

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

PATRÍCIA GONÇALVES PEREIRA COUTO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* E *NTH1* EM
PACIENTES BRASILEIROS COM CARCINOMA DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS
DE PULMÃO (NSCLC)**

BELO HORIZONTE
DEZEMBRO DE 2011

PATRÍCIA GONÇALVES PEREIRA COUTO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* E *NTH1* EM
PACIENTES BRASILEIROS COM CARCINOMA DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS
DE PULMÃO (NSCLC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Orientador: Dr.Luiz Armando Cunha De Marco

BELO HORIZONTE
DEZEMBRO DE 2011

A todos os pacientes que gentilmente participaram dessa pesquisa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Luiz Armando De Marco** pela confiança, disponibilidade, acessibilidade, praticidade e pelos momentos de descontração.

À **Luciana Bastos Rodrigues** pelo aprendizado além dos livros. Me orientou de perto com sabedoria, puxões de orelha, ensinamentos e muita amizade. Obrigada por tudo Lú!

À equipe da Cirurgia Torácica do Hospital Julia Kubitscheck, em especial ao **Nilson Amaral** por viabilizar esse projeto e também à médica **Alyne Vilhena**. Obrigada por sempre estar à disposição e colaborar tanto com este projeto.

À professora **Paula Vidigal** e à **Ivone** por se disponibilizarem e ajudar a enriquecer nosso trabalho.

A todas as colegas do laboratório **Helena, Lucélia, Flávia Melo, Cristina, Nayra, Mariana e Flavia Lage** pela ajuda, gargalhadas, conversas e amizade.

Aos **colegas da Medicina Molecular** pelas palavras de incentivo e troca de experiências.

A todas as iniciações científicas do laboratório de Genética Molecular. Especialmente à **Fê e Flávia Passos** por me ajudarem tanto na bancada.

À **Juliana Carneiro**, por me mostrar o lugar certo, a hora certa, as pessoas certas e o projeto certo.

Aos **pacientes** que gentilmente concordaram em participar dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (**CNPq**), por ter me propiciado essa oportunidade.

Aos meus **pais e irmãos** por serem meu apoio, força e incentivo.

Ao **Paulinho**, por ser meu refúgio mais aconchegante e por ser meu futuro mais brilhante.

RESUMO

O câncer de pulmão é a neoplasia que apresenta maior taxa de mortalidade mundial, sendo o prognóstico dos pacientes acometidos muito ruim. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a melhor compreensão da tumorigênese relacionada a este tipo de câncer são necessários para aumentar a sobrevida dos doentes. Neste sentido, *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *PTEN* são genes que atuam em vias de crescimento, proliferação, migração, sobrevivência celular e inibição de apoptose enquanto *NTH1* é uma glicosilase que atua na via de reparo de DNA. Alterações somáticas nesses genes podem estar associadas ao desenvolvimento do câncer de pulmão. Para avaliar essas possíveis alterações, analisamos as regiões-alvo de *NTH1* (exons 1-6), *PTEN* (exons 1-9), *KRAS* (exons 2 e 3), *BRAF* (exon 15) e *EGFR* (exon 18-21) em oitenta e dois pacientes brasileiros portadores de carcinoma de não-pequenas células de pulmão (NSCLC). A expressão da proteína PTEN foi investigada em vinte e uma amostras pelo método de imunohistoquímica. Analisamos a ancestralidade genômica dos nossos pacientes através de 40 indels bialélicos. Não foram detectadas mutações ou polimorfismos em *PTEN* e *BRAF*. A expressão de PTEN nuclear foi maior em células neoplásicas quando comparado com células benignas. Na análise de *KRAS* detectamos a presença da mutação G228A no códon 12 em um paciente (1.2%) e dois pacientes (2,4%) apresentaram polimorfismo no códon 61 (*rs17851045*). Em *EGFR* encontramos a presença da deleção 746_750 (domínio LREA) no exon 19 em 3.6% pacientes e não detectamos alterações nos exons 18 e 21. No exon 20, dois polimorfismos foram identificados: a substituição silenciosa (CAG> CAA) na posição c.2538 (*rs1050171*) detectada em 54,9% dos casos e a substituição 2284-60T>C a montante do exon 20 (*rs10241451*) encontrada em 13,4% dos casos. A substituição 2284-60T>C apresentou associação significativa com a doença tanto para frequência alélica quanto genotípica ($p = 0,03$ e $p = 0,02$, respectivamente). Na análise de ancestralidade encontramos um maior componente africano em nossa amostra. Em *NTH1* encontramos os polimorfismos G99T (*rs2302102*), 140-17C>T (*rs2233518*) e 131 (C> A) em apenas dois pacientes (4%) que podem estar relacionados ao desenvolvimento da doença. Como demonstrado, nossos dados apresentam uma baixa frequência de mutações em *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *PTEN*, o que pode ser explicado pelo alto componente africano encontrado em nossos pacientes. Nossos dados destacam que a heterogeneidade genética da via de EGFR em NSCLC pode diferir entre as populações, ressaltando assim a necessidade de reavaliar a utilização de agentes terapêuticos destinados a inibição desta via. É importante destacar que esses resultados devem ser expandidos e validados em estudos de escopo mais largo, com foco em pacientes brasileiros em geral.

Palavras-chave: câncer de pulmão; EGFR; KRAS; BRAF; PTEN; NTH1; mutações; ancestralidade.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading global cause of cancer-related mortality and the patients have poor prognosis. To improve the survival rate of lung cancer patients, a better understanding of tumor biology is required as well as the subsequent development of new therapeutic strategies. *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PTEN* genes play important role in the regulation of cell growth, proliferation, migration, survival and inhibition of apoptosis, while *NTH1* function as a DNA glycosylase in DNA repair pathway. Somatic alterations in these genes may be associated with the development of lung cancer. To investigate these molecular alterations, we analyzed the targeted regions of *NTH1* (exons 1-6), *PTEN* (exons 1-9), *KRAS* (exons 2 and 3), *BRAF* (exon 15) and *EGFR* (exons 18-21) in eighty-two Brazilian patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *PTEN* protein expression was evaluated in twenty-one samples by immunohistochemistry. We analyzed the genomic ancestry of our patients through 40 biallelic indels. No mutations or polymorphisms were detected in *PTEN* and *BRAF*. The nuclear *PTEN* expression was higher in neoplastic cells compared to benign cells. The analysis detected the presence of *KRAS* mutation G228A in codon 12 in one patient (1.2%) and two patients (2.4%) showed polymorphism at codon 61 (*rs17851045*). In *EGFR* sequences we found 746_750 deletion (domain LREA) in exon 19 in 3.6% patients and no alterations in exons 18 and 21. In exon 20, two polymorphisms were identified: a silent substitution (CAG> CAA) at position c.2538 (*rs1050171*) was detected in 54.9% of cases and a substitution 2284-60T> C upstream of exon 20 (*rs10241451*) was found in 13.4% of cases. The substitution 2284-60T> C was significantly associated with the disease for both, allele and genotype frequency ($p = 0.03$ and $p = 0.02$, respectively). Ancestry analysis showed a greater African component in our sample. Analysis of *NTH1*, showed the G99T polymorphism (*rs2302102*), 140-17C> T (*rs2233518*) and 131 (C> A) in only two patients (4%), which may be related to the disease. As shown, our data show a low frequency of mutations in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *PTEN*, which can be explained by the high African component of our patients. Our data highlight that the genetic heterogeneity of the EGFR pathway in NSCLC may differ between populations. Therefore, it underscores the need to reassess the use of therapeutic agents for the inhibition of this pathway in different populations. Furthermore, these results should be expanded and validated in studies of larger scope, focusing on Brazilian patients in general.

Keywords: lung cancer, EGFR, KRAS, BRAF, PTEN, NTH1; mutations; ancestry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização de <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> e <i>PTEN</i>	26
Figura 2. Ação de PTEN em PI3K	29
Figura 3. Mecanismos de ação de PTEN no núcleo celular	30
Figura 4. Relação entre o potencial mutagênico de análogos de bases de DNA e sua frequência de ocorrência	32
Figura 5. Via de reparo BER	33
Figura 6. Eletroferograma mostrando a mutação G228A em heterozigose no códon 12 do exon 2 de <i>KRAS</i>	47
Figura 7. Eletroferograma mostrando A189T em heterozigose no códon 61 de <i>KRAS</i> (exon 3)(<i>rs17851045</i>).....	48
Figura 8. Eletroferograma mostrando polimorfismo G99T (<i>rs2302102</i>) em heterozigose	48
Figura 9. Eletroferograma mostrando a substituição 140-17C>T a montante do exon 2 de <i>NTH1</i> (SNP intrônico <i>rs2233518</i>)	49
Figura 10. Eletroferograma mostrando polimorfismo não descrito no códon 131 (C>A) do exon 3 de <i>NTH1</i>	49
Figura 11. Alta expressão de PTEN em tecido tumoral	50
Figura 12. Baixa expressão de PTEN em tecido normal	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais causas de morte no mundo em 2008	14
Tabela 2. Estimativa para 2012 por sexo dos dez tipos de cânceres mais incidentes no Brasil.....	15
Tabela 3. Sétima edição do sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase para câncer de pulmão.....	19
Tabela 4. - Alterações sugeridas na sétima edição do sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase para câncer de pulmão.....	20
Tabela 5. Características de amplificação por PCR dos genes estudados	39
Tabela 6. Características clínicas dos pacientes com NSCLC	44
Tabela 7. Mutações encontradas no Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em Células não-pequenas de Câncer de Pulmão	45
Tabela 8. Frequências genotípicas e alélicas da alteração G2538A e 2254-60T>C em pacientes com câncer de pulmão	46
Tabela 9. Expressão de PTEN em NSCLC	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise da ancestralidade genômica dos pacientes com câncer de pulmão .52

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	microlitro
μM	micromolar
ADC	Adenocarcinoma
AJCC	“American Joint Commission on Cancer”
AP site	Sítio abásico
BER	“Base Excision Repair”
BRAF	“V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1”
CENP-C	“Centromere protein H”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	“Deoxyribonucleotide triphosphate”; termo genérico que define os quatro deoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
E2F-1	“Extracellular-signal regulated kinase”
EDTA	Ácido etileno di-amino tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	“Epidermal Growth Factor Receptor”
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
GAPs	“GTPase activating proteins”
GDP	Guanosina-difosfato
GEFs	“Guanine nucleotide exchange factors”
GTP	Guanosina-trifosfato
HE	Hematoxilina-Eosina
HRAS	“V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog”
INCA	Instituto Nacional do Cancer
Indels	“Short insertion/deletion polymorphisms”
KRAS	“V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog”
LOH	Perda de heterozigose
LREA	Leucina-Arginina-Glutamato- Alanina
M	Molar
mg	miligramas

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	mililitro
mM	miliMolar
MMAC	“Mutated in multiple advanced cancers”
NaCl	Cloreto de Sódio
Nedd-4	“E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4 “
NRAS	“Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog”
NSCLC	Câncer de Não - Pequenas Células de Pulmão
NTH1	“Human immunodeficiency virus”
OGG1	“8-oxoguanina DNA glicosilase 1”
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salino fosfatado (“phosphate buffered saline”)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (“ <i>Polymerase chain reaction</i> ”)
PI3K	“Phosphatidylinositol 3 kinase”
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato
PTEN	“Phosphatase and tensin homolog”
Rad51	“Extracellular-signal regulated kinase”
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SCC	Carcinoma Escamo Celular
SCLC	Câncer de Pequenas Células de Pulmão
SDS	“Sodium dodecyl sulfate”
SNP	“Single-Nucleotide Polymorphism”
TBE	Tris Base EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TEP1	“Transforming growth factor b-regulated and epithelial cell enriched phosphatase 1”
TK	Tirosina quinase
TNM	Tumor-Nódulo-Metastase
UICC	“Union Internationale Contre le Cancer”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CÂNCER.....	14
1.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	15
1.2.1 Carcinoma de Pequenas Células de Pulmão (SCLC).....	16
1.2.2 Carcinoma de Não-Pequenas Células de Pulmão (NSCLC).....	16
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
1.4 DIAGNÓSTICO	18
1.5 ESTADIAMENTO	18
1.6 TRATAMENTO	20
1.7 FATORES DE RISCO	21
1.7.1 Tabagismo	21
1.7.2 Fatores Ambientais/Ocupacionais.....	22
1.7.3 Fatores Genéticos	22
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 PACIENTES E CONTROLES	36
3.2 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS.....	36
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS.....	37
3.4 ANÁLISES MOLECULARES.....	37
3.4.1 Extração de DNA.....	37
3.4.2. Amplificação e sequenciamento das amostras	38
3.4.3 Análises de Ancestralidade	40
3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DE PTEN	41
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
4 RESULTADOS	43
4.1 AMOSTRAGEM E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES	43

4.2 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO	44
4.2.1 EGFR.....	44
4.2.2 KRAS.....	47
4.2.3 BRAF.....	47
4.2.4 PTEN.....	48
4.2.5 NTH1	48
4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA DE PTEN.....	49
4.4 ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE GENÔMICA	51
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO1	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o termo usado para designar um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos ou órgãos. Segundo Hanahan e Weinberg (2000) o câncer surge a partir de alterações essenciais na fisiologia da célula, as quais, coletivamente, contribuem para o crescimento de tumores malignos.

O carcinoma do pulmão é um dos cânceres de maior incidência mundial, sendo a principal causa de morte relacionada ao câncer em homens e mulheres em todo o mundo. Anualmente, mais de um milhão de pessoas morrem em decorrência dessa doença (OMS, 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que, em 2008, o câncer de pulmão estava entre as 10 principais causas de morte mundial (Tabela 1). No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 14.715 óbitos em 2000 e estimativas para o ano de 2012 apontam para 27.320 novos casos, sendo 17.210 em homens e 10.110 em mulheres (INCA, 2011) (Tabela 2).

Tabela 1. Principais causas de morte no mundo em 2008

No mundo	Morte por milhão	% de mortes
Doença cardíaca isquêmica	7.25	12.8%
Acidente vascular cerebral e outras doenças cerebrovasculares	6.15	10.8%
Infecções respiratórias	3.46	6.1%
Doença pulmonar obstrutiva crônica	3.28	5.8%
Doenças diarreicas	2.46	4.3%
HIV/AIDS	1.78	3.1%
Cânceres de pulmão, traquéia e brônquio	1.39	2.4%
Tuberculose	1.34	2.4%
Diabetes mellitus	1.26	2.2%
Acidente de trânsito	1.21	2.1%

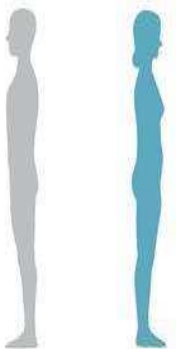
(OMS, 2008)

Devido à manifestação tardia dos sintomas no câncer de pulmão, a maioria dos pacientes apresenta estágio avançado da doença no momento do diagnóstico. Estima-se que ao diagnóstico de NSCLC, 20% dos pacientes possuem doença localizada, 25% dos pacientes têm extensão da neoplasia para os linfonodos mediastinais e 55% já

apresentam metástases à distância (Seregini *et al.*, 1995). Por esse motivo, o prognóstico é sombrio para a maioria dos pacientes com câncer de pulmão e a sobrevida média de cinco anos varia de 13% a 21% em países desenvolvidos e de 7% a 10% nos países em desenvolvimento (Robbins, 2010; INCA, 2011). Somente um terço dos pacientes é passível de ressecção total do tumor e, portanto, a maioria não é candidata a tratamento curativo. Uma série de fatores prognósticos (estadiamento, tipo histológico, marcadores tumorais, entre outros) parece influenciar no tempo de sobrevida (Jamnik *et al.*, 2009).

O estadiamento correto do tumor é essencial para prever a sobrevida de pacientes com NSCLC (Greene *et al.*, 2002) e para definir grupos com estratégias de tratamento similar (Detterbeck, 2007). No entanto, são necessários marcadores prognósticos mais eficazes que refinem os perfis prognósticos e selecionem pacientes que se beneficiarão mais de cada um dos tratamentos hoje estabelecidos e previnam toxicidade de tratamentos ineficazes. Além disso, a descoberta de marcadores moleculares pode ajudar a identificar potenciais alvos terapêuticos que sejam mais eficientes e menos prejudiciais que os tratamentos atuais.

Tabela 2. Estimativa para 2012 por sexo dos dez tipos de cânceres mais incidentes no Brasil

Localização primária	casos novos	percentual	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

(INCA, 2011)

1.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

O Câncer de pulmão pode ser dividido em dois subtipos histológicos principais: carcinoma de não-pequenas células de pulmão (NSCLC) e carcinoma de pequenas

células de pulmão (SCLC). Esses subtipos diferem no tamanho da célula do tumor, no comportamento biológico, em características de alterações genéticas e ainda na frequência de ocorrência e prognóstico (Yesner *et al.*, 1982).

1.2.1 Carcinoma de Pequenas Células de Pulmão (SCLC)

O carcinoma de pequenas células de pulmão (SCLC) representa aproximadamente 20% dos casos de câncer de pulmão. O SCLC é mais frequentemente hilar ou central, geralmente apresenta células epiteliais pequenas, arredondadas e com pouco citoplasma, denominadas “oat cell”. Esse tipo histológico exibe forte relação com o tabagismo sendo que cerca de 99% dos pacientes são fumantes (Robbins, 2010). O curso clínico do SCLC é o mais agressivo de todos os tumores malignos de pulmão e, para os doentes não tratáveis, permite uma sobrevida média de cerca de três meses após o diagnóstico. Em geral, os resultados terapêuticos ainda não são satisfatórios e os fatores prognósticos negativos mais associados à doença incluem o sexo masculino, tabagismo e idade acima dos 70 anos (Skarda *et al.*, 2011).

1.2.2 Carcinoma de Não-Pequenas Células de Pulmão (NSCLC)

O carcinoma de não-pequenas células de pulmão é responsável por aproximadamente 85% de todos os casos e é comumente relacionado ao tabagismo. Em cerca de 9-15% dos casos, é causado pela exposição a outros fatores cancerígenos, como hidrocarbonetos policíclicos, amianto, ou radon. Carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, e carcinoma de grandes células de pulmão são os três tipos mais comuns de NSCLC. O tratamento atual do NSCLC inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia baseada em platina. No momento do diagnóstico, pelo menos 40% dos pacientes apresentam estágio avançado da doença (Vandenbroucke *et al.*, 2009), enquanto que menos de 25% apresentam doença em estágio inicial (Robinson and Bradley, 2010).

1.2.2.1 Adenocarcinoma

Constitui o tipo mais comum de câncer de pulmão em mulheres não fumantes. Representa cerca de 30% a 40% de todos os pacientes acometidos pela doença (Uehara *et al.*, 1998). Em geral, as lesões são de localização mais periférica e, histologicamente, variam desde tumores bem diferenciados a lesões papilares e massas sólidas com apenas células e glândulas ocasionais, produtoras de mucina. Os adenocarcinomas crescem mais lentamente do que os carcinomas de células escamosas e estão menos associados ao tabagismo (embora mais de 75% sejam encontrados em fumantes) do que os carcinomas de células escamosas ou pequenas células (> 98%) (Robbins, 2010).

1.2.2.2 Carcinoma de Células Escamosas

É o subtipo mais encontrado em homens e está estreitamente correlacionado com o tabagismo. É o segundo tipo mais comum de câncer de pulmão, e compõe cerca de 30% de todos os casos (Hendler & Ozanne, 1984). Este tumor surge nos brônquios mais centrais e maiores, tende a disseminar-se localmente e metastatiza-se um pouco mais tarde do que os outros padrões, porém a sua velocidade de crescimento no local de origem costuma ser mais rápido do que os outros subtipos (Robbins, 2010).

1.2.2.3 Carcinomas de Grandes Células

Responsável por cerca de 10% de todos os casos de câncer de pulmão, podendo apresentar localização central ou periférica. Sua incidência é baixa e o prognóstico é, geralmente, ruim (Robbins, 2010).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A maioria das pessoas desenvolvem sintomas inespecíficos no momento do diagnóstico (Reddy *et al.*, 2011). As manifestações clínicas aparecem em decorrência dos efeitos diretos do tumor primário, para efeitos de tumores metastáticos em outras partes do corpo, ou a distúrbios de hormônios, sangue, ou outros sistemas causada pelo câncer (Reddy *et al.*, 2011).

Sintomas de câncer de pulmão primário incluem tosse, hemoptise, dor maçante e persistente no peito, perda de peso e falta de ar que geralmente resulta de uma obstrução ao fluxo de ar em parte do pulmão, acúmulo de líquido em volta do pulmão (derrame pleural), ou a propagação do tumor ao longo dos pulmões (Yano *et al.*, 2011).

Cerca de 30% a 40% dos indivíduos com câncer de pulmão apresentam sintomas ou sinais relacionados à doença metastática (Yano *et al.*, 2011). Nestes casos, os sintomas variam de acordo com o local acometido e extensão do tumor. O câncer de pulmão se dissemina mais comumente para o fígado, supra-renais, ossos e cérebro. Em caso de acometimento dos ossos, provoca dor óssea, geralmente na coluna vertebral, fêmur e costelas. O envolvimento cerebral pode ocasionar dificuldades como fraqueza e convulsões (Reddy *et al.*, 2011).

Os pacientes podem ainda manifestar síndromes paraneoplásicas, efeitos indiretos do câncer não relacionados à invasão direta de um órgão por células tumorais, muitas vezes desencadeadas por substâncias químicas liberadas pelo tumor. Os sintomas incluem hipercalcemia, anemia ferropriva, fraqueza muscular, osteoartropatia hipertrófica, erupções cutâneas, entre outros (Reddy *et al.*, 2011).

1.4 DIAGNÓSTICO

A maneira mais fácil de diagnosticar o câncer de pulmão é através do raio-X do tórax complementado por tomografia computadorizada. A broncoscopia (endoscopia respiratória) deve ser realizada para avaliar a árvore traqueobrônquica e, eventualmente, permitir a biópsia. É fundamental obter um diagnóstico correto, seja pela citologia ou patologia (Frank, 2007).

1.5 ESTADIAMENTO

Uma vez obtida a confirmação da doença, é feito o estadiamento, que avalia o estágio de evolução, ou seja, verifica se a doença está restrita ao pulmão ou disseminada por outros órgãos (Uehara *et al.*, 1998). O sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase (TNM) tem sido adotado para o estadiamento do câncer de

pulmão desde o final da década de 1960. É um sistema de classificação bem conhecido, baseado nas características próprias do tumor, nos linfonodos acometidos e em sítios potencialmente metastáticos. De acordo com esse sistema, cada um dos descritores (tumor, nódulo e metástase) é subdividido em categorias que são combinadas a fim de fornecer uma classificação final, com o objetivo de agrupar pacientes com prognósticos semelhantes em uma mesma categoria. O TNM também auxilia na seleção da melhor proposta de tratamento para cada caso de câncer de pulmão (Andrade *et al.*, 2010; Robbins, 2010).

Em janeiro de 2010, cirurgiões torácicos e pneumologistas foram apresentados à sétima edição do manual de estadiamento da “American Joint Commission on Cancer” (AJCC) e da “Union Internationale Contre le Cancer” (UICC)(Tabela 3). Esse documento revisa o sistema de estadiamento TNM para câncer de pulmão e sugere algumas modificações (Tabela 4). É importante que todos os cirurgiões torácicos e pneumologistas estejam cientes dessas revisões, pois elas afetam diretamente a prática clínica diária (Andrade *et al.*, 2010).

Tabela 3. Sétima edição do sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase para câncer de pulmão

Descritores/ Grupos Prognósticos				
T/M	N0	N1	N2	N3
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a	IV	IV	IV	IV
	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV

Tabela 4 - Alterações sugeridas na sétima edição do sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase para câncer de pulmão.

Descritor	Alteração sugerida
Tumor	Subclassificar T1 de acordo com o tamanho do tumor T1a: ≤ 2 cm T1b: > 2 cm mas ≤ 3 cm Subclassificar T2 de acordo com o tamanho do tumor T2a: > 3 cm mas ≤ 5 cm (ou um outro descritor T2 mas ≤ 5 cm) T2b: > 5 cm mas ≤ 7 cm Reclassificar tumores T2 > 7 cm como T3 Reclassificar tumores T4 com nódulo(s) adicionais no mesmo lobo do tumor primário como T3 Reclassificar tumores M1 com nódulo(s) adicionais em um outro lobo ipsilateral como T4 Reclassificar tumores T4 com derrame pleural maligno como M1a
Nódulo	Sem alterações
Metástase	Subclassificar M1 M1a: nódulo(s) tumorais separados no pulmão contralateral; tumor com nódulos pleurais ou derrame pleural (ou pericárdico) maligno M1b: metástase à distância

1.6 TRATAMENTO

Cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia são as três modalidades de tratamento usadas para tratar pacientes com NSCLC. Elas podem ser usadas sozinhas ou combinadas, dependendo do tipo histológico, estadiamento e características clínicas do paciente (INCA, 2011).

Em geral, para pacientes em estágio I ou II da doença, a cirurgia de ressecção proporciona a melhor oportunidade de cura (Ettinger *et al.*, 2010). Entretanto, mesmo no estágio clínico IA cerca de 30 a 40% dos pacientes morrerão em consequência da progressão da neoplasia, principalmente às custas de recidiva sistêmica (Younes, 1997; Mountain, 1997; Naruke *et al.*, 1997). Em pacientes com NSCLC ressecável, a quimioterapia adjuvante tem aumentado a sobrevida média daqueles em estágio inicial da doença. Quimioterapia e radioterapia simultâneas, parecem oferecer maiores benefícios em relação à terapia sequencial para pacientes com NSCLC estágio III. A cirurgia é raramente realizada para pacientes com doença em estágio IV. Nos pacientes com doença em estágio IV, que apresentam boas condições clínicas, a quimioterapia baseada em platina é benéfica (Ettinger *et al.*, 2010).

Atualmente as pesquisas clínicas estão voltadas para terapias específicas, personalizadas e mais eficazes no tratamento do câncer. Agentes terapêuticos têm

sido desenvolvidos com o objetivo de direcionar o tratamento para cada tipo de câncer e aumentar sua eficácia. Nos últimos anos, a introdução de novos medicamentos com alvos moleculares, cuja eficácia está intimamente relacionada à presença de mutações genéticas no DNA tumoral (Sun *et al.*, 2007; Pao & Girard, 2011), tem contribuído bastante para o tratamento farmacológico de pacientes com NSCLC. O marco inicial dessa terapia molecular foi a resposta benéfica demonstrada por inibidores de tirosina quinase (TKI) dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Pacientes que carregam mutações em *EGFR* (gene que codifica o receptor) apresentam maior sensibilidade e taxa de resposta aos fármacos (TKI), melhorando o tempo de sobrevida quando comparados a pacientes que não apresentam estas mutações (Pao *et al.*, 2005).

1.7 FATORES DE RISCO

Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de cigarros, bem como a exposição a agentes cancerígenos, como o amianto e radônio, e fatores genéticos têm uma forte associação causal com o cancer de pulmão (Alberg *et al.*, 2007).

1.7.1 Tabagismo

Uso do tabaco é a principal causa de muitas das doenças malignas incluindo a doença cardiovascular, doença pulmonar obstrutiva crônica e o câncer de pulmão. No total, o tabagismo é responsável pela morte de quase um em cada dez adultos no mundo inteiro. Fumar é muitas vezes a causa oculta de muitas doenças que levam ao óbito (OMS, 2008).

O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão, responsável por mais de 85% de todas as mortes relacionadas à doença (Doll & Peto, 1976). A relação de risco entre tabagismo ativo e desenvolvimento do câncer de pulmão tem sido bem estudada e compreendida nos últimos anos. Já foi estabelecido que o risco para câncer de pulmão aumenta com o número de cigarros fumados por dia e com o tempo de exposição ao tabaco (Wald *et al.*, 1986). Estimativas atuais mostram que a pessoa que fuma mais de um maço de cigarro por

dia tem um risco de 20 a 25 vezes maior quando comparado com alguém que nunca fumou (Samet, 2007). Quando uma pessoa deixa de fumar, seu risco para o desenvolvimento da neoplasia diminui gradualmente. Cerca de 15 anos após parar de fumar, o risco de câncer de pulmão cai para o nível de alguém que nunca fumou (Uehara *et al.*, 1998). O fumo de cachimbo e charuto aumenta o risco para doença, mas não tanto como fumar cigarros. Isso porque a fumaça do cigarro contém mais de 4000 produtos químicos, muitos dos quais foram identificados como cancerígenos (Uehara *et al.*, 1998).

Aproximadamente 20% dos casos de NSCLC ocorrem em não fumantes (<100 cigarros/vida) ou fumantes leves (<10/15 anos-maço) (Sun *et al.*, 2007). O recente aumento de casos de câncer de pulmão primários em não fumantes é proeminente em contraste com a diminuição do hábito de fumar na maioria dos países desenvolvidos (Boffetta *et al.*, 2001; Wakelee *et al.*, 2007).

1.7.2 Fatores Ambientais/Ocupacionais

Muitos estudos foram realizados para avaliar a contribuição de fatores ambientais no desenvolvimento do câncer de pulmão. Muitos especialistas acreditam que a exposição prolongada ao ar poluído por veículos motores, fábricas e outras fontes é semelhante à exposição prolongada ao fumo passivo em termos de aumentar o risco para desenvolvimento da doença (Reddy *et al.*, 2011).

A exposição ao amianto, radônio, arsênico cromo, níquel, hidrocarbonetos aromáticos, éteres, fuligem, alcatrão e outras substâncias podem também causar câncer de pulmão (Alberg *et al.*, 2007; Whitrow *et al.*, 2003).

1.7.3 Fatores Genéticos

Pessoas com história familiar de câncer de pulmão podem ter risco aumentado para desenvolverem a doença, mesmo sendo não fumantes (National Institute Of Health). O fato de apenas uma parcela dos fumantes desenvolver câncer de pulmão sugere uma predisposição genética relacionada ao desencadeamento da doença (Thomas *et al.*, 2007). Estudos de genética molecular têm mostrado que múltiplos loci

genéticos contribuem para o câncer pulmonar esporádico. Atualmente são conhecidos mais de 230 genes ligados ao câncer (Thomas *et al.*, 2007). Estudos sugerem que os genes de reparo de DNA, genes relacionados à proliferação celular e supressores de tumor sejam os mais envolvidos no surgimento da doença (Ettinger *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2007; Paz-Elizur *et al.*, 2008; Risch & Plass, 2008; Saviozzi *et al.*, 2009). Portanto, análises de polimorfismos genéticos são ferramentas importantes, utilizadas na elucidação do papel de determinados genes no desenvolvimento do câncer de pulmão (Paz-Elizur *et al.*, 2007).

1.7.3.1 EGFR

O Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR), purificado e caracterizado por Cohen (1980) é uma glicoproteína da membrana plasmática composta por um domínio de ligação extracelular, um segmento transmembrana lipofílico e um domínio intracelular de tirosina quinase (Murray *et al.*, 2006; Irmer *et al.*, 2007). EGFR é integrante da família ErbB, que é composta por quatro membros (EGFR/Her1, ErbB2/Neu/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4). O gene *EGFR* está mapeado no cromossomo sete, composto por vinte e oito exons, sendo que os exons 18-24 codificam seu receptor de tirosina quinase (Riely *et al.*, 2006; Irmer *et al.*, 2007).

EGFR é ativado através da homodimerização com outro EGFR ou heterodimerização com outro membro da família HER, por exemplo, HER-2 (Ahmed *et al.*, 2006). Existem vários ligantes que se acoplam ao EGFR, tais como o fator de crescimento epidermal, o fator transformador de crescimento alfa (TGF α), anfirregulina e betacelulina (Irmer *et al.*, 2007). A ativação do complexo EGFR-tirosina quinase tem sido identificada como um evento iniciador de uma grande variedade de cascatas de sinalização incluindo as vias de PI3 quinase-Akt-mTOR, PI3K-Rac-Rho-Cdc42, JAK-STAT e Ras-Raf-MAP quinase (Ahmed *et al.*, 2006). Essas cascatas de sinalização intracelular levam à proliferação celular, sobrevivência, angiogênese e metastatização (Figura 1).

Estudos confirmam que alguns tumores superexpressam os receptores de EGF quando comparados a células normais ao proporcionar ativação intermitente de suas

vias de sinalização (Irmer *et al.*, 2007). A super expressão de EGFR está freqüentemente associada à agressividade da neoplasia, menor sobrevida e maior freqüência de doença metastática. Cerca de um terço de todos os tumores epiteliais, tais como câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão e mama superexpressam EGFR (Nicholson & Harper, 2001).

Estudos prévios determinaram que *EGFR* é um dos genes mais mutados em NSCLC e mutações ativadoras têm sido relatadas em aproximadamente 16% dos casos de NSCLC (Rosell *et al.*, 2009). Atualmente, mutações em *EGFR* são usadas como marcadores prognóstico no câncer de pulmão, assim como alvo de terapias específicas (Murray *et al.*, 2006; Irmer *et al.*, 2007; Mok *et al.*, 2009).

O domínio TK de EGFR tem sido o principal alvo de fármacos pelo grande número de alterações encontradas nos exons que o codificam (Rosell *et al.*, 2009) e portanto, serão alvo de estudo de nosso trabalho. Inibidores de tirosina quinase (TKIs - Gefitinib e Erlotinib) têm sido utilizados como adjuvantes nos tratamentos convencionais de câncer de pulmão (Ahmed *et al.*, 2006; Cascone *et al.*, 2006).

Cada mutação em *EGFR* está relacionada a um diferente comportamento da doença e a diferentes respostas aos fármacos (Irmer *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2006). Mutações nos exons 18 (G719A/C), 21 (L858R e L861Q) e deleções no exon 19 no domínio LREA (del746-750) conferem uma maior susceptibilidade à resposta para Gefitinib e Erlotinib. Por outro lado, a inserção D770_N771insNPG, no exon 20, confere resistência a estes fármacos. As mutações D761Y, no exon 19, e T790M, no exon 20, também estão associadas à resistência e são adquiridas pelo indivíduo durante o tratamento (Riely *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2005). Por outro lado, cânceres de pulmão que apresentam mutações no gene *KRAS* (códon 12, 13 e 61) são resistentes à terapia de EGFR-TKI e apresentam menor sobrevida e taxa de resposta aos fármacos (Pao *et al.*, 2005).

Mutações em *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* que participam da mesma via de sinalização têm se mostrado serem exclusivas, sugerindo que uma única mutação na via pode levar à ativação da cascata de sinalização e ser suficiente para a patogênese do câncer de pulmão (Kosaka *et al.*, 2004; Shigematsu *et al.*, 2005; Leidner *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Suda *et al.*, 2010).

1.7.3.2 KRAS

A super família das proteínas RAS desempenha importante papel no ciclo celular. Existem três proteínas dessa família: HRAS, KRAS e NRAS, sendo que KRAS está expressa em quase todos os tipos celulares (Downward, 2003). As proteínas RAS estão acopladas no lado citoplásmico da membrana plasmática através de ligação covalente a um grupo de lipídeos. Vários estudos mostraram que RAS desempenha importante papel na mitogênese, transmitindo sinal da superfície celular para outras estruturas no interior da célula (Alberts *et al.*, 2002; Cotran *et al.*, 1999).

Como outras proteínas GTP, RAS alterna entre a forma ativada, que transmite sinais, e um estado inativo e quiescente (Robbins, 2010; Downward, 2003). A forma inativa da proteína RAS está ligada a guanosina-difosfato (GDP) e a forma ativa esta ligada a guanosina-trifosfato (GTP). As células quando estimuladas por fatores de crescimento ou por outras interações com receptores, tornam-se ativas (Downward, 2003).

Nas células normais, o estágio ativado de transmissão de sinais da proteína RAS é transitório, visto que a atividade de GTPase (GAPs - GTPase activating proteins) hidrolisa o GTP a GDP, com conseqüente retorno a seu estado basal quiescente (Robbins, 2010; Downward, 2003; Alberts *et al.*, 2002). GEFs (guanine nucleotide exchange factors), por outro lado, catalisam a dissociação de GDP e RAS o substituindo por GTP para ativação da proteína (Robbins, 2010).

RAS ativado promove a fosforilação em cascata de resíduos de serina e treonina em proteínas sinalizadoras que alteram o padrão de expressão gênica. A proteína RAS ativada excita a via de MAP-quinase ao recrutar a proteína citosólica raf-1, promovendo a mitogênese (Downward, 2003; Robbins, 2010). RAS além de ativar a via MAP-kinase, também ativa a via PI-3-Kinase (phosphatidylinositol 3 kinase), outra via de sinalização importante que promove crescimento celular (Alberts *et al.*, 2002; Downward, 2003) (Figura1).

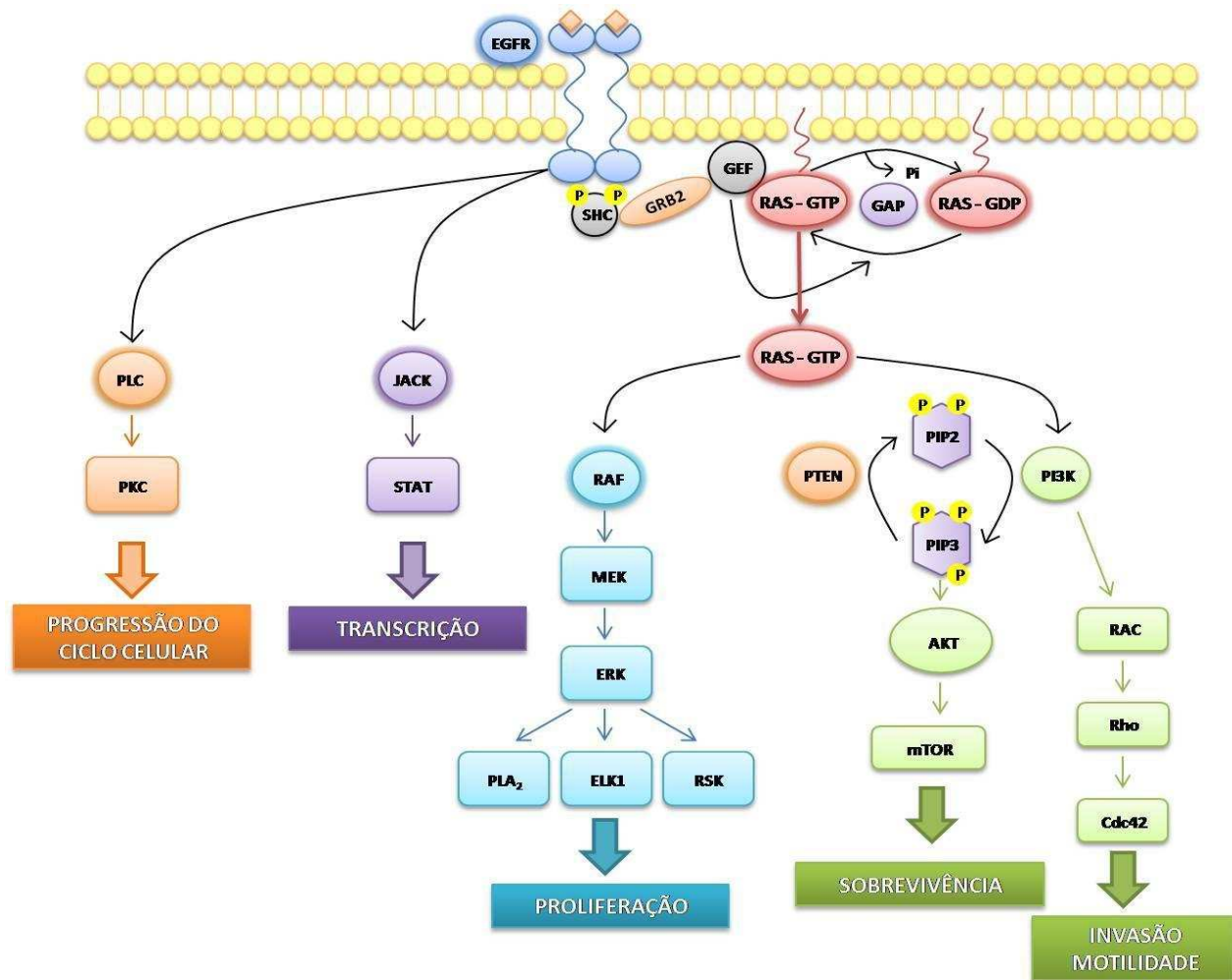


Figura 1. Via de sinalização de EGFR, KRAS, BRAF e PTEN.

As proteínas RAS controlam vias de sinalização que são reguladoras chave de vários aspectos do crescimento celular normal e da transformação maligna. Elas são alteradas na maioria dos tumores humanos devido a mutações ativadoras nos genes *RAS*, especialmente em *KRAS* (Downward, 2003).

Cerca de 20% dos tumores humanos têm mutações pontuais ativadoras em *RAS*, sendo mais frequentes em *KRAS* (85% do total), seguido por *NRAS* (15%), e *HRAS* (< 1%) (Bos, 1989). Em sua forma mutante *KRAS* fica permanentemente ativa uma vez que as GAPs não hidrolisam o GTP e, portanto, promovem proliferação e crescimento celular intermitente (Robbins, 2010).

Mutação em *RAS* geralmente ocorre em adenocarcinoma (Rodenhuis *et al.*, 1987; Suda *et al.*, 2010), raramente em carcinomas de células escamosas, e é ausente em câncer de pequenas células de pulmão (Mitsudomi *et al.*, 1991). *KRAS* (v-Ki-ras2

Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) está mapeado no cromossomo 12 e é composto por seis exons. Mutações somáticas do gene *KRAS* em câncer de pulmão foram identificadas pela primeira vez em 1984 (Santos *et al.*, 1984) e, geralmente, ocorrem no códon 12, ocasionalmente no códon 13 e, raramente, no códon 61 (Rodenhuis *et al.*, 1987), os quais serão foco de nosso trabalho. Mutação em *KRAS* é também indicativo de mau prognóstico, pois pacientes que apresentam essas alterações têm sobrevida menor quando comparados com pacientes que não a possuem (Ettinger *et al.*, 2010).

1.7.3.2 BRAF

A proteína BRAF pertence à família de quinases de serina-treonina RAF, tendo sido descritas três isoformas funcionais nas células de mamíferos: ARAF, BRAF e CRAF. Entre estes, o *BRAF*, cujo gene codificante está localizado no cromossoma 7q34, é o mais potente ativador da via de MAPK (Trovisco *et al.*, 2006; Cantwell-Dorris *et al.*, 2011).

BRAF exerce a função de regular a via MAPK/ERK que é conservada em todos os eucariotos (Robinson *et al.*, 1997). Como já citado, a via de RAS/RAF/MEK/ERK age como transdutor entre o meio extracelular e o núcleo. Sinais extracelulares como hormônios, citocinas e vários outros fatores de crescimento interagem com seu receptor e ativam a família RAS. RAS ativo induz alterações conformacionais em RAF que permite seu recrutamento para a membrana celular, promovendo mudanças no estado de fosforilação e provocando sua atividade quinase (Garnett & Marais, 2004) (Figura1). BRAF ativa envia sinais através MEK para ativar ERK, que, por sua vez, ativa fatores de transcrição a jusante para induzir uma série de processos bioquímicos, incluindo a diferenciação, proliferação, crescimento celular e apoptose. Tem sido demonstrado que a hiperativação de BRAF pode dar início a tumorigênese (Davies *et al.*, 2002).

BRAF está mutado em uma ampla gama de cânceres humanos, incluindo melanomas malignos (40-70%), câncer de tireóide papilar (45%), câncer colo-retal (10%) e também em cânceres de ovário, mama e pulmão (Davies *et al.*, 2002; Xing *et al.*, 2005; Dhomen e Marais *et al.*, 2009).

Mais de quarenta diferentes mutações em *BRAF* já foram identificadas em cânceres humanos. Noventa por cento delas são representadas pela mutação somática do tipo “missense”, que consiste na transversão de timina por adenina (T1799A), no exon 15 (alvo de nosso estudo), que resulta na mudança do resíduo 600, substituindo valina por glutamina ($BRAF^{V600E}$) (Davies *et al.*, 2002; Cantwell-Dorris *et al.*, 2011). A troca do aminoácido ativa a proteína, pois propicia a fosforilação constitutiva dos aminoácidos adjacentes, conferindo capacidade oncogênica (Wan *et al.*, 2004).

Nucera *et al.* (2011) mostraram que tumores que apresentam $BRAF^{V600E}$ são mais invasivos e agressivos. Mutações no gene *BRAF* não ocorrem em concomitância à mutação de *KRAS* (Davies *et al.*, 2002).

1.7.3.3 PTEN

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), também conhecido como *MMAC* (mutated in multiple advanced cancers) (Steck *et al.*, 1997) ou *TEP1* (transforming growth factor b-regulated and epithelial cell enriched phosphatase 1) (Li & Sun, 1997) foi originalmente identificado como um gene supressor de tumor em 1997 (Li *et al.*, 1997).

PTEN é uma fosfatase que age em fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP3), removendo o fosfato da posição três do anel inositol (Maehama *et al.*, 1998), para criar o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) e assim, antagonizar diretamente a sinalização da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Dessa forma, *PTEN* antagoniza ações de PI3K negativamente, regulando diversos processos celulares dessa via de sinalização, incluindo crescimento, proliferação, sobrevivência, apoptose, metabolismo e migração celular (Endersby & Baker, 2008; Tang *et al.*, 2011) (Figura2).

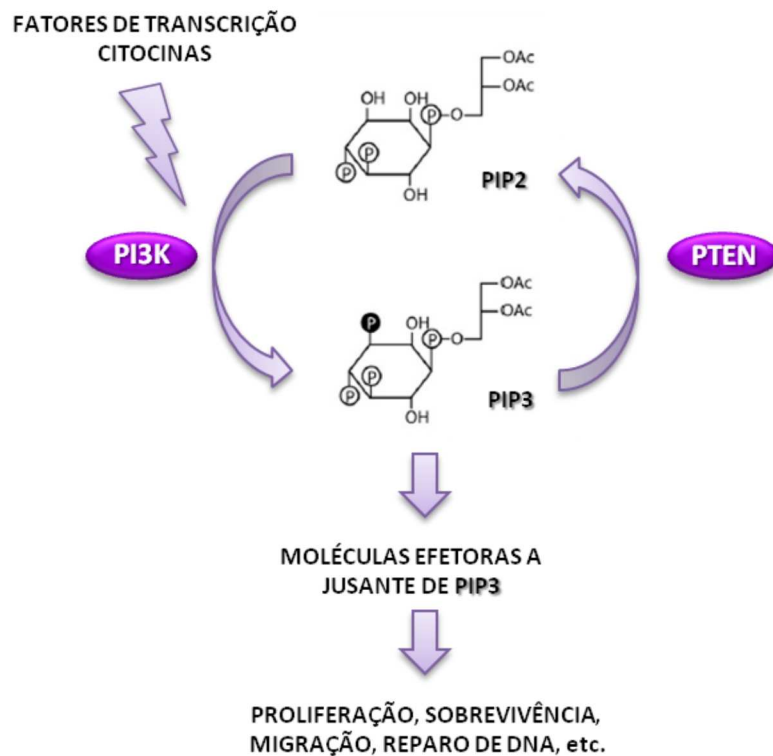


Figura 2: Ação de PTEN em PI3K.

A via de PI3K é de crítica relevância para o câncer humano, não só por estar associada à tumorigênese humana, mas também porque muitas das proteínas que participam dessa via, incluindo PTEN podem ser alvos terapêuticos (Pandolfi, 2008).

PTEN também se transloca do citoplasma para o núcleo através de um mecanismo dependente de ubiquitina, em que Nedd-4 media a monoubiquitinação promovendo a importação nuclear de PTEN. No núcleo, PTEN se associa fisicamente com centrômeros através CENP-C e mantém a integridade do cromossomo. PTEN age também em cromatina para coordenar com E2F-1 a regulação da transcrição de Rad51, resultando no controle do processo de reparo de DNA de fita dupla (Yin & Shen, 2008) (Figura 3).

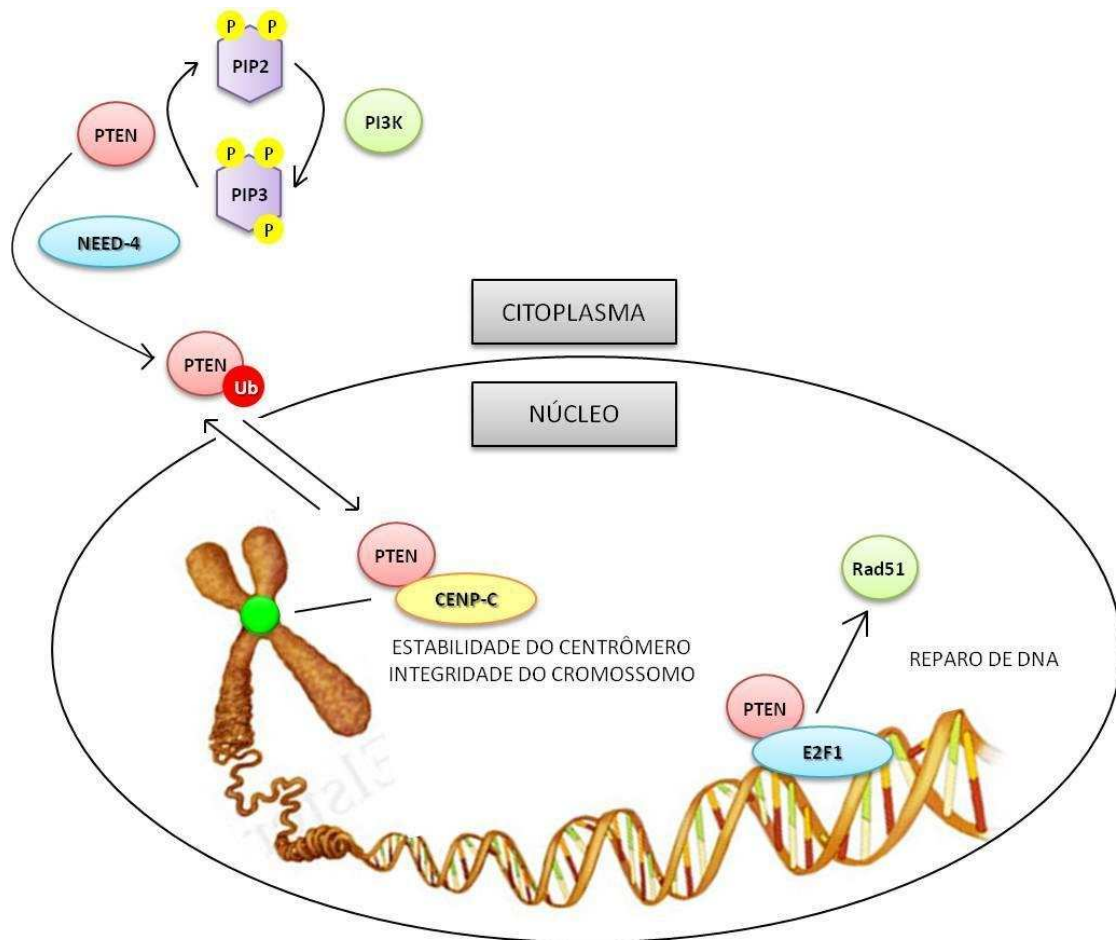


Figura 3: Mecanismos de ação de PTEN no núcleo celular.

PTEN se localiza no cromossomo 10q23.3 e mutações somáticas neste gene foram identificadas em vários tipos de tumores humanos (Simpson & Parsons, 2001). Muitos estudos afirmam que *PTEN* é um dos genes mais frequentemente mutado, deletado e silenciado em câncer (Cantley & Neel, 1999; Simpson & Parsons, 2001; Pandolfi, 2008). *PTEN* alterado induz acúmulo de PIP3 nas células gerando hiperativação dos seus sinais à jusante, levando as células a obter um caráter oncogênico (Cristofano & Pandolfi, 2000; Leslie & Downes, 2004; Maehama *et al.*, 2011).

1.7.3.4 NTH1

Diversos agentes endógenos e exógenos, aos quais estamos expostos diariamente, são capazes de causar danos ao DNA, alterando a integridade da

transmissão da informação genética (Hoeijmakers, 2011b). A exposição dos indivíduos a agentes genotóxicos e a geração de danos no DNA, bem como, a capacidade das células de responder a estes danos são determinantes críticos no processo de desenvolvimento do câncer (Ishikawa *et al.*, 2006).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas continuamente como subprodutos da respiração (1-5% do O₂ consumido) nas mitocôndrias, e são os mais abundantes agentes tóxicos endógenos em organismos aeróbicos, incluindo mamíferos (Hazra *et al.*, 2006). Elevado nível celular de ROS é formado quando as células são expostas a agentes redox, radiação ionizante, metais pesados e poluentes (Hazra *et al.*, 2006; Hirano, 2008). ROS induz danos ao DNA, que inclui uma infinidade de lesões, como base oxidada e sítios abásico, que são invariavelmente citotóxicas e/ou mutagênicas (Friedberg *et al.*, 2004).

A maioria dos cânceres esporádicos, a síndrome de envelhecimento, bem como uma variedade de outros estados fisiopatológicos são prováveis consequências de mutações, morte celular ou alterações de sinalização induzidas por dano oxidativo de DNA. O cigarro contém grandes quantidades de substâncias que podem causar danos oxidativos ao DNA e, dessa forma, aumentar o risco de câncer, como o de pulmão (Asami *et al.*, 1997).

Nos organismos eucarióticos, o reparo por excisão de base (BER) é o principal mecanismo para reparar lesões promovidas por danos oxidativos no DNA (Robertson *et al.*, 2009). Esta via de reparo tem a capacidade de corrigir muitos tipos de bases danificadas em uma célula, garantindo assim a integridade do genoma. As bases modificadas que mais prevalecem no DNA são a 8-oxoguanina (8-oxoG), a timina glicol (Tg) e as formamidopirimidinas (Fapy) (Wilson & Bohr, 2007). A frequência e ocorrência de algumas bases comumente danificadas na molécula de DNA estão representadas na Figura 4.

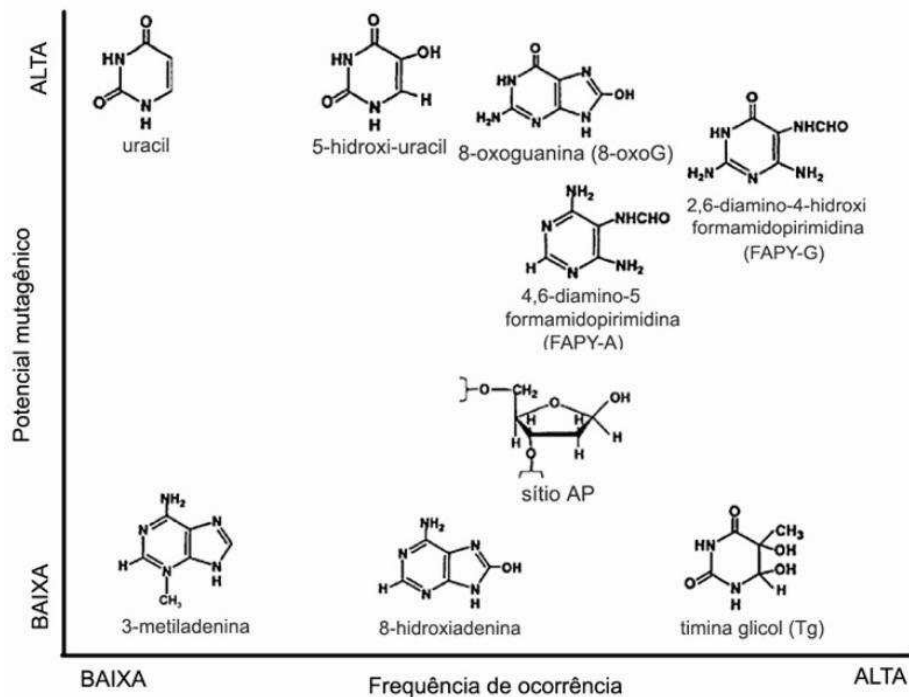


Figura 4: Relação entre o potencial mutagênico de análogos de bases de DNA e sua frequência de ocorrência (adaptado de Wilson & Bohr 2007).

A via BER (Figura 5), que atua no reparo dessas lesões, pode ser dividida em cinco passos (Fortini *et al.*, 2003):

1. Remoção da base danificada por ação de uma DNA glicosilase;
2. Incisão no sítio abásico resultante (sítio AP ou sítio apurínico ou purimidínico) por uma AP endonuclease;
3. Processamento das extremidades terminais;
4. Preenchimento do sítio AP;
5. Reconstituição da fita danificada;

As proteínas envolvidas nessa via agem em conjunto para remover uma base de DNA danificada e substituí-la pela base correta (Robertson *et al.*, 2009).

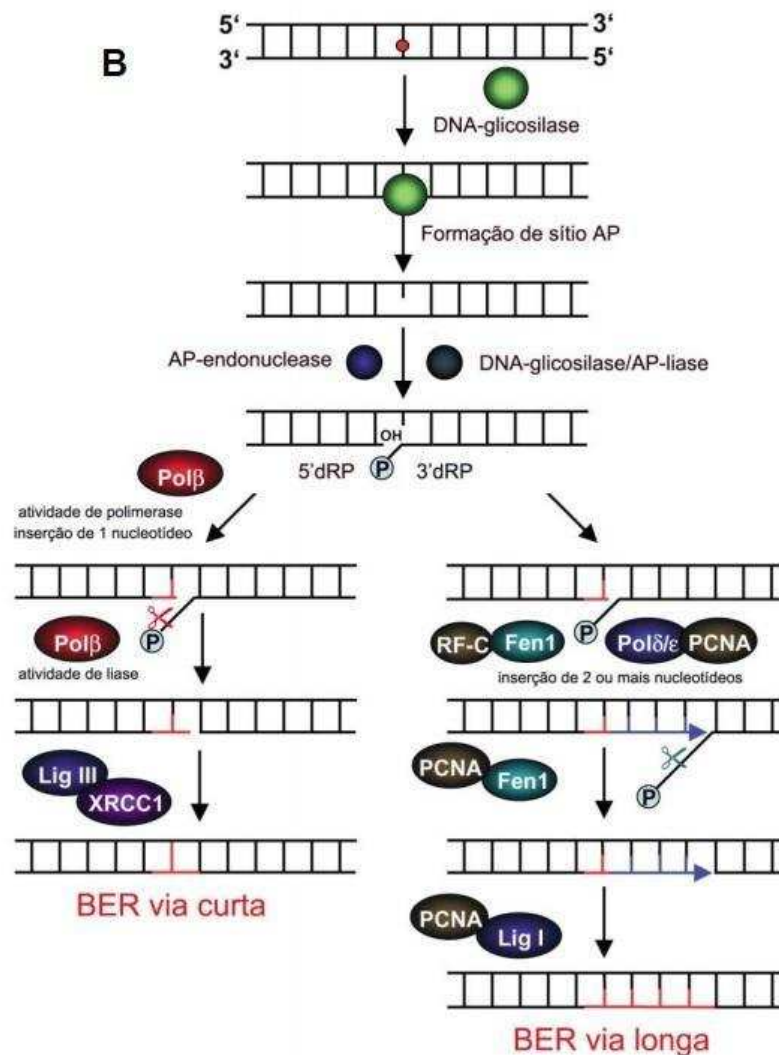


Figura 5: Via de reparo BER. O reconhecimento da lesão ocorre por uma DNA glicosilase específica que remove a base danificada através da hidrólise da ligação glicosídica. O sítio AP resultante é processado por uma AP endonuclease. Dependendo da capacidade de clivagem da extremidade 5'dRP pela Polβ, o reparo segue pela via curta ou pela via longa de BER (adaptado de Christmann *et al.*, 2003).

Esta via de reparo BER se inicia, portanto, com a ação de DNA glicosilases que reconhecem a base modificada e dão origem a uma quebra simples de DNA. A maioria dessas enzimas atua em um substrato específico, mas com preferência em derivados de purinas ou pirimidinas. Em mamíferos, a DNA glicosilase NTH1 (homólogo de endonuclease III de *E. coli*) também conhecida como NTHL1, reconhece uma ampla gama de pirimidinas oxidadas e seus derivados, como timina glicol (Tg), 5-hidroxicitosina-diidrouacil (DHU) e pelo menos seis outros tipos de pirimidinas oxidadas, enquanto a DNA glicosilase OGG1 (DNA glicosilase de 8-oxoguanina) é responsável pelo reparo de produtos derivados de guaninas, como 8-oxoG e

formamidopirimidina-guanina (Fapy) (Hazra *et al.*, 2007). NTH1 está mapeado no braço curto do cromossomo 16 e é composto por 6 exons. Atividade comprometida de BER é associada ao acúmulo de danos oxidativos ao DNA e podem ser fator causal dos cânceres.

Nosso estudo abordou gene representativo da via de reparo de DNA BER (*NTH1*), genes envolvidos com o crescimentos e proliferação celular (*EGFR*, *KRAS* e *BRAF*) e gene supressor de tumor (*PTEN*) visando associar possíveis alterações em pacientes brasileiros acometidos por NSCLC.

2 OBJETIVOS

- Avaliar possíveis alterações genéticas em *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* e *NTH1* em pacientes brasileiros com NSCLC.
- Caracterizar pacientes diagnosticados com NSCLC quanto aos aspectos clínicos.
- Detectar e estimar a frequência de polimorfismos e/ou mutações em *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* e *NTH1* através de seqüenciamento.
- Detectar e estimar a frequência da expressão de PTEN através da técnica de imunohistoquímica.
- Determinar o componente de ancestralidade genômica dos pacientes.