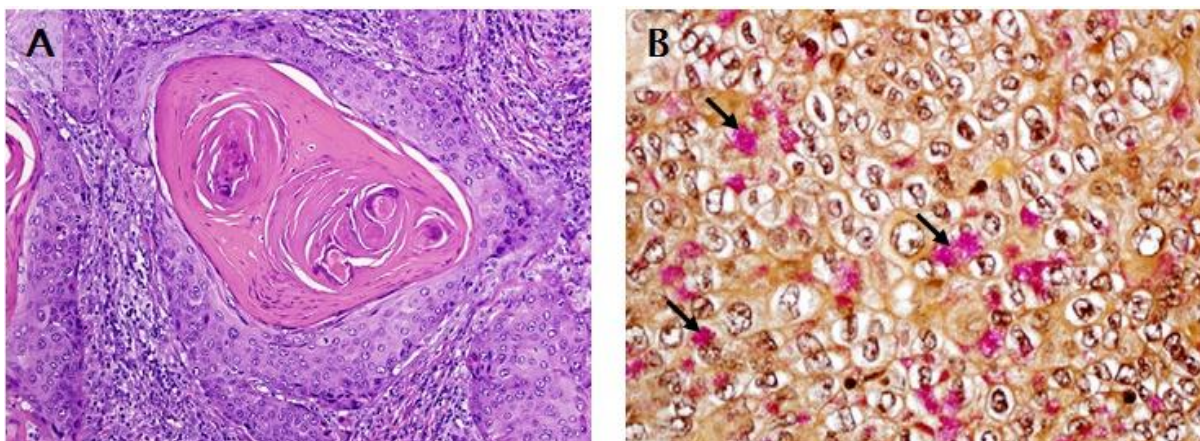
Estes padrões são acinar, papilar, bronquioloalveolar e sólido, com formação de mucina. Em comparação com o CPCE, apresenta lesões mais localizadas na periferia e tende a ser menor, cresce mais lentamente e tende a metastizar de forma mais ampla e precoce. Cérebro, ossos, glândulas suprarrenais e fígado metastizam mais comumente [15-17,19-20]. O ADC surge de uma hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) que progride para o carcinoma bronquioloalveolar, que depois se transforma em ADC invasivo. Contudo, nem todos os ADCs se originam desta forma e nem todos os carcinomas bronquioloalveolares se tornam invasivos se não forem tratados [21].

### **1.1.3.2. Carcinoma de pequenas células (CPPC)**

O CPPC é um tumor altamente maligno. As células epiteliais são pequenas, com citoplasma escasso, nucléolos ausentes, bordos mal definidos e cromatina nuclear finamente granular [15]. A contagem mitótica é alta. A necrose é comum e geralmente extensa.

O CPPC tem uma forte relação com o tabagismo. Ocorrem tanto em grandes brônquios como na periferia do pulmão. Não existe uma fase pré-invasiva ou carcinoma *in*

situ. Estes tumores são mais agressivos, metastizam amplamente e são virtualmente incuráveis por meios cirúrgicos [15-17,19].



**Figura 3 – Subtipos histológicos do CP [15]. (A) CPCE.** Neste tumor é visível a presença de queratinização que pode tomar a forma de pérolas escamosas, células grandes e achatadas e citoplasma eosinófilo abundante. **(B) ADC sólido com mucina.** Numerosas gotículas intracitoplasmáticas de mucina são visíveis neste subtipo histológico de CP.

#### 1.1.4. Estadiamento anatómico do carcinoma pulmonar

Em 1953, a “*Union International Contre le Cancer*” (UICC) determinou que o sistema TNM constituiria a base para o estadiamento de todos os tumores [22]. O conceito de classificação dos tumores malignos TNM baseia-se na extensão e dimensão do tumor primário (T), no envolvimento dos gânglios linfáticos regionais (N) e na existência ou não de metástases (M) [22-23]. Posteriormente, o “*American Joint Comittee for Cancer Staging*” (AJCC) propôs um estadiamento baseado na nomenclatura TNM, definindo-se quatro estadios clínicos [22]. O objetivo destes sistemas de classificação é auxiliar o clínico no planeamento do tratamento, determinar o prognóstico e avaliar e facilitar o intercâmbio de resultados de tratamento realizados em diferentes centros [23]. O sistema de estadiamento anatómico em uso é apresentado na tabela 2.

#### 1.1.5. Diagnóstico e Tratamento

Em termos de diagnóstico é avaliada a história clínica do doente, o histórico como fumador, a exposição ambiental ou ocupacional a determinadas substâncias e a história familiar de cancro. Se há suspeita de CP é necessário analisar as células pulmonares. Estas células podem ser obtidas da expetoração, de células do muco dos pulmões, através da tosse, e ainda por broncoscopia, aspiração por agulha fina, toracocentese ou toracotomia. Pode ainda recorrer-se à imagiologia médica através de radiografia torácica, tomografia axial



**Tabela 2 – Sistema de Estadiamento Internacional para o CP (adaptado de [22-23]).**

Sistema de classificação de acordo com a classificação da OMS, de 2004, de tumores do pulmão

**Tumor Primário - T**

**TX** – O tumor primário não consegue ser avaliado; ou o tumor primário é comprovado pela presença de células malignas na expetoração ou em brônquios segmentares, mas não detetado por broncoscopia e imagiologia.

**T0** – Ausência de evidências do tumor primário.

**Tis** - *Carcinoma in situ*.

**T1** - Tumor com  $\leq 3$  cm ou de diâmetro sem evidência de invasão proximal a um brânquio lobar.

**T2** – Tumor com  $>3$  cm de diâmetro.

Tumor de qualquer dimensão com:

- Invasão da pleura visceral;
- Atelectasia que não envolva o pulmão inteiro;
- Localização num brânquio lobar ou estar a pelo menos 2 cm da carina.

**T3** – Tumor de qualquer dimensão com:

- Invasão da parede torácica;
- Envolvimento do diafragma, pleura mediastínica ou pericárdio;
- Atelectasia que envolva todo o pulmão;
- Localização num brânquio principal a  $<2$  cm da carina.

**T4** – Tumor de qualquer dimensão com:

- Invasão do mediastino;
- Invasão do coração ou grandes vasos;
- Invasão da traqueia ou esófago;
- Presença de derrame pleural ou pericárdico maligno;
- Nódulo (s) tumoral satélite dentro do mesmo lobo do tumor primário;
- Invasão dos corpos vertebrais ou carina.

**Envolvimento ganglionar – N**

**Nx** - O envolvimento ganglionar não consegue ser avaliado.

**N0** – Sem envolvimento ganglionar regional.

**N1** – Metástases nos gânglios peribrônquicos e/ou hilares homolaterais.

**N2** – Metástases nos gânglios mediastínicos homolaterais e/ou sub-carinais.

**N3** – Metástases nos gânglios hilares ou mediastínicos contralaterais; metástases nos gânglios supraclaviculares homo ou contralaterais.

**Metástases – M**

**Mx** – Metástases à distância não conseguem ser avaliadas.

**M0** – Ausência de metástases à distância.

**M1** – Presença de metástases à distância (incluindo nódulos tumorais metastáticos num lobo diferente do tumor primário).

**Estadiamento TNM**

**Carcinoma oculto:** TX N0 M0

**Estadio 0:** Tis N0 M0

**Estadio IA:** T1 N0 M0

**Estadio IB:** T2 N0 M0

**Estadio IIA:** T1 N1 M0

**Estadio IIB:** T2 N1 M0; T3 N0 M0

**Estadio IIIA:** T1 N2 M0; T2 N2 M0; T3 N1 M0; T3 N2 M0

**Estadio IIIB:** qualquer T N3 M0; T4 qualquer N M0

**Estadio IV:** qualquer T qualquer N M1

computorizada (TAC), ressonância magnética, estudos com radioisótopos ou mediastinoscopia, para avaliar a extensão do tumor [14].

Com base em estudos histológicos e no estadio do CP, os tratamentos incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias-alvo. Para o CPNPC, a cirurgia é geralmente o tratamento de escolha. Para a maioria dos doentes, a sobrevivência é melhorada quando a quimioterapia é efetuada após a cirurgia. A radioterapia e a quimioterapia são frequentemente utilizadas em combinação com a cirurgia. Doentes com cancro em fase avançada de CPNPC são geralmente tratados com quimioterapia, terapias-alvo, ou com a combinação das duas. A quimioterapia isolada ou combinada com a radioterapia é o tratamento usual escolhido para o CPPC [2,14].

## **1.1.6. Biologia Molecular do Cancro do Pulmão**

### **1.1.6.1. Carcinogénese**

As bases moleculares da suscetibilidade para cancro foram evidenciadas aquando do desenvolvimento das técnicas de análise de DNA. Alterações no DNA podem ser herdadas ou adquiridas ao longo da vida de um indivíduo, por ação de compostos químicos, agentes biológicos ou agentes físicos [24]. Para além disso, mutações espontâneas que ocorrem com elevada frequência durante a replicação do DNA podem exceder a capacidade de reparação por parte das polimerases de DNA, constituindo um risco potencial para o desenvolvimento de uma neoplasia [24-25].

A carcinogénese é um processo multifatorial e multifásico, que culmina no desenvolvimento de neoplasias malignas, pela acumulação de alterações genéticas e/ou epigenéticas que poderão conduzir a mudanças na atividade génica e a fenótipos alterados sobre os quais atua a seleção ambiental e microambiental [26]. Este processo passa por vários estadios até que se constitua um carcinoma *in situ* (CIS), podendo ser dividido em três fases consecutivas: iniciação, promoção e progressão [19]. A iniciação é uma fase que se caracteriza por uma alteração no material genético de uma célula normal, por ação de um agente carcinogénico, de uma mutação espontânea ou hereditária, ou outro fator que resulte num dano celular.

Caso a célula não tenha capacidade de reparar o dano sofrido, vai ocorrer uma acumulação sucessiva de alterações genéticas que conferem vantagem seletiva à célula “iniciada”- fase de promoção. A acumulação sequencial de alterações genéticas em genes responsáveis pelo controlo da proliferação celular, da morte celular programada e da manutenção da integridade do genoma, culmina na expansão clonal da célula “iniciada”. A

fase de progressão é uma fase irreversível, em que o processo evolui até ao aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença. A progressão do cancro caracteriza-se pela inativação de determinados genes e sobre-expressão de outros, dando origem a células independentes da regulação local e central do organismo, que proliferam sem inibição [19].



**Figura 4 – Adaptações fisiológicas ocorridas nas células tumorais durante o desenvolvimento neoplásico (adaptado de [26]).** As células tumorais apresentam características distintas das células normais, sabendo-se que, durante a carcinogénese, adquirem fenótipos essenciais e discriminativos como: autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a sinais de inibidores de crescimento, resistência ao sistema imunitário, potencial proliferativo ilimitado, inflamação, capacidade de invasão tecidular e metastização à distância, capacidade de promover a angiogénese, instabilidade genómica e mutações, capacidade de evasão à apoptose e desregulação metabólica [26].

Contudo, o número de alterações necessárias para adquirir estas capacidades e a ordem pela qual elas surgem, variam de acordo com as características da neoplasia. Algumas alterações podem ser transmitidas de geração em geração, através da linhagem germinativa do indivíduo, originando os cancros familiares, que são raros (entre 5 e 10%) [19,27]. Ainda assim, a maioria das neoplasias surgem de um modo esporádico, na linhagem somática de tipos específicos de células, originando os cancros esporádicos [27].

### **1.1.6.2. Instabilidade genómica: alterações cromossómicas e perda de heterozigotia**

O cancro resulta de alterações dinâmicas do genoma, frequentemente associadas a ganho de função de oncogenes, perda de função de genes supressores de tumores e alteração de genes envolvidos na reparação do DNA que em conjunto contribuem para a transformação e progressão de células malignas [18-28].

A deteção de amplificações e deleções no número de cópias cromossómicas, resultado da instabilidade genómica, conduziu à identificação de inúmeros oncogenes e genes supressores de tumores. Várias alterações genéticas têm sido associadas ao CP, incluindo aneuploidias, ganhos e perda alélica específica [29].

<b>Tabela 3 – Alterações cromossómicas frequentemente encontradas no CP [18-29].</b> p – braço curto de cada cromossoma; q - braço longo.		
	<b>CPPC</b>	<b>CPNPC</b>
<b>Perda</b>	3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17p, 22q	3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 19q, 21q, 22q
<b>Ganho</b>	3q, 5p, 8q, 19q	1p, 1q, 3p, 3q, 5p, 7p, 7q, 8p, 8q, 9q, 11q, 12q

Além disso, alterações em vários genes têm sido implicadas no desenvolvimento do CP, incluindo a ativação de *EGFR*, *PIK3CA*, *MYC*, *KRAS*, *MET*, *FGFR1*, *ERBB2*, *EML4-ALK*, *NKX2-1*, *SOX2*, *BCL2L1*, bem como a inativação de *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*, *STK11*, *PTEN* e *FHIT* [18-29].

Deste modo, segue-se uma breve caraterização dos oncogenes e genes supressores de tumores supramencionados e representados na figura 5, tendo em conta a sua importância no CP.

### **1.1.6.3. Protooncogenes e oncogenes / Sinalização de fatores de crescimento**

Os protooncogenes estão envolvidos no controlo da proliferação celular, apoptose ou ambos e a alteração da sua estrutura e/ou expressão resulta na formação de oncogenes. Estes genes atuam de forma dominante e podem ser ativados através de alterações estruturais resultantes de mutações ou fusões de genes, através de justaposição a promotores fortes ou por amplificação. De uma forma geral, os oncogenes promovem o crescimento celular através da ativação constitutiva de vias mitogénicas. Os oncogenes podem ser classificados de acordo com os diferentes produtos genéticos que codificam: recetores de fatores de crescimento e fatores de crescimento, transdutores de sinais, fatores de transcrição e reguladores da apoptose [19,31].

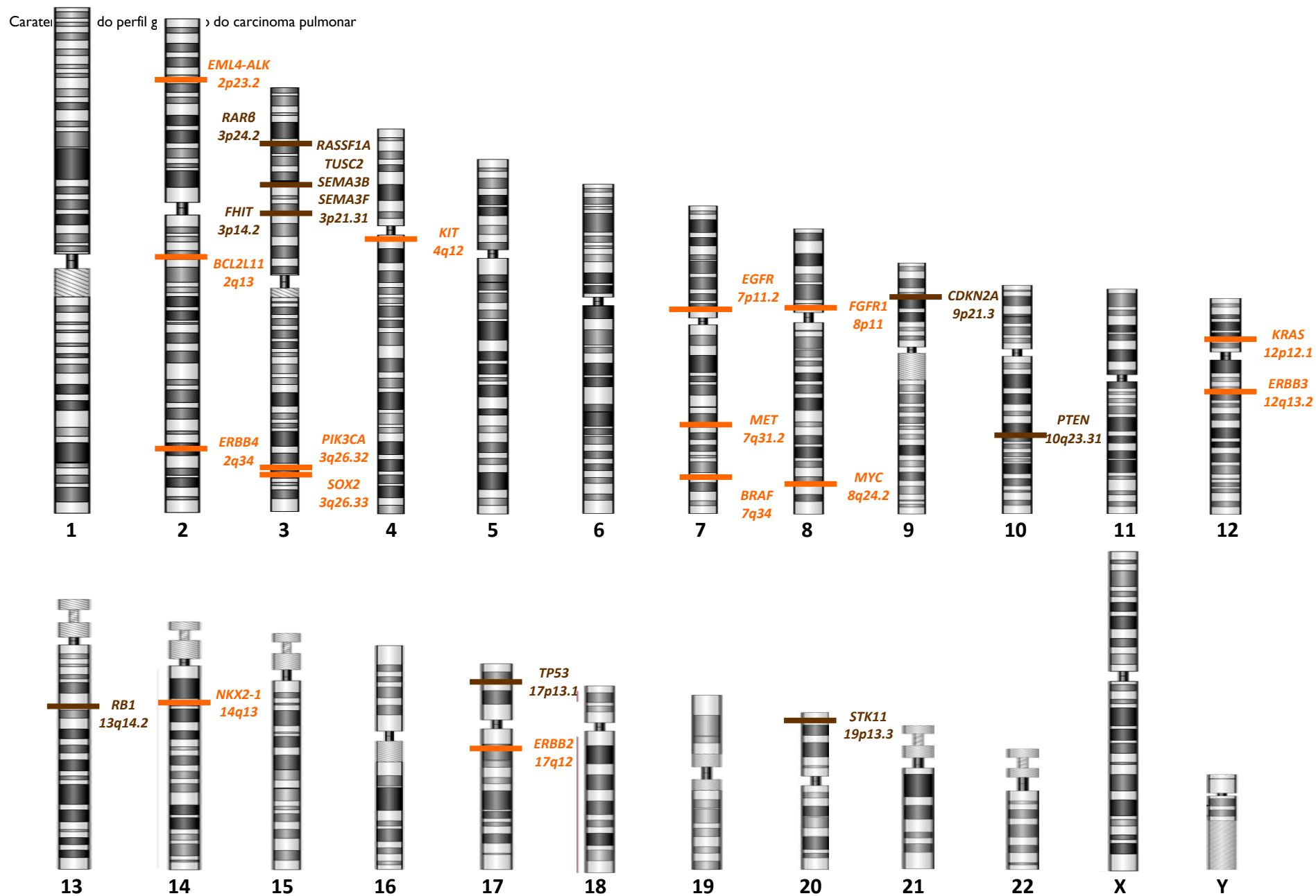


Figura 5 – Representação esquemática, de acordo com as diferentes referências bibliográficas, das posições cromossômicas dos oncogenes (a laranja) e dos genes 16 supressores tumorais (a castanho) com relevância terapêutica para o CP. Todos os genes estão de acordo com o HUGO Gene Nomenclature Committee [30].

### **1.1.6.3.1. Alteração dos recetores de fatores de crescimento e dos fatores de crescimento**

A desregulação de recetores na superfície celular que transmitem sinais estimuladores de crescimento para o interior das células contribui para o desenvolvimento tumoral, constituindo uma estratégia no desenvolvimento de autossuficiência em fatores de crescimento. A sobre-expressão destes recetores permite que a célula tumoral responda cada vez mais aos níveis habituais de fatores de crescimento. Para além da sobre-expressão, alterações estruturais ou mutações nos recetores podem afetar a sua atividade, podendo levá-los a funcionar como potentes oncogenes [31-33].

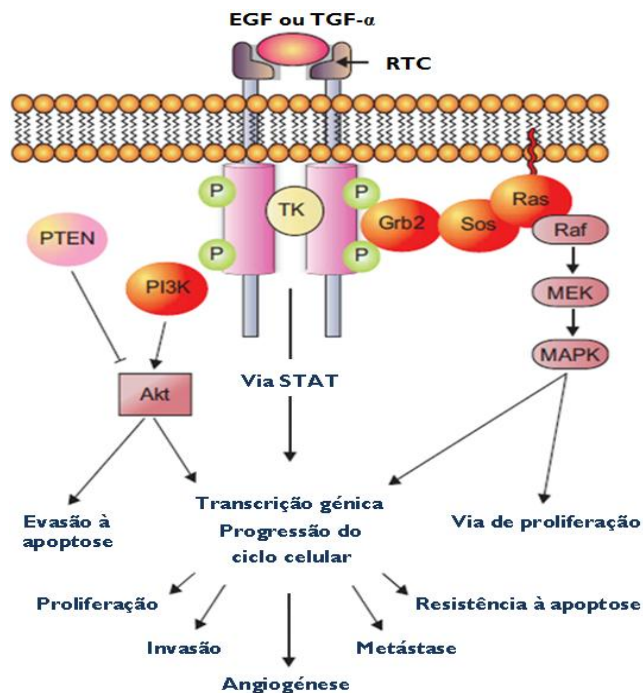
Os recetores de fatores de crescimento normalmente associados a tirosina cinases estão frequentemente sobre-expressos no CP [34]. Os recetores tirosina cinase (RTC) são glicoproteínas transmembranares que sofrem ativação após ligação de ligandos específicos e que comunicam o sinal extracelular para o citosol através da fosforilação de resíduos de tirosina do próprio recetor (autofosforilação) ou em proteínas associadas [35].

A família de genes *ERBB* inclui o *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* e *ERBB4*, frequentemente sobre-expressos no CP.

A ativação dos protooncogenes que codificam o recetor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e o *ERBB2* podem contribuir para a transformação de fenótipos celulares e proporcionar às células tumorais um crescimento substancial e vantagens de sobrevivência [32-33]. A sobre-expressão de *EGFR*, 7p11.2, é relatada em 50-90% dos casos de CPNPC, e está relacionada com um prognóstico desfavorável [18,34,36-38]. Para além da sobre-expressão do *EGFR*, os seus ligandos *EGF*, fator de crescimento epidermal, e *TGF $\alpha$* , fator de crescimento e transformação  $\alpha$ , são também frequentemente expressos no CPNPC, levando à hiperatividade do recetor [34]. A sobre-expressão de *ERBB2* é identificada em cerca de 20% do CP [39]. Mutações nos genes *EGFR* e *ERBB2* são identificadas em 10-30% e ~2%, respetivamente, no CPNPC, e são mais incidentes no sexo feminino, ADC, não-fumadores e etnia asiática [34,40-41].

Em 2004, a FDA aprovou dois inibidores do *EGFR* em doentes com CPNPC que não respondem à quimioterapia convencional. Embora na clínica fossem inicialmente usados anticorpos monoclonais, que têm como alvo o domínio extracelular do recetor, como o cetuximab, atualmente são amplamente usados os inibidores do *EGFR* para inibir a atividade intracelular do recetor, tais como o erlotinib e o gefitinib [18,35,37,42-43]. A resistência à terapia com estes inibidores está associada, entre outros, a mutações no gene *KRAS* e à amplificação do protooncogene que codifica o recetor do fator de transição epitélio-

mesenquimal (MET), responsável pela ativação da via PI3K, através da fosforilação de ERBB2 ou ERBB3 [45]. A inibição da sinalização do MET pode restabelecer a sensibilidade aos inibidores do EGFR [34,37].



**Figura 6 – Vias de transdução do sinal desencadeadas por RTC (adaptado de [37]).** A ligação de ligandos ao domínio extracelular provoca a dimerização dos receptores monoméricos ou o rearranjo da estrutura quaternária dos receptores heterotetraméricos, levando à ativação de proteínas tirosina cinase. Esta ativação induz um aumento da atividade catalítica intrínseca e a criação de locais de ligação para moléculas sinalizadores subsequentes, incluindo a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). Esta cinase fosforila uma membrana fosfolipídica, gerando produtos que ativam a cinase AKT. A AKT está envolvida na proliferação celular e na inibição da apoptose. Os resíduos fosforilados no recetor também funcionam como locais de ancoragem às proteínas adaptadoras que são capazes de se ligarem a outras proteínas efetoras. Uma proteína adaptadora é a Grb2, que se liga à guanosina trifosfato (GTP) captando o fator SOS. O SOS atua na ligação da GTP à proteína RAS e catalisa a formação da RAS, que ativa a cascata da proteína cinase ativada pelo mitogéneo (MAPK). As MAPKs ativas estimulam a síntese e fosforilação de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição ativados por essas sinalizações em cascata estimulam, sucessivamente, a produção de fatores de crescimento, receptores dos fatores de crescimento e proteínas que controlam diretamente a entrada de células no ciclo celular. Os fatores de transcrição citoplasmática denominados STATs (conversores de sinais e ativação da transcrição) são alguns dos fatores que ativam a transcrição gênica e desencadeiam a proliferação e invasão celulares, angiogénese, metastização e evasão à apoptose [18-19,34,37].

O protooncogene *FGFR1* (8p11) codifica o *Fibroblast growth factor receptor* (FGFR). A ativação do recetor pela ligação do *fibroblast growth factor* (FGF) contribui para a progressão tumoral, levando a um aumento da proliferação e migração celulares, apoptose e angiogénese. Esta ativação continuada ocorre graças à amplificação do gene *FGFR1*, translocação ou mutações ativadoras. O ganho genético de *FGFR1* representa hoje um dos mais promissores biomarcadores no CP. Esta alteração ocorre maioritariamente em CPCE (21% em CPCE e 3,4% em ADC) [44].

O protooncogene *KIT* (4q12) codifica a proteína transmembranar KIT, com atividade de tirosina cinase, que atua como recetor para o fator de crescimento de mastócitos (SFC). Este fator de crescimento, aliado a outros fatores, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), desencadeia diversas funções celulares, entre as quais, proliferação, adesão e diferenciação celulares e apoptose [49-50]. O recetor KIT sinaliza apenas em resposta ao seu ligando primário, o SFC. Mutações no gene que codifica o KIT conduzem à ativação constitutiva do recetor. Embora seja mais reportada em CPPC, a sobre-expressão de *KIT* está também presente em ADC e CPCE [18,45-48].

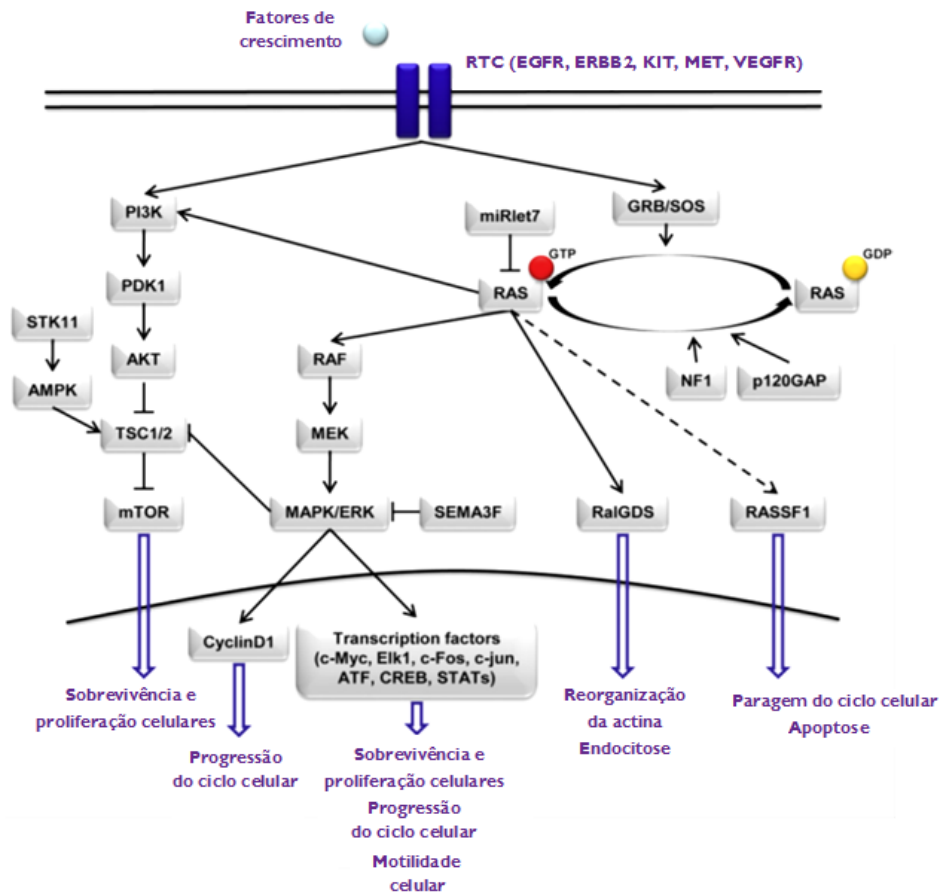
O protooncogene *MET* (7q31.2) codifica o recetor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR), com atividade de tirosina cinase. Em células normais, o gene *MET* promove o crescimento e a migração celulares. Contudo, a desregulação do gene *MET* conduz à proliferação e sobrevivência celulares, angiogénese, invasão da matriz extracelular e metástase. Esta desregulação do *MET* ocorre através da sobre-expressão do recetor, amplificação do recetor, mutação génica e sobre-expressão do ligando HGF (fator de crescimento de hepatócitos). A ligação de HGF promove a ativação do HGFR, e esta sobre-expressão é detetada em 45% dos carcinomas pulmonares. A sobre-expressão do gene *MET* é observada em 67% de ADC, 57% de CPGC, 57% de CPCE, 25% de CPPC e 60% de tumores carcinoides do pulmão [42,45,49].

### **1.1.6.3.2. Proteínas transdutoras de sinais codificadas por oncogenes**

Os sinais de crescimento celular são transmitidos dos recetores dos fatores de crescimento na superfície celular para o núcleo através de uma rede complexa de vias designadas de cascata de transdução de sinal. A sinalização celular desempenha assim um papel fundamental na carcinogénese. Estas vias são semelhantes entre células normais e tumorais, contudo, aquando o tumor encontram-se desreguladas [19,33].

A ativação da via RAS/RAF/MEK/MAPK ocorre frequentemente no CP (figura 7) graças à presença de mutações ativadoras no gene *KRAS* (12p12), que ocorrem em aproximadamente 20% dos tumores do pulmão, em particular, em ADC [18,38,52]. No CP, 90% das mutações estão localizadas no *KRAS* sendo estas mutações mutuamente exclusivas, isto é, são encontradas mutações no gene *KRAS* quando o gene *EGFR* e *ERBB2* não se encontram mutados, e observadas principalmente em homens e fumadores. Mutações no gene *KRAS* são incomuns em CPCE [18,37-38,50].





**Figura 7 – Via da RAS (adaptado de [18]).** A proteína RAS pode existir em dois estados: ativo, em que a GTP é ligada à molécula; e inativo, em que a GTP foi clivada a guanosina difosfato (GDP). A existência de mutações pontuais ativadoras pode conduzir a um potencial oncogénico, através da perda de atividade de GTPase intrínseca, levando à incapacidade para clivar GTP a GDP. Este processo desencadeia vários aspetos do comportamento celular incluindo a proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência celulares, através da ativação de vias como a RAF/MEK/MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. A RAS pode induzir tanto sinais apoptóticos como antiapoptóticos. A mutação do KRAS resulta, por isso, na ativação constitutiva de vias de sinalização a jusante, tornando os tumores derivados desta mutação, independentes da sinalização dos RTC, e, portanto, resistentes à terapêutica com IRTC, bem como à quimioterapia [18,37-38,50].

O gene *BRAF* (7q34) codifica a cascata serina/treonina cinase que atua na via RAS/RAF/MAPK, essencial para a regulação do ciclo celular. A proteína RAF é uma serina-treonina cinase que quando ativada fosforila a proteína MEK, que por sua vez fosforila a proteína ERK. Esta última proteína quando ativada fosforila diferentes alvos citoplasmáticos e nucleares, mediando uma resposta celular. Esta via controla a proliferação e diferenciação celulares, bem como a apoptose [51]. No CP as mutações no gene *BRAF* (~3%) são predominantemente encontradas em ADC, sendo estas mutuamente exclusivas com mutações nos genes *EGFR* e *KRAS* [18,37,52].

O gene *MYC* (8q24.21), *Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*, codifica o fator de transcrição *C-MYC*, que heterodimeriza com a *partner protein myc-associated factor X* (MAX) para regular a expressão génica. Em conjunto com o gene *MAX*, o *MYC* emerge como um

fator de transcrição oncogénico que integra a maquinaria do ciclo celular, adesão e metabolismo celulares, e vias apoptóticas, estando assim envolvido na regulação da expressão génica e do ciclo celular [36,53]. Os genes *MYC* são maioritariamente amplificados no CPPC, e menos frequentemente no CPNPC, representando cerca de 15-30% do total dos casos de CP [18,37]. Este tipo de mutações ocorre como eventos tardios [49].

O protooncogene *PIK3CA* (3q26.32) está frequentemente amplificado no CP, essencialmente no CPPC. As proteínas PI3Ks regulam a proliferação, sobrevivência, adesão e motilidade celulares. Na carcinogénese pulmonar, a hiperativação desta via parece ocorrer graças a mutações nos genes *PI3K*, *PTEN*, *EGFR* ou *KRAS*, amplificação do gene *PIK3CA*, perda de *PTEN* e ativação das cinases AKT e mTOR. A via tem dois reguladores negativos: o gene supressor tumoral, *PTEN* (10q23.31) e o complexo TSC1/TSC2. A desregulação desta via, mais frequente no CPCE do que no ADC, resulta num aumento do metabolismo energético, crescimento celular, resistência à apoptose e aumento do potencial metastático [18,37,54].

A fusão genética entre o gene *ALK*, que codifica uma proteína pertencente à família dos recetores de tirosina cinase, e o gene *EML4*, que codifica uma proteína associada aos microtúbulos, é responsável pela constante sinalização mitogénica e pela transformação maligna e pensa-se ter um papel na ativação da RAS e da PI3K. Esta fusão, situada no braço curto do cromossoma 2, está presente em 2-7% dos CPNPCs, ocorrendo maioritariamente em ADC e não fumadores ou fumadores passivos. Mutações nesta fusão génica são exclusivas das mutações no *EGFR* e *KRAS* [18,36-37,55-57].

A fusão génica entre *KIF5B* e o protooncogene *RET* é causada por uma inversão pericêntrica em 10p11.22-q11.21, e tem sido apontada como um alvo molecular promissor no diagnóstico e tratamento do CP. Esta fusão, identificada em ADC, pode ser responsável pela sobre-expressão do recetor RET, com atividade tirosina-cinase, induzindo espontaneamente a transformação celular [58]. A perda do domínio cinase do recetor ROS1 tem também sido relatada no CP. A expressão de genes de fusão *ROS1* tem sido, por isso, identificada como um excelente alvo terapêutico no CPNPC [59].

### **1.1.6.3.3. Transformação da expressão génica desencadeada por fatores de transcrição**

Os fatores de transcrição são proteínas nucleares que regulam a expressão de genes alvo ou de família de genes. Estes fatores têm um papel fundamental na conversão de sinais extracelulares em alterações na expressão de genes específicos, regulando desta forma vários processos biológicos. A transcrição é regulada através da ligação de fatores de

transcrição a sequências específicas do DNA. No CP, a alteração da expressão de genes específicos desencadeada por fatores de transcrição oncogénicos provoca alterações génicas que contribuem para a carcinogénese pulmonar [19,31].

O *NKX2-1* (NK2 homeobox-1), também conhecido como TTF-1 (fator de transcrição da tiroide-1) é um fator de transcrição específico do pulmão, tiroide e diencéfalo. No pulmão, regula o desenvolvimento normal e morfogénese, essencialmente a diferenciação de células epiteliais do pulmão e o desenvolvimento respiratório perinatal. O gene *NKX2-1* (14q13.3) atua como um protooncogene e contribui para a patogenicidade do CP [36]. O *NKX2-1* tem diferentes perfis de expressão em diferentes subtipos histológicos de CP: em ADC e CPPC a expressão é elevada; no entanto, em CPGC e CPCE é baixa ou ausente. Este fator de transcrição é expresso em cerca de 60-70% de ADC e é indicado como um marcador específico de tecido, capaz de distinguir morfologicamente ADCs metastáticos semelhantes de origem pulmonar a partir de outros sítios primários desconhecidos [18,60].

O fator de transcrição *SOX2* é expresso em células epiteliais do pulmão e controla a morfogénese e diferenciação do tecido epitelial das vias aéreas. A ausência de *SOX2* no epitélio traqueal adulto resulta na redução da proporção de células basais e inibe a sua capacidade de autorrenovação. Este fator de transcrição encontra-se frequentemente amplificado na região 3q26.33, essencialmente no CPCE, em comparação com ADCs [18,37,61].

#### **1.1.6.3.4. Evasão à apoptose**

A morte celular programada ou apoptose é um mecanismo que elimina seletivamente células envelhecidas, danificadas ou que não são necessárias, com o objetivo final de manter a homeostasia dos tecidos. As duas principais vias da apoptose, via intrínseca (via mitocondrial) e extrínseca (via dos recetores de morte), ativam caspases responsáveis pela clivagem de vários substratos e pela indução da morte celular. As células, em apoptose, apresentam alterações morfológicas características, tais como a condensação da cromatina, fragmentação do DNA, diminuição do volume celular e formação de corpos apoptóticos, sendo posteriormente reconhecidas por macrófagos e fagocitadas. Este processo é altamente regulado e alterações nestas vias podem levar a um aumento da sobrevivência celular contribuindo para a expansão de células neoplásicas. A evasão à apoptose permite ainda criar um ambiente propício à instabilidade genética e acumulação de mutações

contribuindo para o desenvolvimento de neoplasia e insensibilidade a tratamentos anti-tumorais [19,31].

A *BCL2* é uma proteína localizada na mitocondria, retículo endoplasmático (RE) e membrana nuclear externa. A família de genes *BCL2* inclui mais de 30 moléculas anti e pró-apoptose, que se associam em homo e heterodímeros na regulação da morte celular. Proteínas anti-apoptóticas, tais como a *BCL2*, localizam-se maioritariamente na membrana mitocondrial externa, onde previnem a libertação do citocromo C e outras proteínas proapoptóticas da mitocondria para o citosol. As proteínas proapoptóticas, tais como a *BAX*, atuam como sensores a danos celulares, iniciam e desencadeiam os eventos que levam à morte celular [62].

O protooncogene *BCL2L11* (2q13) encontra-se sobre-expresso no CP, em 80% de CPPC e 10-30% de CPNPC. Este gene consegue impedir a apoptose em células tumorais sem alterar a proliferação celular [36,49,63]. Em contraste, o gene proapoptótico, *BAX*, é reprimido em CPPC e maioritariamente expresso em CPNPC.

A co-expressão de *MYC* e *BCL2L11* está associada a um aumento da incidência de CP, demonstrando a existência de uma sinergia entre estes dois genes na evasão à apoptose [37].

#### **1.1.6.4. Genes supressores de tumores /Sinalização de inibidores de crescimento**

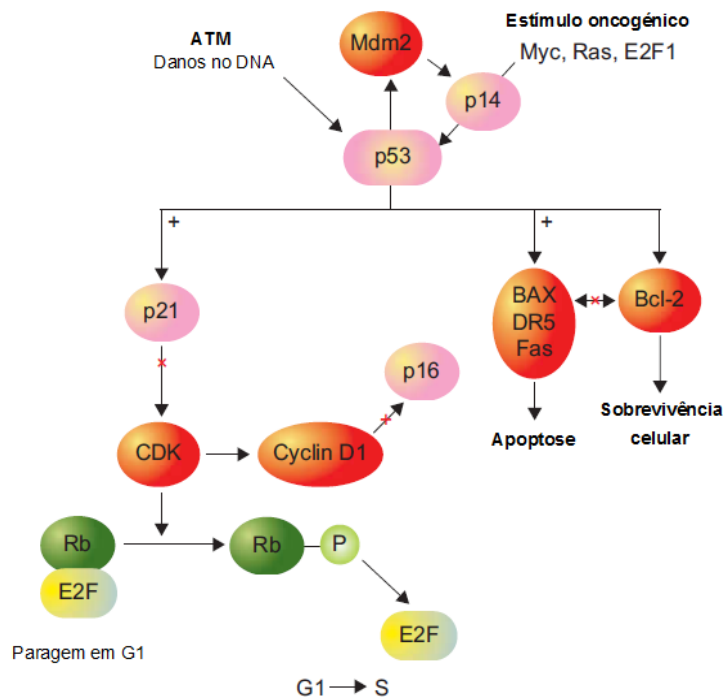
Os genes supressores tumorais são importantes no controlo da divisão celular, nomeadamente na presença de condições desfavoráveis, tais como danos no DNA, ausência de fatores de crescimento ou erros no processo de divisão celular, bloqueando o avanço do ciclo celular quando se verificam erros na replicação, podendo mesmo induzir a célula a entrar em apoptose. A deleção de segmentos cromossómicos pode ser uma das causas de inativação destes genes, contribuindo assim para a iniciação e/ou progressão do fenótipo maligno das células, uma vez que as células continuam a dividir e eventualmente acumulam ainda mais alterações no DNA [19,31].

O gene supressor tumoral *TP53* (17p13) codifica a proteína p53 que atua como fator de transcrição em inúmeras funções anti-proliferativas e é ativado em resposta a várias formas de stresse celular, incluindo irradiação, hipoxia, danos genotóxicos causados por drogas e ativação de oncogenes [36]. A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear com potencial para se ligar ao DNA, estando envolvida no reconhecimento de danos no DNA e na prevenção da propagação de alterações genéticas [18,37,48].

O gene *TP53* é o mais frequentemente mutado no CP, representando cerca de 90% do CPPC e CPGC e 50% do CPNPC. Embora ocorra frequentemente perda de função da p53, muitas vezes há ganho de função, levando à maior agressividade do cancro. São encontradas alterações maioritariamente em CPCE e lesões pré-neoplásicas, ligadas ao tabagismo [18,37].

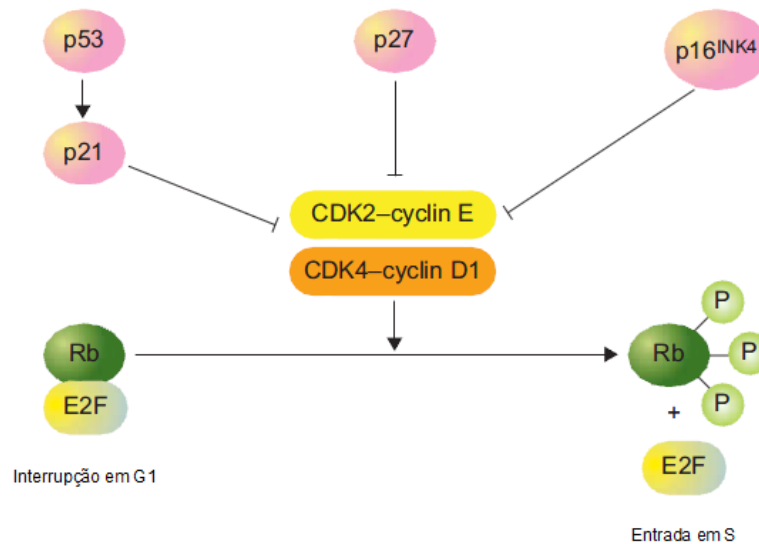
O gene *RBI* (13q14) codifica uma proteína que atua como regulador da transcrição de genes envolvidos na síntese de DNA e no controlo do ciclo celular [36].

A perda da proteína Rb ocorre em mais de 70% e 90% do CNEGC e CPPC, respetivamente, e apenas em 10-15% do CPNPC [18,37]. São encontradas mutações no locus *INK4/ARF*. Os alelos modificados de p16<sup>INK4</sup> presentes no CP perdem a capacidade de bloquear a atividade da ciclina CDK4 e impedir a fosforilação da Rb durante o ciclo celular.



**Figura 8 – Via da p53 (adaptado de [37]).** A quantidade e atividade da p53 é maioritariamente regulada via Mdm2 (*mouse double minute 2*). Em condições normais, a proteína p53 encontra-se em baixas concentrações e apresenta um tempo de meia vida curto devido à degradação mediada por ubiquitinação e proteólise. Este estado é mantido através da interação com proteínas reguladoras, nomeadamente a Mdm2, que inibe a atividade transcripcional e medeia a degradação da p53. Em condições de stresse celular verifica-se um aumento dos níveis da proteína p53 através da diminuição da sua degradação proteolítica via Mdm2 e um aumento da afinidade de p53 para o DNA. O gene *p14<sup>ARF</sup>* (9p21) é um gene supressor de tumores que responde a estímulos oncogénicos (*Ras*, *Myc*, *E2F1*) e/ou a danos no DNA, e é responsável pelo sequestro de Mdm2. A perda de expressão da proteína *p14<sup>ARF</sup>* ocorre com frequência no CPPC, CNPGC e alguns ADCs. A ativação de *p14<sup>ARF</sup>* induz a paragem do ciclo celular, apoptose, senescência, diferenciação e antiangiogénese. A amplificação de *Mdm2* é rara no CP, 6% no CPNPC, embora a sobre-expressão seja frequente, 30% no CPNPC e CPPC. O gene *ATM* é um dos genes implicados na reparação do DNA, contudo não são conhecidas alterações no CP. Todas estas alterações resultam da ativação da expressão de vários genes alvos, incluindo o *p21*, resultado da paragem do ciclo celular nas diferentes fases, *BAX*, *Fas* e *DR5* (*TRAIL-5*, *tumor necrosis factor – related apoptosis – inducing ligand*), que resultam na ativação de vias apoptóticas. Estes quatro fatores estão fortemente desregulados no CP [18-19,37].

A inativação da função da Rb, via desfosforilação, em CPNPC, é obtida essencialmente devido à perda da expressão da proteína p16<sup>INK4</sup> e/ou à sobre-expressão dos genes que codificam as ciclinas D1 e E. O gene *CDK4* está raramente sobre-expresso e é amplificado numa pequena percentagem de CPNPC. Em contraste, a sobre-expressão do gene que codifica a ciclina D1 e a perda de expressão da p16 são encontradas em 40-50% do CPNPC. O gene que codifica a ciclina D1 (*CCD1*) está raramente amplificado no CP; contudo, a sobre-expressão do gene que codifica a ciclina D1 é observada em 35-50% do CPNPC. A perda do alelo p26, no *locus* 9p21 (*CDKN2A/CDKN2B*), é muito frequente. A sobre-expressão do gene que codifica a ciclina E é detetada em 30% do CPNPC [37,45]. No geral, estes são eventos precoces no CP, detetados em 30-50% do CPNPC, essencialmente no CPCE [18].



**Figura 9 – Papel da via Rb na regulação do ciclo celular (adaptado de [37]).** A proteína Rb na sua forma ativa, ou seja, quando está fosforilada, inibe a progressão do ciclo celular no ponto de restrição G1-S. A regulação do ciclo resulta da interação com várias proteínas, incluindo: ciclinas, que catalisam a inativação da Rb via desfosforilação; inibidores das cdk, tais como a p21, p16 e p27 que inibem a fosforilação da Rb; e a família dos fatores de transcrição E2F, que aumentam a expressão de genes necessários à entrada na fase S do ciclo celular.

A perda de uma cópia de genes supressores tumorais do braço curto do cromossoma 3 é um dos primeiros eventos mais frequentes encontrado em 96% do CP e em 78% das lesões pulmonares pré-neoplásicas. Os mais frequentes e reportados são o *RARβ* (3p24), *RASSF1A*, *TUSC2*, e 2 membros da família das semaforinas, *SEMA3B* e *SEMA3F* (todos em 3p21.3) e *FHIT* (3p14.2) [18,36-37].

As proteínas *FHIT*, *RASSF1A*, *TUSC2* e *SEMA3B* reduzem o crescimento celular quando reintroduzidos em células de CP. A proteína *FHIT* tem sido evidenciada na indução da apoptose. A *RASSF1A*, além de poder induzir a apoptose, é capaz da estabilização dos microtúbulos e alteração da regulação do ciclo celular. O efeito supressor de tumor do gene

*TUSC2* é capaz de inibir os RTC, bem como inibir a degradação da p53, mediada por Mdm2. O gene *SEMA3B* codifica uma proteína responsável pela diminuição da proliferação celular e indução da apoptose. A *RAR $\beta$*  exerce a sua função supressora limitando o crescimento e diferenciação celulares. A proteína *SEMA3F* pode inibir a vascularização agindo sobre o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O gene *VEGF* codifica uma proteína que atua especificamente nas células endoteliais de várias maneiras: na mediação do aumento da permeabilidade vascular, indução da angiogénese, vasculogénese e do crescimento de células endoteliais, promoção da migração celular e inibição da apoptose. A expressão aumentada deste gene poderá, deste modo, ser um indicador de fraco prognóstico [18].

O gene *PTEN* codifica uma fosfatase lipídica com atividade enzimática cuja principal função consiste na regulação negativa da via PI3K. Mutações neste gene promovem a ativação constitutiva dos componentes da via PI3K, incluindo as cinases AKT e mTOR. No CP, a perda de *PTEN* é observada em cerca de 30% do CPPC e em 50% dos CPNPC [18,37,49].

O gene supressor tumoral *STK11* (19p13.3) codifica uma proteína serina-treonina cinase II, facilitadora da apoptose e que regula a polaridade da célula, bem como a sua diferenciação, motilidade, metastização e metabolismo. Deleções nesta região cromossómica ocorrem em 30% do CP, tornando-o no terceiro gene mais mutado neste tipo de cancro. É responsável pela inibição da via mTOR, via AMPK. É mais incidente em ADC, homens e fumadores [18,37,64].

#### **1.1.6.5. Imortalização celular e ativação da telomerase**

Os telómeros são sequências repetitivas localizadas nas extremidades dos cromossomas dos eucariotas, constituídos por repetições TTAGGG. Estas estruturas são responsáveis pela estabilização do comprimento dos cromossomas, impedindo-os da fusão topo-a-topo e da excisão de exonucleases. Os telómeros encurtam depois de cada divisão celular, o que limita o tempo de vida de uma célula. O encurtamento continuado dos telómeros limita a proliferação celular e induz a apoptose ou senescência celular, ativando a via p53. A telomerase, uma ribonucleoproteína, é a enzima responsável pelo alongamento dos telómeros. Embora expressa na maioria dos cancros humanos, a telomerase é inativa em células somáticas adultas. A reativação da expressão da telomerase é, por isso, necessária para a proliferação contínua de células tumorais e essencial para a imortalização celular. Embora silenciada em células normais, a telomerase é ativada em mais de 80% do CPNPC e quase uniformemente no CPPC [18,37,49].

### **I.1.7. Ferramentas moleculares utilizadas para a caracterização do perfil genómico do Carcinoma Pulmonar**

Uma melhor compreensão dos mecanismos que controlam o crescimento, a invasão e a dispersão do CP é extremamente importante e necessária, bem como a investigação de alvos moleculares que permitam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O reconhecimento das alterações genéticas nas lesões malignas e potencialmente malignas do parênquima pulmonar oferece a possibilidade de se desenvolver e melhorar a avaliação do risco, do diagnóstico e do prognóstico.

As alterações no número de cópias de sequências cromossómicas específicas são frequentemente citadas como causa ou predisposição para doenças ou síndromes humanas [65]. Neste sentido, diferentes técnicas são utilizadas para a deteção de alterações do número de cópias de sequências cromossómicas, incluindo as técnicas de *array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH), *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH).

Assim, o mapeamento das alterações genéticas em diagnóstico do CP permitirá a avaliação de um painel de biomarcadores, possibilitando a correlação com o fenótipo cancerígeno e o prognóstico.

#### **I.1.7.1. Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)**

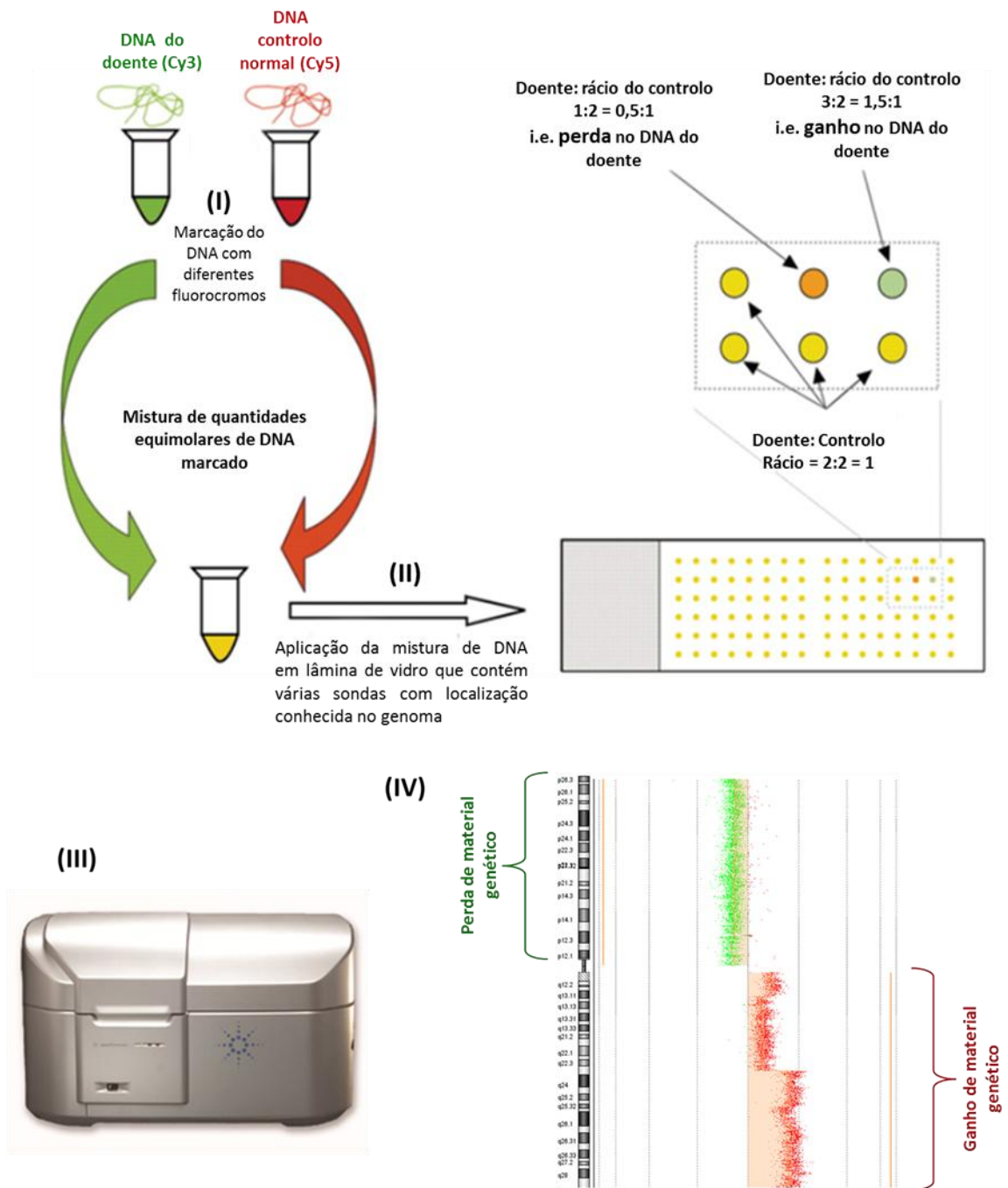
A técnica de aCGH permite analisar, simultaneamente, alterações no número de cópias em milhares de sequências-alvo do genoma e tem como base a técnica de hibridação comparativa do genoma (CGH) previamente descrita por Kallioniemi et al., em 1992 [66]. No aCGH, fragmentos de DNA genómico humano clonados a partir de bactérias (*Bacterial Artificial Chromosome-BAC*) ou de *PI-derived Artificial Chromosomes* (PAC), ou ainda oligonucleótidos sintéticos e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) têm localização previamente conhecida nos cromossomas e, dessa forma, podem ser diretamente relacionados com a informação sobre a sequência do genoma humano disponível em bases de dados [67].

O aCGH, com a capacidade de analisar DNA de uma grande variedade de modelos com elevada resolução, tem revolucionado não só o diagnóstico como também a identificação das bases moleculares de várias doenças. Contudo, apresenta como limitação não detetar alterações equilibradas nem variações de ploidia. Quaisquer alterações detetadas por aCGH devem ser, preferencialmente, confirmadas por técnicas moleculares alternativas,



tais como MLPA e FISH. A maior desvantagem é ainda a necessidade de um investimento avultado, principal obstáculo à sua generalização na rotina [67-69].

Com a crescente utilização da tecnologia de aCGH foram identificadas novas *Copy Number Variations* (CNV's), que consistem em alterações no número de cópias de segmentos de DNA submicroscópicos. Estas podem ser causais dos fenótipos estudados ou corresponderem a uma variação normal no genoma humano. É, por isso, crucial tanto para diagnóstico como para investigação ser capaz de distinguir entre CNV's responsáveis por patologia ou CNV's benignas. A distinção destas depende do uso de bases de dados adequadas que apontam dados precisos do genótipo e descrições fenotípicas detalhadas de diversas patologias. As bases de dados mais comunmente utilizadas são a DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*), a ECARUCA (*European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*), o Ensembl e a ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*) [70].



**Figura 10 - Representação esquemática da técnica de *array-CGH* ((I) e (II) adaptado de Sharkey et al., 2005 [71]; (IV) imagem cedida pelo Laboratório de Citogenética e Genómica – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC)).** Esta metodologia consiste em 5 etapas: (I) marcação do DNA genómico com diferentes fluorocromos, *Cyanine 3* (Cy3) e *Cyanine 5* (Cy5), (II) hibridação na plataforma de *microarray*, (III) leitura dos sinais pelo *scanner*, (IV) processamento dos dados pelo *software* e análise dos resultados. As intensidades de DNA em cada sequência alvo são quantificadas. Desvios na intensidade relativa de fluorescência entre a amostra em estudo e a amostra controlo permitem estimar ganhos ou perdas de segmentos cromossómicos, resultado do rácio Cy5: Cy3 alterado. A resolução do método é determinada pelo número e tamanho dos fragmentos usados na matriz e pela distância que os separa no genoma.

### **1.1.7.2. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**

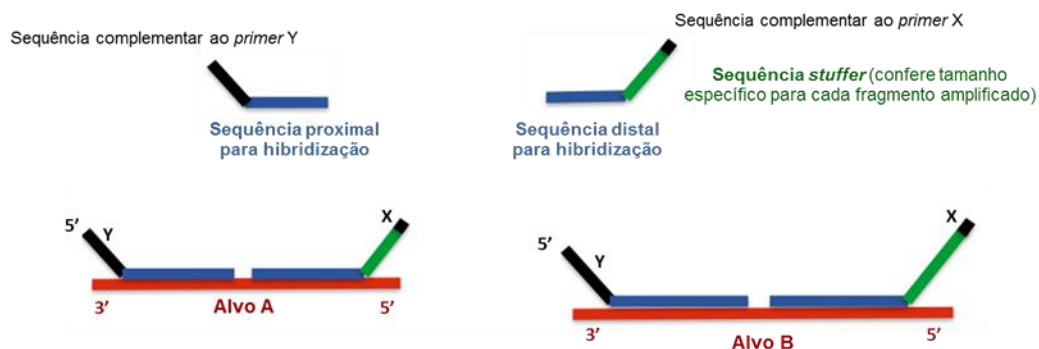
Embora diferentes técnicas sejam utilizadas para a deteção de alterações no número de cópias de sequências cromossómicas (aCGH, FISH, ensaios de *Southern Blot* ou de perda de heterozigotia (LOH)), muitas destas técnicas não são capazes de detetar deleções ou duplicações num único exão, apresentando-se como técnicas morosas, difíceis de implementar como ensaios *multiplex* (FISH, LOH) ou requererem grandes quantidades de DNA (*Southern Blot*) [65].

Em 2002, Schouten et al., demonstraram que a técnica de MLPA é suficientemente sensível, reproduzível e específica para detetar ganho ou perda de uma cópia de um único exão em amostras de DNA humano, recorrendo a pequenas quantidades de DNA (20 ng). O MLPA é um método semi-quantitativo que permite avaliar até 48 *loci* diferentes. Em comparação com o aCGH e com o FISH, é mais rápido, económico e requer menos tempo para preparar as amostras, obtendo-se os resultados em 24h, após extração de DNA. É uma técnica robusta e pouco laboriosa, possibilitando o processamento de um grande número de amostras em simultâneo. Devido às suas vantagens de utilização e reduzido custo, tem-se tornado muito popular na investigação como ferramenta de diagnóstico. As etapas envolvidas na reação de MLPA encontram-se descritas na figura 11 [65,72].

Os painéis de sondas comerciais para ensaios de MLPA estão disponíveis na empresa *MCR Holland*. Esta empresa oferece painéis para mais de 250 aplicações diferentes, que incluem deteção de mutações e de SNPs, análise de metilação do DNA, quantificação relativa de mRNA, caraterização cromossómica de linhas celulares e amostras de tecidos e deteção de duplicações e deleções de genes com predisposição para o cancro humano [73].

No entanto, a técnica de MLPA reúne algumas limitações: incapacidade de detetar alterações de ploidia e mosaicismo de baixo grau e maior sensibilidade a contaminações e inibidores de PCR, como fenóis. Da mesma forma, as mutações pontuais ou SNP que se encontram perto do local de ligação da sonda de MLPA podem afetar a eficiência da ligação da sonda, levando a uma aparente redução da altura relativa do pico e a falsos positivos [72,74].

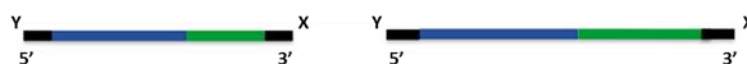
(I) e(II) Desnaturação e Hibridização - As seqüências proximal e distal de cada sonda hibridizam a seqüências-alvo de DNA adjacentes



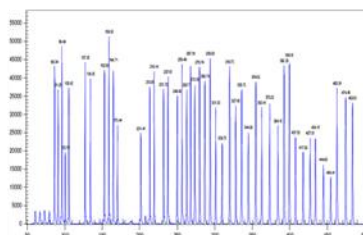
(III) Ligaçãõ - As duas seqüências são ligadas por uma ligase termoestável



(IV) PCR - Os produtos de ligaçãõ das sondas são amplificados por PCR por um único par de primers. O produto de amplificaçãõ de cada sonda possui um tamanho único (130-480 pb)



(V) Separaçãõ dos produtos por eletroforese capilar



(VI) Análise de resultados; Programa de análise estatística *Coffalyser* - compara a quantidade relativa dos produtos de amplificaçãõ da sonda do doente com uma amostra de DNA de referênciã, refletindo o número de cópiã alvo.



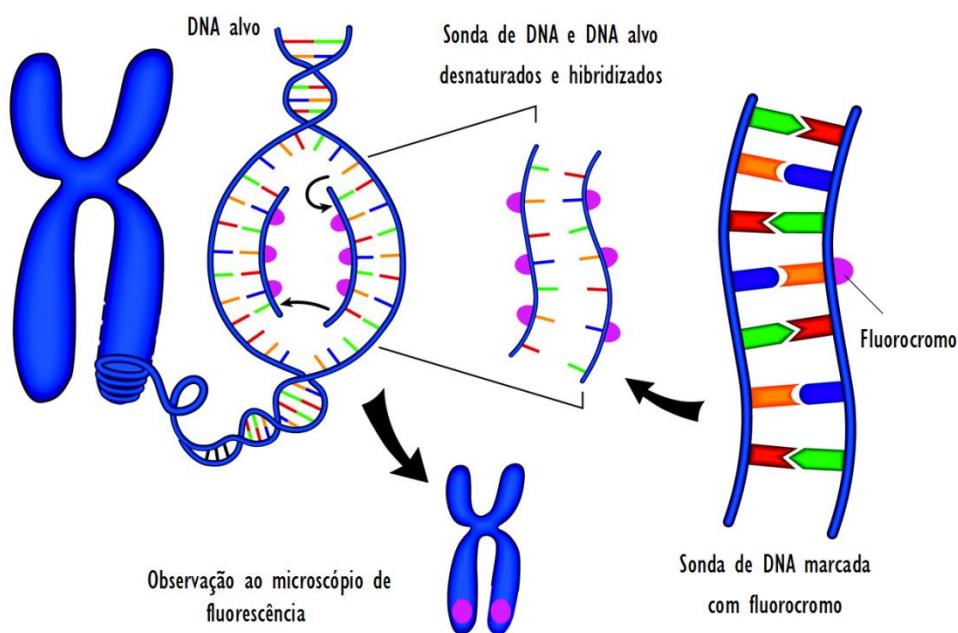
Figura 11 – Descrição geral das etapas envolvidas na reação de MLPA (adaptado de [65] e [73])

### 1.1.7.3. Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

A FISH é uma técnica de citogenética molecular utilizada para o estudo de anomalias cromossômicas, através da detecção de regiões específicas de um cromossoma em metafase, prometáfase ou interfase. As etapas envolvidas na FISH estão apresentadas na figura 12. Esta metodologia pode, por isso, ser aplicada em células que não estão em divisãõ e, portanto, não é necessãrio a cultura celular, pois utilizam-se os núcleos em interfase. É uma técnica muito direcionada e, por isso, é utilizada principalmente para confirmar a presença de alterações cromossômicas já suspeitas e não para realizar um *screening* de todo o genoma.

Nesta metodologia verificam-se nas células normais dois sinais fluorescentes para genes autossómicos, os quais correspondem aos dois alelos normais. Nas situações onde ocorre ganho de material genético verificam-se múltiplos sinais, e se houver deleção observa-se perda do sinal fluorescente.

Existem vários tipos de sondas que diferem segundo o seu tamanho, posição e objetivo. As sondas centroméricas são sequências repetitivas de DNA e identificam centrómeros. As sondas de sequência única marcam especificamente um gene ou uma região de um dado cromossoma e são particularmente úteis na identificação de alterações estruturais desequilibradas. As sondas subteloméricas são utilizadas na caraterização de alterações envolvendo regiões distais dos cromossomas. As sondas teloméricas são sequências de DNA repetitivas e permitem detetar a ausência de telómeros. As sondas de pintura cromossómica consistem numa mistura de várias sondas de DNA obtidas a partir de diferentes localizações de um determinado cromossoma, todas marcadas com o mesmo fluorocromo com o qual se obtém uma pintura cromossómica. São particularmente úteis na identificação de cromossomas marcadores ou alterações estruturais complexas [75,76].



**Figura 12 – Esquema representativo do princípio da técnica de FISH.** A FISH compreende a desnaturação da sonda de DNA marcada com fluorescência e do DNA alvo, a hibridização específica da sonda na sequência complementar do DNA alvo e a visualização ao microscópio dos sinais fluorescentes resultantes da hibridização.

## **2. OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

Este estudo teve como principal objetivo caraterizar o perfil genómico do CP por técnicas de citogenómica e biologia molecular. Uma das principais aplicações destas metodologias neste campo é a análise de perdas e ganhos de genes envolvidos na carcinogénese. Neste sentido, ao elucidar as bases genéticas envolvidas no CP e ao aferir a sensibilidade das técnicas em uso, pretendeu-se contribuir para a realização futura de diagnósticos mais precoces e, conseqüentemente, possibilitar a escolha de um tratamento mais adequado para cada doente de modo a colaborar para um prognóstico mais favorável. Uma vez que as alterações genéticas estão ainda pouco elucidadas no CP, pretende-se ainda com a realização deste estudo estabelecer uma adequada relação genótipo-fenótipo. Esta relação é importante para direcionar a comunidade científica e potenciar novos alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Assim, foi propósito deste estudo:

1. Caraterizar o perfil genómico do CP por aCGH e MLPA. Pretende-se estudar biópsias tumorais e não tumorais de adenocarcinomas e carcinomas epidermóides, tendo como finalidade averiguar se há diferenças entre o par tecidual tumoral e não tumoral de cada doente; quais as diferenças entre os subtipos histológicos abordados; quais as alterações caraterísticas dos dois subtipos histológicos, correlacionando com o grau de malignidade, severidade e prognóstico.
2. Estabelecer para cada subtipo histológico e para cada estadio TNM as diferentes alterações encontradas por aCGH e MLPA.
3. Validar, por MLPA, o painel *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer*, da MCR-Holland, para a deteção precoce deste carcinoma. Esta validação poderá possibilitar um aperfeiçoamento na seleção dos genes candidatos à progressão da doença auxiliando no diagnóstico.
4. Comparar os resultados obtidos por aCGH e MLPA.
5. Fazer expansão de células em cultura, obtidas em estudos prévios em doentes com CP, tendo como objetivo comparar o perfil genómico do tecido tumoral com o perfil genómico da cultura, por MLPA. Esta comparação servirá para validar estas culturas celulares como potenciais modelos para outros estudos.
6. Validar a título exploratório, por *Touch-FISH*, as técnicas de aCGH e MLPA. Uma vez que estas técnicas não detetam a presença de mosaicismo, pretendeu-se implementar uma estratégia direcionada em alguns casos representativos.



7. Correlacionar, de forma exploratória, o perfil genómico com dados sobre o perfil metabonómico deste tipo de carcinomas. Neste sentido, a correlação destes perfis poderá proporcionar novos *inputs* sobre o mecanismo de carcinogénese e, por conseguinte, a identificação e utilização destes perfis genómicos e metabonómicos como potenciais biomarcadores de diagnóstico no futuro.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. População em estudo

No total, foram incluídos neste estudo 44 biópsias do parênquima pulmonar, recolhidas, com o consentimento informado, de doentes com diagnóstico de CP, provenientes do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC). As biópsias correspondem a 22 tecidos não tumorais, contíguos ao tumor, e a 22 tecidos tumorais, relativos a 22 doentes. As amostras foram colhidas em espelho. Em todos os doentes, o tecido pulmonar parenquimal foi recuperado num prazo máximo de 30 minutos após a cirurgia e imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , tendo como objetivo a extração de DNA. Cada uma das amostras armazenadas tinha cerca de  $5\text{ mm}^3$ . As biópsias utilizadas para a extração de DNA foram analisadas previamente por  $^1\text{H-RMN}$  [77].

De todos os doentes foram recolhidos os seguintes dados: idade, sexo, hábitos tabágicos, estudo histopatológico, percentagem de células tumorais, estadió do tumor utilizando a classificação TNM e tratamento. Os dados considerados para cada doente estão representados na tabela 4.

#### 3.2. Extração, quantificação e análise da integridade de DNA

Para a execução das técnicas de aCGH e MLPA, foi extraído DNA a partir de biópsias de tecido tumoral e não tumoral do parênquima pulmonar. Foi utilizado o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche GmbH, Mannheim, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* de extração compreende uma fase inicial de digestão do tecido com tampão de lise e proteínase K, seguindo-se a extração dos ácidos nucleicos através de um sistema de colunas, com subseqüentes lavagens, sendo por último eluído o DNA em tampão de eluição, obtendo-se o DNA puro.

Após a extração todas as amostras foram quantificadas e determinado o grau de pureza utilizando um espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). O grau de pureza é avaliado através do quociente entre a absorvância a 260 nm e 280 nm e entre a absorvância a 260 nm e 230 nm. O DNA é considerado puro quando o quociente 260/280 é cerca de 1,8. Os valores para o quociente 260/230 devem estar compreendidos entre 1,8 e 2,2 para o DNA puro.

Tabela 4 – Caraterísticas clínicas dos doentes incluídos no estudo.

Doente	Sexo	Idade	Fumador	Estudo histopatológico	% células tumorais	Estadio	Tratamento
1	♂	49	Sim	Adenocarcinoma	90%	IB	CIR
2	♀	71	Sim	Adenocarcinoma	s.i.	IB	CIR
3	♀	57	Sim	Adenocarcinoma	s.i.	IB	CIR
4	♀	55	Sim	Adenocarcinoma	s.i.	IB	CIR
5	♂	73	Sim	Adenocarcinoma	40%	IB	CIR
6	♂	72	Sim	Adenocarcinoma	s.i.	IIA	CIR
7	♀	77	Sim	Adenocarcinoma	30%	IIB	CIR
8	♂	59	Sim	Adenocarcinoma	50%	IIB	CIR
9	♂	68	Sim	Adenocarcinoma	5%	IIIA	CIR
10	♂	60	Sim	Adenocarcinoma	30%	IIIA	CIR
11	♂	68	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IA	CIR
12	♂	72	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IA	CIR
13	♂	48	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IB	CIR
14	♂	64	Sim	Carcinoma Epidermoide	10%	IB	CIR
15	♂	58	Sim	Carcinoma Epidermoide	80%	IB	CIR
16	♂	63	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IB	CIR
17	♂	73	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IIA	CIR
18	♂	64	Sim	Carcinoma Epidermoide	50%	IIB	CIR
19	♂	69	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IIB	CIR
20	♂	64	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IIB	CIR
21	♂	63	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IIIA	CIR
22	♂	46	Sim	Carcinoma Epidermoide	s.i.	IIIA	CIR

s.i. – sem informação; CIR – Cirurgia

No que respeita à integridade das amostras, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com *GreenSafe* (Nzytech, Lisboa, Portugal). O marcador de peso molecular utilizado foi o *50 bp DNA Step Ladder* (Promega Corporation, Wisconsin, USA). A eletroforese foi realizada a 100V, durante 120 min, e a imagem do gel captada com

o *Bio-Rad ChemiDoc XRS*, utilizando o *Quantity One Software v4.2* (Bio-Rad Hercules, California, USA).

### 3.3. Análise por aCGH

A metodologia de aCGH foi realizada utilizando um *microarray* composto por 180 000 sondas de oligonucleótidos que abrange sequências codificantes e não codificantes de todo o genoma. Para este formato de *microarray* (figura 13), *Agilent Human Genome microarray 4x180K* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), é necessária uma quantidade de DNA genómico entre 0,5 a 1,5 µg para um volume final de 26 µL e, sempre que necessário perfez-se o volume com água *Nuclease-free* (Promega Corporation). Esta técnica foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pela *Agilent* ([www.genomics.agilent.com/](http://www.genomics.agilent.com/)).



Figura 13 - Exemplos de formatos *Agilent Human Genome microarray* (Agilent Technologies), correspondendo a lâmina de 180K ao formato utilizado neste estudo (adaptado de [78]).

Para o estudo de aCGH o DNA da amostra tumoral foi marcado com o fluorocromo *Cy5-dUTP*, vermelho, e a amostra não tumoral com *Cy3-dUTP*, verde (Agilent Technologies). De seguida foi realizada a purificação do DNA genómico marcado utilizando filtros individuais Amicon 30 KDa (Millipore, Massachusetts, USA) e TE (pH 8,0) (Promega Corporation), obtendo-se um volume final de 21 µL de DNA marcado após a purificação. O grau de marcação e a atividade específica foram determinados recorrendo a um espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific). A mistura de hibridização: *Cot-1 DNA* (1mg/mL) (Gibco Invitrogen, California, USA), *Agilent 10x Blocking Agent* e *Agilent 2x Hi-RPM Buffer* (Agilent Technologies), foi adicionada a cada tubo contendo o DNA do tecido tumoral e não tumoral, previamente marcados. A hibridização ocorreu a 65°C durante 24h, num forno de hibridização (Agilent Technologies). Após este tempo foram realizadas lavagens com *Agilent Oligo aCGH Wash Buffer 1* e 2 (Agilent Technologies), durante 1 min à temperatura ambiente, seguido de 5 min a 37°C, respetivamente. Posteriormente, a lâmina de oligoarray foi digitalizada no *Agilent Microarray Scanner System* (Agilent Technologies) e os

resultados processados com o *software Feature Extraction v10.7* (Agilent Technologies) e analisados no *Agilent Genomic Workbench v6.5*, com a configuração ADM2 como algoritmo de alteração.

### 3.4. Análise por MLPA

A tecnologia de MLPA foi realizada conforme descrito em 2002, por Schouten [65]. Tendo por base a aplicação de uma técnica sensível, fiável e com custos comportáveis no diagnóstico precoce, e eventualmente de rotina, do CP, foi utilizado um painel de sondas específico para esta neoplasia, *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer* (MCR-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Este painel contém 27 sondas para deteção do número de cópias dos genes *BCL2L11*, *PIK3CA*, *EGFR*, *MET*, *FGFR1*, *PTEN*, *KRAS* e *ERBB2*, com relevância clínica e/ou prognóstico no CP. Para além disso, o painel tem nove sondas específicas para as mutações pontuais *PIK3CA E545K*, *PIK3CA H1047R*, *EGFR T790M*, *EGFR L858R*, *EGFR L861Q*, *EGFR Del 2235-2249*, *BRAF V600E*, *KRAS G12C* e *ERBB2 2322\_2323ins12*. O painel possui ainda 13 sondas de referência que detetam localizações autossómicas supostamente não alteradas neste tumor. Na figura 14 estão representados todos os genes, por cromossoma, para o painel de sondas estudado.

Para cada reação de MLPA foram utilizados três controlos de referência, correspondentes aos tecidos não tumorais dos doentes 1, 9 e 19. Em cada reação foi ainda incluído um controlo positivo *sample DNA SD010* (MCR-Holland), para as sondas específicas de mutação, e um controlo negativo, água *Nuclease-free* (Promega Corporation), para excluir possíveis contaminações nas reações.

Para cada reação de MLPA foram utilizados 5 µL de DNA, com uma quantidade de cerca de 100 ng e sempre que necessário foram realizadas diluições em água *Nuclease-free*. O DNA foi inicialmente desnaturado num termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durante 10 min a 98°C. Após a adição de 1,5 µL de sonda e 1,5 µL do tampão (1,5 mmol/L KCl, 300 mmol/L Tris-HCl, pH 8,5, 1 mmol/L EDTA), a amostra foi desnaturada durante 1 min a 95°C e as sondas permaneceram a hibridizar durante 15h a 60°C. A reação de ligação ocorreu durante 15 min a 54°C após a adição de 32 µL da *master mix* da ligase. A ligase foi, posteriormente, inativada através do calor, durante 5 min a 98°C. A reação de PCR foi realizada num volume de 50 µL contendo 10 µL do produto de ligação, 30 µL da mistura do tampão de PCR (4 µL do tampão de PCR e 26 µL de água *Nuclease-free*) e 10 µL da *master mix* da polimerase (2 µL *SALSA PCR primers*, 2 µL do tampão de diluição da enzima, 5,5 µL de água *Nuclease-free* e 0,5 µL da polimerase). A reação de PCR foi realizada durante

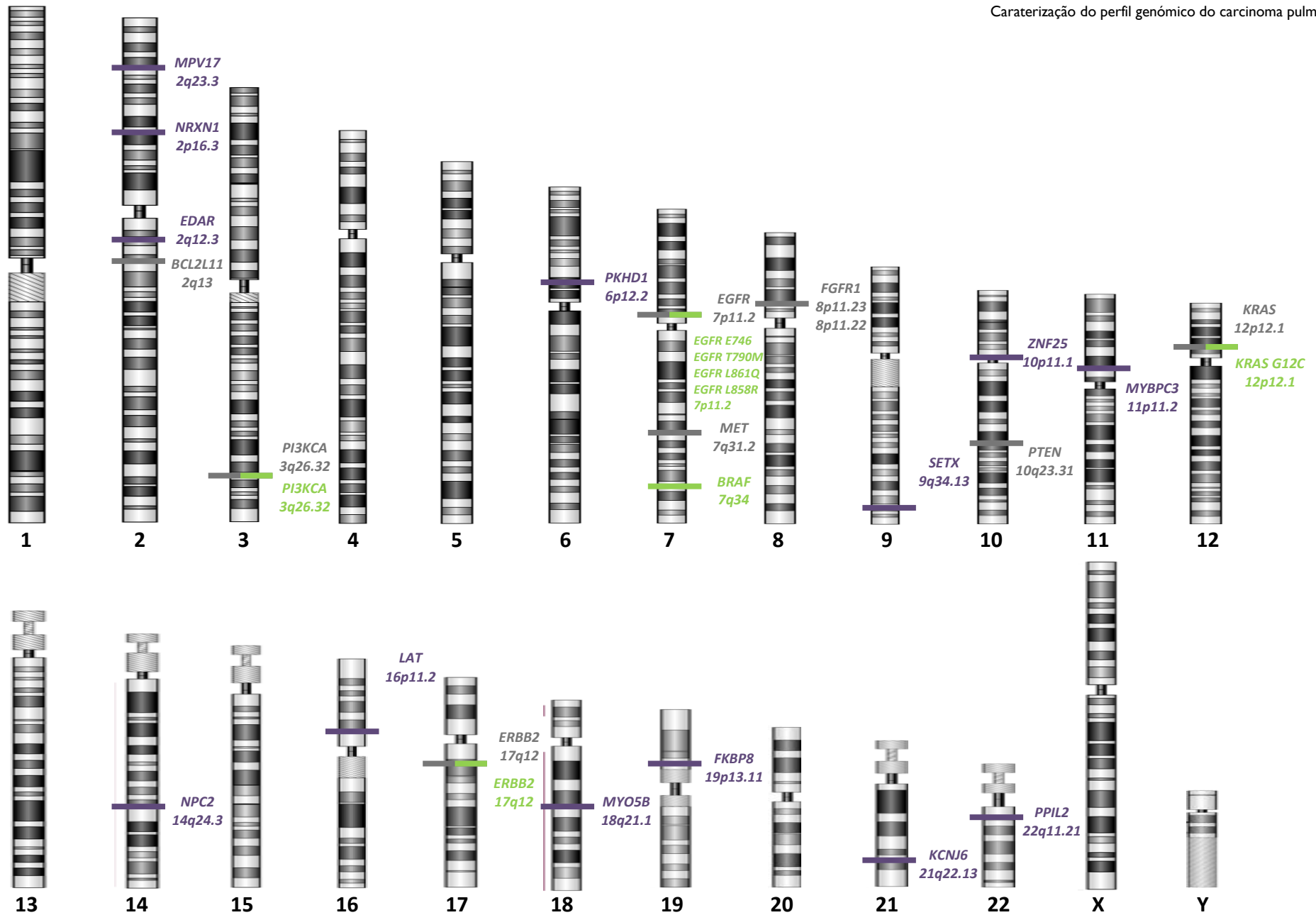


Figura 14 – Representação esquemática das posições cromossómicas das sondas para deteção do número de cópias (a cinza), de mutação (a verde) e de referência (a roxo), utilizando o painel SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung Cancer.



35 ciclos: 30 s de desnaturação a 95°C, 30 s de emparelhamento a 60°C e 1 min de extensão a 72°C, com uma extensão final de 20 min a 72°C. Para a interpretação dos resultados, 1 µL do produto de PCR juntamente com 0,3 µL de Genescan™ 500 Rox™ size standard (Applied Biosystem) e 9,1 µL de formamida desionizada (Applied Biosystem), depois de desnaturados durante 2 min a 80°C, foram separados electroforeticamente num sequenciador ABI PRISM™ 3130 (Applied Biosystems) e analisados através do software *GeneMapper v4.1* (Applied Biosystems), que permite a identificação e análise visual dos picos referentes a cada amplificado. O cálculo dos resultados foi feito recorrendo ao software *Coffalyser.net* (MCR-Holland), que compara a quantidade relativa dos produtos de amplificação da sonda do doente com uma amostra de DNA de referência, refletindo o número de cópias alvo. Neste estudo, sempre que o valor para o número de cópias for inferior a 0,8 é interpretado como perda e valores superiores a 1,2 são interpretados como ganho.

### **3.5. Expansão de células em cultura**

Células primárias em cultura de tecidos tumorais e não tumorais do parênquima pulmonar, obtidas em estudo prévio, em solução de criopreservação de *Fetal Bovine Serum*, FBS (Gibco, USA), contendo 10% de *Dimethyl Sulphoxide*, DMSO (Sigma, USA), em azoto líquido, foram descongeladas e transferidas para tubos de centrifuga contendo uma solução de *Hanks' Balanced Salt Solutions*, HBSS (Gibco). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* e *F-12 Nutrient Mixture (Ham)*, DMEM-F12 (Gibco), com 1% Penicilina e Estreptomicina (Gibco), 1% L-Glutamina (Gibco) e 5% FBS.

As caixas de cultura (25 cm<sup>3</sup>) foram mantidas numa incubadora (Binder CBI50, USA) à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a total confluência das células verificada ao microscópio invertido (*Nikon Eclipse TS100*, USA), foram realizadas subculturas, de modo a garantir a manutenção da expansão de células em cultura. Foram usadas as soluções HBSS e tripsina (0,05% EDTA, Gibco) de forma a permitir a desagregação das células das caixas de cultura. Avaliado o crescimento e confirmada uma nova confluência total das células em cultura foram selecionadas as células para desbaste para *eppendorf* microcentrifuga, 2ml. Foi adicionado *Phosphate Buffered Saline*, PBS (Gibco) às caixas de cultura e com um raspador foi retirado o conteúdo celular para *eppendorfs*, para extração de DNA. As restantes células foram congeladas em azoto líquido, permitindo assim a manutenção destas culturas para eventuais estudos futuros.

Todos os procedimentos descritos foram elaborados com assepsia em câmara de fluxo laminar (Steril Manufacturing Division, Italy).

### 3.6. Análise por *Touch FISH*

A técnica de *Touch FISH* foi efetuada em núcleos em interfase obtidos a partir de biópsias tumorais de doentes com CP. Esta metodologia foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dória et al., em 2009, e Romeo et al., em 2003 [79,80]. Contudo, foram introduzidas pequenas modificações ao procedimento inicialmente descrito.

De uma forma geral esta técnica engloba três etapas principais: pré-hibridização, hibridização e pós-hibridização. Resumidamente, o tecido tumoral (2-3 mm<sup>3</sup>) foi friccionado várias vezes em lâminas silanizadas (VWR International, Leuven, Belgium). As lâminas foram submetidas a um tratamento de pré-hibridização numa solução de metanol frio, sendo depois fixadas em metanol : ácido acético (3:1; v/v), 20 min cada. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, a 37°C, numa solução 2x *standard saline citrate* (SSC), pH 7,4, durante 10 min, e, posteriormente sujeitas a uma solução de formaldeído (39 mL PBS 1x, 1 mL formaldeído 37%, 0,18 g MgCl<sub>2</sub>), durante 10 min. Após lavagem em PBS, as lâminas foram submetidas a uma solução de pepsina (49 mL água MiliQ, 500 µL HCl 1N, 0,075 g pepsina em 500 µL de água MiliQ) a 37°C, durante 5 min. Depois de lavadas em PBS, as lâminas foram secas ao ar. Subsequentemente, foram desidratadas numa série de soluções de etanol de concentração crescente (70%, 96% e 100%), 1 min cada. Depois da aplicação de 2 µL das sondas selecionadas as lâminas foram submetidas a um processo de co-desnaturação durante 5 min a 75°C e, a hibridização realizou-se numa câmara húmida a 37°C, durante a noite. As lavagens de pós-hibridização realizaram-se em soluções de 0,5x SSC, a 70°C durante 1,5 min, e de 2x SSC com *Tween*, durante 1 min. Estas lavagens permitiram remover a solução de hibridização remanescente na preparação e a sonda não ligada, possibilitando assim, o controlo da restringência, o que se traduz na remoção das ligações inespecíficas entre a sonda e o DNA alvo. As lâminas foram de seguida prontas em meio de montagem *Vectashield* com 1,5 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories Inc, Burlingame, California, USA).

Os sinais fluorescentes foram contados em 100 interfases utilizando um microscópio fluorescente equipado com os filtros apropriados para os diferentes fluorocromos (Nikon Eclipse E400, Melville, New York, USA) e acoplado ao sistema *Cytovision* (Applied Imaging International Lda, Welzlar, Germany). Foram ainda capturadas imagens representativas dos resultados obtidos. Os núcleos interfásicos foram escolhidos aleatoriamente, contudo,

apenas foram contabilizados os núcleos não sobrepostos e com a membrana nuclear intacta. Apenas sinais fluorescentes com intensidade similar foram contabilizados.

Foi utilizado o *LAVysion* (Abbott Molecular Inc, Illinois, USA), que corresponde a um conjunto multicolor de sondas, desenvolvido para a deteção do CP [81]. O *LAVysion* contém sondas específicas para o locus 5p15 (*D5S23/D5S271*), 7p12 (*EGFR*), 8q24 (*MYC*), e uma sonda centromérica para o cromossoma 6 (*CEP 6*).

### **3.7. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa informático *Statistical Package for Social Sciences v20.0* (Chicago, Illinois, USA). Para caracterizar a amostra recorreu-se à utilização de medidas descritivas de dispersão e tendência central (média e desvio padrão, variáveis quantitativas) e frequências absolutas e relativas (variáveis nominais). Para identificar os genes capazes de diferenciar ADC e CPCE, através da técnica de MLPA, foram utilizados os testes exatos de *Fisher* e qui-quadrado com recurso a simulação de *Montecarlo*, usando 10000 amostras. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com *p de value* inferior a 0,050.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Caraterização da amostra em estudo**

Neste estudo foram analisadas biópsias de 22 doentes com diagnóstico de CP. De cada um dos doentes foi analisada uma biópsia de tecido tumoral e outra de tecido aparentemente não tumoral, contígua ao tumor. Da população em estudo, 81,8% (18/22) são indivíduos do sexo masculino e 18,2% (4/22) são indivíduos do sexo feminino. A média de idades e o desvio padrão dos doentes analisados é de  $63 \pm 9$  anos, respetivamente, com faixa etária de 48-77 anos. Em todos os doentes, o parênquima circundante tinha características histológicas de "pulmão fumador".

O diagnóstico definitivo e o estadiamento TNM foram previamente estabelecidos pelo estudo histopatológico: 45% (10/22) dos tumores epiteliais malignos foram classificados em adenocarcinomas e 55% (12/22) em carcinomas epidermóides, de acordo com a classificação da OMS de 2004 [15]. Dos 10 adenocarcinomas pulmonares foram avaliados cinco doentes com estadio IB, um doente com estadio IIA, dois doentes com estadio IIB e dois doentes com estadio IIIA. Relativamente aos tumores epidermóides do pulmão foram estudados dois doentes com estadio IA, quatro doentes com estadio IB, um doente com estadio IIA, três doentes com estadio IIB e dois doentes com estadio IIIA. No total, 50% (11/22) dos doentes caraterizados têm estadio I, 32% (7/22) têm estadio II e 18% (4/12) estadio III.

Foi fornecida a informação sobre a percentagem de células neoplásicas em cada biópsia. Esta percentagem foi estabelecida em 41% (9/22) dos doentes. Em 59% (13/22) dos doentes não havia qualquer informação relativa a esta percentagem. Contudo, da informação disponibilizada, em apenas 18% (4/22) foi conseguida uma percentagem de células tumorais igual ou superior a 50% (tabela 4).

### **4.2. Extração, quantificação e avaliação da integridade do DNA das amostras**

A extração de DNA é um passo fundamental, uma vez que fornece o material para todos os estudos a realizar posteriormente. A avaliação de cada amostra relativamente à sua concentração e grau de pureza é essencial para a performance das reações posteriores. A concentração e a pureza de DNA foram determinadas por densidade ótica em espectrofotómetro. Na tabela 5 estão representados os valores referentes à concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) e às absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm para o método de extração adotado, *High Pure PCR Template Preparation Kit*.

**Tabela 5 – Valores referentes à quantidade e qualidade de DNA extraído a partir de tecidos tumorais e não tumorais de doentes com diagnóstico de CP, utilizando o High Pure PCR Template Preparation Kit.**

Doente	Tecido	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	Doente	Tecido	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm
1	N	196,6	1,88	2,37	12	N	45,3	1,76	2,16
	T	130	1,86	2,28		T	105,1	1,85	2,13
	C	40,7	1,96	1,76					
2	N	78,9	1,81	2,2	13	N	147	1,86	2,22
	T	534,7	1,85	2,36		T	145,8	1,82	2,31
3	N	119,6	1,84	2,32	14	N	210,9	1,9	2,38
	T	99,5	1,89	2,36		T	175,9	1,89	2,35
4	N	166,6	1,88	2,33	15	N	166,5	1,86	2,01
	T	141,7	1,88	2,3		T	355	1,88	2,37
	C	75	1,94	2,02		C	91,7	1,93	1,89
5	N	90,2	1,84	2,16	16	N	283,8	1,85	2,37
	T	405,3	1,87	2,36		T	383,1	1,86	2,35
6	N	199,5	1,84	2,29	17	N	208,4	1,86	2,41
	T	156	1,85	2,33		T	376,8	1,84	2,38
7	N	264,6	1,87	2,36	18	N	119,7	1,9	2,34
	T	200,7	1,85	2,28		T	203,9	1,88	2,28
	C	47,7	1,81	1,16					
8	N	84,8	1,82	2,2	19	N	260,6	1,86	2,37
	T	105,7	1,84	2,08		T	248,7	1,87	2,31
9	N	233,3	1,88	2,34	20	N	75,5	1,86	2,17
	T	184,8	1,84	2,28		T	776,1	1,86	2,35
	C	116,9	1,91	2,11					
10	N	136,9	1,89	2,34	21	N	81,4	1,82	2,32
	T	248,3	1,89	2,36		T	218,7	1,85	2,29
11	N	103,7	1,81	2,17	22	N	187,3	1,85	2,2
	T	237,3	1,84	2,3		T	263,6	1,86	2,37

**N** – Não Tumoral; **T** – Tumoral; **C** – Tumoral, Cultura

É notória uma diferença nos valores de concentração de DNA de tecidos tumorais e não tumorais extraídos relativamente a tecidos previamente estabelecidos em cultura celular. A concentração de DNA é mais baixa nestes últimos casos, excetuando o tecido não tumoral do doente 4 que apresenta uma concentração relativamente baixa, comparativamente aos outros tecidos. Relativamente à qualidade de DNA, podemos inferir que, de uma forma geral, os valores obtidos para os rácios 260/280 nm e 260/230 nm estão dentro dos limites aceitáveis para o DNA puro. O DNA genómico de boa qualidade deve estar livre de contaminantes como hidratos de carbono, proteínas, solventes orgânicos e, também deve estar intato, com o mínimo de degradação. Os valores inferiores a 1,8-2,2 para o rácio 260/230 nm, verificados nos tecidos tumorais em cultura dos doentes 1 e 7, poderão indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230 nm, nomeadamente álcool, guanidina, isotiocianato, e outros componentes celulares como hidratos de carbono.

Ainda assim, no geral, os valores para a concentração de DNA, bem como para o grau de pureza são aceitáveis, permitindo, deste modo, prosseguir com este material para estudos moleculares de aCGH e MLPA.

A fim de avaliar a integridade de DNA e verificar a presença de fragmentação do mesmo foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v). Esta avaliação não foi feita para todas as amostras. Como casos representativos, e uma vez que todas as amostras foram preparadas nas mesmas condições, foram analisadas as amostras relativas aos doentes 1, 4, 7, 9 e 15, uma vez que dos 22 casos em estudo, apenas estes cinco doentes apresentam células em cultura. Para além dos referidos, foram ainda incluídos nesta avaliação os doentes 12, 18 e 22. Pela análise da figura 15 é possível verificar a presença de DNA íntegro, não fragmentado, uma vez que não existe um arrastamento de DNA, indicativo da sua degradação.

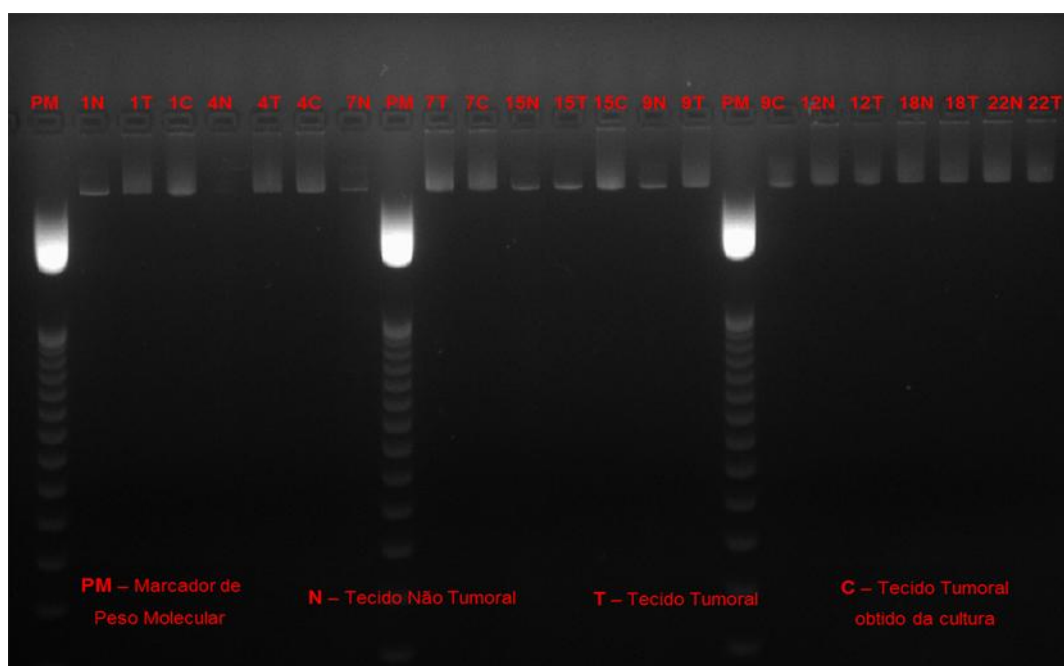
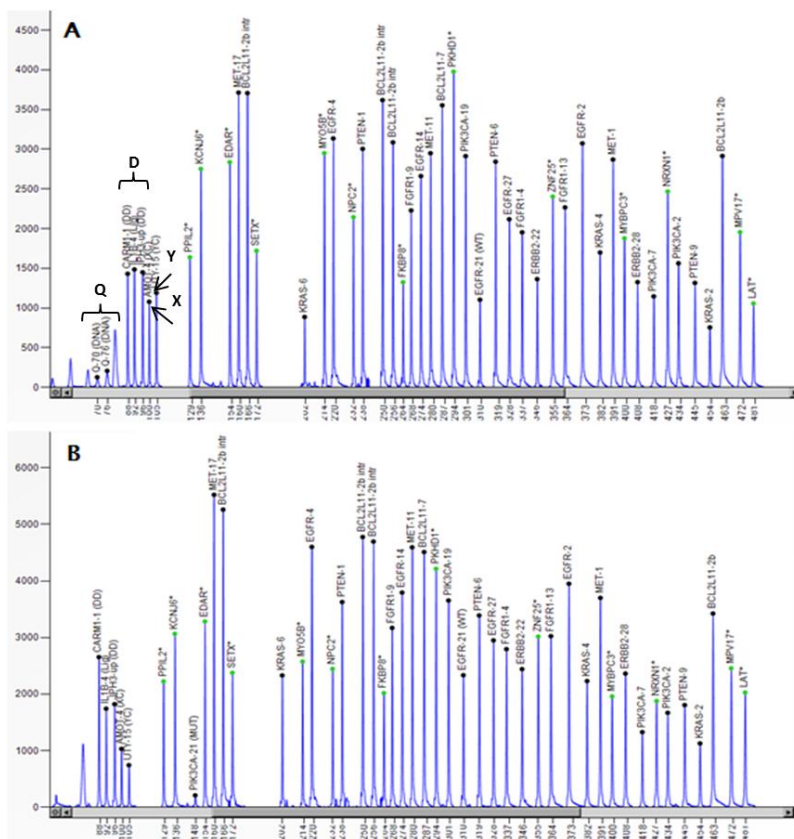


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v) para os tecidos tumorais (T) e não tumorais (N) dos doentes 1, 4, 7, 9, 15, 18 e 22, bem como para os tecidos obtidos da cultura (C) dos doentes 1, 4, 7, 9 e 15, todos extraídos pelo método *High Pure PCR Template Preparation Kit*.

A quantidade e qualidade de DNA são também verificadas na técnica de MLPA. O produto de MLPA origina para cada amostra um eletroferograma (figura 16). Na análise do mesmo é possível verificar determinados parâmetros que funcionam como controlo da experiência. A quantidade de DNA da amostra é conferida nos quatro primeiros picos (fragmentos com 64, 70, 76 e 82 nucleótidos – fragmentos Q) do eletroferograma, observando-se picos de tamanho reduzido ou até invisíveis quando a presença de DNA é suficiente para análise. A desnaturação é observada nos três picos seguintes relativos a



fragmentos de DNA com 88, 92 e 96 nucleótidos (fragmentos D), ricos em ilhas CpG e deste modo de difícil desnaturação. O painel de sondas possui também fragmentos de DNA que hibridizam com regiões do cromossoma X e do cromossoma Y.



**Figura 16 – (A) Eletroferograma correspondente ao tecido não tumoral do doente 19 e (B) eletroferograma correspondente ao tecido tumoral do doente 20, através da aplicação da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer, recorrendo ao software GeneMapper. Cada pico do eletroferograma corresponde a uma sonda do painel.**

Assim, para os dois tecidos, não tumoral e tumoral, representativos, verificamos que existe amplificação de todas as sondas, sem, se detetar falta de DNA, ou vestígios de degradação.

### 4.3. Resultados obtidos por aCGH

Para o estudo de aCGH o DNA das 22 amostras tumorais foi co-hibridizado com o DNA das respetivas amostras não tumorais. Assim, a análise de elevada resolução de aCGH utilizando *microarrays* de oligonucleótidos contendo 180 000 sondas de DNA, permitiu observar vários níveis de ganho e perda de material genético, traduzidos em diferentes logaritmos consoante o nível de amplificação e de deleção. Deste modo o aumento ou diminuição do número de cópias estimado para as diferentes regiões alteradas é muito variável.

No total, foram encontradas 2343 alterações nos 22 casos analisados, sendo que 70% (1651/2343) correspondem a ganho e 30% (692/2343) a perda de material genético.

Para os dois subtipos histológicos, ADC e CPCE, serão referidas as alterações encontradas nos diferentes estadios TNM analisados.

### 4.3.1. aCGH em Adenocarcinomas

Nas 10 amostras de doentes classificados como adenocarcinomas foram identificadas 502 alterações, através da técnica de aCGH, sendo que 54% (272/502) correspondem a ganho e 46% (230/502) a perda de informação génica.

#### Estadio I

Os doentes 1, 2, 3, 4 e 5, foram histologicamente classificados em ADC, estadio IB (T2N0M0). Este estadio é comum em tumores com mais de 3 cm de diâmetro (T2) e ausência de envolvimento ganglionar regional (N0) e de metástases à distância (M0), de acordo com o sistema de estadiamento internacional para o CP [22-23] (tabela 2).

No presente estudo, este estadio acarreta o maior número de alterações em ADC: 473 alterações no total, a que correspondem 52% (244/473) de ganho e 48% (229/473) de perda de material genético (ver figura 17).

Relativamente à amostra do doente 1 foram descobertas 463 alterações (235 ganhos e 228 perdas). Este caso apresentou alterações em todos os cromossomas. Verificam-se perdas de material genético em todos os cromossomas excepto no 22. São ainda encontradas perdas de porções cromossómicas no braço curto dos cromossomas 1, 17 e 19, bem como perdas de material genético no braço longo dos cromossomas 4, 5, 7, 10, 13, 14, 15 e Y. Os cromossomas 2, 3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 18, 20, 21 e X apresentam perda de segmentos cromossómicos nos braços longo e curto. No que diz respeito a ganho de material genético, os cromossomas 9, 14, 15 e 22 exibem amplificação dos braços longos. Os cromossomas 13, 18, 21, X e Y não indicam ganho genético e, nos restantes cromossomas, verifica-se ganho em ambos os braços, longo e curto. Os resultados obtidos mostram uma provável e elevada taxa de mosaicismo, traduzida na instabilidade genética observada na figura 17. Ainda assim, as maiores alterações detetadas em termos de tamanho são encontradas em 4q, 6q, 13q, Xp e Xq, relativamente à perda de material genético, e ganho em 17q, 19q e 22q.

A amostra do doente 2 não apresenta nenhuma variação no número de cópias em nenhum cromossoma.

Caraterização do perfil genómico do carcinoma pulmonar

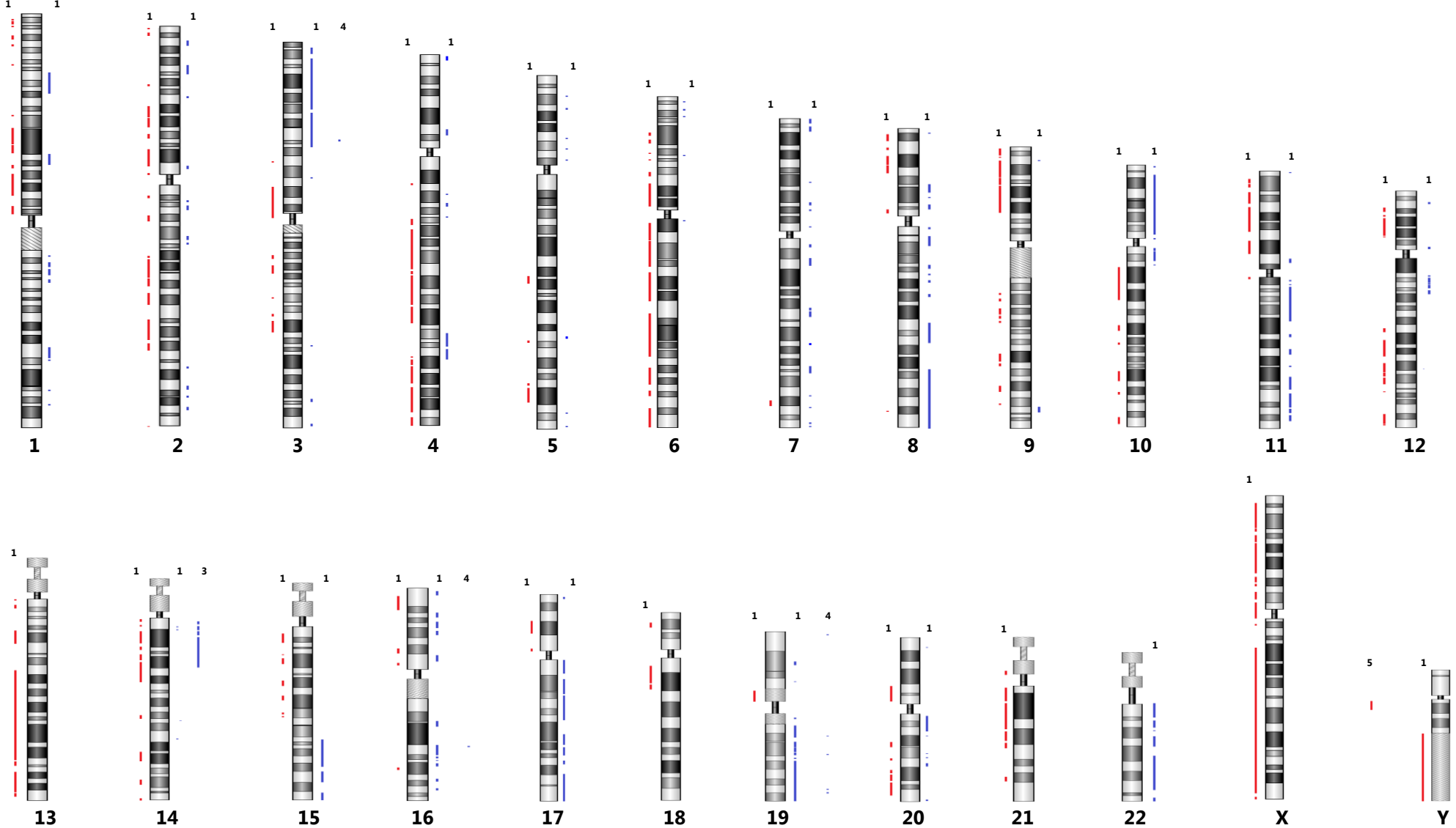


Figura 17 – Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 1, 2, 3, 4 e 5, diagnosticados com CP, histologia ADC, estadio IB. A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.

No que se refere à amostra do doente 3, verificam-se apenas duas alterações no cromossoma 14. Este cromossoma exhibe ganho no braço longo 14q11.2-q21.2 (25,5 Mb) e ganho aparentemente em mosaico para 14q22.1 (443 Kb).

Em relação à amostra do doente 4, o cromossoma 3 apresenta ganho aparentemente em mosaico no braço curto, 3p21.31-p21.2 (495 Kb). O cromossoma 16 demonstra ganho para 16q22.1 (113 Kb). No cromossoma 19 verifica-se ganho com um número variável de cópias no braço curto, 19q22.1 (279 Kb), e também ganho no braço longo para 19q13.12, 19q13.2 e 19q13.42 (58 Kb, 98 Kb e 336 Kb, respectivamente).

A amostra do doente 5 apresenta uma única alteração para Yq11.21-q11.221 (4 Mb), traduzido em perda de material genético.

## Estadio II

O doente 6 foi histologicamente classificado em ADC, estadio IIA (T1N1M0), e os doentes 7 e 8 em ADC, estadio IIB (T3N0M0), pela classificação adoptada [22-23]. A diferença entre estes dois estadios deve-se ao facto de existirem diferenças no tamanho do tumor, e no primeiro haver metástases nos gânglios (tabela 2).

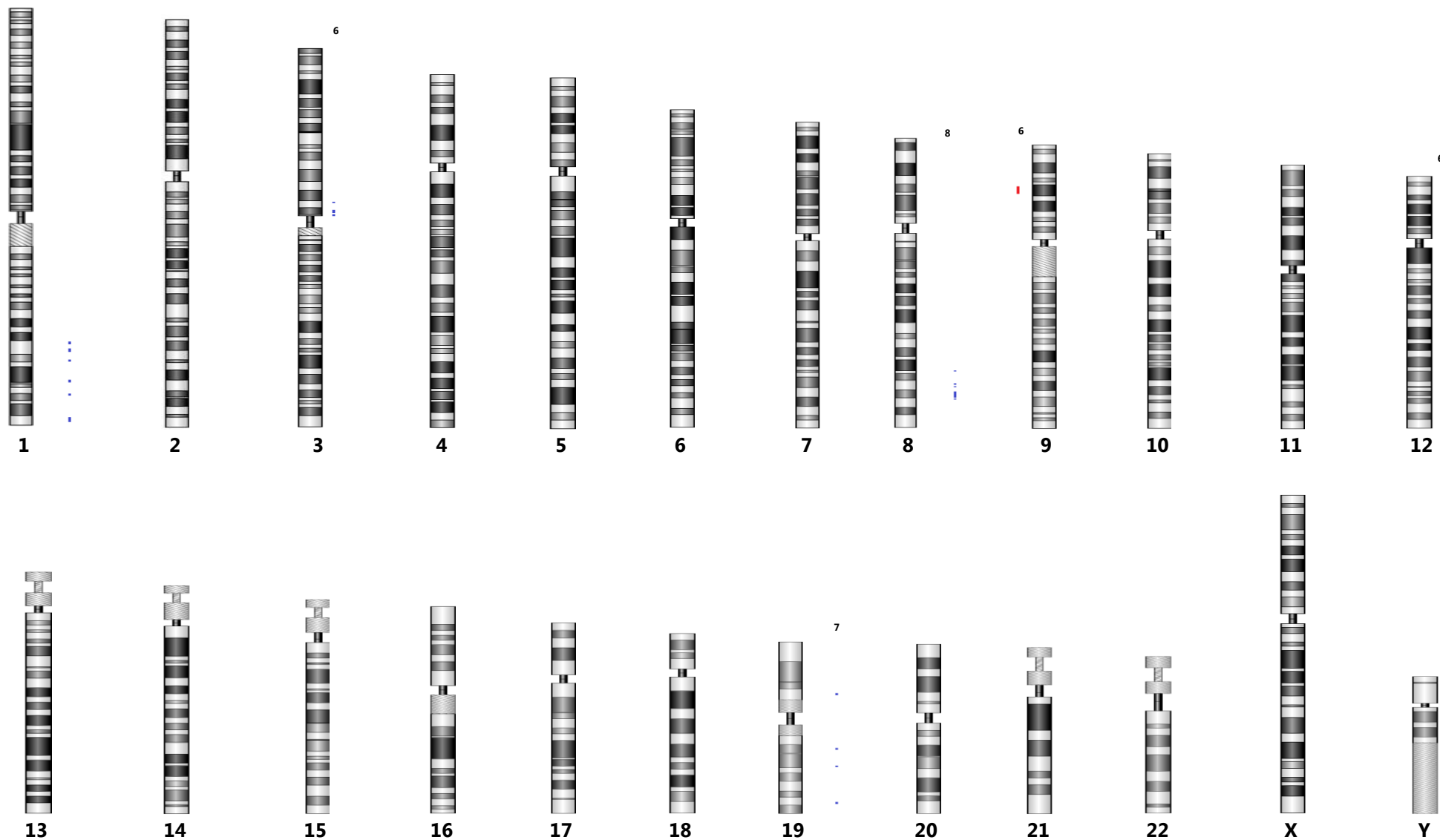
Neste estadio foram detectadas 27 alterações, das quais 96% (26/27) correspondem a ganho e 4% (1/27) a perda de material genético (ver figura 18). Foram encontradas variações no número de cópias apenas nos cromossomas 1, 3, 8, 12 e 19, traduzidos em ganho e perda no cromossoma 9.

A amostra do doente 6 apresenta, para o braço curto do cromossoma 3, um elevado aumento do número de cópias na região cromossómica 3p12.2-p11.1 (11 Mb). O cromossoma 9 demonstra deleção em mosaico para 9p22.3-p22.2 (1,2 Mb). No cromossoma 12 verifica-se ganho em mosaico para 12q15-q21.1 (7 Mb).

No que se refere à amostra do doente 7, foram detectadas quatro alterações no braço longo do cromossoma 19. Este cromossoma exhibe assim ganho em mosaico para 19p13.11 (204 Kb), 19q13.12 (77 Kb), 19q13.2 (44 Kb) e 19q13.42 (87 Kb).

Em relação à amostra do doente 8, verifica-se para o cromossoma 1, ganho em mosaico de porções cromossómicas do braço longo. Estas seis alterações na região 1q32.1-q44 têm tamanhos semelhantes, exceptuando os segmentos 1q32.1 e 1q44 com alterações de tamanho 1,7 Mb e 2,9 Mb, respectivamente. O cromossoma 8 demonstra ganho de material genético, evidenciado pelas sete alterações encontradas. Estas alterações correspondem a situações de mosaicismo com alterações de tamanho relativamente reduzido ( $\approx$  40 Kb). Apenas o segmento 8q24.21 apresenta uma alteração de 3,2 Mb.

Caraterização do perfil genómico do carcinoma pulmonar



**Figura 18 – Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 6, 7 e 8, diagnosticados com CP, histologia ADC, estadio IIA e IIB. A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.**

### **Estadio III**

As amostras dos doentes 9 e 10 foram histologicamente classificadas em ADC, estadio IIIA (T3N1M0) (tabela 2). Sendo este um estadio mais avançado seria de esperar um maior número de alterações. Contudo, foram apenas encontradas duas alterações de tamanho 1,8 Mb e 190 Kb, correspondentes a ganho genético (ver figura 19). Estas alterações foram detectadas na amostra do doente 10, em 7p11.2, sendo estas alterações correspondentes a um elevado aumento do número de cópias.

A amostra do doente 9 não apresenta nenhuma variação no número de cópias em nenhum cromossoma.

### **4.3.2. aCGH em Carcinomas Epidermóides**

Nas 12 amostras de doentes classificados como carcinomas epidermóides foram detetadas 1841 alterações, através da técnica de aCGH, sendo que 75% (1379/1841) correspondem a ganho e 25% (462/1841) a perda de material genético.

#### **Estadio I**

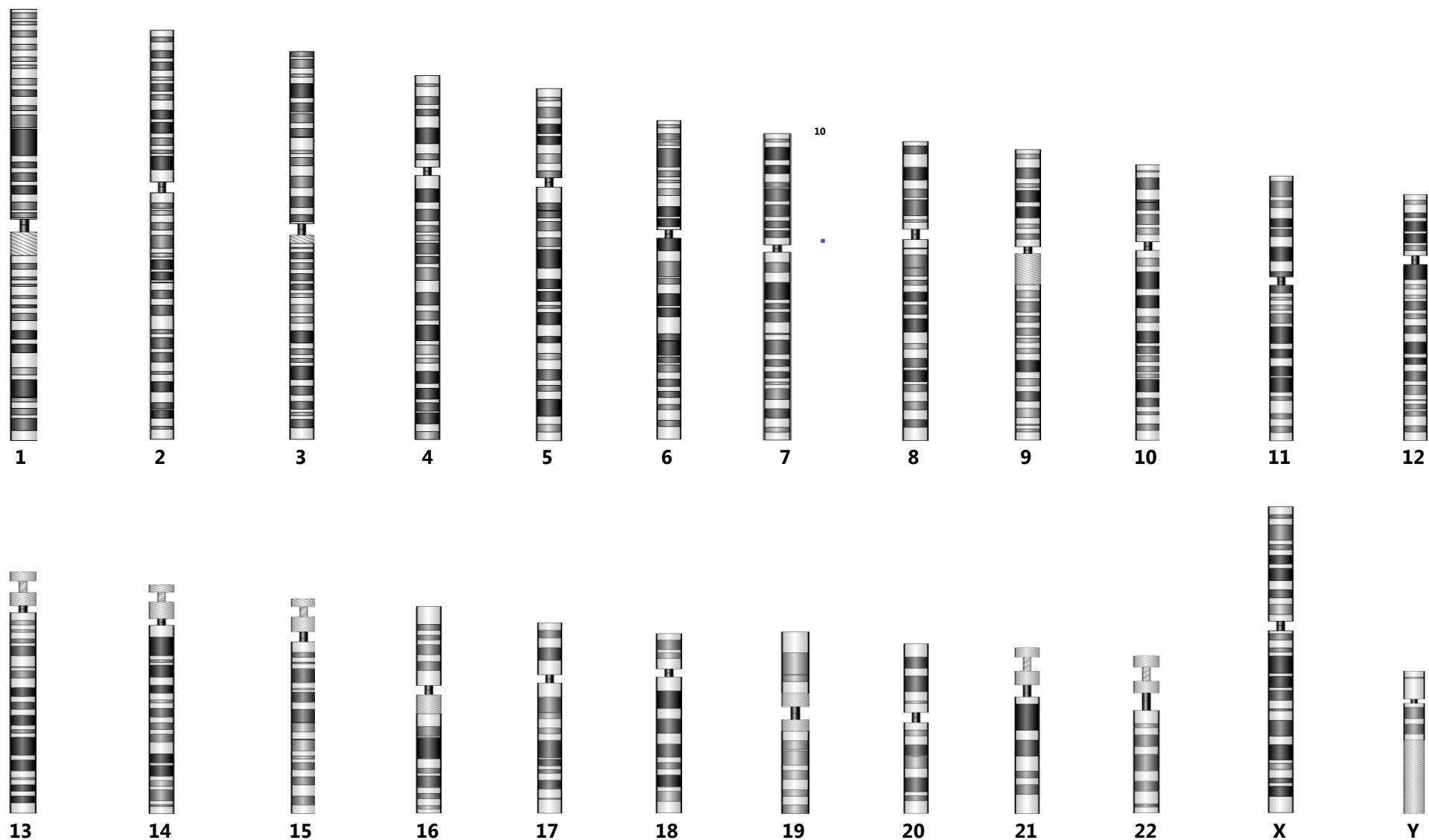
As amostras dos doentes 11 e 12 foram macroscopicamente classificadas em CPCE, estadio IA (T1N0M0), e as biópsias dos doentes 13, 14, 15 e 16 em CPCE, estadio IB (T2N0M0), pela classificação adoptada [22-23]. A diferença entre estes dois estadios deve-se ao facto de existirem diferenças no tamanho do tumor, de acordo com o sistema de estadiamento internacional para o CP [22-23] (tabela 2).

Neste estadio I foram identificadas 584 alterações havendo, à excepção de todos os outros estadios estudados, predomínio de perda de informação génica, 59% (344/584), relativamente a ganho de segmentos cromossómicos, 41% (240/584) (ver figura 20).

Apenas a amostra do doente 12 não apresenta nenhuma variação no número de cópias em nenhum cromossoma. Os resultados apresentados a seguir correspondem às alterações mais relevantes e significativas nas restantes cinco amostras, dos cinco doentes, para este estadio.

A amostra do doente 11 demonstra ganho para as regiões 3q, 5p, 11p, 11q, 14q, 19p, 19q, 22q e Xp. Os braços curto e longo do cromossoma Y são as únicas regiões que revelam perda de material para este doente.

Caraterização do perfil genómico do carcinoma pulmonar



**Figura 19 – Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 9 e 10, diagnosticados com CP, histologia ADC, estadio IIIA. A azul está identificado ganho de material genético. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.**

Relativamente à amostra do doente 13, verifica-se ganho em todo o braço ou em praticamente todo o braço do cromossoma em 1q, 2p, 2q, 3q, 4q, 5p, 6q, 7p, 7q, 8q, 9q, 11p, 11q, 12p, 12q, 13q, 14q, 15q, 16q, 17q, 18p, 20q, 22q e Xq. Em termos de perda as alterações mais significativas foram encontradas em Yp e Yq. Ainda assim, foram encontradas perdas, para este doente, nos cromossomas 1, 4, 10, 14, 19, 21 e X.

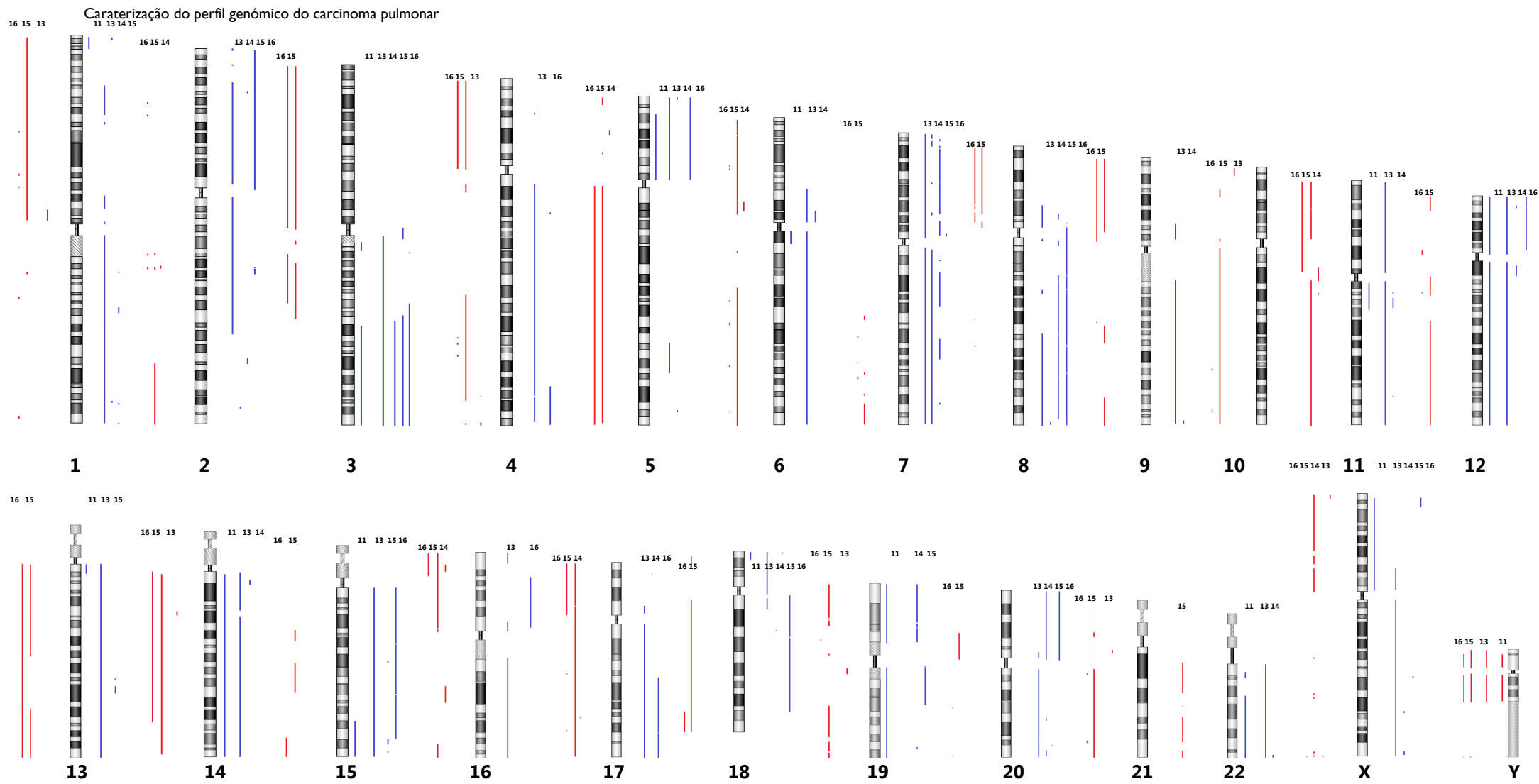
Em relação à amostra do doente 14, as regiões 3q, 7q, 19p e 20p exibem ganho de material genético. No entanto, em termos de perda, embora não existam alterações de tamanho comparável com outras alterações detectadas neste estadio, os cromossomas 5, 6, 11, 16, 17 e X apresentam perda de porções cromossómicas neste doente.

No que diz respeito à amostra do doente 15, os segmentos 2p, 3q, 8q e 19q encontram-se em ganho. Constata-se ainda que todos os cromossomas exibem perda para este doente. Ainda assim as alterações mais relevantes estão localizadas em 1p, 2q, 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 9p, 10q, 11p, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16q, 17q, 18q, 19p, 19q, 21q, 22q, Xp, Yp e Yq.

No que refere à amostra do doente 16, verifica-se ganho em 2q, 3q, 5p, 8q, 12p, 15q, 16p, 17q, 18q, 20p. As regiões dos cromossomas localizadas em 3p, 3q, 4p, 5q, 8p, 9p, 11p, 13q, 14q, 17p, Yp e Yq exibem perda.

Neste estadio, como verificado na figura 20, existem alterações significativas comuns para os cromossomas 3, 5, 7, 8, 12, 15 e Y. Os tecidos tumorais dos doentes 11, 13, 14, 15 e 16 apresentam ganho em 3q, sendo estas alterações correspondentes a um elevado número de cópias. Estas alterações têm tamanhos compreendidos entre 54 a 104 Mb. Também os cromossomas 5p e 12p se encontram em ganho em mosaico nas amostras dos doentes 11, 13, 14 e 16. Apenas a biópsia do doente 14 demonstra alterações de tamanho mais reduzido para estas regiões, quando comparadas com as alterações em todo o braço curto destes dois cromossomas. O cromossoma 7 exibe ganho em elevado número de cópias, em ambos os braços do cromossoma, nos tecidos tumorais dos doentes 13, 14, 15 e 16. Estas alterações têm tamanhos diferentes, ainda assim, bastante consistentes nestes mesmos doentes. Para este cromossoma apenas a amostra do doente 16 demonstra, no braço curto, uma alteração de tamanho inferior. Outra das alterações mais visíveis é encontrada em 8q nas biópsias dos doentes 13, 14, 15 e 16.





**Figura 20 – Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 11, 12, 13, 14, 15 e 16, diagnosticados com CP, histologia CPCE, estadio IA e IB. A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.**

Estas alterações para além de corresponderem a um elevado número de cópias, têm tamanhos compreendidos entre 20 a 99 Mb. O cromossoma 15 apresenta também ganho em mosaico de material genético nos tecidos tumorais dos doentes 11, 13, 15 e 16. As alterações, em termos de perda, encontradas em Yp e Yq são também elucidativas. Estas alterações verificadas nas amostras dos doentes 11, 13, 15 e 16 têm tamanhos bastantes similares (5 e 29 Mb, respetivamente).

Para além das alterações comuns descritas, este estadio exhibe, na biópsia do doente 13, inúmeros ganhos de porções cromossómicas para todos os cromossomas, exceptuando os cromossomas 10, 19, 21 e Y. Por outro lado, a perda de material genético evidenciado em 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 11p, 13q, 14q e 17p, nas amostras dos doentes 15 e 16, contribui para o elevado número de perdas génicas encontradas neste estadio.

### **Estadio II**

O doente 17 foi histologicamente classificado em CPCE, estadio IIA (T1N1M0), e os doentes 18, 19 e 20 em CPCE, estadio IIB (T3N0M0), pela classificação adoptada [22-23] (tabela 2).

Este estadio acarta o maior número de alterações em CPCE: 1178 alterações, a que correspondem 91% (1072/1178) de ganho e 9% (106/1178) de perda de material genético (ver figura 21).

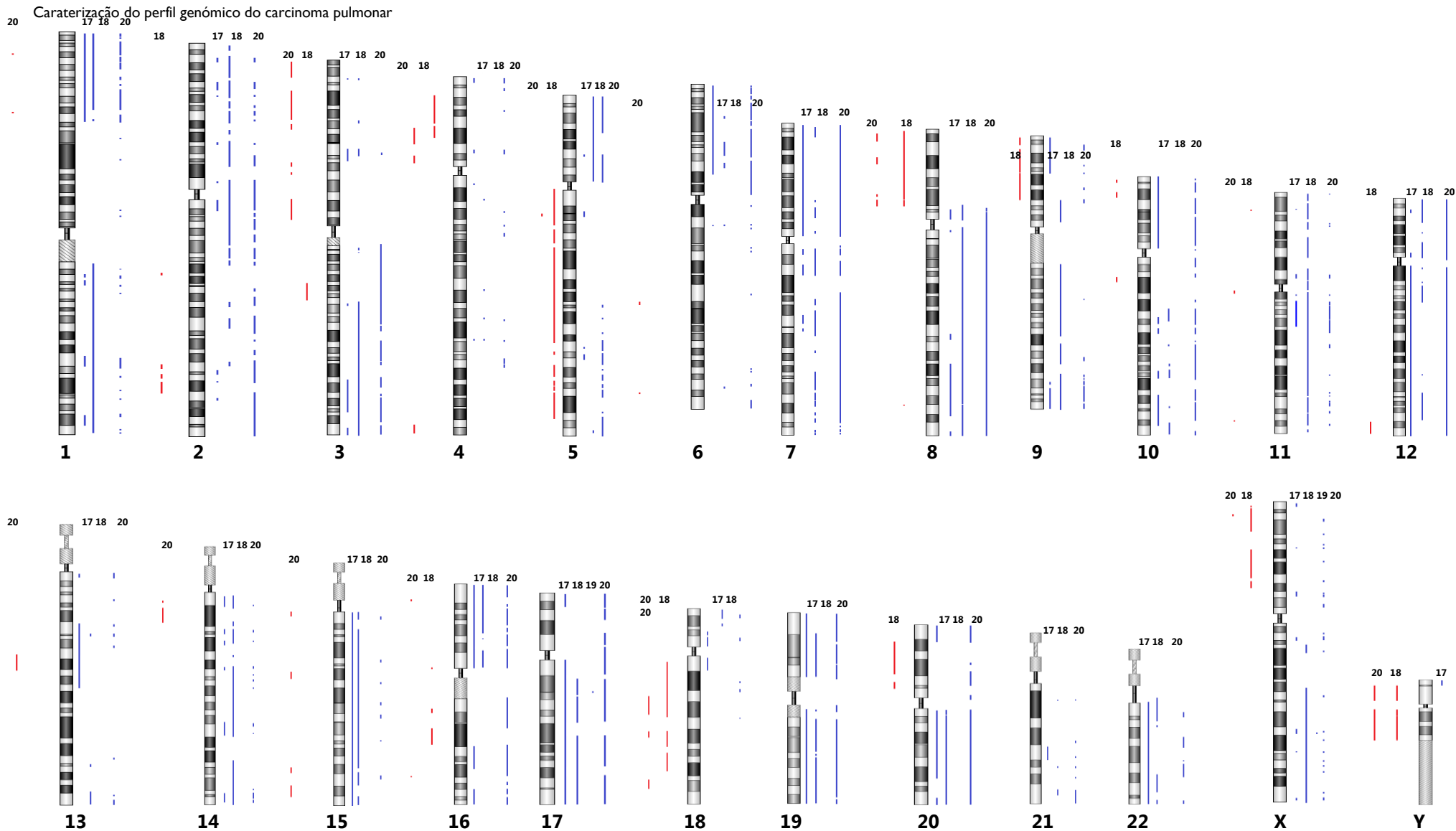
Foram encontradas alterações no doente 19 apenas nos cromossomas 17 e X. Este doente apresenta, para o braço longo do cromossoma 17, um elevado aumento do número de cópias nas regiões cromossómicas 17q12 (220 Kb) e 17q21.1 (107 Kb). O cromossoma X demonstra ganho em mosaico para 17q24 (432 Kb).

Relativamente aos outros três doentes, os resultados apresentados a seguir correspondem às alterações mais relevantes e significativas neste estadio.

A amostra do doente 17 exhibe ganho em 1p, 6p, 7p, 10p, 12q, 13q, 15q, 16p, 17q, 19p, 19q, 20q e 22q. Esta amostra não revela perda genética em nenhum dos cromossomas.

No que diz respeito à amostra do doente 18, os cromossomas 1p, 1q, 2p, 2q, 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11p, 11q, 12p, 14q, 15q, 16p, 17q, 19p, 19q, 20q e Xq demonstram ganho de material genético. Nas regiões 4p,5q, 8p, 9p, 18q, 20p, Yp e Yq verifica-se perda de segmentos genéticos.

Em relação à amostra do doente 20, verifica-se ganho em ambos os braços dos cromossomas 1, 2, 5, 7, 10, 12, 16, 17, 19 e 20, e ainda em 3q, 6p, 8q, 11q e 22q. As regiões dos cromossomas localizadas em 3p, 8p, 15q, Yp e Yq exibem perda.



**Figura 21 – Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 17, 18, 19 e 20, diagnosticados com CP, histologia CPCE, estadio IIA e IIB. A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.**

Como verificado na figura 21, existem alterações comuns reveladoras em todos os cromossomas. Ainda assim para os cromossomas 4, 13 e 21 não existem muitas alterações concordantes nos doentes analisados. A perda de segmentos cromossómicos não está muito evidenciada neste estadio. Contudo, esta perda é expressiva em 5q, 9p, 20p e Xp para o doente 18, em 3p para o doente 20 e em 8p, 18p, Yp e Yq para os doentes 18 e 20. As amostras dos doentes 17 e 19 não revelam, como referido anteriormente, perda de informação genética. Em termos de ganho genético, nas amostras dos doentes 17, 18 e 20 foram encontradas inúmeras alterações correspondentes a um elevado número de cópias, situações de mosaicismo, diferentes tamanhos de alteração, ganho de um braço cromossómico completo e alterações pontuais dispersas por todo o cromossoma. As regiões igualmente alteradas nestas três amostras correspondem aos braços curtos dos cromossomas 1, 6 e 16, aos braços longos dos cromossomas 3, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 20 e 22, e a ambos os braços, curto e longo, dos cromossomas 2, 7, 12 e 19.

### **Estadio III**

Os doentes 21 e 22 foram histologicamente classificados em CPCE, estadio IIIA (T3N1M0), pela classificação adoptada [22-23] (tabela 2).

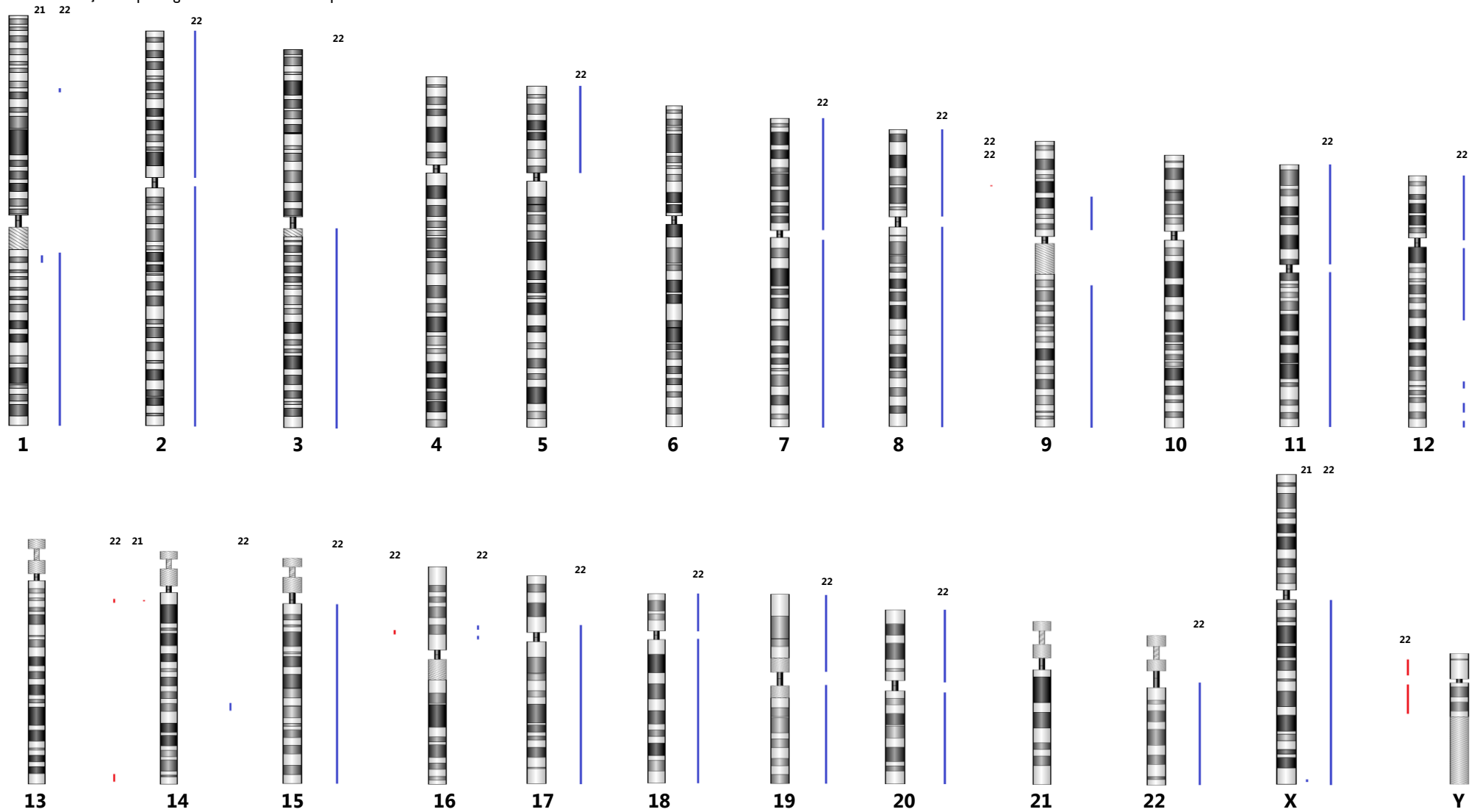
Neste estadio foram encontradas 79 alterações correspondentes a 15% (12/79) de perda e a 85% (67/79) de ganho de material genético (ver figura 22). Os cromossomas 4, 6, 10, 13 e 21 não se encontram alterados para nenhum dos dois doentes analisados.

No que se refere à amostra do doente 21, foram identificadas apenas três alterações nos cromossomas 1, 14 e X. O cromossoma 1 demonstra ganho em mosaico em 1q21.2-q21.3 (740 Kb), bem como em Xq28 (38 Kb). No cromossoma 14 verifica-se perda em mosaico em 14q11.2 (574 Kb).

A amostra do doente 22 apresenta uma percentagem de ganho de material genético bastante superior à percentagem de perda. Assim verifica-se ganho de ambos os braços, longo e curto, dos cromossomas 2, 7, 8, 11, 18, 19 e 20, ganho de todo o braço curto dos cromossomas 5 e 12, e ganho de todo o braço longo dos cromossomas 1, 3, 15, 17, 22 e X. Para os cromossomas 3, 7, 9, 12, 17 e X foram detetadas alterações correspondentes a um elevado número de cópias. Relativamente a perda de segmentos cromossómicos, as alterações mais significativas foram descobertas em Yp e Yq. Ainda assim, foram identificadas perdas, nesta amostra, nos cromossomas 9, 14 e 16.

Neste estadio não existem praticamente alterações comuns entre os diferentes casos analisados.

Caraterização do perfil genómico do carcinoma pulmonar



**Figura 22 – Representação das alterações identificadas por aCGH nas amostras dos doentes 21 e 22 diagnosticados com CP, histologia CPCE, estadio IIIA.** A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.

### 4.3.3. Comparação dos resultados obtidos por aCGH em Adenocarcinomas e Carcinomas Epidermóides

As figuras 23 e 24 evidenciam todas as alterações encontradas em ADC e CPCE, respetivamente, para os três estadios investigados. Face à enorme quantidade de informação obtida com a utilização de uma técnica de *screening* de elevada resolução do genoma humano, o grande desafio que se coloca é a análise dessa informação de forma eficaz e, a sua utilização para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica.

Relativamente aos doentes identificados macroscopicamente como ADC verifica-se que nos três diferentes estadios analisados não existe correspondência em termos de alterações cromossómicas. Os resultados obtidos são, assim, de difícil interpretação. Na literatura, existem estudos que mostram, em ADC, ganho em 1q, 7p e 17q, e perda de material genético em 3p, 8p, 9p, 13q, 17p e 18q [82].

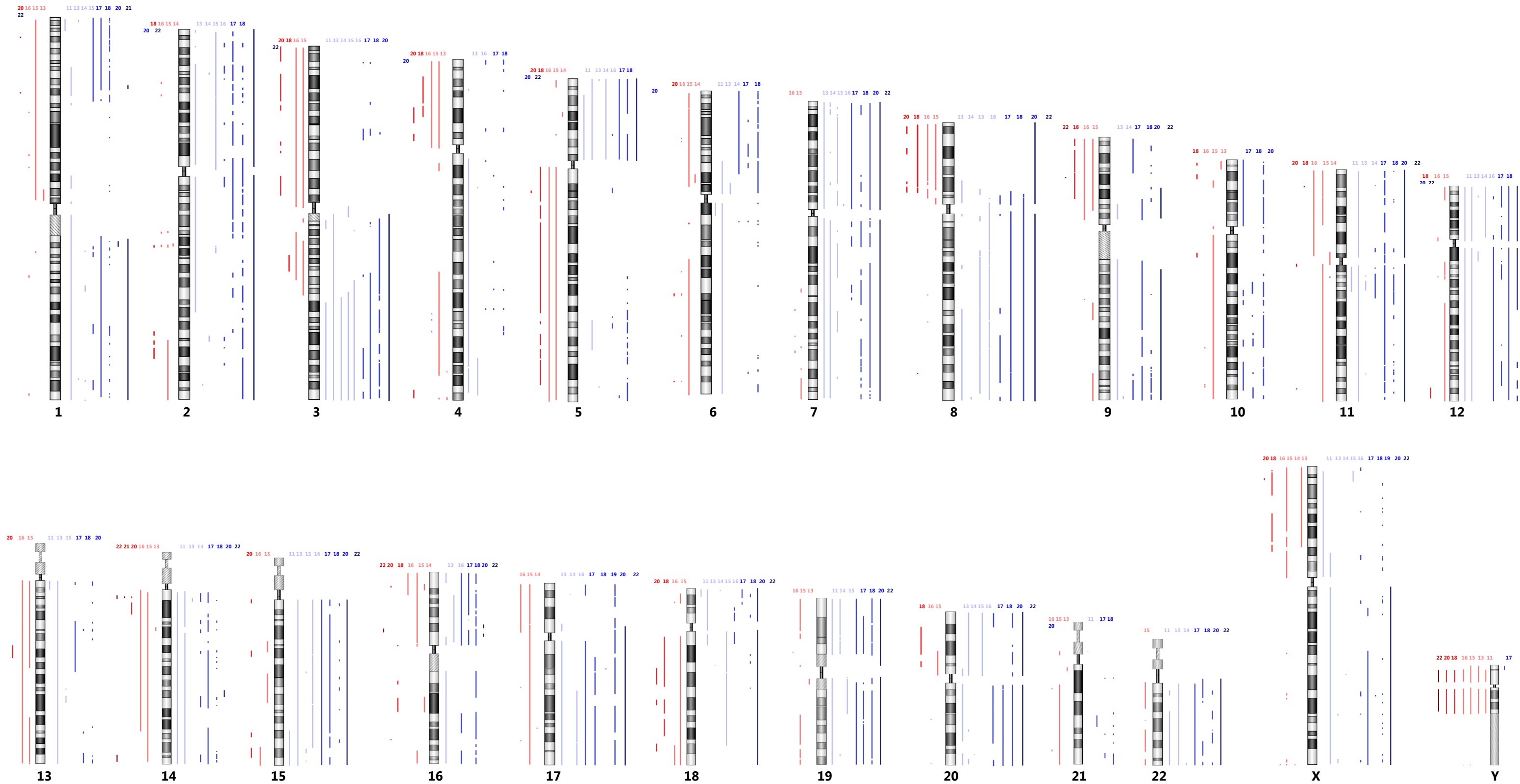
A amostra correspondente ao doente 1 detém 92% (463/502) das alterações verificadas em ADC, traduzidas em diferentes valores de ganho e perda de material genético. Poderá colocar-se a possibilidade de esta amostra, de estadio I, poder integrar outro estadio TNM superior, dada a quantidade de alterações que possui, e que em nada se comparam com as alterações verificadas noutros doentes com ADC analisados. O mesmo acontece com a amostra do doente 9, de estadio III, onde não foi detetada qualquer alteração. Ainda assim, um elevado número de alterações poderá não estar diretamente relacionado com a severidade do tumor, uma vez que estas alterações poderão não englobar genes envolvidos na carcinogénese pulmonar. Desta forma, a caracterização molecular poderá ser uma ferramenta valiosa na classificação dos diferentes estadios TNM, auxiliando a anatomia patológica.

No que diz respeito aos doentes classificados histologicamente como CPCE é observada uma maior concordância entre amostras em termos de ganho, quando comparada com perda de segmentos cromossómicos. As regiões que indicam ganho e que poderão ter potencial para diagnóstico estão localizadas em 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 12p, 12q, 15q, 17q, 19p, 19q, 20p, 20q e 22q. Em termos de perda, as regiões 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, Xp, Yp e Yq apresentaram elevada homologia. Nestas doze amostras é ainda possível diferenciar os diferentes estadios de acordo com as alterações verificadas. Ainda assim, e tal como acontece nos ADC, para o estadio III foi avaliado um número reduzido de doentes. Desta forma, é difícil estabelecer um padrão de alterações genéticas em regiões específicas que poderão conter genes candidatos e vias moleculares envolvidas no CP.

Caraterização do perfil genómico do carcinoma pulmonar



**Figura 23 – Representação de todas as alterações identificadas por aCGH em ADC.** A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos para o **estadio I**, **estadio II** e **estadio III**, e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético para o **estadio I**, **estadio II** e **estadio III**. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.



**Figura 24 – Representação de todas as alterações verificadas por aCGH em CPCE.** A azul (do lado direito de cada cromossoma) estão identificados os ganhos para o **estadio I**, **estadio II** e **estadio III**, e a vermelho (do lado esquerdo de cada cromossoma) as perdas de material genético para o **estadio I**, **estadio II** e **estadio III**. Em cima de cada cromossoma está indicado o caso.





É, deste modo, necessário o estudo de um maior número de doentes, não só para este estadio, utilizando a técnica de aCGH, para que seja possível identificar novas regiões cromossómicas frequentemente alteradas neste carcinoma, melhorando a compreensão deste tumor.

Pela análise das figuras 23 e 24 é notória a diferença entre ADC e CPCE, contendo este último tipo de tumor um valor mais elevado de alterações, podendo traduzir-se num prognóstico mais desfavorável e numa maior agressividade do tumor. Na literatura, estudos em CPNPC, recorrendo à técnica de aCGH, têm reportado, na grande maioria, ganho em 1q, 3q e 8q. São ainda consideradas relevantes as amplificações das regiões 5p, 7p, 7q, 11q, 12p, 17q, 19q e 20q. Em termos de perda as regiões mais citadas estão localizadas em 3p, 8p, 9p, 13q, 17p e 18q [83-86]. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos no nosso estudo em CPCE, embora, como referido anteriormente, em ADC estas alterações não tenham sido significativas.

O aCGH permitiu não só a identificação de alterações nas regiões descritas como associadas ao CP, como também várias alterações dispersas pelo genoma humano que eventualmente poderão estar associadas a esta neoplasia. A utilização desta técnica de elevada resolução permitiu ainda verificar a presença de diferentes níveis de mosaicismo nas biópsias analisadas. Face aos resultados obtidos poderá haver contaminação das amostras tumorais com DNA não tumoral, bem como presença de diferentes níveis de alteração para a mesma região cromossómica, revelando a heterogeneidade intra-tumoral. Algumas regiões demonstram expansão variável no número de cópias, ou seja, apesar de no geral as células constituintes dessa amostra apresentarem alterações nessa região, algumas dessas células terão maior nível de ganho do que outras, isto é, apresentam um número de cópias diferente para essa região, o que se traduz em diferentes logaritmos de alteração.

Depois de analisado todo o genoma, segue-se uma breve discussão dos resultados obtidos por aCGH apenas para algumas das regiões que se encontram estabelecidas na literatura como fortemente associadas ao CP.

Foram avaliados pormenorizadamente 35 genes, já reportados na literatura como associados ao CP, e a sua localização genómica, dos quais se identificaram, no nosso estudo, 135 ganhos e 36 perdas (figura 25).

Os recetores EPH são um grupo de recetores que são ativados aquando da ligação a efrinas (EPH). Estes recetores, pertencente ao grupo de recetores tirosina cinase, são agrupados em EPHA e EPHB, de acordo com a homogeneidade da sequência e a sua afinidade para diferentes ligandos. Alterações nestes recetores têm sido implicados no CP.

Pensa-se que o recetor *EPHB6* poderá estar envolvido na ativação da via de sinalização MAPK, em ADC [87]. O ganho de segmentos cromossómicos, em CPNPC, parece ter um papel importante na expressão aumentada de efrinas. O aumento do número de cópias dos genes *EPHA3* e *EPHA5* têm sido referidos em CPNPC [88]. Por outro lado, estes dois genes, juntamente com *EPHA7*, *EPHBI* e *EPHB6*, são encontrados mutados em ADC. No geral, 16% de ADC têm mutações ou amplificações na via EPH, reconhecendo-se possivelmente as efrinas como potenciais protooncogenes envolvidos no CP [89]. No presente estudo, o gene *EPHA3* (3p11.1) demonstra, em CPCE, perda em 16,7% dos casos analisados. No gene *EPHA5* (4q13.1) foi detetada perda numa amostra de ADC. Para o gene *EPHA7* (6q16.1), observou-se ganho numa amostra de um doente com CPCE e perda numa amostra de um doente com ADC. O gene *EPHBI* (3q22.2) exibiu ganho em 33.3% das amostras com CPCE e perda num caso com ADC e noutro com CPCE. O gene mais alterado nesta família de genes que codificam efrinas foi o *EPHB6* (7q34), demonstrando ganho em 41.7% dos casos com CPCE (figura 25).

A família de recetores DDR (*discoidin domain receptor*) é composta por dois elementos distintos, DDR1 e DDR2. Existem estudos que sugerem que a ativação de DDR1 e DDR2 com colagénio está associada à ativação das vias PI3K/Akt e Ras/MAPK, promovendo a migração celular, proliferação e sobrevivência [90-91]. Embora estas alterações pareçam ser mais frequentes em CPPC, neste estudo foram avaliadas as alterações no número de cópias em amostras de CPNPC. Os genes *DDR2* (1q23.3) e *DDR1* (6p21.33) exibiram ganho em 33.3% de CPCE. Este último gene encontra-se ainda em perda numa amostra de CPCE. Para nenhum dos genes se verificam alterações em ADC, nos casos analisados.

Dos dois genes selecionados no braço longo do cromossoma 2, foram observadas alterações apenas em CPCE. O gene *BCL2L1* (2q13) encontra-se em ganho em 25% e o gene *ERBB4* (2q34) em apenas 8.3%. Para este último gene, verifica-se perda em 16.7% dos casos.

O maior número de genes selecionados encontra-se no cromossoma 3. Os genes *RAR $\beta$*  (3p24.2), *RASSF1A* (3p21.31), *TUSC2* (3p21.31), *SEMA3B* (3p21.31), *SEMA3F* (3p21.31) e *FHIT* (3p14.2) demonstram, em CPCE, perda em 16,7%. Os quatro genes localizados em 3p21.31 revelam ainda ganho numa amostra com CPCE e em dois casos com ADC. Na literatura, a perda de heterozigotia tem sido reportada em mais de 50% dos casos de CPNPC e, tal como no CPPC, pensa-se que seja uma alteração genética inicial no desenvolvimento da neoplasia. A perda alélica em 3p21.31 tem sido relatada em todos os

principais tipos de CP, e alterações em perda no número de cópias para o gene *FHIT* têm sido documentadas em mais de 40% dos CPNPC [82-84].

Os genes *SOX2* (3q26.33) e *PIK3CA* (3q22.2) revelaram-se os genes mais alterados neste estudo com 66.7% e 75% de ganho no CPCE. Neste subtipo histológico de CP a amplificação do braço longo do cromossoma 3 tem sido reportada como a alteração genómica mais comum [83, 85, 92]. Esta amplificação em 3q desempenhará um papel fundamental na carcinogénese do CPCE, mas não necessariamente em ADC. O ganho em 3q representa, por isso, uma das diferenças mais marcantes entre os subtipos histológicos, CPCE e ADC [93]. Embora a região 3q possa abrigar muitos outros potenciais genes alvo, estes dois genes parecem apresentar já valor promissor como biomarcadores em doentes para selecionar fármacos específicos [94]. Contudo, parece pertinente a necessidade de mais estudos direcionados para esta região em ADC, no sentido de averiguar a possível menor importância destes genes na carcinogénese (figura 25).

Para o gene *KIT* (4q12) não foi observada qualquer alteração nas amostras analisadas. Alterações neste gene parecem ser mais frequentes em CPPC [18]. Deste modo, será pertinente a realização de estudos futuros relativamente ao número de alterações em que este gene está envolvido, em CPNPC.

Os genes *EGFR* (7p11.2) e *BRAF* (7q34) apresentaram ganho numa única amostra com ADC analisada. Para além destes dois genes, o gene *MET* (7q31.2) exibiu também ganho em 50% dos casos de CPCE analisados. No gene *FGFR1* (8p11.23-p11.22) foi detetada perda numa amostra com CPCE e encontrado ganho numa amostra com ADC e ganho em 41.7% das amostras analisadas com CPCE. Estes quatro genes serão discutidos posteriormente neste trabalho, uma vez que também foram analisados pela técnica de MLPA (capítulo 4.4).

O gene *MYC* (8q24.21) representa o oncogene descrito como o mais significativo localizado em 8q e está implicado na patogénese de diversos cancros humanos. Neste estudo este gene apresenta uma taxa de ganho de 20% para ADC e 58.3% para CPCE. Embora este gene não englobe os genes descritos como fundamentais no desenvolvimento do CP, a amplificação de *MYC* no cancro da mama e no cancro da próstata tem sido correlacionada com a progressão e recorrência da doença [95]. Para além disso, a região 8q24.21 parece estar associada a um prognóstico desfavorável no carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço [96]. Contudo, e uma vez que este gene foi o terceiro mais alterado em 35 genes selecionados para este estudo por aCGH, será necessária uma avaliação mais exaustiva de forma a esclarecer o seu papel no desenvolvimento do CP (figura 25).

O gene *CDKN2A* (9p21.3) controla a via Rb que regula a transição da fase G1/S e a via da p53 que induz a paragem do crescimento ou apoptose em resposta a danos no DNA ou a estímulos mitogénicos inapropriados [97]. A inativação deste gene pode ocorrer por mutação, deleção homozigótica ou metilação do promotor. A mutação deste gene inativa seletivamente a via Rb, enquanto que a deleção compromete ambas as vias, Rb e p53 [92]. As alterações em perda neste gene têm sido reportadas em 30-50% dos CPNPC, sendo características de CPCE [18]. Neste estudo foram comprovadas estas alterações em 33.3% dos casos, em apenas CPCE (figura 25).

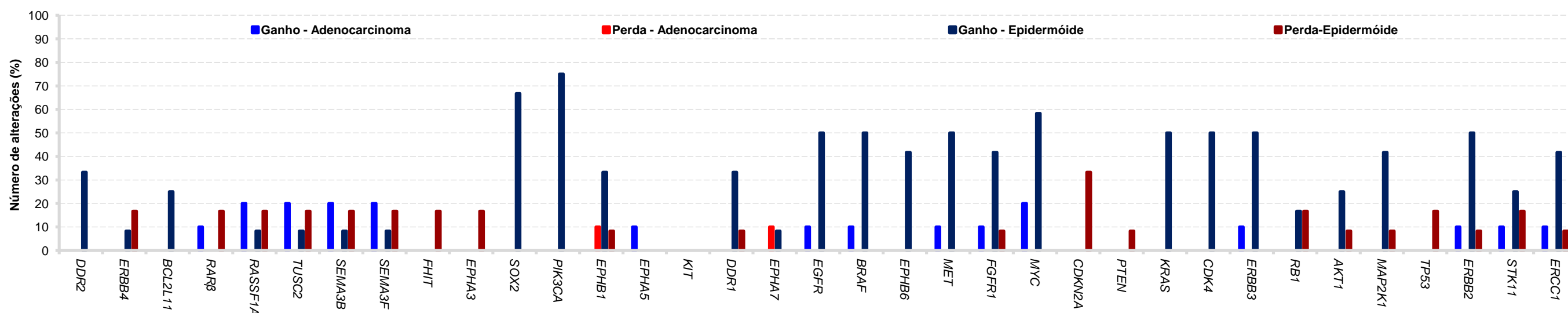
Foi encontrada apenas um único caso com CPCE e com alteração em perda no gene *PTEN* (10q23.31). Este gene será também discutido mais a frente neste estudo, uma vez que foi também avaliado por MLPA (capítulo 4.4).

Os três genes localizados no cromossoma 12, *KRAS* (12p12.1), *CDK4* (12q14.1) e *ERBB3* (12q13.2), apresentam ganho em 50% dos CPCE, neste estudo. O gene *ERBB3* encontra-se ainda em ganho numa amostra com ADC. Na literatura, o gene *CDK4* está pouco amplificado em CPNPC [37]. Contudo, neste estudo apresenta uma percentagem de ganho significativa. Por outro lado, embora seja citado em inúmeros estudos de CP, o gene *ERBB3* não é englobado nos principais genes envolvidos na carcinogénese pulmonar. Neste sentido, estas elevadas percentagens de ganho verificadas para estes dois últimos genes poderão ser indicativas de que um maior número de estudos deverão ser realizados, a fim de elucidar os seus papéis nestes tumores.

O gene *RBI* (13q14.2) revelou, neste estudo, a mesma taxa de ganho e de perda, 16.7%, em amostras com CPCE. Embora ocorra perda de *RBI* com maior frequência em CPPC [37], não parecem haver evidências neste gene capazes de distinguir ADC e CPCE, uma vez que o número de alterações detetadas em CPNPC é muito reduzido.

O oncogene *AKT1* (*V-AKT murine thymoma viral oncogene*) (14q32.33) codifica a proteína AKT. Esta proteína serina-treonina cinase medeia a maioria dos sinais na via da PI3K. A ativação anormal de AKT contribui para a carcinogénese pulmonar e é detetada em 30-75% de CPNPC. A proteína AKT pode ser ativada através de mutações ativadoras nos genes *KRAS*, *PIK3CA* ou *AKT1*, do aumento da expressão de *PIK3CA*, *AKT1* ou *AKT2*, ou perda de *PTEN* [98]. Neste estudo, para o gene *AKT1* observa-se ganho em 25% e perda em 8.3% das amostras com CPCE (figura 25).

Adenocarcinoma (estadios IB, IIA, IIB E IIIA, casos 1 a 10)										Classificação histológica	Epidermóide (estadios IA, IB, IIA, IIB E IIIA, casos 11 a 22)																		
Alterações - Nº casos (%)			IB					IIA		IIB			IIIA		Estadio	Doente	IA	IB		IIA		IIB		IIIA		Alterações - Nº casos (%)			
Normal	Ganho	Perda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Perda	Ganho	Normal
10/10 (100%)													DDR2 (1q23.3)																
10/10 (100%)													ERBB4 (2q34)														2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	9/12 (75%)
10/10 (100%)													BCL2L11 (2q13)														3/12 (25%)	9/12 (75%)	
9/10 (90%)	1/10 (10%)												RARβ (3p24.2)													2/12 (16.7%)	10/12 (83.3%)		
8/10 (80%)	2/10 (20%)												RASSF1A (3p21.31)													2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	9/12 (75%)	
8/10 (80%)	2/10 (20%)												TUSC2 (3p21.31)													2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	9/12 (75%)	
8/10 (80%)	2/10 (20%)												SEMA3B (3p21.31)													2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	9/12 (75%)	
8/10 (80%)	2/10 (20%)												SEMA3F (3p21.31)													2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	9/12 (75%)	
10/10 (100%)													FHIT (3p14.2)													2/12 (16.7%)	10/12 (83.3%)		
10/10 (100%)													EPHA3 (3p11.1)													2/12 (16.7%)	10/12 (83.3%)		
10/10 (100%)													SOX2 (3q26.33)													8/12 (66.7%)	4/12 (33.3%)		
10/10 (100%)													PIK3CA (3q26.32)													9/12 (75%)	3/12 (25%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)											EPHB1 (3q22.2)													1/12 (8.3%)	4/12 (33.3%)	7/12 (58.3%)	
9/10 (90%)	1/10 (10%)												EPHA5 (4q13.1)													12/12 (100%)			
10/10 (100%)													KIT (4q12)													12/12 (100%)			
10/10 (100%)													DDR1 (6p21.33)													1/12 (8.3%)	4/12 (33.3%)	7/12 (58.3%)	
9/10 (90%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)											EPHA7 (6q16.1)													1/12 (8.3%)	11/12 (91.7%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)												EGFR (7p11.2)													6/12 (50%)	6/12 (50%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)												BRAF (7q34)													6/12 (50%)	6/12 (50%)		
10/10 (100%)													EPHB6 (7q34)													5/12 (41.7%)	7/12 (58.3%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)												MET (7q31.2)													6/12 (50%)	6/12 (50%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)												FGFR1 (8p11.23-p11.22)													1/12 (8.3%)	5/12 (41.7%)	6/12 (50%)	
8/10 (80%)	2/10 (20%)												MYC (8q24.21)													7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)		
10/10 (100%)													CDKN2A (9p21.3)													4/12 (33.3%)	8/12 (66.7%)		
10/10 (100%)													PTEN (10q23.31)													1/12 (8.3%)	11/12 (91.7%)		
10/10 (100%)													KRAS (12p12.1)													6/12 (50%)	6/12 (50%)		
10/10 (100%)													CDK4 (12q14.1)													6/12 (50%)	6/12 (50%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)												ERBB3 (12q13.2)													6/12 (50%)	6/12 (50%)		
10/10 (100%)													RBI (13q14.2)													2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)	8/12 (66.7%)	
10/10 (100%)													AKT1 (14q32.33)													1/12 (8.3%)	3/12 (25%)	8/12 (66.7%)	
10/10 (100%)													MAP2K1 (15q22.31)													1/12 (8.3%)	5/12 (41.7%)	6/12 (50%)	
10/10 (100%)													TP53 (17p13.1)													2/12 (16.7%)	10/12 (83.3%)		
9/10 (90%)	1/10 (10%)												ERBB2 (17q12)													1/12 (8.3%)	6/12 (50%)	5/12 (41.7%)	
9/10 (90%)	1/10 (10%)												STK11 (19p13.3)													2/12 (16.7%)	3/12 (25%)	7/12 (58.3%)	
9/10 (90%)	1/10 (10%)												ERCC1 (19q13.32)													1/12 (8.3%)	5/12 (41.7%)	6/12 (50%)	



**Figura 25 – Análise das alterações de genes já reportados na literatura como fortemente associadas ao CP.** Dos 35 genes analisados foi encontrado um maior número de alterações em casos com CPCE. Em termos de ganho, os genes *PIK3CA*, *SOX2*, *MYC* apresentam uma taxa de alteração superior a 50%, no CPCE, enquanto que os genes *EGFR*, *BRAF*, *MET*, *KRAS*, *CDK4*, *ERBB3* e *ERBB2* encontram-se alterados em metade dos casos com CPCE. Apenas o gene *CDKN2A* demonstrou um valor significativo de perda de material genético.



O oncogene *MAP2K1* (15q22.31) codifica a proteína MEK. Esta proteína serina-treonina cinase está envolvida na via de sinalização da RAS, promovendo, quando ativada, apoptose e a proliferação e diferenciação celulares [97]. Pelo estudo de aCGH, o gene *MAP2K1* exibiu ganho em 41.7% e perda em 8.3% dos casos com CPCE.

O gene *TP53* (17p13.1) está descrito como o gene mais frequentemente mutado no CP [18,37]. No entanto, pouco se sabe relativamente à variação do número de cópias deste gene. Neste estudo foram encontrados apenas dois casos com alterações em perda para o gene *TP53* em CPCE. Embora pouco conclusivos, estes dados apoiam a literatura, dada a maior frequência destas alterações em CPCE (figura 25).

O gene *ERBB2* (17q12) exibe ganho em 50% e perda em 8.3% dos casos com CPCE. Este gene apresenta também ganho num caso com ADC. Mais à frente este gene será discutido com mais pormenor, uma vez que foi também avaliado por MLPA (capítulo 4.4).

O gene supressor tumoral *STK11* (19p13.3) é reportado como um dos mais mutados no CP [18,37]. Embora as alterações em termos de número de cópias não estejam ainda bem estabelecidas na literatura, para este gene e, neste estudo, verificou-se ganho num caso com ADC e ganho em 25% e perda em 16.7% dos casos com CPCE. Dada a sua importância inibitória da via mTOR, via MAPK, seria importante a realização de estudos adicionais direcionados para esta região, tendo como finalidade uma melhor compreensão do papel deste gene num eventual prognóstico desfavorável.

A proteína codificada pelo gene *ERCCI* (*Excision Repair Cross-Complementing 1*) (19q13.32) permite a remoção de DNA danificado durante o processo de diferentes vias de reparação de DNA [99]. Através da análise de aCGH, este gene demonstrou ganho em 41.7% e perda em 8.3% dos casos com CPCE. Para além disso, foi detetado também em ganho num caso com ADC (figura 25).

#### 4.4. Resultados obtidos por MLPA

Depois de avaliado todo o genoma, foi feita a validação por MLPA de algumas das regiões mais relevantes na carcinogénese pulmonar. Nesta técnica, o aumento ou a diminuição da intensidade do sinal de sondas consecutivas é uma forte evidência de duplicação ou deleção, respetivamente, e normalmente, os vários painéis de sondas são desenhados para detetar estas alterações mais comuns, validando os resultados numa única reação. Contudo, quando se verificam ganhos e perdas que parecem afetar uma única sonda, frequentemente num único exão, é necessário a validação por um método alternativo [100].



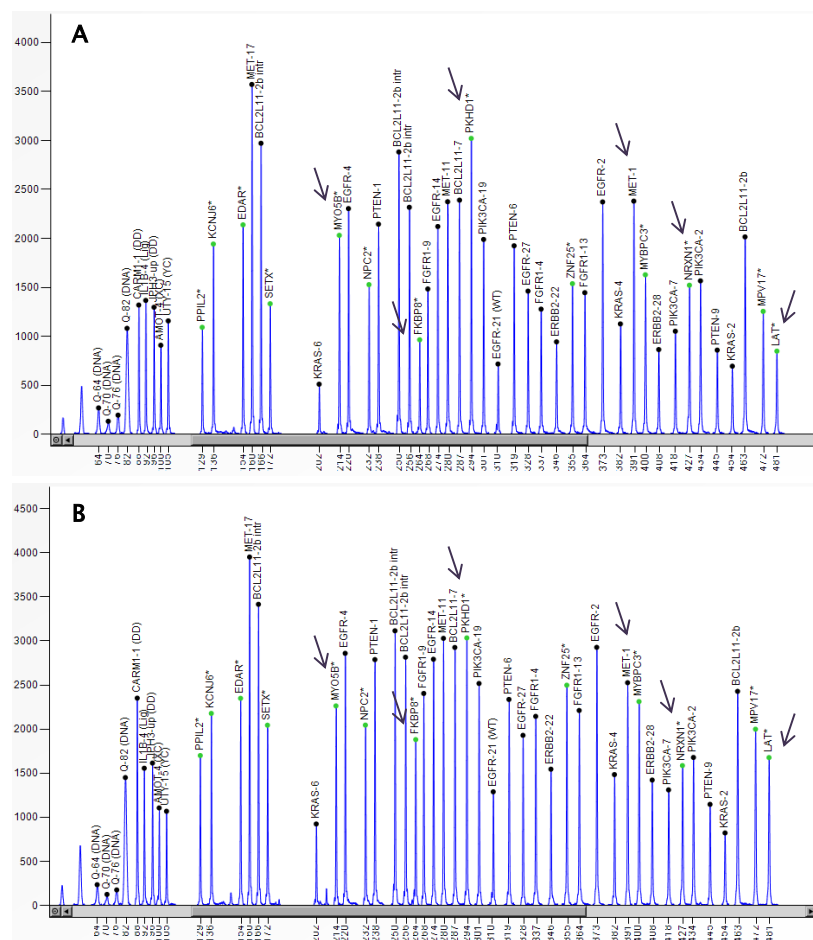
Neste estudo foi utilizado o painel de sondas específico para CP, *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer*.

Uma das grandes limitações na análise de amostras tumorais reside na sua contaminação com DNA aparentemente normal. Deste modo, as amostras tumorais apresentam elevados níveis de mosaicismo, mesmo quando o DNA é cuidadosamente isolado das amostras de tecido tumoral, podendo conter entre 20-50% de DNA normal. Esta contaminação com DNA normal reduz a amplitude da variação do número de cópias específicas do tumor, dificultando a sua deteção por MLPA [100].

No presente estudo, para a análise dos resultados de MLPA foram estabelecidos os valores de *cutoff* para determinar se o número de cópias de DNA é normal ou exibe ganho ou perda. Os critérios para a alteração foram definidos como perda se o rácio é inferior a 0,8 e ganho se o rácio é maior ou igual a 1,2. Na técnica de MLPA os resultados resultam da comparação do número de cópias do gene em análise com os controlos normais: teoricamente um rácio de 1 indica a presença de dois alelos, 0,5 é indicativo da ausência de um dos alelos e 1,5 sugere que um alelo está duplicado. No entanto, frequentemente os rácios utilizados em vários estudos são 0,7 para perda e 1,3 para ganho. Contudo, a presença de mosaicismo em amostras tumorais dificulta a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que mascara a presença de alterações genéticas menos expressivas no genoma. Assim, os resultados referentes a alterações em amostras tumorais sofreram uma normalização, adaptando deste modo os valores de *cutoff* para este tipo de amostras.

Outro aspeto importante para a realização da técnica de MLPA é a seleção das amostras controlo. Para esta técnica são necessários pelo menos três controlos representativos da população saudável, sem qualquer alteração nos genes em estudo. O mesmo método de extração e a similaridade dos tecidos na escolha dos controlos evita variações e permite tirar elações mais fidedignas. Dos 22 tecidos não tumorais, apenas três (tecidos não tumorais dos doentes 1, 9 e 19) foram selecionados e utilizados como controlos em todas as reações de MLPA, uma vez que estes três controlos se demonstraram perfeitamente normais para todos os genes estudados. Os restantes candidatos a controlo foram rejeitados por apresentarem alguma alteração. Ainda assim, e uma vez que os 22 casos incluídos no estudo são fumadores, seria importante a utilização de um grupo controlo não fumador e ainda, eventualmente, alargar este estudo de forma a incluir amostras de indivíduos fumadores sem diagnóstico de CP, para tentar identificar as alterações provocadas pelo tabagismo. Porém, face à dificuldade na obtenção de amostras não tumorais controlo, foram apenas utilizados neste estudo amostras de doentes diagnosticados com CP.

A figura 26 representa os resultados de MLPA, para o painel de sondas *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer*, obtidos para a amostra do doente 9. Esta figura constitui um exemplo para o doente 9, de como foram interpretados os resultados de MLPA que estão enumerados nas tabelas 6 e 7. Através da análise do eletroferograma correspondente ao tecido tumoral verifica-se uma diminuição dos picos relativos dos genes *MET* (exão 1), *NRXN1*, *PKHD1* e *MYO5B*, em relação à amostra controlo, indicando perda de material genético. Um aumento da altura dos picos é indicativo de ganho génico (verificado apenas nos genes *LAT* e *FKBP8*).



**Figura 26 – (A) Eletroferograma correspondente à amostra não tumoral do doente 9 e (B) eletroferograma correspondente à amostra tumoral do doente 9, através da aplicação da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer*, recorrendo ao software *GeneMapper*.**

Neste estudo, para o tecido tumoral verificaram-se, utilizando a técnica de MLPA, 289 alterações no número de cópias em diferentes genes. Destas alterações 65% (188/289) correspondem a ganho e a 35% (101/289) a perda de material genético. O maior número de ganhos está localizado em 3q, 7p, 8p e 19p e, a maioria das perdas está situada em 10q e 12p.

No painel disponibilizado todas as sondas se encontram alteradas no número de cópias em pelo menos um doente. Deste modo, foram também incluídas no estudo as 13 sondas de referência disponibilizadas, uma vez que foram detetadas 84 alterações (29% do total) nestas sondas. Embora estas 13 sondas detetem localizações autossómicas possivelmente não alteradas nesta neoplasia, verificamos que apresentam taxas de alteração elevadas, em alguns casos superiores a 90%.

#### **4.4.1. MLPA em Adenocarcinomas**

Nas 10 amostras de doentes classificados como ADC foram identificadas 77 alterações, através da técnica de MLPA, sendo que 66% (51/77) correspondem a ganho e 34% (26/77) a perda de informação génica. Na tabela 6 estão descritas todas as alterações encontradas em ADC.

A alteração mais consistente descoberta neste subtipo histológico é referente à amostra do doente 10, exibindo esta ganho, correspondente a um elevado número de cópias, para todos os exões estudados do gene *EGFR*. Também neste gene, apenas o exão 21 se revelou o mais alterado demonstrando ganho em 40% e perda em 20% dos casos analisados. Relativamente ao gene *MET*, a amostra do doente 2 parece estar alterada em perda, embora tenha também sido detetado numa outra amostra ganho no exão 11 (caso 8) e, noutro, perda no exão 1 (caso 9). Para as amostras dos doentes 1 e 8, observou-se ganho de material genético no gene *FGFR1*. O gene *PTEN* revelou ganho no doente 8 e perda no exão 6 e 9 nos doentes 1 e 2, respetivamente. Para o gene *KRAS* é evidenciado ganho e perda de material genético em diferentes doentes. Deste modo, verifica-se ganho na amostra do doente 8 e perda na amostra do doente 2. O exão 6 do gene *KRAS* apresenta a maior taxa de alteração, revelando perda em 40% e ganho em 50% dos casos. No que diz respeito ao gene *ERBB2*, foram observados ganhos nos dois exões estudados em três casos, embora nas amostra dos doentes 4 e 5 seja também visível ganho nos exões 28 e 22, respetivamente (tabela 6).

No que se refere às sondas de referência, as alterações com maior relevo foram identificadas no gene *FKBP8*, importante na regulação da apoptose. Este gene encontrou-se em ganho em 90% dos casos, isto é, apenas um doente não apresentou alteração. O gene *LAT* revelou ganho em três casos. Para além disso, nos genes *NRXN1*, *PKHD1* e *MYO5B* foram observadas duas alterações em perda em 20%, e nos genes *MYBPC3* e *PPIL2* ganho também em 20% dos casos. Os genes *EDAR*, *SETX*, *MYBPC3* e *NPC2* não se encontraram alterados em nenhum doente (tabela 6).

**Tabela 6 – Resultados obtidos para as 10 amostras dos doentes com ADC, referentes às alterações presentes no tecido tumoral, utilizando o painel de sondas SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer.** A azul está representado ganho e a vermelho perda de material genético. As sondas a roxo correspondem às sondas de referência do painel. As últimas nove sondas, representadas na tabela, correspondem às sondas de mutação.

Estadios (IB, IIA, IIB e IIIA) – Adenocarcinoma (casos 1 a 10)		IB					IIA	IIB		IIIA		Número de alterações (%)			
Gene, Exão	Posição Cromossómica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Normal	Ganho	Perda	Mutação
BCL2L11, ex 2b	2q13											10/10 (100%)			
BCL2L11, intr 2												10/10 (100%)			
BCL2L11, intr 2												10/10 (100%)			
BCL2L11, intr 2												8/10 (80%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	
BCL2L11, ex 7												10/10 (100%)			
PIK3CA, ex 2	3q26.32											10/10 (100%)			
PIK3CA, ex 7												8/10 (80%)		2/10 (20%)	
PIK3CA, ex 19												9/10 (90%)		1/10 (10%)	
EGFR, ex 2	7p11.2											9/10 (90%)	1/10 (10%)		
EGFR, ex 4												9/10 (90%)	1/10 (10%)		
EGFR, ex 14												9/10 (90%)	1/10 (10%)		
EGFR, ex 21 Wild type												4/10 (40%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	
EGFR, ex 27												9/10 (90%)	1/10 (10%)		
MET, ex 1	7q31.2											8/10 (80%)		2/10 (20%)	
MET, ex 11												8/10 (80%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	
MET, ex 17												10/10 (100%)			
FGFR1, ex 13	8p11.23											8/10 (80%)	2/10 (20%)		
FGFR1, ex 9												8/10 (80%)	2/10 (20%)		
FGFR1, ex 4	8p11.22											9/10 (90%)	1/10 (10%)		
PTEN, ex 1	10q23.31											9/10 (90%)	1/10 (10%)		
PTEN, ex 6												8/10 (80%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	
PTEN, ex 9												8/10 (80%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	
KRAS, ex 6	12p12.1											1/10 (10%)	5/10 (50%)	4/10 (40%)	
KRAS, ex 4												6/10 (60%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)	
KRAS, ex 2												7/10 (70%)	1/10 (10%)	2/10 (20%)	
ERBB2, ex 22		17q12											6/10 (60%)	4/10 (40%)	
ERBB2, ex 28												6/10 (60%)	4/10 (40%)		
MPV17	2p23.3											9/10 (90%)	1/10 (10%)		
NRXN1	2p16.3											8/10 (80%)		2/10 (20%)	
EDAR	2q12.3											10/10 (100%)			
PKHD1	6p12.2											8/10 (80%)		2/10 (20%)	
SETX	9q34.13											10/10 (100%)			
ZNF25	10p11.1											8/10 (80%)	2/10 (20%)		
MYBPC3	11p11.2											10/10 (100%)			
NPC2	14q24.3											10/10 (100%)			
LAT	16p11.2											7/10 (70%)	3/10 (30%)		
MYO5B	18q21.1											8/10 (80%)		2/10 (20%)	
FKBP8	19p13.11											1/10 (10%)	9/10 (90%)		
KCNJ6	21q22.13											9/10 (90%)		1/10 (10%)	
PPIL2	22q11.21											8/10 (80%)	2/10 (20%)		
PIK3CA, ex 10 (MUT)	3q26.32											10/10 (100%)			
PIK3CA, ex 21 (MUT)													10/10 (100%)		
EGFR, ex 21 E746 (MUT)	7p11.2											10/10 (100%)			
EGFR, ex 20 T790M (MUT)												10/10 (100%)			
EGFR, ex 21 L861Q (MUT)												10/10 (100%)			
EGFR, ex 21 L858R (MUT)												10/10 (100%)			
BRAF, ex 15 (MUT)		7q34											10/10 (100%)		
KRAS, ex 2 G12C (MUT)	12p12.1											10/10 (100%)			
ERBB2, ex 24 (MUT)	17q12											10/10 (100%)			

No presente estudo, em ADC não foram identificadas mutações nos genes avaliados (tabela 6).

#### 4.4.2. MLPA em Carcinomas Epidermóides

Nos 12 casos selecionados com CPCE foram encontradas 212 alterações, através da técnica de MLPA, sendo que 65% (137/212) correspondem a ganho e 35% (75/212) a perda de informação genética. Na tabela 7 estão enumeradas todas as alterações encontradas em CPCE.

As três diferentes regiões analisadas no intrão 2 do gene *BCL2L1* apresentaram o maior número de alterações para este gene, traduzidas em diferentes taxas de alteração de ganho e perda. Estas taxas de alteração compreendem valores entre 8.3% e 33.3% dos casos analisados. O gene mais alterado no CPCE, em termos de ganho, foi o *PIK3CA*, revelando aumento no número de cópias em todos os exões em cinco das amostras estudadas. São observadas para este gene taxas de alteração de 50% para o exão 2 e 58.3% para os exões 7 e 19. Relativamente ao gene *EGFR*, a amostra do doente 13 e do doente 15 demonstraram ganho em todos os exões, embora neste último o exão 21 esteja em perda. Tal como em ADC, o exão 21 voltou a ser o exão mais alterado com 41.7% de ganho e 33.3% de perda dos casos. Este gene exhibe ainda ganho e perda em dois exões nos doentes 20, 21 e 22, e 18, respetivamente. Para o gene *MET*, observa-se perda no doente 16 e ganho no doente 20 e 22. Ainda assim, neste último o exão 17 encontra-se inalterado. As amostras dos doentes 12, 13, 14 e 15 evidenciaram ganho num único exão, e as amostras 19 e 21 perda também num só exão. No que diz respeito ao gene *FGFR1*, verificaram-se taxas de alteração elevadas, com 5 casos em ganho em todos os exões e, na amostra 21 com um exão sem alteração. Ao contrário do constatado em ADC, o gene *PTEN* revelou ganho em três amostras e perda em cinco, embora dois destes cinco casos estejam alterados apenas nos exões 6 e 9. No gene *KRAS* foi detetada, nos exões 4 e 6, perda em dois casos e ganho em três. Nas amostras dos doentes 15 e 20 foram encontrados todos os exões deste gene alterados em perda e ganho, respetivamente. O gene *ERBB2* demonstrou ganho em quatro casos.

Como verificado em ADC, *FKBP8* voltou a destacar-se com uma taxa de alteração em ganho de 91.7% dos casos analisados. Por outro lado, no CPCE todos os genes de referência se encontram alterados em pelo menos um doente. Os genes *MPV17* e *PPIL2*, e, *NRXN1* e *PKHD1* apresentaram ganho e perda, respetivamente, em 41.7% dos casos. Os genes *EDAR* e *MYBPC3*, e *ZNF25* revelam ganho e perda em 16.7%, respetivamente. No que diz respeito aos genes *KCNJ6* e *MYO5B* são detetadas alterações em perda em 33.3% dos casos.

**Tabela 7 – Resultados obtidos para as 12 amostras dos doentes com CPCE, referentes às alterações presentes no tecido tumoral, utilizando o painel de sondas SALSA MLPA probemix**

**X050-AI Lung cancer.** A azul está representado ganho, a vermelho perda e a verde mutação. As sondas a roxo correspondem às sondas de referência do painel. As últimas nove sondas, representadas na tabela, correspondem às sondas de mutação.

Estádios (IA, IB, IIA, IIB e IIIA) – Epidermóide (casos 1 a 22)		IA		IB				IIA	IIB			IIIA		Alterações - Nº casos (%)			
Gene, Exão	Posição Cromossómica	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Normal	Ganho	Perda	Mutação
BCL2L11, ex 2b	2q13													9/12 (75%)	2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	
BCL2L11, intr 2														8/12 (66.7%)	3/12 (25%)	1/12 (8.3%)	
BCL2L11, intr 2														9/12 (75%)	2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	
BCL2L11, intr 2														5/12 (41.7%)	4/12 (33.3%)	3/12 (25%)	
BCL2L11, ex 7														10/12 (83.3%)	1/12 (8.3%)	1/12 (8.3%)	
PIK3CA, ex 2	3q26.32													5/12 (41.7%)	6/12 (50%)	1/12 (8.3%)	
PIK3CA, ex 7														4/12 (33.3%)	7/12 (58.3%)	1/12 (8.3%)	
PIK3CA, ex 19														5/12 (41.7%)	7/12 (58.3%)		
EGFR, ex 2	7p11.2													8/12 (66.7%)	2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)	
EGFR, ex 4														9/12 (75%)	3/12 (25%)		
EGFR, ex 14														9/12 (75%)	3/12 (25%)		
EGFR, ex 21 Wild type														3/12 (25%)	5/12 (41.7%)	4/12 (33.3%)	
EGFR, ex 27														7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)		
MET, ex 1	7q31.2													7/12 (58.3%)	3/12 (25%)	2/12 (16.7%)	
MET, ex 11														6/12 (50%)	4/12 (33.3%)	2/12 (16.7%)	
MET, ex 17														8/12 (66.7%)	2/12 (16.7%)	2/12 (16.7%)	
FGFR1, ex 13	8p11.23													4/12 (33.3%)	7/12 (58.3%)	1/12 (8.3%)	
FGFR1, ex 9														5/12 (41.7%)	6/12 (50%)	1/12 (8.3%)	
FGFR1, ex 4	8p11.22													6/12 (50%)	5/12 (41.7%)	1/12 (8.3%)	
PTEN, ex 1	10q23.31													6/12 (50%)	2/12 (16.7%)	4/12 (33.3%)	
PTEN, ex 6														4/12 (33.3%)	2/12 (16.7%)	6/12 (50%)	
PTEN, ex 9														3/12 (25%)	2/12 (16.7%)	7/12 (58.3%)	
KRAS, ex 6	12p12.1													4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)	
KRAS, ex 4														4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)	
KRAS, ex 2														9/12 (75%)	1/12 (8.3%)	2/12 (16.7%)	
ERBB2, ex 22	17q12													7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)		
ERBB2, ex 28														8/12 (66.7%)	4/12 (33.3%)		
MPV17	2p23.3													7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)		
NRXN1	2p16.3													7/12 (58.3%)		5/12 (41.7%)	
EDAR	2q12.3													10/12 (83.3%)	2/12 (16.7%)		
PKHD1	6p12.2													6/12 (50%)	1/12 (8.3%)	5/12 (41.7%)	
SETX	9q34.13													11/12 (91.7%)		1/12 (8.3%)	
ZNF25	10p11.1													9/12 (75%)	1/12 (8.3%)	2/12 (16.7%)	
MYBPC3	11p11.2													10/12 (83.3%)	2/12 (16.7%)		
NPC2	14q24.3													8/12 (66.7%)	3/12 (25%)	1/12 (8.3%)	
LAT	16p11.2													4/12 (33.3%)	6/12 (50%)	2/12 (16.7%)	
MYO5B	18q21.1													8/12 (66.7%)		4/12 (33.3%)	
FKBP8	19p13.11													1/12 (8.3%)	11/12 (91.7%)		
KCNJ6	21q22.13													8/12 (66.7%)		4/12 (33.3%)	
PPIL2	22q11.21													7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)		
PIK3CA, ex 10 (MUT)	3q26.32													10/12 (83.3%)			2/12 (16.7%)
PIK3CA, ex 21 (MUT)														9/12 (75%)			3/12 (25%)
EGFR, ex 21 E746 (MUT)	7p11.2													12/12 (100%)			
EGFR, ex 20 T790M (MUT)														12/12 (100%)			
EGFR, ex 21 L861Q (MUT)														12/12 (100%)			
EGFR, ex 21 L858R (MUT)														12/12 (100%)			
BRAF, ex 15 (MUT)	7q34													12/12 (100%)			
KRAS, ex 2 G12C (MUT)	12p12.1													12/12 (100%)			
ERBB2, ex 24 (MUT)	17q12													12/12 (100%)			

O gene *LAT* exibiu ganho em seis casos e perda em dois. O gene *NPC2* apresenta alterações em perda em 25% dos casos. No que se refere a mutações, apenas no gene *PIK3CA* foram observadas mutações: duas no exão 10 e três no exão 21.

### 4.4.3. Comparação dos resultados obtidos por MLPA em Adenocarcinomas e Carcinomas Epidermóides

A figura 27 mostra todas as alterações encontradas em ADC e CPCE, respetivamente, para os três estadios investigados.

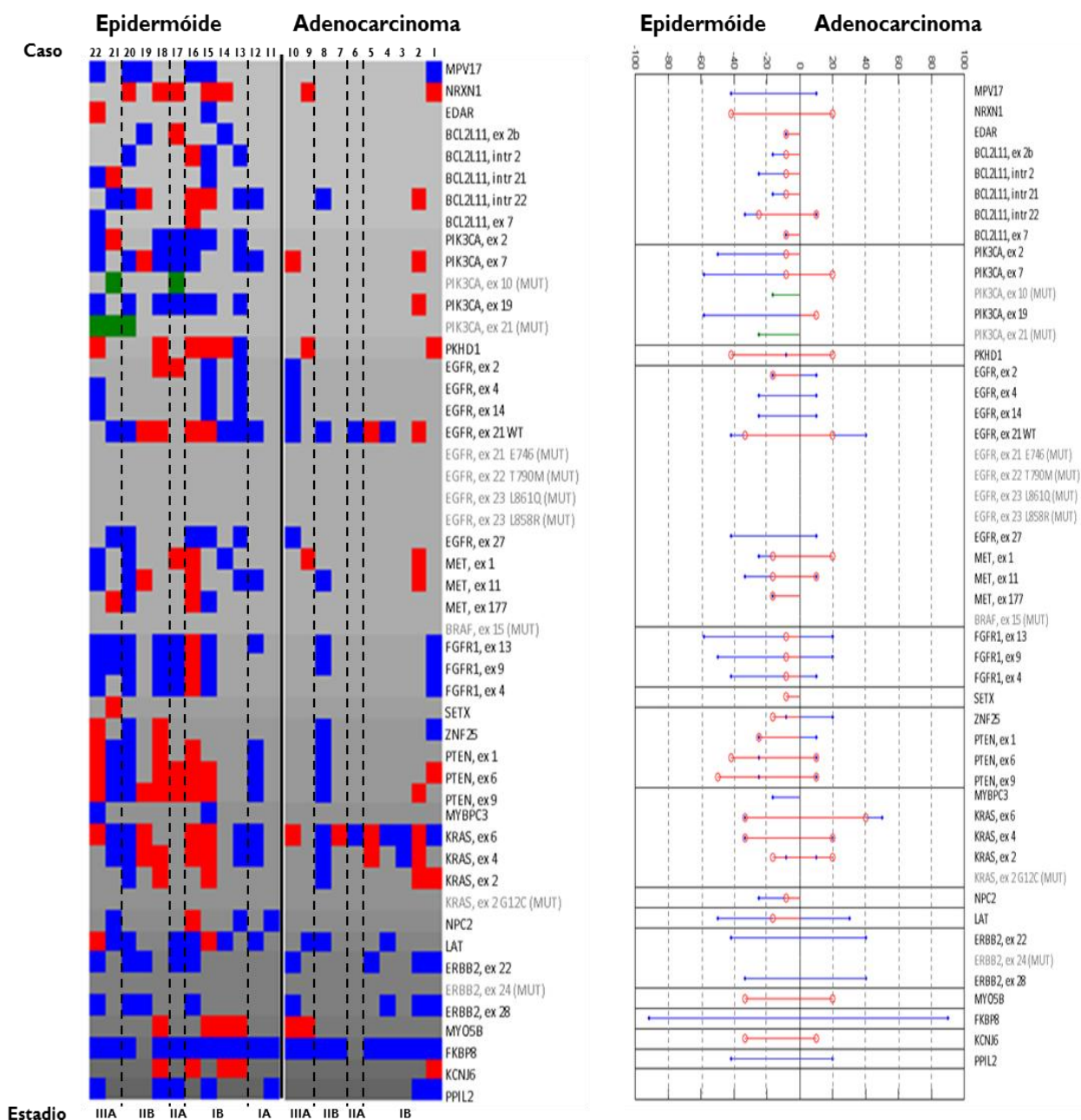


Figura 27 – Alterações encontradas no número de cópias em todos os genes analisados por MLPA, em ADC e CPCE. O azul corresponde a ganho, o vermelho a perda e o verde a mutação. O gráfico do lado direito evidencia também a frequência das alterações para cada um dos genes avaliados em ADC e CPCE.

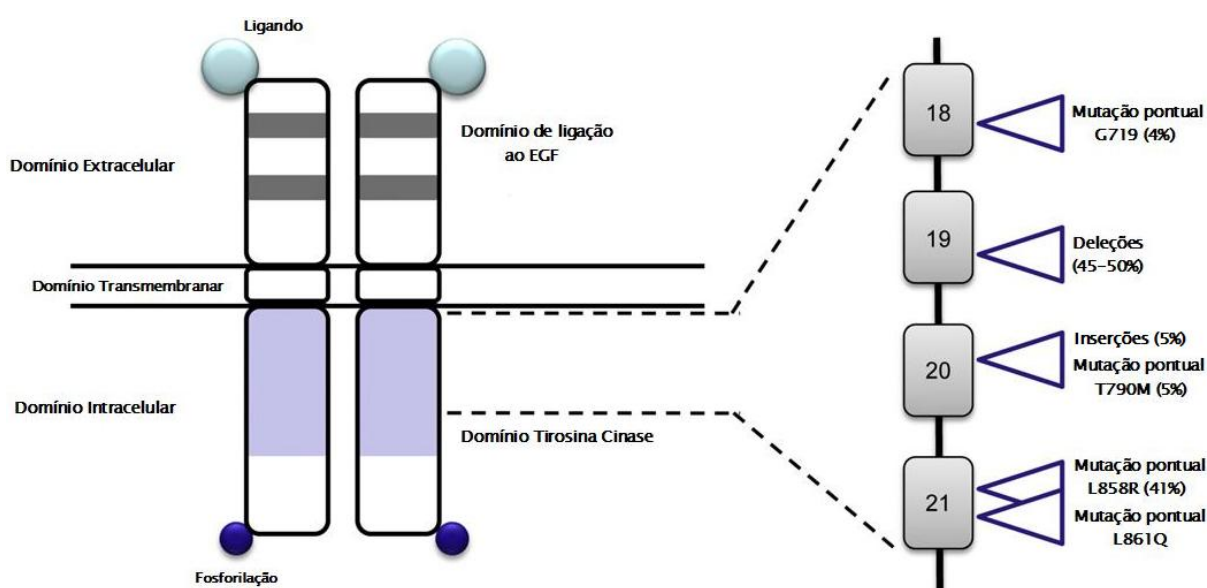
Estudos anteriores têm demonstrado que o domínio BH3 da proteína BCL2 é necessário para a indução da apoptose em tumores provenientes da desregulação de RTC. A deleção polimórfica de segmentos intrónicos do gene *BCL2L1* (2q13) parece estar associada a uma resposta inferior dos inibidores do EGFR, em CPNPC. Esta deleção de 2,9 Kb no intrão 2 altera o padrão de *splicing*, comprometendo a transcrição de exões que codificam o domínio BH3. Esta deleção foi encontrada em aproximadamente 12% de indivíduos saudáveis do leste asiático, estando ausente na população africana e europeia [101-102]. Neste estudo, o gene *BCL2L1* encontra-se praticamente inalterado em ADC. No entanto, em CPCE apresenta uma taxa de alteração em ganho no número de cópias superior à taxa de alteração em perda, sem com isso, demonstrar valores elevados de alteração. Deste modo, a deteção de deleção no gene *BCL2L1*, que confere resistência aos inibidores do EGFR, em doentes com CPNPC, poderá ter aplicabilidade diagnóstica e terapêutica.

Os resultados deste estudo mostraram que o ganho do gene *PIK3CA* (3q26.32) ocorre com frequência no CP, embora os diferentes subtipos histológicos difiram no nível de ganho. Estes resultados, tal como outros estudos encontrados na literatura [103-105], apoiam por isso a hipótese de que o aumento do número de cópias de *PIK3CA* é mais frequente em CPCE do que em ADC, e que, por isso, CPCE e ADC podem ter mecanismos diferentes de carcinogénese. A taxa de ganho neste gene variou entre 50% e 58.3% no CPCE. No entanto, os ADC apresentaram apenas perda do locus *PIK3CA*. Este resultado está de acordo com um estudo realizado por Wang e colaboradores [103]. Estudos anteriores têm também analisado mutações no gene *PIK3CA* em CPNPC e demonstraram que a sua frequência é relativamente baixa (3.4-4.3%) em comparação com outros tumores, tais como a mama, cólon e ovário [105]. Ainda assim, neste estudo o gene *PIK3CA* foi o único onde foram detetadas mutações: duas no exão 10 e três no exão 21. Estas duas mutações estudadas no gene *PIK3CA*, E545K (exão 10) e H1047R (exão 21), parecem conduzir a um aumento da ineficácia dos inibidores da via PI3K. Embora situações raras de alterações no número de cópias no gene *PTEN* (10q23.31), com taxas de alteração no número de cópias inferiores a 5%, possam ser consideradas como uma causa do CPNPC, a regulação negativa da proteína PTEN tem sido frequentemente descrita em 34-74% dos casos. Esta regulação negativa por hipermetilação do promotor pode estar associada a um silenciamento epigenético do gene [103]. No entanto, embora não existam na literatura estudos que evidenciem a diferença entre ADC e CPCE no que diz respeito às alterações para este gene, foi detetado um maior número de alterações em CPCE, com taxas de alteração em perda



compreendidas entre 33.3% e 58.3%. Recentemente, a perda de PTEN tem sido sugerida como um mecanismo potencial de resistência a inibidores do EGFR em CPNPC [106].

A amplificação do gene *EGFR* (7p11.2) parece estar associada com uma melhor sobrevida após o tratamento com inibidores do EGFR. Esta amplificação é mais comum em CPCE [18]. Neste estudo, foi encontrado maior taxa de ganho deste gene em CPCE, sem contudo, apresentar no geral diferenças proeminentes na distinção dos dois subtipos histológicos. Mutações em *EGFR* são também encontradas no CP, mais frequentemente em ADC [18]. No entanto neste estudo não foram detetadas quaisquer mutações. A figura 28 descreve as mutações reportadas no gene *EGFR*, evidenciando a resistência ou não destas mutações a inibidores do EGFR.



**Figura 28 – Mutações encontradas no gene *EGFR*, em CP [adaptado de 18].** Deleções, inserções e mutações pontuais estão localizados nos exões 19 a 21, que codificam para o domínio tirosina cinase do EGFR. A maioria dos tumores do pulmão albergando um alelo mutante do EGFR são altamente sensíveis a inibidores do EGFR, com até 70% dos pacientes exibindo uma resposta clínica significativa. Mutações no gene *EGFR*, no exão 21, mutações L858R e L861Q, estão envolvidas no aumento da sensibilidade a inibidores do EGFR [107]. Por outro lado, a mutação pontual T790M, no exão 20, parece estar associada com uma diminuição da atividade dos inibidores do EGFR [108]. Mutações nestes exões têm mostrado ativação preferencial da via PI3K/AKT, em detrimento da via RAS/MAPK [18].

A amplificação do gene *MET* (7q31.2) é um dos mecanismos mais importantes envolvidos na resistência a inibidores do EGFR. Estudos anteriores demonstraram que a ineficácia destes inibidores, resultado de ganhos no gene *MET*, é responsável pela ativação do recetor ERBB3 e da via PI3K/AKT [109-110]. Noutro estudo, foi mostrada que a amplificação do gene *MET* em doentes com resistência adquirida ao gefitinib ou erlotinib, confirma que o *MET* pode ser um alvo terapêutico clinicamente relevante para alguns doentes com resistência adquirida aos inibidores do EGFR. Esta amplificação do gene ocorre

independentemente da presença de mutações pontuais T790M no gene *EGFR* [111]. Neste estudo, e embora não existam diferenças relevantes no ganho do *MET* em ADC e CPCE [18], verificou-se um maior número de alterações para este gene em CPCE.

As amplificações no gene *FGFR1* (8p11.23-p11.22) têm sido identificadas como um dos eventos preponderantes na carcinogénese da mama e pulmão. Um estudo baseado na análise do número de cópias de SNPs, detetou ganho em 21% de CPCE em comparação com os 3.4% de ADC [44]. Também neste estudo as alterações no gene *FGFR1* evidenciam as diferenças entre CPCE e ADC. Enquanto que as taxas de alteração em ganho em ADC exibem valores de 10-20%, em CPCE estas taxas atingem valores de 41.7-58.3%. Assim, estes resultados sugerem que o gene *FGFR1* pode ser um alvo terapêutico atrativo em CPNPC, uma vez que a amplificação do gene poderá conduzir à ineficácia de inibidores do FGFR.

A amplificação no gene *KRAS* (12p12.1) é uma alteração molecular comum em CPNPC, caracterizada em aproximadamente 15% dos tumores. Esta alteração está associada a indicadores de agressividade local, e pode agir sinergicamente com mutações no gene *KRAS*, promovendo a progressão tumoral [112]. Neste estudo não foi possível estabelecer um padrão de alteração diferente em ADC e CPCE. Nos dois subtipos histológicos foram detetadas várias alterações no número de cópias com taxas de alteração em ganho e perda muito semelhantes. Assim, as muitas alterações no gene *KRAS* parecem não ser indicativas da maior propensão destas alterações para um ou outro subtipo histológico. As mutações no gene *KRAS* são detetadas maioritariamente em carcinomas relacionados com o tabagismo e associados com um prognóstico desfavorável, independentemente do tratamento. A mutação G12C no gene *KRAS* é a mais frequente em doentes com CP e pode estar relacionada com a resistência oferecida aos inibidores do EGFR [113]. Ainda assim, em nenhum dos 22 doentes analisados foi detetada qualquer mutação para este gene.

Na literatura está reportado que a proteína ERBB2 é sobre-expressa em cerca de 20% de CPNPC. No entanto, a amplificação do gene *ERBB2* ocorre em apenas 2% dos casos [114]. Neste estudo não foram encontradas perdas génicas neste gene. As taxas de alteração em ganho rondaram os 40% em ambos os subtipos histológicos, sendo difícil, deste modo, usar as alterações detetadas neste gene para diferenciar ADC e CPCE. Doentes que apresentam amplificação ou mutação 2322\_2323ins12 no gene *ERBB2* podem beneficiar do tratamento com transtuzumab [115]. Contudo, esta mutação no exão 24 do gene *ERBB2* não foi encontrada em nenhum caso analisado neste estudo.

Outra mutação que não foi identificada em nenhum dos casos analisados corresponde à mutação BRAF V600E. Este tipo de mutações encontradas no gene *BRAF* (7q34) são detetadas em 0.5-4% em doentes com CP, mais frequente em ADC e em mulheres, e podem conduzir a uma maior sensibilidade dos inibidores BRAF V600E [116].

Na tabela 8 estão descritos todos os resultados obtidos por dois testes estatísticos, com o intuito de descobrir quais os genes que poderão dar indicação das diferenças encontradas entre os dois subtipos histológicos, recorrendo à técnica de MLPA.

**Tabela 8 – Resultados obtidos pelos testes exatos de Fisher e qui-quadrado com recurso a simulação de Montecarlo, usando 10000 amostras.** Foram considerados resultados estatisticamente significativos (representados a negrito) aqueles com *p* de value < 0.050.

Cromossoma	Gene, exão	p	Cromossoma	Gene, exão	p	Mutação	p
2	<i>BCL2L11</i> , ex 2b	0.476	8	<i>FGFR1</i> , ex 13	0.056	PIK3CA, ex 10 (MUT)	0.481 <sup>F</sup>
	<i>BCL2L11</i> , intr 2	0.151		<i>FGFR1</i> , ex 9	0.135	PIK3CA, ex 21 (MUT)	0.221 <sup>F</sup>
	<i>BCL2L11</i> , intr 2	0.476		9	<i>FGFR1</i> , ex 4	0.106	EGFR, ex 21 E746 (MUT)
	<i>BCL2L11</i> , intr 2	0.253	<i>SETX</i>		1.000 <sup>F</sup>	EGFR, ex 20 T790M (MUT)	(1) <sup>F</sup>
	<i>BCL2L11</i> , ex 7	1.000	10	<i>PTEN</i> , ex 1	0.169	EGFR, ex 21 L861Q (MUT)	(1) <sup>F</sup>
	<i>MPV17</i>	0.162 <sup>F</sup>		<i>PTEN</i> , ex 6	0.116	EGFR, ex 21 L858R (MUT)	(1) <sup>F</sup>
	<i>NRXN1</i>	0.381 <sup>F</sup>		<i>PTEN</i> , ex 9	<b>0.040</b>	BRAF, ex 15 (MUT)	(1) <sup>F</sup>
	<i>EDAR</i>	1.000		<i>ZNF25</i>	0.587	KRAS, ex 2 G12C (MUT)	(1) <sup>F</sup>
		<i>MYBPC3</i>		0.481 <sup>F</sup>	ERBB2, ex 24 (MUT)	(1) <sup>F</sup>	
3	PIK3CA, ex 2	<b>0.007</b>	13				
	PIK3CA, ex 7	<b>0.013</b>	14	KRAS, ex 6	0.481		
	PIK3CA, ex 19	<b>0.009</b>		KRAS, ex 4	0.639		
6	<i>PKHD1</i>	0.276		KRAS, ex 2	1.000		
7	<i>EGFR</i> , ex 2	0.587	15	<i>NPC2</i>	0.151		
	<i>EGFR</i> , ex 4	0.364	16	<i>LAT</i>	0.191		
	<i>EGFR</i> , ex 14	0.594 <sup>F</sup>	17	<i>ERBB2</i> , ex 22	1.000 <sup>F</sup>		
	<i>EGFR</i> , ex 21 WT	0.863		<i>ERBB2</i> , ex 28	1.000 <sup>F</sup>		
	<i>EGFR</i> , ex 27	0.162 <sup>F</sup>	18	<i>MYO5B</i>	0.646 <sup>F</sup>		
	<i>MET</i> , ex 1	0.296	19	<i>FKBP8</i>	1.000 <sup>F</sup>		
	<i>MET</i> , ex 11	0.394	20	<i>KCNJ6</i>	0.323 <sup>F</sup>		
	<i>MET</i> , ex 17	0.227	21	<i>PPIL2</i>	0.381 <sup>F</sup>		

Com base na análise estatística foi testada uma regressão logística com a variável dependente para identificar quais os genes que acentuam a diferença entre os subtipos histológicos, ADC e CPCE. Os exões 2, 7 e 19 do gene *PIK3CA* e o exão 9 do gene *PTEN* são os indicadores desta diferença. Ainda assim, os modelos ajustados não se revelaram estatisticamente significativos, o que pode estar relacionado com o número diminuto de casos.

Depois de analisados os diferentes genes em termos de alterações no número de cópias, e de identificadas todas as evidências de ganhos e perdas de material genético em ADC e CPCE, torna-se essencial aprovar e validar a técnica de MLPA, e em particular o painel *SALSA MLPA probemix XO50-A1 Lung cancer*, em futuros testes de diagnóstico. Uma vez que todos os genes incluídos no painel têm como finalidade a terapêutica, confirma-se, deste

modo, a importância desta técnica, rápida e com custos comportáveis com o diagnóstico, bem como deste painel, no auxílio do clínico no tratamento e na aprovação destes genes e direcionamento para o fármaco indicado. Contudo, a utilização de apenas um painel de sondas não permite estabelecer um padrão característico de alterações nos diversos cromossomas. Deste modo, a complementaridade de novos painéis de sondas permitirá de forma mais consistente determinar um padrão de alterações característico no seu genoma. Surge então a necessidade de desenvolver outros painéis direcionados, que abranjam um maior número de genes, tais como, *MYC*, *SOX2*, *ERBB3*, *MAP2K1*, *CDKN2A*, *FHIT* e *STK11*. Uma vez que se encontram altamente mutados no CP [18,37], seria importante incluir também neste painel mutações nos genes *TP53* e *STK11*. Estes genes surgem assim, e depois de realizado o *screening* de todo o genoma, por aCGH, como potenciais biomarcadores no diagnóstico, em MLPA.

Ainda assim, este painel contém 13 sondas de referência bastante alteradas no número de cópias e, embora não estejam ainda associadas à carcinogénese pulmonar, poderão vir a tornar-se potenciais biomarcadores de diagnóstico no futuro. A proteína codificada pelo gene *FKBP8* (19p13.11) desempenha um papel importante na imunorregulação e em processos celulares básicos envolvendo o *folding* e o tráfico de proteínas. Para além disso a forma ativa da proteína *FKBP8* pode desempenhar um papel importante na regulação da apoptose [116]. Este gene exhibe ganho em 91% (20/22) da totalidade dos casos. Outro gene bastante alterado foi o gene *LAT* (16p11.2) demonstrando ganho em 41% (9/22) e perda em 9% (2/22). A proteína codificada pelo gene *PKHD1* (6p12.2) parece estar envolvida na correta divisão celular, através da regulação dos centrossomas [117]. Neste estudo, este gene apresenta ganho num só doente e perda de material genético em 32% (7/22) dos casos. Nestes 13 genes foi ainda detetada alguma coerência no número de alterações: os genes *MPV17* (2p23.3) e *PPIL2* (22q11.21) evidenciaram apenas ganho, e os genes *NRXN1* (2p16.3), *MYO5B* (18q21.1) e *KCNJ6* (21q22.13) revelaram apenas perda de informação génica, com taxas de alteração compreendidas entre 22% e 32%. Os restantes genes, ainda que alterados em pelo menos um caso, evidenciaram menor número de alterações. Assim, é notória a necessidade de alterar algumas destas regiões do painel, dada a possível envolvência destas regiões no CP, sem com isso, sugerir a realização de estudos posteriores direcionados para estes genes, no sentido de confirmar ou não a relação dos mesmos, ou das regiões, com a carcinogénese pulmonar.

#### 4.5. Comparação dos resultados obtidos por aCGH e MLPA

Para realizar a análise genética ao nível de múltiplos ganhos e perdas, as tecnologias de eleição foram o aCGH e o MLPA, mostrando serem eficientes para o *screening* de variações no número de cópias (figura 29). Neste sentido, uma primeira abordagem envolvendo todo o genoma, por aCGH, foi realizada a fim de identificar as principais alterações encontradas na totalidade dos cromossomas. Posteriormente, foi utilizado um painel de sondas específico e direcionado para as alterações mais representativas e indicativas da carcinogénese pulmonar através técnica de MLPA. Assim, a avaliação de grande parte do genoma reportado como associado ao CP é utilizado para prever a possibilidade de progressão e recidiva deste carcinoma. A identificação de biomarcadores que possam ser utilizados para complementar o diagnóstico, a possível previsão do prognóstico e a determinação de alterações consistentes com a resistência aos diferentes inibidores usados hoje na prática clínica, revestem-se de grande importância e são alguns dos grandes objetivos das investigações realizadas nesta área.

Na tabela 9 estão enumeradas todas as alterações encontradas em ADC e CPCE, através das metodologias de aCGH e MLPA. Esta comparação não é feita em termos de mutação, uma vez que no aCGH não são detetadas mutações.

Os resultados obtidos por aCGH e MLPA foram, no geral, similares para os 22 casos analisados. No entanto, esta concordância foi maior nos genes *PIK3CA* e *FGFR1*, e em CPCE, evidenciando, deste modo, a realização de diagnósticos mais precoces nestes tumores (tabela 9).

Ainda assim, encontramos alguns casos em que no aCGH se deteta alteração e no MLPA não, e vice-versa. Para além disso, embora num número muito reduzido, a técnica de MLPA exhibe perda para uma determinada região e o aCGH demonstra ganho. Esta situação é visível no exão 21 do gene *EGFR* e no gene *KRAS*. O contrário nunca se verifica. Várias explicações poderão justificar esta incoerência nos resultados. As técnicas de aCGH e MLPA apresentam diferentes sensibilidades para a deteção de mosaicismo. Na maioria dos casos, sempre que se verificou divergência entre os resultados, constatou-se nessas situações que os rácios obtidos por MLPA se encontravam no limiar dos *cutoffs* estabelecidos para definir as alterações. Assim, com o estudo de um maior número de doentes poderá conseguir-se aferir ainda mais a capacidade de análise deste tipo de amostras por MLPA e eventualmente ajustar os valores de *cutoff* previamente definidos.

**Tabela 9 - Resultados obtidos para os 22 casos, referentes às alterações presentes no tecido tumoral, utilizando as técnicas de aCGH e MLPA. A azul está representado ganho e a vermelho perda de material genético. As sondas a roxo correspondem às sondas de referência do painel.**

Gene, Exão	Estádio	Adenocarcinoma										Epidermóide												
		Caso	IB				IIA		IIB		IIIA		IA		IB		IIA		IIB		IIIA			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Posição Cromossómica	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA	aCGH	MLPA		
<i>BCL2L1</i> , ex 2b	2q13																							
<i>BCL2L1</i> , intr 2																								
<i>BCL2L1</i> , intr 2																								
<i>BCL2L1</i> , intr 2																								
<i>BCL2L1</i> , ex 7																								
<i>PIK3CA</i> , ex 2	3q26.32																							
<i>PIK3CA</i> , ex 7																								
<i>PIK3CA</i> , ex 19																								
<i>EGFR</i> , ex 2	7p11.2																							
<i>EGFR</i> , ex 4																								
<i>EGFR</i> , ex 14																								
<i>EGFR</i> , ex 21 Wild type																								
<i>EGFR</i> , ex 27																								
<i>MET</i> , ex 1	7q31.2																							
<i>MET</i> , ex 11																								
<i>MET</i> , ex 17																								
<i>FGFR1</i> , ex 13	8p11.23																							
<i>FGFR1</i> , ex 9	8p11.22																							
<i>FGFR1</i> , ex 4																								
<i>PTEN</i> , ex 1	10q23.31																							
<i>PTEN</i> , ex 6																								
<i>PTEN</i> , ex 9																								
<i>KRAS</i> , ex 6	12p12.1																							
<i>KRAS</i> , ex 4																								
<i>KRAS</i> , ex 2																								
<i>ERBB2</i> , ex 22	17q12																							
<i>ERBB2</i> , ex 28																								
<i>MPV17</i>	2p23.3																							
<i>NRXN1</i>	2p16.3																							
<i>EDAR</i>	2q12.3																							
<i>PKHDI</i>	6p12.2																							
<i>SETX</i>	9q34.13																							
<i>ZNF25</i>	10p11.1																							
<i>MYBPC3</i>	11p11.2																							
<i>NPC2</i>	14q24.3																							
<i>LAT</i>	16p11.2																							
<i>MYO5B</i>	18q21.1																							
<i>FKBP8</i>	19p13.11																							
<i>KCNJ6</i>	21q22.13																							
<i>PPIL2</i>	22q11.21																							



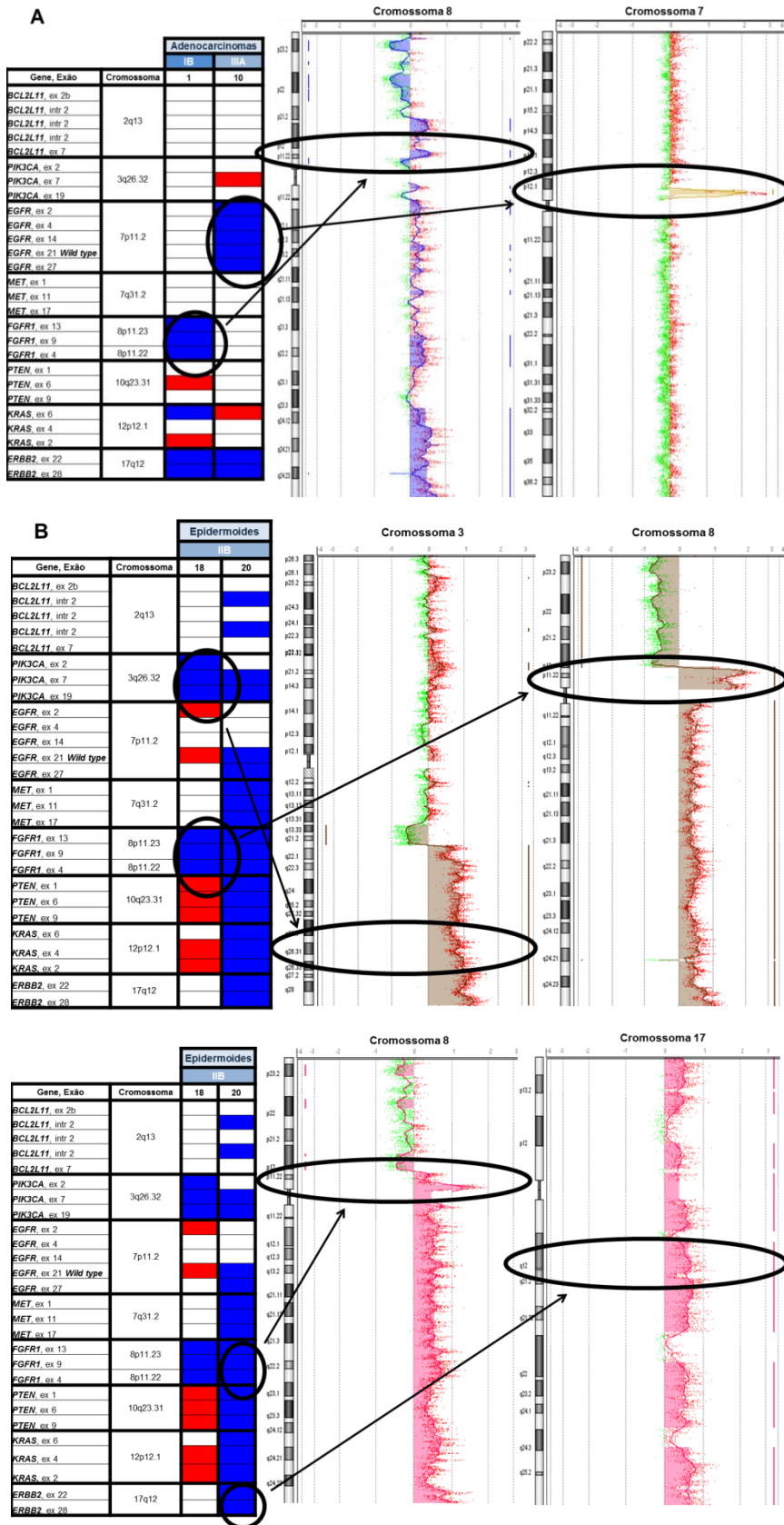
Por outro lado, este maior número de células não tumorais presente na amostra, capaz de mascarar as alterações das células tumorais, faz com que o MLPA não demonstre sensibilidade suficiente para discriminar estas alterações. Estes dois aspetos reforçam a dificuldade de analisar amostras com elevados níveis de mosaicismo. Na maioria das amostras de ADC analisadas neste estudo, a percentagem de células neoplásicas é baixa. De facto, só o caso I apresenta um nível elevado de células tumorais (90%). Este caso exibiu o maior número de alterações em ADC. No entanto, os casos 5, 7 e 10 revelaram menor número de alterações e apresentam 40%, e 30% de células tumorais para os dois últimos casos, respetivamente.

Outra justificação provável para os diferentes resultados obtidos deve-se ao fato de não haver correspondência entre as sondas no aCGH e no MLPA, isto é, em nenhum dos genes analisados, as sondas têm a mesma localização no genoma. Deste modo, é possível detetar num mesmo gene ganho, no aCGH, e perda no MLPA, ou então só ganho ou só perda numa das técnicas. Para além disso o número de sondas em cada gene, no aCGH, mostrou-se reduzido para este tipo de estudos. Esta situação é ainda mais evidente nas sondas de referência, tendo os dois genes mais alterados, *FKBP8* e *LAT*, uma só sonda no aCGH. Por este motivo, seria importante a realização de estudos adicionais direcionados para estas regiões, envolvendo formatos *microarray* com um maior número de sondas e específico para cancro. Idealmente, cada gene deveria conter no mínimo três sondas específicas, dando deste modo credibilidade à alteração encontrada.

#### **4.6. Comparação do perfil genómico do tecido tumoral com o perfil genómico da cultura, através de MLPA**

A importância das culturas celulares como modelos de doenças é controversa, uma vez que estas, devido às pressões de seleção *in vitro*, podem tornar-se altamente divergentes do tumor original. No entanto, Gazdar e colaboradores demonstraram que as culturas celulares do CP permitem realizar estudos precisos do tumor original, verificando que as alterações genéticas nas linhas celulares deste carcinoma refletem o tumor *in vivo* e, portanto, podem ser uma ferramenta valiosa para o estudo do seu desenvolvimento e progressão [118]. As culturas celulares têm desempenhado um papel fundamental em algumas descobertas importantes na carcinogénese pulmonar: identificação de regiões altamente amplificadas, perda do cromossoma 3p e identificação de genes supressores tumorais inativos, elucidação da via RB-CDKN2A, ampliações e mutações no gene *PIK3CA*





**Figura 29 – Resultados obtidos por aCGH e MLPA, analisados pelos softwares Agilent Genomic Workbench e GeneMapper, respetivamente. Estas figuras constituem exemplos dos inúmeros desequilíbrios no número de cópias de múltiplas regiões genómicas. (A) Resultados obtidos nos genes *EGFR* e *FGFR1*, em ADC. (B) Resultados obtidos nos genes *PIK3CA*, *FGFR1* e *ERBB2*, em amostras de CPCE.**

no CPCE, mutações nos genes *TP53* e *BRAF* em outros tumores do pulmão, para além do CPNPC e mutações no gene *EGFR* e resposta aos inibidores do EGFR, em CPNPC [118].

A relevância das culturas celulares para estudos moleculares depende do quão estas culturas se assemelham aos tumores primários. Neste estudo, culturas primárias de CP estabelecidas previamente e criopreservadas, correspondentes aos casos cujo perfil genómico foi avaliado, foram comparadas com as regiões de ganho e perda de material genético frequentes nas amostras tumorais de ADC e CPCE. A tabela 10 resume todas as alterações encontradas, por MLPA, no tecido tumoral e nas culturas celulares correspondentes.

Dos 22 casos analisados, dispúnhamos apenas de células primárias em cultura de tecidos tumorais correspondentes aos casos 1, 4, 7, 9 e 15. Estas células levaram, em média, 3 dias a crescer, após o descongelamento em azoto líquido. Depois de verificada a total confluência das células ao microscópio invertido, foram realizadas subculturas, de modo a garantir a manutenção destas células em cultura. Passados, em média, 3 dias, e verificada uma nova confluência total das células, procedeu-se ao desbaste das mesmas para posterior extração de DNA.

Durante a observação ao microscópio das células em cultura foi visível uma aparente abundância de fibroblastos em detrimento de células epiteliais tumorais. Os fibroblastos apresentam uma morfologia fusiforme com prolongamentos citoplasmáticos e, as células epiteliais ocorrem, frequentemente, em aglomerados celulares, com células mais arredondadas e com núcleos pleomórficos com vários nucléolos. Nas cinco culturas analisadas não foi possível encontrar células com estas características. Ainda assim, depois de extraído o DNA, estas amostras foram analisadas por MLPA, utilizando o painel de sondas *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer*.

Ao contrário do descrito na literatura, nas cinco culturas celulares utilizadas não foi possível encontrar muitas alterações. No geral, as frequências de ganhos e/ou perdas de material genético em culturas celulares são maiores do que os correspondentes tecidos tumorais, o que pode refletir (1) a preferência da cultura por tumores que contêm alterações no número de cópias em regiões cruciais que englobam oncogenes e genes supressores de tumores, (2) situações de mosaicismo menos evidenciadas, ou (3) a promoção da instabilidade genómica, reflexo dos curtos tempos de duplicação das células em cultura [118].

**Tabela 10 - Resultados obtidos para os casos 1, 4 7, 9 e 15, referentes às alterações presentes no tecido tumoral e nas culturas celulares, utilizando o painel de sondas SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer. A azul está representado ganho e a vermelho perda de material genético. As sondas a roxo correspondem às sondas de referência do painel. As últimas nove sondas, representadas na tabela, correspondem às sondas de mutação.**

Gene, Exão	Estadio	Adenocarcinoma							Epidermóide		
		IB				IIB		IIIA		IB	
		1	1 Cultura	4	4 Cultura	7	7 Cultura	9	9 Cultura	15	15 Cultura
<i>BCL2L11</i> , ex 2b	2q13										
<i>BCL2L11</i> , intr 2											
<i>BCL2L11</i> , intr 2											
<i>BCL2L11</i> , intr 2											
<i>BCL2L11</i> , ex 7											
<i>PIK3CA</i> , ex 2	3q26.32										
<i>PIK3CA</i> , ex 7											
<i>PIK3CA</i> , ex 19											
<i>EGFR</i> , ex 2	7p11.2										
<i>EGFR</i> , ex 4											
<i>EGFR</i> , ex 14											
<i>EGFR</i> , ex 21 <i>Wild type</i>											
<i>EGFR</i> , ex 27											
<i>MET</i> , ex 1	7q31.2										
<i>MET</i> , ex 11											
<i>MET</i> , ex 17											
<i>FGFR1</i> , ex 13	8p11.23										
<i>FGFR1</i> , ex 9	8p11.22										
<i>FGFR1</i> , ex 4											
<i>PTEN</i> , ex 1	10q23.31										
<i>PTEN</i> , ex 6											
<i>PTEN</i> , ex 9											
<i>KRAS</i> , ex 6	12p12.1										
<i>KRAS</i> , ex 4											
<i>KRAS</i> , ex 2											
<i>ERBB2</i> , ex 22	17q12										
<i>ERBB2</i> , ex 28											
<i>MPV17</i>	2p23.3										
<i>NRXN1</i>	2p16.3										
<i>EDAR</i>	2q12.3										
<i>PKHD1</i>	6p12.2										
<i>SETX</i>	9q34.13										
<i>ZNF25</i>	10p11.1										
<i>MYBPC3</i>	11p11.2										
<i>NPC2</i>	14q24.3										
<i>LAT</i>	16p11.2										
<i>MYO5B</i>	18q21.1										
<i>FKBP8</i>	19p13.11										
<i>KCNJ6</i>	21q22.13										
<i>PPIL2</i>	22q11.21										
<i>PIK3CA</i> , ex 10 (MUT)	3q26.32										
<i>PIK3CA</i> , ex 21 (MUT)											
<i>EGFR</i> , ex 21 <b>E746</b> (MUT)	7p11.2										
<i>EGFR</i> , ex 20 <b>T790M</b> (MUT)											
<i>EGFR</i> , ex 21 <b>L861Q</b> (MUT)											
<i>EGFR</i> , ex 21 <b>L858R</b> (MUT)											
<i>BRAF</i> , ex 15 (MUT)	7q34										
<i>KRAS</i> , ex 2 <b>G12C</b> (MUT)	12p12.1										
<i>ERBB2</i> , ex 24 (MUT)	17q12										

No total foram encontradas sete alterações nas células previamente estabelecidas em cultura: o caso 1 exibiu ganho no exão 6 do gene *KRAS*; o caso 4 demonstrou ganho nos exões 4 e 6 do gene *KRAS* e perda numa das regiões do intrão 2 do gene *BCL2L11*. Para os casos 7 e 9, não foram observadas quaisquer alterações. No caso 15, verifica-se o maior número de alterações (57% do total): ganho nos exões 14 e 21 do gene *EGFR*, no exão 9 do gene *FGFR1* e nos exões 4 e 6 do gene *KRAS*. Este último caso demonstrou ainda perda numa das regiões intrónicas do gene *BCL2L11*. Para além disso, nenhuma sonda de referência apresentou qualquer alteração na cultura. A presença de mutações avaliadas por este painel na cultura foi também colocada de parte. No geral, estes resultados não são concordantes com os obtidos nos tecidos tumorais. Assim, não é possível validar estas culturas celulares como potenciais modelos para outros estudos, uma vez que não aparentam ter as mesmas alterações do tecido. Contudo, é necessário ter em conta o número reduzido de amostras estudadas, comparativamente com os demais estudos referidos na literatura [118].

#### 4.7. Resultados obtidos por *Touch FISH*

A instabilidade genómica é característica do cancro. As células tumorais frequentemente apresentam-se poliploides ou com um conteúdo cromossómico aneuploide. Recorrendo a sondas específicas de *FISH* é possível analisar estas alterações, o que permite complementar os resultados obtidos pelas técnicas de aCGH e MLPA. A técnica de *Touch FISH* em interfase realizada nas biópsias de tecido tumoral permitiu comparar os resultados obtidos para os genes analisados por esta técnica e os mesmos genes analisados por aCGH e/ou MLPA. Assim, surge a tentativa de validar os resultados obtidos para as biópsias tumorais por outra tecnologia, por comparação com os resultados obtidos anteriormente. Para além da validação dos resultados pretende-se ainda comparar a fiabilidade destas duas técnicas. A avaliação de células individuais em interfase permite ainda verificar a presença de mosaicismo.

Neste sentido, a título exploratório, foram selecionados cinco casos: 9, 10, 15, 20 e 21. Ainda assim, em dois destes cinco casos não foi possível implementar esta estratégia direcionada. Os casos 9 e 21, ambos em estadio IIIA, de ADC e CPCE, respectivamente, não apresentam qualquer alteração no aCGH, nas regiões consideradas preponderantes no CP. Era por isso, importante, tentar perceber, para os genes disponíveis no conjunto de sondas *LAVision*, se se encontravam alterações que corroborassem os resultados obtidos por aCGH. Contudo, não foi possível, uma vez que as biópsias disponibilizadas se encontravam aparentemente danificadas. Embora tenha sido efetuado todo o protocolo de *Touch FISH*

descrito anteriormente (capítulo 3.6), não foi possível visualizar qualquer sinal após a hibridização. Para além da possível degradação da amostra, poderão contribuir para esta ausência de resultados, falhas nos tempos de lavagem e erros na hibridização. Ainda assim, este protocolo foi repetido, mas novamente sem sucesso.

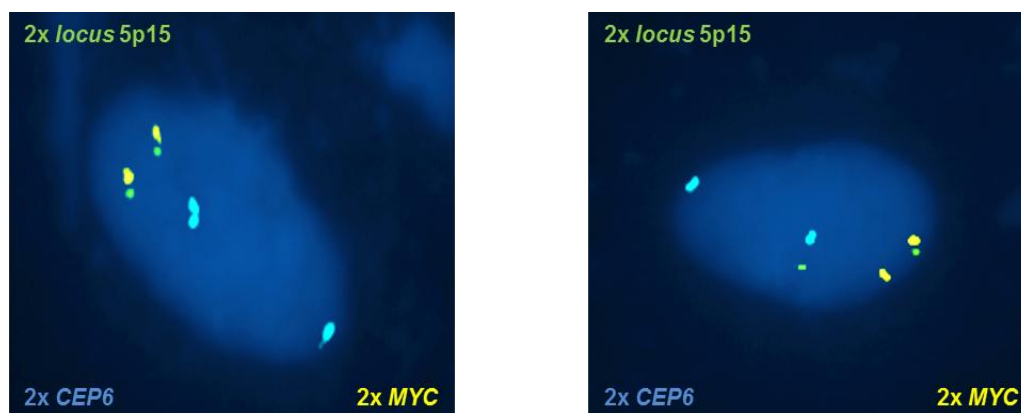
No que diz respeito ao caso 10, era importante tentar validar a grande amplificação encontrada no gene *EGFR*, bastante evidenciada por aCGH e MLPA. O número de núcleos interfásicos passíveis de serem contabilizados foi reduzido, o que impossibilitou a contabilização de 100 núcleos, tornando apenas possível analisar 65 (tabela 11).

**Tabela 11 – Resultados obtidos pela técnica de *Touch FISH* para o caso 10 (ADC, estadio IIIA), utilizando o conjunto de sondas *LAVysion*.**

Número de células	Nº Sinais <i>D5S23/D5S271</i> 5p15	Número de células	Nº Sinais <i>CEP 6</i> (Sonda centromérica do cromossoma 6)	Número de células	Nº Sinais <i>MYC</i> 8q24.21
65/65 (100%)	2	65/65 (100%)	2	65/65 (100%)	2

Como observado na tabela 11, dos 65 núcleos analisados, em todos se contabilizaram dois sinais para o *locus* 5p15 e para o gene *MYC* e dois sinais para o centrómero do cromossoma 6, o que nos permite aferir que todas as células avaliadas são aparentemente normais, isto é, diplóides para este cromossoma. Na figura 30, é possível observar a morfologia dos núcleos a azul (DAPI) e as diferentes cores correspondem aos sinais fluorescentes detetados aquando a hibridização das sondas com as sequências complementares das amostras tumorais. Neste caso não foram contabilizados os sinais referentes ao gene *EGFR*, uma vez que estes não se revelaram conclusivos, dado o inúmero ruído encontrado nesta sonda.

Os resultados de aCGH indicam que o *locus* 5p15 e o gene *MYC* não detêm qualquer alteração, estando deste modo, concordantes com os resultados obtidos por *Touch FISH*.



**Figura 30 – Imagens de *Touch FISH* em células interfásicas representativas dos resultados obtidos para o caso 10 (ADC, estadio IIIA), com o conjunto de sondas *LAVysion*. Para este caso não foram contabilizados os sinais referentes ao gene *EGFR*.**

Para o caso 15, o número total de núcleos contabilizados foi 100 e, portanto, os resultados obtidos são representativos da amostra. Os dados encontrados na tabela 12 foram bastante díspares, tornando-se assim difícil tirar conclusões fidedignas. Estes resultados permitem-nos comprovar a constituição heterogénea do tumor e, portanto, a existência de vários subclones celulares com diferentes alterações genéticas. No geral, o estudo do *locus* 5p15 e dos genes *EGFR* e *MYC* é indicativo de diferentes taxas de amplificação. Por outro lado, os diferentes sinais encontrados na sonda centromérica do cromossoma 6 são indicativos da presença de células polissómicas. A figura 31 representa três núcleos interfásicos hibridizados com o conjunto de sondas *LAVision*, no caso 15.

Tabela 12 – Resultados obtidos pela técnica de *Touch FISH* para o caso 15 (CPCE, estadio IB), utilizando o conjunto de sondas *LAVision*

Número de células	Nº Sinais D5S23/D5S271 5p15	Número de células	Nº Sinais CEP 6 (Sonda centromérica do cromossoma 6)	Número de células	Nº Sinais EGFR 7p11.2	Número de células	Nº Sinais MYC 8q24.21
10/100 (10%)	3	2/100 (2%)	3				
		3/100 (3%)	4				
16/100 (16%)	5	6/100 (6%)	5				
31/100 (31%)	6	21/100 (21%)	6	14/100 (14%)	6	10/100 (10%)	6
21/100 (21%)	7	22/100 (22%)	7	27/100 (27%)	7	21/100 (21%)	7
14/100 (14%)	8	33/100 (33%)	8	17/100 (17%)	8	14/100 (14%)	8
8/100 (8%)	9	9/100 (9%)	9	15/100 (15%)	9	23/100 (23%)	9
		4/100 (4%)	10	6/100 (6%)	10	9/100 (9%)	10
				14/100 (14%)	11	8/100 (8%)	11
				7/100 (7%)	12	6/100 (6%)	12
						4/100 (4%)	13
						5/100 (5%)	14

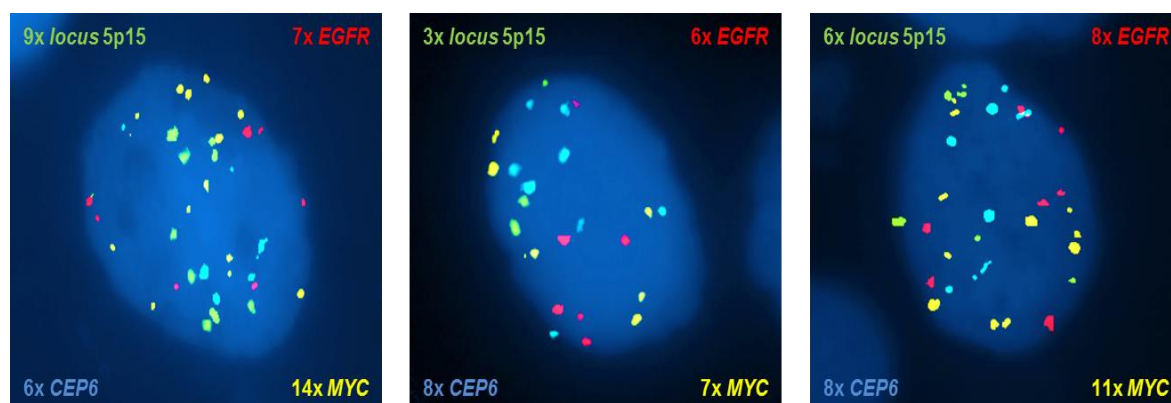


Figura 31 – Imagens de *Touch FISH* em células interfásicas representativas dos resultados obtidos para o caso 15 (CPCE, estadio IB), com o conjunto de sondas *LAVision*.

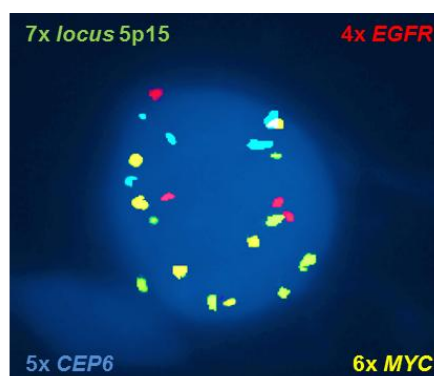
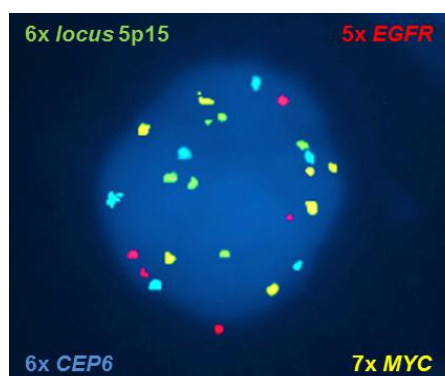
Embora não existam resultados de MLPA para o gene *MYC*, neste caso foi detetado, por aCGH, ganho neste gene, correspondente a um elevado número de cópias. Estes dados de aCGH são bastante concordantes com os obtidos por *Touch FISH*. Face aos resultados conseguidos por aCGH e MLPA, também o gene *EGFR* exibiu ganho por *Touch FISH*. No que

se refere ao *locus* 5p15, o resultado de aCGH não é concordante com o de *Touch FISH*. Uma possível explicação para esta divergência de resultados poderá ser devido ao fato de estarmos a comparar material diferente, uma vez que parte da biópsia de tecido tumoral de onde proveio o DNA para a aplicação da técnica de aCGH, poderia apresentar uma elevada percentagem de células não tumorais, comparativamente à restante porção que foi analisada por *Touch FISH*. Assim, o maior número de células normais presentes na biópsia tumoral analisada por aCGH, poderá explicar a ausência de alteração neste *locus*, assumindo, dado o elevado número de sinais encontrado para esta sonda, que os resultados de *Touch FISH* são verdadeiros.

Relativamente ao caso 20, o número de núcleos interfásicos passíveis de serem contabilizados foi bastante reduzido. Os resultados descritos na tabela 13 foram também bastante diferentes, comprovando a heterogeneidade do tumor e, portanto, a existência de vários subclones celulares com diferentes alterações genéticas. No geral, os diversos sinais encontrados na sonda centromérica do cromossoma 6 são indicativos da presença de células polissómicas. O estudo do *locus* 5p15 e dos genes *EGFR* e *MYC* é indicativo de diferentes taxas de amplificação. Na figura 32 são apresentados dois núcleos interfásicos hibridizados com o conjunto de sondas *LAVysion*, no caso 20.

**Tabela 13 – Resultados obtidos pela técnica de *Touch FISH* para o caso 20 (CPCE, estadio IIB), utilizando o conjunto de sondas *LAVysion*.**

Número de células	Nº Sinais <i>D5S23/D5S271</i> 5p15	Número de células	Nº Sinais <i>CEP 6</i> (Sonda centromérica do cromossoma 6)	Número de células	Nº Sinais <i>EGFR</i> 7p11.2	Número de células	Nº Sinais <i>MYC</i> 8q24.21
3/50 (6%)	3	2/50 (4%)	3	3/50 (6%)	3		
9/50 (18%)	4	4/50 (8%)	4	16/50 (32%)	4		
7/50 (14%)	5	19/50 (38%)	5	14/50 (28%)	5	3/50 (6%)	5
8/50 (16%)	6	14/50 (28%)	6	9/50 (18%)	6	17/50 (34%)	6
17/50 (34%)	7	5/50 (10%)	7	8/50 (16%)	7		
6/50 (12%)	8	2/50 (4%)	8			17/50 (34%)	8
		4/50 (8%)	10			5/50 (10%)	11
						8/50 (16%)	12



**Figura 32 – Imagens de *Touch FISH* em células interfásicas representativas dos resultados obtidos para o caso 20 (CPCE, estadio IIB), com o conjunto de sondas *LAVysion*.**

Ainda que não tenham sido avaliados por MLPA, o *locus* 5p15 e o gene *MYC*, demonstraram ganho, por aCGH, correspondente a um elevado número de cópias. No gene *EGFR*, foi observado ganho de material genético através de aCGH e MLPA. Todos estes resultados foram comprovados por *Touch* FISH.

#### 4.8. Correlação do perfil genómico com o perfil metabonómico

A metabonómica pode ser definida como a avaliação de metabolitos endógenos (metaboloma) presentes em sistemas biológicos (células, tecidos e fluidos biológicos), e o estudo das suas variações em diferentes perturbações, tais como uma doença ou uma agressão tóxica [119]. Os metabolitos são moléculas pequenas (<1 kDa) que podem atuar como transportadores, substratos ou produtos em vias bioquímicas celulares, e estando na extremidade final de uma cascata de eventos celulares, modificações a montante dos genes e proteínas podem conduzir a alterações no metabolismo celular (figura 33).

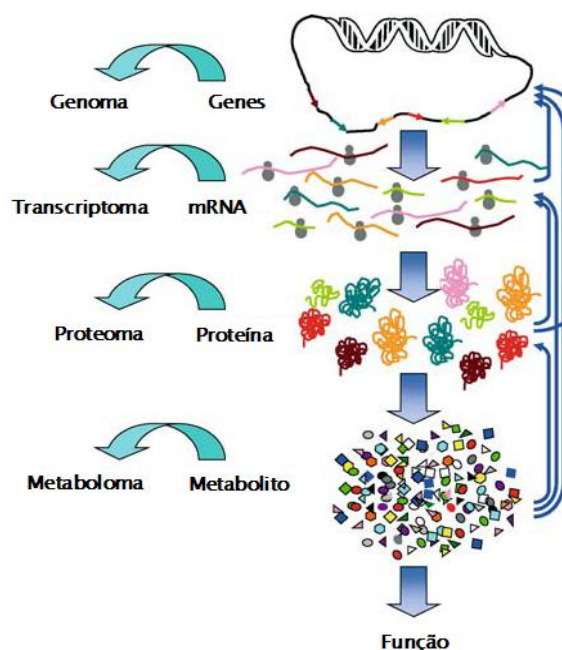


Figura 33 - Representação genérica da organização e interação entre os diferentes níveis no interior da célula (adaptado de [120]).

A desregulação metabólica é uma das adaptações fisiológicas ocorridas nas células tumorais, durante o desenvolvimento neoplásico. Esta desregulação resulta de alterações nas vias de sinalização, na expressão proteica, entre outros mecanismos moleculares, refletindo, deste modo, adaptações bioquímicas específicas durante a carcinogénese. O perfil metabólico característico das células tumorais pode estar correlacionado com a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores, desempenhando uma



participação ativa na carcinogénese e conferindo vantagens de sobrevivência às células neoplásicas [121-122]. Assim, a caracterização metabólica do tumor e a caracterização genómica poderão fornecer novos *inputs* sobre a biologia das células tumorais e oferecer novas opções para o diagnóstico e tratamento do cancro.

As amostras caraterizadas neste estudo foram previamente avaliadas em termos metabonómicos [77,123-124]. Assim, neste capítulo discutir-se-á de forma exploratória os dados obtidos do perfil genómico neste trabalho e os resultados metabonómicos prévios publicados, no mesmo grupo de estudo. As seções a seguir abordam sucintamente duas das principais vias metabólicas, glicólise e glutaminólise, e o seu envolvimento no fenótipo metabólico das células tumorais e a sua correlação com os dados do perfil genómico avaliado.

#### **4.8.1 Glicólise e Glutaminólise**

A glicólise é a principal via de oxidação metabólica das hexoses (principalmente a glicose e outras hexoses provenientes da alimentação). É constituída por 11 etapas enzimáticas, através das quais cada molécula de glicose é transformada em duas trioses, de piruvato ou lactato. É uma via de recurso para a obtenção energética de emergência pela maior parte dos tipos celulares, em situação de carência acentuada ou total de oxigénio [125].

Em contraste com as células não tumorais, que dependem essencialmente da fosforilação oxidativa para a produção de ATP, as células tumorais dão preferência à glicólise para satisfazer as suas necessidades energéticas, mesmo na presença de oxigénio.

Otto Warburg observou que há uma maior captação de glicose nas células tumorais, relativamente às células não tumorais, possuindo uma alta capacidade para produzir lactato. Um exemplo desta aplicação é visível por tomografia por emissão de positrões (PET), que utiliza um análogo da glicose marcado radioativamente, para acompanhar a captação de glicose em tumores. Estudos recorrendo a esta metodologia têm mostrado uma correlação direta entre a taxa de consumo de glicose e a agressividade do tumor [126-129].

Sob condições extremas de hipóxia, a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa é substituída pela produção menos eficiente de ATP através da glicólise anaeróbia. Para compensar este decréscimo de ATP, o complexo fator induzível por hipoxia-1 (HIF-1) ativa genes-chave envolvidos no transporte de glicose e glicólise, tais como o transportador 1 e 3 de glicose (GLUT-1 e GLUT-3), fosfofrutocinase L (PFK), fosfoglicerato cinase I (PGKI) e lactato desidrogenase-A (LDH) (figura 34) [126].

Para além de alterações na expressão de enzimas-chave do metabolismo e da inibição das vias de fosforilação oxidativa, outras alterações poderão contribuir para o “efeito de Warburg” em células tumorais, tais como, a perda da p53 e a ativação de vários oncogenes, incluindo *PIK3CA*, *MYC*, *KRAS* e *AKT1* [125-126]. Por exemplo, a ativação da via da PI3K/AKT pode resultar no aumento da absorção de glicose e do metabolismo, enquanto que o *MYC* ativa a transcrição de várias enzimas glicolíticas. Além disso, em células com baixo teor de p53, a expressão de SCO2 (síntese de citocromo c oxidase 2), um regulador chave do complexo essencial para a respiração mitocondrial, é interrompida, levando as células a darem preferência à glicólise para produzirem energia. Assim, para além de ser uma resposta à hipoxia, a glicólise aeróbia confere também uma vantagem adicional para as células tumorais. Estas células desenvolvem um fenótipo de resistência à hipoxia e acidose, como resultado do elevado fluxo glicolítico, e, sendo este microambiente tóxico para outras populações celulares locais, promove a degradação da matriz extracelular, invasão e metástase [126-129].

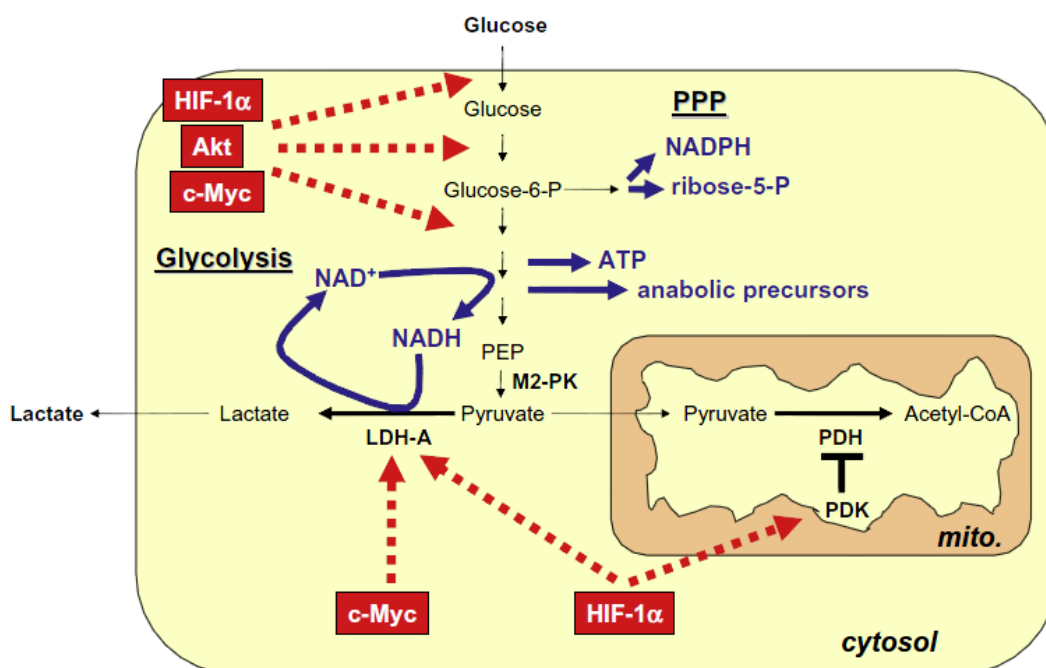


Figura 34 - Glicólise e reprogramação metabólica na proliferação de células neoplásicas (adaptado de [126]).

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no corpo humano. É classificada como um aminoácido não essencial, uma vez que pode ser sintetizada pelo organismo a partir de outros aminoácidos. A glutamina está envolvida em diferentes funções, tais como a proliferação e desenvolvimento celulares, o balanço acidobásico, o transporte da amónia entre os diferentes tecidos, a doação de compostos de carbono para a gliconeogénese, a participação no sistema antioxidante, entre outras [130].

Nas células tumorais a expressão das enzimas glutaminase mitocondrial e malato descarboxilase mitocondrial tendem a favorecer a oxidação da glutamina. A conversão da glutamina em lactato é chamada de glutaminólise e sua principal função é regenerar a energia, produzindo glutamato, citrato e aspartato. O citrato é necessário para a síntese de acetil-CoA, isoprenóides e ácidos gordos, e o aspartato para a síntese de pirimidinas. A glutaminólise tem a vantagem de manter os níveis de glutamina constantemente altos nos tecidos e tumores sólidos e de possibilitar a sobrevivência e proliferação de células neoplásicas em condições de boa oxigenação, mas com aporte de glicose limitado [128].

O oncogene *MYC* parece ter um papel importante na glutaminólise. A sobre-expressão deste oncogene resulta numa maior expressão da glutamina mitocondrial, induzindo, deste modo, o catabolismo da glutamina, impulsionando a produção de NADPH, que sustenta a síntese de ácidos gordos e de nucleótidos [128,131].

As biópsias previamente avaliadas por <sup>1</sup>H-RMN revelaram, em estudos prévios, um aumento de glutamato e de lactato em ADC e CPCE. Ainda assim, este aumento é maior em CPCE. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo por aCGH, onde os oncogenes *PIK3CA* e *MYC*, bem como os oncogenes *KRAS* e *AKT1* exibiram elevados níveis de ganho de material genético. Assim esta sobre-expressão oncogénica aumentada em CPCE poderá ser correlacionada com a glicólise e glutaminólise, que, embora não essenciais nestas neoplasias, demonstram ser estratégias favoráveis à sobrevivência e proliferação de células tumorais, em situações de carência de nutrientes e oxigénio. Estudos e análises adicionais serão importantes para correlacionar os dados dos perfis genómicos e metabonómicos e contribuir, não só para a compreensão da carcinogénese, mas sobretudo como ferramentas importantes no diagnóstico e terapêutica.

## **5. CONCLUSÕES**



## 5. Conclusões

O CP apresenta a maior taxa de incidência e uma das maiores taxas de mortalidade na totalidade dos tumores, que são atribuídas ao diagnóstico tardio da doença e à escassez de métodos de diagnóstico. Para este fato contribui a ausência de programas de rastreio juntamente com a falta de marcadores biológicos definitivos e fidedignos para o diagnóstico precoce desta neoplasia. A importância de se identificarem biomarcadores moleculares conjugados com as características histológicas e o estadio clínico do tumor para a determinação de um diagnóstico e prognóstico precisos, bem como para a escolha de um tratamento mais adequado, sugere a necessidade de se continuarem a realizar estudos moleculares e citogenéticos com vista a estabelecer o perfil genómico dos diferentes subtipos histológicos. Estes estudos a longo prazo permitirão melhorar as taxas de sobrevivência e facilitarão a descoberta de novos alvos terapêuticos para esta doença.

Deste modo, este trabalho experimental permitiu, de uma forma geral, atingir a maioria dos objetivos propostos, tendo em conta algumas limitações, como a amostragem reduzida e a dificuldade em obter tecido controlo. Desta forma, com a realização deste estudo foi possível concluir que:

- A análise genómica por aCGH das 22 amostras de tecido tumoral permitiu identificar 2343 alterações no número de cópias, nos 22 casos analisados. As alterações identificadas em todos os estadios TNM, revelaram uma percentagem de ganho de material genético superior à percentagem de perda, em ADC e CPCE, exceto no estadio I dos casos de CPCE analisados. Embora não tenha sido detetada, nos ADC, concordância de alterações cromossómicas nos três diferentes estadios, em CPCE, a concordância em ganho nas regiões 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 12p, 12q, 15q, 17q, 19p, 19q, 20p, 20q e 22q e em perda em 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, Xp, Yp e Yq, revelou, para os diferentes estadios, ter potencial para diagnóstico. Através desta técnica foi também possível diferenciar ADC de CPCE, contendo este último tipo histológico um valor mais elevado de alterações neste estudo, podendo ser indicativo de um prognóstico mais desfavorável e uma maior agressividade do tumor. Dos 35 genes que se avaliaram mais exaustivamente neste estudo, já reportados na literatura como associados ao CP, *PIK3CA*, *SOX2* e *MYC* revelaram a maior percentagem de ganho na totalidade dos casos analisados.
- A técnica de MLPA representa um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo para a análise em paralelo de múltiplas amostras. A análise

genética por MLPA permitiu identificar, tal como o aCGH, um maior número de alterações em CPCE, e correspondentes a ganho de material genético. Alterações em ganho e em perda nos genes *PIK3CA* e *PTEN*, respetivamente, são características de CPCE. Ainda assim, foram identificadas alterações em elevado número de cópias nos genes *PIK3CA*, *FGFR1* e *PTEN*, no CPCE. Em ADC não foram detetadas alterações significativas concordantes capazes de discriminar este tipo histológico. Para além disso, o gene *FKBP8*, embora ainda não associado à carcinogénese pulmonar, poderá ser um futuro biomarcador no CP, uma vez que apresentou a percentagem de alteração mais elevada por MLPA.

- O painel de sondas de MLPA escolhido para a realização deste estudo, *SALSA MLPA probemix X050-A1 Lung cancer*, demonstrou-se eficiente na identificação de alterações nos vários genes associados ao CP. Ainda assim, é necessária a alteração de algumas das regiões de referência do painel, dada a possível envolvimento destas regiões no CP, uma vez que apresentaram percentagens de alteração muito elevadas. Contudo, tendo em conta o desenvolvimento e aplicação de técnicas de elevada resolução para o *screening* de todo o genoma humano, revela-se importante o desenvolvimento de outros painéis de sondas específicos para o CP. Estes painéis devem abarcar os vários genes já descritos como importantes para a progressão do CP, e altamente alterados neste estudo, tais como, *MYC*, *SOX2*, *ERBB3*, *MAP2K1*, *CDKN2A*, *FHIT* e *STK11*. Embora no painel utilizado não tenham sido identificadas muitas mutações, seria importante incluir também neste painel a deteção de mutações nos genes *TP53* e *STK11*, uma vez que se encontram altamente mutados no CP.
- Os resultados obtidos por MLPA permitiram, na generalidade, comprovar os resultados obtidos por aCGH. Esta concordância, em termos de alterações do número de cópias, foi maior nos genes *PIK3CA* e *FGFR1* no CPCE.
- Nas cinco culturas primárias celulares utilizadas não foi possível encontrar muitas alterações no número de cópias, por MLPA. Durante a observação ao microscópio das células em cultura foi visível uma aparente abundância de fibroblastos em detrimento de células epiteliais tumorais. No geral, os resultados da cultura não são concordantes com os obtidos nas amostras tumorais analisadas. Assim, não é possível validar estas culturas celulares

como potenciais modelos para outros estudos, uma vez que não aparentam ter as mesmas alterações da amostra tumoral.

- A técnica de *Touch FISH*, realizada em algumas amostras tumorais de casos representativos, mostrou ser uma técnica precisa na deteção de sequências específicas nos núcleos em interfase. Com a utilização desta técnica foi possível confirmar alguns dos resultados obtidos por aCGH e MLPA, bem como comprovar a fiabilidade destes dois métodos.
- As biópsias avaliadas, previamente em outros estudos, por <sup>1</sup>H-RMN revelaram um aumento de glutamato e de lactato em ADC e CPCE, ainda que maior neste último tipo histológico. A sobre-expressão oncogénica de *PIK3CA* e *KRAS*, observada através da técnica de MLPA, e destes dois últimos genes, juntamente com os genes *MYC* e *AKT1*, por aCGH, foi correlacionada, neste estudo, com fenótipos metabólicos glicolíticos e glutaminólicos. Esta correlação exploratória poderá, deste modo, fornecer novas pistas sobre os mecanismos de carcinogénese do CP.





## **6. BIBLIOGRAFIA**



## 6. Bibliografia

1. JEMAL, A. et al. – Global Cancer Statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 61 (2011), 69-90.
2. AMERICAN CANCER SOCIETY – *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society, 2013.
3. FERLAY, J. et al. – Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127 (2010) 2893–2917.
4. FERLAY, J., PARKIN, D., STELIAROVA-FOUCHER, E. – Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, 46 (2010), 765-781.
5. BOYLE, P., LEVIN, B. – *World Cancer Report 2008*. Lyon: World Health organization - International Agency for Research on Cancer, 2008.
6. ALISON, M. - Cancer. Nature Publishing Group, *Encyclopedia of Life Sciences* (2001), 1-8.
7. HANAHAN, D., WEINBERG, R. – The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (2000), 57-70.
8. COUSSENS, L., WERB, Z. – Inflammation and cancer. *Nature*, 420 (2002), 860-867.
9. SOLEAS, J. et al. - Engineering Airway Epithelium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012), 1-10.
10. HOLLENHORST, M., RICHTER, K., FRONIUS, M. – Ion Transport by Pulmonary Epithelia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2011), 1-16.
11. KNIGHT, D., HOLGATE, S. – The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 8 (2003), 432–446.
12. BÉRUBÉ, K. et al. – Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*, 278 (2010), 311–318.
13. PANNO, J. – The role of genes, lifestyle and environment. *Cancer* (2005), 12-13.
14. ETTINGER, D. et al. – Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 8 (2010), 740-801.
15. TRAVIS, W. – Pathology of Lung Cancer. *Clinics Chest Medicine*, 32 (2011), 669-692.
16. TRAVIS, W. et al. – *Tumours of the lung*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (2004), 9-124.
17. MITCHARD, J., JENKINS, P., SHEPHERD, N. – *Pathology of lung tumours*. The Medicine Publishing Company Ltd (2004).
18. LARSEN, J., MINNA, J. – *Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications*. *Clinics Chest Medicine*, 32 (2011), 703-740.
19. ROBBINS, S., COTRAN, R. – *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7ª edição, Elviesier Ltd, 2005.

20. TRAVIS, W. et al. – International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society, European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6 (2011), 244-285.
21. WISTUBA, I., GAZDAR, A. – Lung Cancer Preneoplasia. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*, 1 (2006), 331-348.
22. BAGANHA, M. – Tabaco ou Saúde. Departamento de Ciências Pneumológicas e Alergológicas, Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra, 2002.
23. UYBICO, S. et al. – Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls. *RadioGraphics*, 30 (2010), 1163–1181.
24. LOEB, L. – Endogenous Carcinogenesis: Molecular Oncology into the Twenty-first Century- Presidential Address. *Cancer Research*, 49 (1989), 5489-5496.
25. AMES, B., GOLD, L. – Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutation Research*, 447 (2000), 3-13.
26. HANAHAN, D., WEINBERG, R. – Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (2011), 646-674.
27. WEBER, B. – Cancer genomics. *Cancer Cell*, 1 (2002), 37-47.
28. BRENNAN, P. – Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis*, 23 (2002), 381-387.
29. MITSUUCHI, Y., TESTA, J. – Cytogenetics and Molecular Genetics of Lung Cancer. *American Journal of Medical Genetics*, 115 (2002), 183–188.
30. HUGO Gene Nomenclature Committee [acedido a 16 de Março de 2013]. Disponível na internet: <http://www.genenames.org/>
31. FARDILHA, M., SILVA, O., CONDE, M. – O essencial em... Sinalização Celular. Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro: Edições Afrontamento, Lda., 2012.
32. ROWINSKY, E. – The ERBB Family: Targets for Therapeutic Development Against Cancer and Therapeutic Strategies Using Monoclonal Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors. *Annual Review of Medicine*, 55 (2004), 433–457.
33. HYNES, N., LANE, H. – ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Publishing Group*, 5 (2005), 341-354.
34. SHARMA, S. – Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Publishing Group*, 7 (2007), 169-181.
35. KRAUSE, D., VAN ETTEN, R. – Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *The New England Journal of Medicine*, 353 (2005), 172-87.

36. PLASS, C., RISCH, A. – Lung cancer epigenetics and genetics. *International Journal of Cancer*, 123 (2008), 1-7.
37. BRAMBILLA, E., GAZDAR, A. – Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *European Respiratory Journal*, 33 (2009), 1485–1497.
38. WU, K. et al. – Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2012), 11471-11496.
39. SHIGEMATSU, H. et al. – Somatic Mutations of the HER2 Kinase Domain in Lung Adenocarcinomas. *American Association for Cancer*, 65 (2005), 1642-1646.
40. SHIGEMATSU, H., GAZDAR, A. – Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *International Journal of Cancer*, 118 (2006), 257–262.
41. UGOCSAI, K. et al. – Investigation of HER2 Overexpression in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research*, 25 (2005), 3061-3066.
42. TAKEUCHI, K., ITO, F. – Receptor Tyrosine Kinases and Targeted Cancer Therapeutics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34 (2011), 1774-1780.
43. CIARDIELLO, F., TORTORA, G. – EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *The New England Journal of Medicine*, 358 (2008), 1160-1174.
44. DUTT, A. et al. – Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE*, 6 (2011), 1-10.
45. WEST, L. et al. – A Novel Classification of Lung Cancer into Molecular Subtypes. *PLOS ONE*, 7 (2012), 1-11.
46. SEKIDO, Y., FONG, K., MINNA, J. – Molecular Genetics of Lung Cancer. *Annual Review of Medicine*, 54 (2003), 73–87.
47. POTTI, A. et al. – CD117 (c-KIT) overexpression in patients with extensive-stage small-cell lung carcinoma. *Annals of Oncology*, 14 (2003), 894–897.
48. YOO, J. et al. – Expression of c-kit and p53 in Non-small Cell Lung Cancers. *Cancer Research and Treatment*, 36 (2004), 167-172.
49. KAYE, F. – Molecular biology of lung cancer. *Lung Cancer*, 34 (2001), S35–S41.
50. RIELY, G., MARKS, J., PAO, W. – KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6 (2009), 201–205.
51. PRATILAS, C. et al. – Genetic Predictors of MEK Dependence in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 68 (2008), 9375-9383.
52. PAIK, P. et al. – Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (2011), 2046-2051.

53. DANG, C. – c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (1999), 1-11
54. SARRIS, E., SAIF, M., SYRIGOS, K. – The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer. *Pharmaceuticals*, 5 (2012), 1236-1264.
55. KWAK, E. et al. – Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363 (2010), 1693-1703.
56. SHAW, A. et al. – Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (2009), 4247-4253.
57. CAGLE, P., ALLEN, T. – Lung Cancer Genotype-Based Therapy and Predictive Biomarkers. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 136 (2012), 1482-1491.
58. JU, Y. et al – A transforming *KIF5B* and *RET* gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Research*, 22 (2012), 436-445.
59. DAVIES, K. et al. – Identifying and Targeting *ROS1* Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18 (2012), 4570-4579.
60. YANG, L., et al. – Nkx2-1: a novel tumor biomarker of lung cancer. *Biomedicine & Biotechnology*, 13 (2012), 855-866.
61. LU, Y. et al. – Evidence That *SOX2* Overexpression Is Oncogenic in the Lung. *PLOS ONE*, 5 (2010), 1-12.
62. SHIVAPURKAR, N. et al. – Apoptosis and Lung Cancer: A Review. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88 (2003), 885–898.
63. Pezzella, F. et al – bcl-2 Protein in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 329 (1993), 690-694.
64. WEN, J. et al. – Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Modern Pathology*, 24 (2011) 932–943.
65. SCHOUTEN, J. et al. – Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30 (2002), 1-13.
66. KALLIONIEMI, A. et al. – Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science*, 258 (1992), 818-821.
67. SHINAWI, M., CHEUNG, S. – The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today*, 13 (2008), 760-770.
68. CHO, E. – Array-based Comparative Genomic Hybridization and Its Application to Cancer Genomes and Human Genetics. *Journal of Lung Cancer*, 10 (2011), 77-86.

- 69.** DAVIES, J. – Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Research*, 13 (2005), 237–248.
- 70.** LEE, C., IAFRATE, A., BROTHMAN, A. – Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature Genetics Supplement*, 39 (2007), S48-S54.
- 71.** SHARKEY, F., MAHER, E., FITZPATRICK, D. – Chromosome analysis: what and when to request. *Archives of disease in childhood*, 90 (2005), 1264–1269.
- 72.** STUPPIA, L. et al. – Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2012), 3245-3276.
- 73.** MRC Holland [acedido a 4 de Fevereiro de 2013]. Disponível na internet: <http://www.mlpa.com>
- 74.** GOUAS, L. et al. – Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathologie Biologie*, 56 (2008), 345–353.
- 75.** KNOLL, J., LICHTER, P. – In Situ Hybridization to Metaphase Chromosomes and Interphase Nuclei (2005).
- 76.** BISHOP, R. – Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*, 3 (2010), 85-95.
- 77.** ROCHA, C. et al. – Metabolic Profiling of Human Lung Cancer Tissue by <sup>1</sup>H High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Spectroscopy. *Journal of Proteome Research*, 9 (2010), 319-332.
- 78.** Agilent [acedido a 21 de Maio de 2013]. Disponível na internet: <http://www.genomics.agilent.com/>
- 79.** Doria S. et al. – An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 147 (2009), 144–50.
- 80.** ROMEO, M. et al. – Chromosomal Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinomas and in Bronchial Epithelia of High-Risk Smokers Detected by Multi-Target Interphase Fluorescence in Situ Hybridization. *Journal of Molecular Diagnostics*, 5 (2003), 103-111.
- 81.** BUBENDORF, L. et al. – Multitarget FISH Analysis in the Diagnosis of Lung Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 123 (2005), 516-523.
- 82.** SHIBATA, T. et al. – Genetic Classification of Lung Adenocarcinoma Based on Array-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis: Its Association with Clinicopathologic Features. *Clinical Cancer Research*, 11 (2005), 6177-6185.



- 83.** TONON, G. et al. – High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (2005), 9625-9630.
- 84.** BALSARA, B., TESTA, J. – Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene*, 21 (2002), 6877-6883.
- 85.** MASSION, P., CARBONE, D. – The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory Research* (2003), 1-15.
- 86.** JIANG, F. et al. – Genomic Profiles in Stage I Primary Non Small Cell Lung Cancer Using Comparative Genomic Hybridization Analysis of cDNA Microarrays. *Neoplasia*, 6 (2004), 623-635.
- 87.** NASARRE, P. et al – Guidance molecules in lung cancer. *Cell Adhesion & Migration* 4 (2009), 130-145.
- 88.** SOS, M. et al – Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (2009), 1727-1740.
- 89.** DING, L. et al. – Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455 (2008), 1069-1075.
- 90.** FU, H. et al. – Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-mediated Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (2013), 7430-7437.
- 91.** HAMMERMAN, P. et al. – Mutations in the DDR2 Kinase Gene identify a Novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *American Association for Cancer Research*, 10 (2011), 77-89.
- 92.** HAMMERMAN, P. et al. – Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489 (2012), 519-525.
- 93.** BRUNELLI, M. et al. – True 3q Chromosomal Amplification in Squamous Cell Lung Carcinoma by FISH and aCGH Molecular Analysis: Impact on Targeted Drugs. *PLOS ONE*, 7 (2012), 1-5.
- 94.** MCCAUGHAN, F. et al. – Progressive 3q Amplification Consistently Targets SOX2 in Preinvasive Squamous Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182 (2010), 83-91.
- 95.** NESBIT, C., TERSAK, J., PROCHOWNIK, E. – MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 18 (1999), 3004-3016.
- 96.** CHEN, Y. et al. – Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*, 204 (2004), 326-332.
- 97.** JOHNSON, J., PILLAI, S., CHELLAPPAN, S. – Genetic and Biochemical Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Biochemistry Research International* (2012), 1-18.

- 98.** SCRIMA, M. et al. – Signaling Networks Associated with AKT Activation in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): New Insights on the Role of Phosphatidylinositol-3 kinase. *PLOS ONE*, 7 (2012), 1-15.
- 99.** VANHECKE, E. et al. – 19q13-ERCCI Gene Copy Number Increase in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* (2013), 1-9.
- 100.** WEIR, B. et al. – Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* (2007), 1-9.
- 101.** COSTA, D. et al. – BIM Mediates EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor - Induced Apoptosis in Lung Cancers with Oncogenic EGFR Mutations. *PLOS ONE*, 4 (2007), 1669-1680.
- 102.** HILLMER, A. et al. – A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nature Medicine* (2012).
- 103.** WANG, H. et al. – Phosphatidylinositol 3-kinase could be a promising target in lung cancer therapy. *Journal of BUON*, 17 (2012), 729-734.
- 104.** YAMAMOTO, H. et al. – PIK3CA Mutations and Copy Number Gains in Human Lung Cancers. *Cancer Research*, 68 (2008), 6913-6921.
- 105.** SHIBATA, T. et al. – Oncogenic mutation of PIK3CA in small cell lung carcinoma: A potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Letters*, 283 (2009), 203-211.
- 106.** FIDLER, M. et al. – PTEN and PIK3CA gene copy numbers and poor outcomes in non-small cell lung cancer patients with gefitinib therapy. *British Journal of Cancer*, 105 (2011), 1920-1926.
- 107.** LYNCH, T. et al. – 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 (2004), 2129-2139.
- 108.** SHOLL, L. et al. – Lung Adenocarcinoma with EGFR Amplification Has Distinct Clinicopathologic and Molecular Features in Never-Smokers. *Cancer Research*, 69 (2009), 8341-8348.
- 109.** CAPPUZZO, F. et al. – Increased MET Gene Copy Number Negatively Affects Survival of Surgically Resected Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (2009), 1667-1674.
- 110.** TURKE, A. et al. – Pre-existence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell*, 17 (2010), 77-88.

- 111.** BEAN, J. et al. – MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (2007), 20932-20937.
- 112.** WAGNER, P. et al. – Frequency and clinicopathologic correlates of KRAS amplification in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 74 (2011), 118-123.
- 113.** RIELY, G., MARKS, J., PAO, W. – KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6 (2009), 201-205.
- 114.** PAO, W., GIRARD, N. – New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncology*, 12 (2011), 175–180.
- 115.** TOMIZAWA, K. et al. – Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer*, 74 (2011), 139-144.
- 116.** MARCHETTI, A. et al. – Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (2011), 1-8.
- 117.** GeneCards, Human Genes [acedido a 14 de Junho de 2013]. Disponível na internet: <http://www.genecards.org>
- 118.** GAZDAR, A. et al. – Lung Cancer Cell Lines as Tools for Biomedical Discovery and Research. *Journal of the National Cancer Institute*, 102 (2010), 1-12.
- 119.** DEBERARDINIS, R. et al. – The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7 (2008), 11-20.
- 120.** Nicholson, J. et al. - Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature*, 1 (2002), 153-161.
- 121.** GOODACRE, R. – Metabolomics - the way forward. *Metabolomics*, 1 (2005), 1-2.
- 122.** KADDURAH-DAOUK, R. – Metabolic Profiling of Patients with Schizophrenia. *PLOS Medicine*, 3 (2006), 1222-1223.
- 123.** CARROLA, J. et al. – Metabolic Signatures of Lung Cancer in Biofluids: NMR-Based Metabonomics of Urine. *Journal of Proteome Research*, 10 (2011), 221-230.
- 124.** DUARTE, I. et al. – Can nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy reveal different metabolic signatures for lung tumours? *Virchows Arch*, 457 (2010), 715-725.
- 125.** NELSON, D., COX, M. – *Lehninger Principles of Biochemistry Lecture Notebook*. W. H. Freeman, 2004.
- 126.** FERON, O. – Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92 (2009), 329-333.
- 127.** VANDER HEIDEN, M., CANTLEY, L., THOMPSON, C. – Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324 (2009), 1029-1033.

- 128.** DEBERARDINIS, R. et al. – Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18 (2008), 54-61.
- 129.** TONG, X., ZHAO, F., THOMPSON, C. – The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19 (2009), 32-37.
- 130.** CRUZAT, V., PETRY, E., TIRAPEGUI, J. – Glutamine: Biochemical, Metabolic, Molecular Aspects and Supplementation. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 15 (2009), 392-397.
- 131.** WISE, D. et al. – Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (2008), 18782-18787.