



UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA**

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

UC

**THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF MEDICINE
HEMATO-ONCOLOGY SECTION**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS (*GERMLINE*) NO GENE EGFR (RECEPTOR
DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL) E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES
COM A RESPOSTA CITOTÓXICA EM FIBROBLASTOS TRATADOS COM
INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE**

RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO

Fortaleza – Ceará

2006

RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS (*GERMLINE*) NO GENE EGFR (RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL) E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM A RESPOSTA CITOTÓXICA EM FIBROBLASTOS TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Data da aprovação: 11/05/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes (Orientador)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Prof^a. Dra. Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal- Mesquita
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Prof^a. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

M784e Montenegro, Raquel Carvalho

Estudo de polimorfismos (Germline) no gene EGFR
(Receptor do Fator de Crescimento Epidermal) e possíveis
associações com a resposta citotóxica em fibroblastos tratados
com inibidores de tirosina quinase/ Raquel Carvalho Montenegro.
2006.

105 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade
de Medicina, Fortaleza, 2006.

1. Farmacogenética . 2. Inibidores de Proteínas Quinases . 3. Genes erbB-1 .
4. Polimorfismo Genético. I. Moraes Filho, Manoel Odorico (orient.). II. Título.

CDD 615.58

RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS (*GERMLINE*) NO GENE EGFR (RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL) E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM A RESPOSTA CITOTÓXICA EM FIBROBLASTOS TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho

Fortaleza-CE

2006

**Dedico esta Tese a Deus por me ajudar
a enfrentar e a superar todos os
obstáculos para realização deste
trabalho.**

***“Mesmo nas noites totalmente sem
estrelas podem anunciar a aurora de
uma grande realização.”***

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Minha Família, pelo apoio na minha ida para Chicago e por toda a compreensão e carinho em todos os momentos da minha vida.

À CAPES, por ter financiado a minha bolsa de doutorado em Chicago.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes, por me aceitar durante todos esse anos no seu laboratório e por incentivar a busca por novos caminhos na atividade científica.

Ao Dr. Mark Ratain, pela oportunidade de estar em seu grupo na Universidade de Chicago por 1 ano e por todo o apoio científico e introdutório no campo da farmacogenética.

À Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo apoio e incentivo na minha ida para Chicago na busca de um novo ramo da Farmacologia.

Ao Dr. Wanqing Liu, meu supervisor no laboratório em Chicago, por me sempre me ajudar, incentivar e ensinar todo o conteúdo necessário para o desenvolvimento desta Tese. Além da sua fiel amizade e companheirismo nas horas mais difíceis.

À Jackeline Ramirez, Jackie, por ter me recebido muito bem no laboratório em Chicago, sempre fornecer os materiais necessários para o desenvolvimento desta tese e por sua amizade nas horas difíceis.

Ao Dr. Federico Innocenti, pelo carinho, apoio, incentivo e opiniões no trabalho desenvolvido.

À Dra. Letícia Veras Costa Lotufo, pela amizade, pelos conselhos sábios e por sempre me incentivar na busca de novos conhecimentos.

À Dra. Cláudia Pessoa, pela amizade e por acreditar sempre no meu potencial.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, por terem colaborado com a minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Clínica da Universidade de Chicago pelo apoio no laboratório, pela amizade e simpatia que tornaram mais fáceis os dias de trabalho em Chicago.

Aos amigos do Laboratório da Dra. Eileen Dolan pelo apoio, amizade e solidariedade nos infindáveis dias na sala de cultura (“The Cave”).

Aos meus amigos da International House em Chicago pela oportunidade de conhecer diferentes culturas e de participar de diferentes eventos.

Aos meus colegas do Laboratório de Oncologia Experimental por acreditar em mim e sempre ajudar e apoiar nas etapas difíceis que devem ser cumpridas por nós estudantes de pós-graduação.

Agradeço as minhas amigas que tiveram paciência comigo e que nunca deixaram de estar presentes na minha vida, nem mesmo afastada por 1 ano.

Por fim, agradeço a Deus por tudo que Ele me proporcionou até agora e que sem a Sua presença nada disso teria sido possível.

SUMÁRIO

Lista de Gráficos	ix
Lista de Tabelas	X
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo	xv
Abstract	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FARMACOGENÉTICA	2
1.2 FARMACOGENÉTICA DE DROGAS ANTICÂNCER	6
1.3 RECEPTORES TIROSINA QUINASE	10
1.4 FAMÍLIA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL	11
1.5 INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE	18
1.5.1 AG1478	19
1.5.2 Gefitinib (Iressa®) e Erlotinib (Tarceva®)	19
1.6 MUTAÇÃO E POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DO EGFR1	21
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Materiais	31
3.2 Métodos	32
3.2.1 CULTURA DE CÉLULAS	32
3.2.2 EXPANSÃO DAS CÉLULAS	32
3.3.3 CONTAGEM E PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS	32
3.4.4 INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE	33
3.5.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA PELO MÉTODO DO ALAMAR BLUE	33

3.6.6 EXTRAÇÃO DE DNA	33
3.7.7 EXTRAÇÃO DE RNA	34
3.8.8 RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism	34
3.9.9 ELETROFORESE CAPILAR	35
3.9.9.1 DETECÇÃO DE MICROSSATÉLITES	35
3.9.9.2 SNaPshot	36
3.9.9.3 <i>Long Range</i> PCR	37
3.10 PCR EM TEMPO REAL	37
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	40
4.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DOS FIBROBLASTOS	41
4.2.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA DA DROGA AG1478	41
4.2.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO GEFITINIB	49
4.2.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ERLOTINIB	56
4.3 AVALIAÇÃO DO GENÓTIPO DOS FIBROBLASTOS PARA O GENE DO EGFR	56
4.3.1 POLIMORFISMO R497K	57
4.3.2 POLIMORFISMO -216 G/T	58
4.3.4 POLIMORFISMO 787 C/T	59
4.3.5 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITE NO INTRON 1	60
4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	61
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS	61
4.6 ESTUDO FUNCIONAL: ASSOCIAÇÕES ENTRE FENÓTIPO E GENÓTIPO	64
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição da raça dos voluntários doadores das amostras de fibroblastos utilizados para a avaliação dos polimorfismos no gene do EGFR.	40
Gráfico 2	Distribuição da raça dos voluntários doadores das amostras de fibroblastos utilizados para a avaliação dos polimorfismos no gene do EGFR	41
Gráfico 3	Curva Dose-Resposta de fibroblastos tratados por 72 horas com inibidor de tirosina quinase do EGFR AG1478 nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 μ M.	42
Gráfico 4	Curva Dose-Resposta de fibroblastos com CI50 maior que 20 μ M tratados com inibidor de tirosina quinase do EGFR AG1478 nas doses de 20, 40, 60 e 80 μ M por 72 horas.	43
Gráfico 5	Comparação das curvas dose-resposta dos grupos resistente (CI50 > 80 μ M) e sensível (CI50 < 20 μ M) ao AG1478.	48
Gráfico 6	Curva Dose-Resposta de fibroblastos tratados por 72 horas com inibidor de tirosina quinase do EGFR gefitinib nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 μ M.	49
Gráfico 7	Curva Dose-Resposta de fibroblastos sensíveis ao tratamento com gefitinib por 72 horas.	50
Gráfico 8	Comparação das curvas dose-resposta dos grupos resistente (CI50 > 30 μ M) e sensível (CI50 < 20 μ M) ao gefitinib.	55
Gráfico 9	Determinação do numero de repetições CA no intron 1 em cada alelo (G e T) da região promotora do gene do EGFR.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblasto sensíveis (CI50 < 10µM).	44
Tabela 2	Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblastos com CI50 entre 10µM e 70µM.	45
Tabela 2 (continuação)	Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblastos com CI50 entre 10µM e 70µM.	46
Tabela 3	Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblastos resistentes (CI50 > 80µM)	47
Tabela 4	Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 20µM e 40µM no grupo de fibroblastos sensíveis (CI50 < 20µM).	51
Tabela 5	Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 10µM e 40µM no grupo de fibroblastos sensíveis com CI50 maior que 20µM e menor que 30µM.	52
Tabela 5 (continuação)	Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 10µM e 40µM no grupo de fibroblastos sensíveis com CI50 maior que 20µM e menor que 30µM.	53
Tabela 6	Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 10µM e 40µM no grupo de fibroblastos (CI50 > 30µM).	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Inter-relação entre os genes e como estes podem afetar a resposta aos fármacos	2
Figura 2	Mecanismo de ativação do receptor EGFR.	12
Figura 3	Localização cromossômica do gene do EGFR, seus éxons e respectivos domínios.	14
Figura 4	Transdução do sinal via EGFR.	17
Figura 5	Estrutura química do inibidor de tirosina quinase AG1478.	19
Figura 6	Estrutura química dos inibidores de tirosina quinase gefitinib (a) e erlotinib (b).	19
Figura 7	Localização dos polimorfismos na região promotora, intron 1 e éxon 13 no gene EGFR.	25
Figura 8	Genotipagem do SNP R497K no éxon 13 do gene EGFR 1.	57
Figura 9	Genotipagem do SNP -216G/T na região promotora do gene EGFR1.	58
Figura 10	Genotipagem do SNP 787C/T no gene do EGFR.	59
Figura 11	Análise de Microssatélites CA no Intron 1 do gene EGFR.	60
Figura 12	Análise do número de repetições CA no Intron 1 e os alelos G e T na região promotora do gene EGFR.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	Área Sobre a Curva
C	Citosina
CYP	Citocromo P450
°C	Graus Celcius
ddNTP	Dideoxi-ribonucleotídeo
dNTPs	Desoxi-ribonucleotídeo
DPD	Dihidropirimidina Dehidrogenase
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
FDA	Food and Drug Administration
G6PD	Glicose-6-fosfato-dehidrogenase
GSTM	Glutathiona S-transferase
G	Guanina
INCA	Instituto do Câncer do Ceará
K	Lisina
mL	Mililitros
MMP	Metaloproteinases
NAT	N-acetiltransferase
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
NSCLC	Câncer de pulmão de células não-pequenas
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
PharmGkB	The Pharmacogenetic and Pharmacogenomic Knowledge Base
PI3K	Quinase fosfatidilinositol-3
R	Arginina

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Timina
TPMT	Tiopurina S-metiltransferase
UGT	UDP-glucuronosil transferase
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
5-FU	5-Fluoracil
μM	Micromolar
μL	Microlitro
%	Porcentagem
'	Minutos
"	Segundos

RESUMO

RESUMO

Estudo de polimorfismos (*germline*) no gene EGFR e possíveis associações com a resposta citotóxica em fibroblastos tratados com inibidores de tirosina quinase. Raquel Carvalho Montenegro. Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Co-Orientador: Mark J Ratain. Tese de Doutorado Sanduíche em Chicago. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC; e Departamento de Medicina, UC. 2006.

Apenas um pequeno número de pacientes beneficiam-se da terapia com inibidores de EGFR. Em razão disso, torna-se importante o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta a estas drogas a fim de encontrar marcadores preditores de eficácia terapêutica, auxiliando, então, na seleção de pacientes que podem se beneficiar com essas drogas. Apesar de mutações somáticas e amplificações gênicas terem sido correlacionadas à eficácia terapêutica dos inibidores de EGFR, foi demonstrado que células neoplásicas e/ou pacientes que possuem expressão de EGFR normal também são sensíveis à estas drogas. Assim, o objetivo deste trabalho foi entender os mecanismos envolvidos na predisposição à sensibilidade aos inibidores de tirosina quinases em células normais por meio de análise de polimorfismos (*germline*) no gene EGFR. Para isso, foi escolhido um modelo *in vitro*, utilizando-se 70 amostras de fibroblastos normais. Os estudos citotóxicos foram realizados com dois inibidores de EGFR Gefitinib (Ge) e AG1478 (AG). As células foram incubadas por 72 horas com diferentes concentrações (10, 20, 40 e 60 μM para Ge e 5, 10, 15 e 20 μM para AG) sendo dissolvidas em DMSO. Para a análise genotípica, foram avaliados quatro polimorfismos: -216G/T, R497K, 787C/T e intron 1 (CA)_n. A expressão de EGFR foi analisada por PCR em tempo real. Já para as outras duas drogas, observou-se que estas se comportaram de forma diferente. Os fibroblastos tiveram uma maior variabilidade na resposta para Ge (coeficiente de variabilidade entre as quatro doses de 61%) quando comparado a resposta para AG (26%). A inibição do crescimento não foi correlacionada com o nível de expressão de EGFR. Observou-se, ainda, correlação significativa entre o polimorfismo R497K e a sobrevivência das células tratadas com AG na dose de 5 μM ($p < 0.01$) e 10 μM ($p < 0.05$) com uma maior inibição do crescimento celular nos alelos K. Nenhuma correlação foi observada entre os polimorfismos e a citotoxicidade de Ge. Essas observações sugerem que os efeitos citotóxicos de G e AG possuem mecanismos diferentes, e que outros genes tais como transportadores podem contribuir para a resposta a essas drogas. O polimorfismo R497K pode ser útil como marcador de predição de resposta a AG e/ou agentes semelhantes. Mais estudos envolvendo vias de sinalização devem ser realizados para esclarecer a relação entre resposta e *rash* cutâneo em pacientes tratados com inibidores de tirosina quinase.

Palavras-Chave: 1. Farmacogenética. 2. Inibidores de Proteínas Quinases. 3.

Genes erbB-1. 4. Polimorfismo Genético

ABSTRACT

ABSTRACT

Response to EGFR inhibitors in fibroblast cell lines and its association with germline polymorphisms. Raquel Carvalho Montenegro. Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Co-Orientador: Mark J Ratain. Tese de Doutorado Sandwich. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC; e Departamento de Medicina, UC. 2006

Only a small number of cancer patients benefit from therapy with EGFR inhibitors. It is therefore important to understand the mechanism of action of these drugs and to find predictive markers for drug response to guide the selection of patients who can benefit from these drugs. Although somatic mutations and gene amplification have been correlated with the efficacy of EGFR-targeting therapy, cancer cells and/or patients with normal EGFR expression are also sensitive to these drugs. We then aim to further understand the mechanism underlying the predisposition to sensitivity to EGFR inhibitors in germline cells. We chose 70 human normal fibroblasts cell lines as an *in vitro* model. Cytotoxicity studies were performed on these cells using two EGFR inhibitors, tarceva (T), gefitinib (G) and AG1478 (AG). Cells were incubated with serial concentrations of the drugs (10, 20, 40 and 60 μM for T and G and 5, 10, 15 and 20 μM for AG) dissolved in DMSO. Growth inhibition was measured by Alamar Blue. Four polymorphisms, -216G/T, R497K, 787C/T and intron 1 (CA)_n, were genotyped in these cells. EGFR expression was measured with real-time PCR. There was considerable variability in drug response in a dose-dependent manner among these cells. No working concentration were found to be toxic for T. The other two drugs behaved quite differently. The fibroblasts had a much more variable response to G (mean of coefficient of variance of survival rates under all 4 concentrations, 61%) when compared to the response to AG (26%). Drug response was not correlated with EGFR expression. A significant correlation was observed between the R497K polymorphism and the survival rate of cells treated with AG at 5 μM ($p < 0.01$) and 10 μM ($p < 0.05$) with higher growth inhibition in K allele-carriers. No correlation was observed between any of the four EGFR polymorphisms and G cytotoxicity. These observations suggest that the cytotoxic effects of G and AG are due to different mechanisms, and that other genes such as transporters may also contribute to drug response. The R497K polymorphism may be useful as a predictive marker for response to AG and/or similar agents. Also, pathway studies should be done to clarify the relationship between response and cutaneous rash in patients treated with tyrosine kinase inhibitors.

Keywords: 1. Pharmacogenetics. 2. Tyrosine kinase inhibitors. 3. erbB-1 gene. 4. Genetic polymorphism

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 FARMACOGENÉTICA

O estudo das bases genéticas envolvidas na variabilidade individual encontrada nas respostas terapêuticas a fármacos é conhecido como farmacogenética (Shi *et al.*, 2001). No nosso organismo os genes e mais recentemente RNAi (RNA de interferência) determinam as proteínas, pequenas modificações nestes genes podem alterar a função destas proteínas. Ao entrar no organismo, os fármacos distribuí-se por todo o corpo interagindo com estas proteínas. Com isso, pequenas modificações podem afetar ou até mesmo abolir a resposta do indivíduo às drogas (Figura 1).

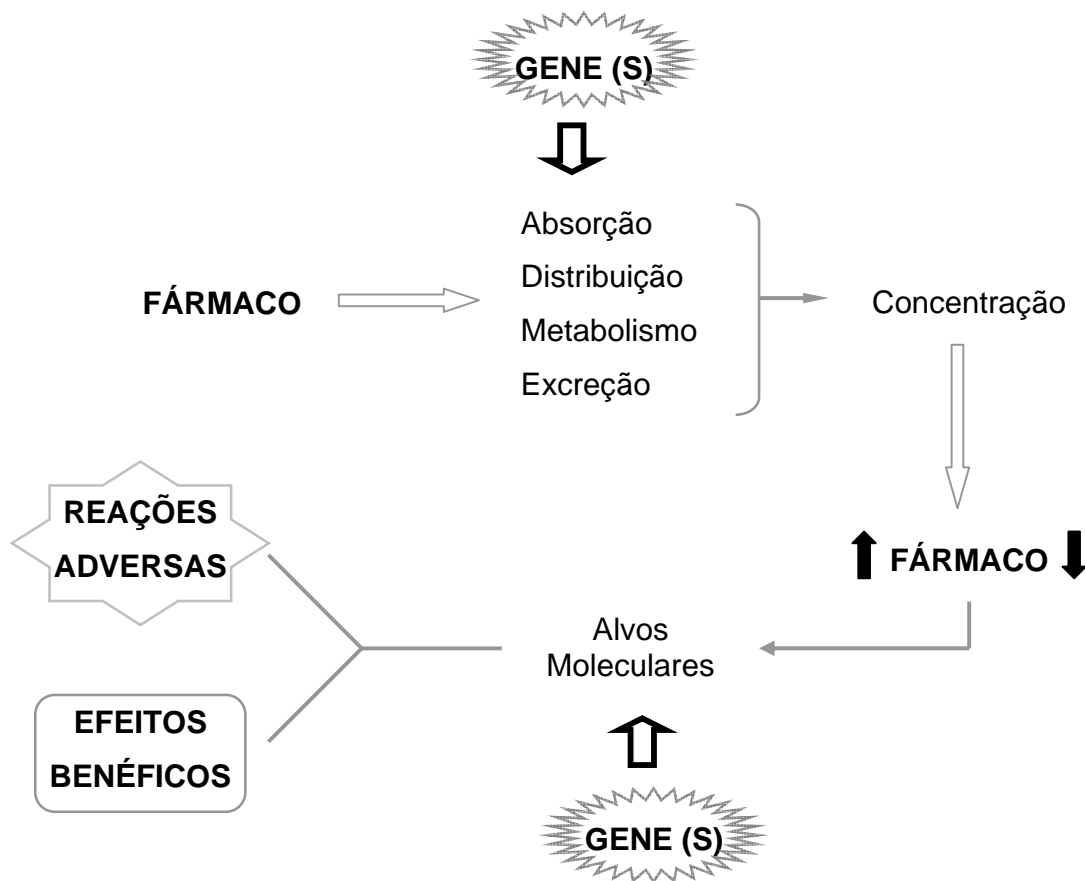


Figura 1: Inter-relação entre os genes e como estes podem afetar a resposta aos fármacos. Diferentes variações em genes envolvidos nos processos

farmacocinéticos podem alterar a concentração do fármaco no organismo, que ao interagir com alvos moleculares tais como receptores, transportadores, entre outros, podem levar a um efeito tóxico (reação adversa) ou a um efeito benéfico. Estes dois caminhos podem ser determinados por variações nos genes responsáveis por estes alvos moleculares.

As primeiras observações da variação individual em respostas às drogas foram relatadas por Pitágoras (510 a.C.), onde a ingestão de favas provocava intoxicação em alguns indivíduos e em outros, não. Passaram-se séculos para que houvesse novas observações que levassem ao que hoje chamamos de farmacogenética.

Entre 1902 e 1909, Archibald Garrod ressaltou a concepção de individualidade química no homem (Garrod, 1902). Em um trecho publicado no livro “Inborn errors of metabolism” (1908), Garrod sumariza a sua visão da farmacogenética: “... *even against chemical poisons taken by mouth, or by other channels, there are some means of defence. Every active drug is a poison, when taken in large enough doses; and in some subjects a dose which is innocuous to the majority of people has toxic effects, whereas others show exceptional tolerance of the same drug...*” (... até mesmo um veneno tomado pela boca ou por qualquer outra via leva o organismo a desenvolver algum tipo de defesa. Toda droga ativa é um veneno quando tomada em altas doses; e em alguns indivíduos a dose que é inócua para a maioria das pessoas pode apresentar efeitos tóxicos, enquanto que em outros indivíduos a mesma droga e dose pode ser tolerada...) (Meyer, 2004).

Apesar das observações de Garrod, o primeiro estudo de relevância na farmacogenética não foi relativo à variabilidade individual em resposta a drogas e sim a habilidade de distinguir o sabor, no caso, inabilidade de sentir o gosto da feniltiocarbamida. Até os dias atuais, não se sabe a causa desta variabilidade, mas este estudo serviu de protótipo para inúmeros ensaios no campo da farmacogenética (Meyer, 2004).

Em meados de 1950, o desenvolvimento de novas técnicas permitiu uma

maior segurança na mensuração da atividade de enzimas metabólicas, metabólitos intermediários e resposta a drogas. Estudos com a isoniazida demonstraram que havia diferença interindividual na excreção desta droga e que esta diferença estava relacionada a habilidade de cada indivíduo converter isoniazida a acetilisoniazida (Meyer, 2004). Foi apenas em 1960 que Evans identificou dois grupos denominando-os de acetiladores rápidos e acetiladores lentos (Evans, 1960). As bases genéticas deste polimorfismo só foram elucidadas 40 anos depois que Blum, Grant e Meyer (1991) purificaram a enzima N-acetiltransferase 1/2 (NAT1/2) e clonaram seus respectivos genes levando a descoberta de duas variáveis mutantes, hoje conhecida como NAT2*5 e NAT2*6 associados a alelos acetiladores lentos (Blum *et al.*, 1991). Estudos com gêmeos demonstraram ser uma herança autossômico-recessiva e que indivíduos com fenótipo de acetiladores lentos eram mais susceptíveis a efeitos tóxicos tais como neuropatia periférica (Meyer, 2004).

Foi na segunda Guerra mundial que Alf Alving e seus colaboradores observaram que aproximadamente 10% dos soldados negros apresentavam crises hemolíticas agudas com a administração de primaquina ou qualquer outra droga anti-malárica quando comparado ao pequeno número de casos observados em soldados caucasianos (Clayman *et al.*, 1952). Depois foi observado que a causa destas crises estava relacionada com a deficiência da enzima glicose-6-fosfato-dehidrogenase (*G6PD*) alterando o metabolismo dos eritrócitos (Alving *et al.*, 1956). Atualmente, sabe-se que o locus desta enzima *G6PD* no cromossomo X é um dos mais polimórficos na espécie humana e que os alelos responsáveis pela atividade reduzida desta enzima estão altamente correlacionados com a prevalência de malária (Meyer, 2004).

Em 1957, Kalow & Staron caracterizaram a deficiência sérica da enzima colinesterase em indivíduos com apnéia relacionada a administração da succinilcolina. Estes autores, estudando grupos familiares, demonstraram que o efeito prolongado da paralisia muscular devido a succinilcolina estava associado a alteração cinética de uma pseudocolinesterase, a butirilcolinesterase e que esta deficiência era autossômica-recessiva.

A propagação dos estudos relacionando variabilidade interindividual em relação às drogas levou Vogel em 1959 a sugerir o nome Farmacogenética (Meyer, 2004). Em 1962, Kalow publicou a primeira monografia chamada: "*Pharmacogenetics - Heredity and the response to drugs*" (Farmacogenética – Hereditariedade e resposta às drogas) com exemplos de fatores genéticos que influenciavam a resposta a drogas. Nos anos subsequentes houve uma explosão de pesquisas e encontros para se discutir os estudos em farmacogenética em diferentes áreas.

Os estudos com gêmeos (Alexanderson *et al.*, 1969) foram importantes para comprovar as evidências de que, os fatores genéticos são responsáveis por essa variação interindividual no metabolismo da maioria das drogas. Foi com estes estudos que se estabeleceu que o mecanismo dos antidepressivos tricíclicos estivesse sob controle gênico.

Nos anos 70, dois grupos marcaram os estudos na farmacogenética. Robert L Smith, em Londres, realizou um experimento com seus colegas onde todos tomaram 32mg de debrisoquina (antihipertensivo). Após algumas horas, Smith apresentou hipotensão ortostática severa enquanto que seus colegas não apresentaram sintomas (Meyer, 2004). A análise da urina dos voluntários revelou que a alta sensibilidade a este medicamento era devida a inabilidade de formar o metabólito 4-hidroxidebrisoquina. Um estudo com 94 voluntários e 3 famílias levou a descrição do polimorfismo na enzima responsável pela oxidação da droga, sendo descrito dois fenótipos: metabolizadores rápidos e metabolizadores lentos, sendo então caracterizada como uma herança autossômica-recessiva (Mahgoub *et al.*, 1977).

No mesmo período, na Alemanha, Michel Eichelbaum e Hans Dengler observaram que em seus estudos de farmacocinética da espertaína (antiarrítmico) dois voluntários apresentaram efeitos indesejáveis, como náuseas, visão turva entre outros. Estes efeitos foram correlacionados a altos níveis de espertaína no plasma dos voluntários. Mais uma vez, estudos de população e com famílias demonstraram que o metabolismo desta droga gerava diferentes fenótipos, sendo, portanto um polimorfismo genético (Meyer, 2004).

O mecanismo molecular foi descoberto alguns anos depois, sendo inicialmente identificado que a enzima responsável pelos diferentes fenótipos era da família do citocromo P450 (Meier *et al.*, 1983). Subseqüentemente, esta enzima, atualmente conhecida como CYP2D6, foi purificada (Gut *et al.*, 1984) e clonada (Gonzalez *et al.*, 1988). Com esta descoberta e com o surgimento da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR (Polimerase Chain Reaction) em 1985, foi possível desenvolver o primeiro teste de PCR alelo específico para identificar os genótipos mais comuns associados aos metabolizadores lentos (Heim & Meyer, 1990). Johansson e colaboradores, em 1993, demonstraram que os indivíduos com fenótipo associado a metabolizadores ultra-rápidos apresentaram amplificação do gene correspondente a enzima CYP2D6. Esta foi a primeira observação de amplificação gênica com ganho de função em indivíduos saudáveis.

Nas décadas seguintes à descoberta da CYP2D6, vários estudos foram realizados a fim de encontrar polimorfismos em outros membros da família do citocromo P450. Um deles foi o polimorfismo da mephenitoína (anticonvulsivante) associada a uma deficiência da enzima CYP2C19 levando a um aumento no efeito do omeprazol (anti-ulcerativos) (Morais *et al.*, 1994), ou ainda, o polimorfismo associado a fenitoína/warfarina, tobutamida, entre outras drogas, causado por uma mutação na enzima CYP2C9 (Scordo *et al.*, 2000).

Atualmente, o estudo da farmacogenética pode ser observado em todas as áreas da medicina; drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, anti-retrovirais, anti-hipertensivas, anti-neoplásicas, entre outras.

1.2 FARMACOGENÉTICA DE DROGAS ANTICÂNCER

O câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil e no mundo. Um dos tratamentos utilizados no combate ao câncer é a quimioterapia que pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. A toxicidade é variável para os diversos tecidos e depende da droga utilizada. Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição e

da concentração plasmática da droga. Com o surgimento da farmacogenética, observamos que essa concentração plasmática pode mudar de acordo com a variabilidade genética de cada indivíduo levando à efeitos mais severos ou até mesmo ausência de efeito terapêutico.

Uma das primeiras observações de um polimorfismo associado a drogas anticâncer foi em 1995 onde Krynetzki e colaboradores identificaram uma mutação pontual (G²³⁸ > C) no gene da enzima tiopurina S-metiltransferase (TPMT), gene com herança autossômico-recessiva, responsável pelo metabolismo das drogas 6-mercaptopurina e azatioprina. Essa mutação leva a um decréscimo na atividade catalítica da enzima resultando em severos efeitos colaterais em pacientes portadores desta alteração. Para caracterizar que esta mutação estava presente no DNA genômico de pacientes que apresentavam toxicidade hematopoiética severa e que esta era inerente a pacientes com deficiência na enzima TPMT, os autores genotiparam o pai, a mãe e o irmão para essa mutação e constataram que a mãe possuía um alelo mutado e um normal, o pai, alelos sem a mutação em questão, e a filha com um alelo mutado e o outro normal para a mutação. Isso leva a conclusão de que existe um outro fator, provavelmente, ligado ao alelo paterno que colabora para a toxicidade observada neste pacientes.

A partir destas descobertas, outros trabalhos estão sendo desenvolvidos na tentativa de se formar um grupo de genes alvos que possam levar a uma melhora no prognóstico e até mesmo no tratamento de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Tais alvos estariam envolvidos com a farmacodinâmica de drogas antileucêmicas tais como a enzima glutathione S-transferase (GSTM 1) e a enzima timidilato sintase (Rocha *et al.*, 2005).

A deficiência da enzima Dihidropirimidina Dehidrogenase (DPD) é um outro alvo do estudo farmacogenético, visto que esta enzima participa da via metabólica do 5-Fluorouracil (5-FU), quimioterápico bastante utilizado na prática clínica. Acreditava-se que a toxicidade causada pelo 5-FU estava associada a uma deficiência na DPD (Diasio *et al.*, 1988). Esta descoberta até então promissora levou à inúmeros estudos, mas com resultados pouco satisfatórios.

Pó volta de 2000, dois grupos demonstraram que 33% e 66% dos seus pacientes com efeitos adversos severos após administração de 5-FU não apresentavam deficiência completa na DPD (Milano *et al.*, 1999; van Kuilenburg *et al.*, 2000) mostrando um possível envolvimento de outros fatores que justifiquem a discrepância entre os achados. Estudos com a variante DPD*2A (mutação G > A em um sítio de splicing), uma das mais freqüentes em pacientes com toxicidade aguda ao 5-FU, mostraram associação com a toxicidade severa (van Kuilenburg *et al.*, 2001; Raida *et al.*, 2001). Já outro estudo (Collie-Duguid *et al.*, 2000) não conseguiu confirmar esta associação.

Atualmente, sabe-se que o gene da DPD apresenta uma série de mutações funcionais o que dificulta o seu uso em testes de *screening* de pacientes com toxicidade ao 5-FU, pois a análise de apenas uma mutação neste gene não seria conclusiva para pacientes com alto risco de toxicidade (Nagasubramanian *et al.*, 2004).

Um outro exemplo no estudo da farmacogenética de drogas anti-neoplásicas é o polimorfismo da enzima UDP-glucuronosil transferase (UGT), envolvida na excreção do irinotecan (Camptosar[®]). Derivado da campotecina, o irinotecan é uma pró-droga que no fígado é metabolizada por carboxilases em SN-38, seu metabólito ativo. O SN-38 é glucoronizado pela enzima UGT (SN-38G), principalmente UGT1A1 (Iyer *et al.*, 1998), sendo em seguida excretado pela bile e urina. No intestino, o SN-38G pode sofrer a ação da enzima bacteriana β -glucuronidase e voltar a sua forma ativa SN-38. Um dos efeitos colaterais do irinotecan é a diarreia severa que está diretamente associada ao seu metabólito ativo, SN-38. Assim, é sabido que quando existem baixos índices de glucoronização do SN-38, maior é o risco de toxicidade (Gupta *et al.*, 1994).

O polimorfismo do gene da enzima UGT1A1 foi inicialmente observado em paciente com Síndrome de Gilbert. A região promotora do gene UGT1A1 ao invés de conter 6 repetições TA continham 7 repetições (Bosman *et al.*, 1995), sendo posteriormente denominada de variante UGT1A1*28 do gene UGT1A1 (Mackenzie *et al.*, 1997). Em 2002, Iyer e colaboradores observaram a correlação entre o número de repetições TA, a farmacocinética e a toxicidade do

irinotecan. Pacientes com genótipo homocigoto ou heterocigoto para o alelo (TA)₇ apresentaram uma aumento na AUC_{SN-38} e um efeito adverso maior, como por exemplo diarreia severa.

Atualmente, esta associaçãõ já está bastante caracterizada e aceita no meio científico (Marcuello *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2005) e em agosto de 2005, a agência americana de regulamentaçãõ de medicamentos e alimentos, FDA (Food and Drugs Administration), aprovou um kit para detectar o polimorfismo do gene UGT1A1, tecnologia desenvolvida pelo grupo do Dr. Mark Ratain na Universidade de Chicago, que será disponibilizada comercialmente para todo o mundo pela clínica Mayo (Rochester-EUA) (Aase, 2005).

Um outro marcador importante na farmacogenética de drogas anti-neoplásicas é o HER-2 ou erbB2. A amplificaçãõ gênica do HER-2 é encontrada em aproximadamente 30% dos cânceres de mama e ovário, resultando na superexpressãõ do seu produto gênico e conseqüentemente em um prognóstico ruim (Pegram *et al.*, 1997).

Em 1992, Carter e colaboradores revolucionaram a terapêutica do câncér com a modelagem de um anticorpo monoclonal humanizado, conhecido atualmente como Herceptin[®] ou Trastuzumab. Esta droga se liga a proteínas HER-2 presentes na superfície celular e que são responsáveis por uma cascata de sinalizaçãõ que controlam a proliferaçãõ celular. Com isso, o FDA aprovou um teste farmacogenético indireto (1998) e um direto (2001) para detecçãõ desta alteraçãõ molecular, sendo recomendado para pacientes com grau +2 ou +3 na escala de imunorreatividade do HER-2 (Eppenberger-Castori *et al.*, 2001). Atualmente, o trastuzumab é utilizado em milhões de pacientes vítimas do câncér de mama, positivos para HER-2.

A descoberta do cromossomo Filadélfia em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LCM) em 1960 foi um marco na citogenética do câncér (Nowell & Hungerford, 1960). Em 1973, Rowley demonstrou que o cromossomo Filadélfia resulta de uma translocaçãõ recíproca de material genético entre o cromossomo 9 e o cromossomo 22, definido citogeneticamente como t(9:22)(q34;q11). Esta translocaçãõ resulta em uma proteína quimérica conhecida

como bcr/abl, com atividade tirosina quinase. Por causa dessa alta atividade específica e nova localização na célula agora no citoplasma, bcr/abl tem acesso a diferentes substratos que a proteína c-abl não tinha, e as fosforila de uma maneira desordenada (Senechal & Sawyer, 1996). Em 2001, o FDA aprova o Glivec[®] (Mesilato de Imatinib), uma droga inibidora da atividade tirosina quinase da proteína quimérica bcr/abl (FDA, 2001). Atualmente, é possível determinar se através da detecção desta proteína aberrante, quais os pacientes que tem o cromossomo Filadélfia e que podem ser beneficiados com o uso do Mesilato de Imatinib.

Atualmente, um dos alvos da farmacogenética de drogas anti-neoplásicas é o receptor de fator de crescimento epidermal tipo 1 (EGFR). Isso porque foi observado que o gene EGFR apresenta-se amplificado ou superexpresso em inúmeros tipos de câncer, sendo detectado em até 50% dos tumores de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) (Amann *et al.*, 2005).

Em maio de 2003, o FDA aprovou o gefitinib (Iressa[®]) (Cohen *et al.*, 2004) e em 2004, o erlotinib (Tarceva[®]), drogas inibidoras da tirosina quinase do EGFR1, utilizada para pacientes com NSCLC avançado ou metastático (FDA, 2004).

Atualmente, sabe-se que a resposta terapêutica associada a estes inibidores está relacionada a mutações encontradas no domínio tirosina quinase do receptor (Lynch *et al.*, 2004). A partir desta descoberta, muitos estudos estão sendo realizados com o intuito da caracterização da importância deste receptor e o seu envolvimento na resposta terapêutica.

1.3 RECEPTORES TIROSINA QUINASE

A família de receptores acoplados à tirosina quinase é uma das mais importantes no controle e regulação da sinalização celular tanto nas células sadias quanto nas células tumorais. Proteínas tipo tirosina quinase existem em duas formas: acopladas a receptores ou citosólicas. Algumas, ainda, podem ser nucleares como a Abl. Todas possuem um domínio para o substrato, o ATP e a

catálise. Este último domínio é responsável pela transferência de um grupo fosforil terminal do ATP para um grupo amino da tirosina do substrato aceptor, desencadeando uma cascata de fosforilação de resíduos de tirosina de inúmeras moléculas alvo, controlando, assim, processos celulares fundamentais como o ciclo celular, migração, metabolismo, proliferação e diferenciação (Schlessinger, 2000).

As tirosinas quinases acopladas a receptores representam mais da metade de todas as tirosinas quinases já descritas (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Estes receptores possuem um domínio extracelular onde reside o sítio de ligação, uma alfa-hélice hidrofóbica na porção transmembrânica e um domínio citosólico que possui o resíduo protéico com atividade tirosina quinase. Quando o efetor se liga ao receptor ocorre à dimerização do receptor, com conseqüente transdução do sinal via fosforilação de um radical de tirosina em uma proteína intracelular, desencadeando, assim, uma seqüência de eventos que leva a uma resposta celular (Tibes *et al.*, 2005). Atualmente, um dos grupos de receptores mais estudados com atividade tirosina quinase é a família dos receptores de fator de crescimento epidermal ou EGFR.

1.4 FAMÍLIA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

A família do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) localiza-se na superfície celular, possuindo um domínio extracelular, um transmembrânico e um intracelular. Esta família consiste de quatro representantes: (a) EGFR ou ErbB1 ou HER1; (b) ErbB2 ou HER2/neu; (c) ErbB3 ou HER3; e, (d) ErbB4 ou HER4. Estes receptores são homólogos no domínio tirosina quinase, mas diferem no domínio extracelular e na porção carboxi-terminal (Schlessinger, 2000). Quando o ligante acopla a um dos membros desta família, ocorre dimerização do receptor. Esta pode ocorrer entre receptores iguais (homodímeros) como, por exemplo, ErbB1/ErbB1 ou entre receptores diferentes mas da mesma família (heterodímero) como por exemplo ErbB1/ErbB2, com conseqüente internalização do receptor (Figura 2) (Tsao &

Herbst, 2003). Após a dimerização e a internalização do receptor, ocorre a autofosforilação dos resíduos citoplasmáticos de tirosina quinase, o que permite a fosforilação de outras proteínas que levam, assim, a transdução do sinal e consequentes eventos celulares (Herbst, 2004).

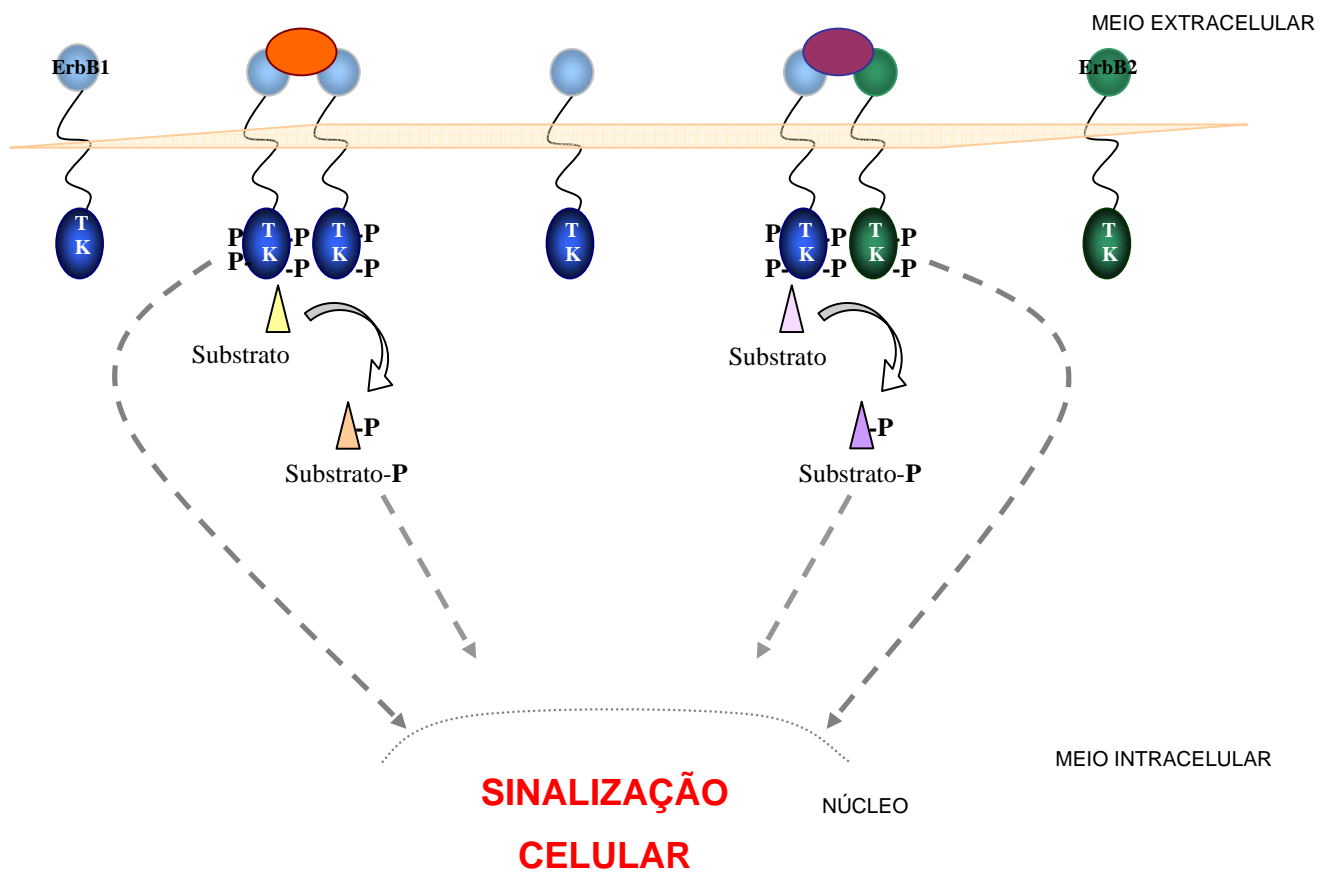


Figura 2: Mecanismo de ativação do receptor EGFR. Quando o ligante acopla ao receptor, ocorre dimerização deste receptor. Esta pode ser entre receptores iguais (homodímeros) ou diferentes (heterodímeros), levando a transdução do sinal via fosforilação de substratos intracelulares. (John Mendelsohn and Jose Baselga .J Clin Oncol. 2003. 21:2787-2799).

A degradação destes receptores é um passo muito importante na regulação deste receptor. Depois de ligado, este sofre internalização, com término da sinalização em alguns segundos, sendo então degradado por endocitose e posteriormente, reciclado na superfície celular para que possa repetir todo o processo de sinalização (Yarden, 2001).

Quando a atividade tirosina quinase apresenta-se alterada podem ocorrer transformações oncogênicas nas células ou tecido. Atualmente, sabe-se que existem quatro mecanismos mais prováveis: (a) transdução retroviral de um proto-oncogene correspondente a tirosina quinase e concomitante mudanças estruturais (Miller & Raab-Traub, 1999); (b) rearranjo genético, tais como translocações, o que resulta em fusão de proteínas, onde a nova proteína gerada possui a porção tirosina quinase da proteína A e a porção externa da proteína B, como por exemplo, a proteína aberrante Bcr-Abl conhecido como cromossomo Filadélfia, encontrado em leucemias (Kloetzer *et al.*, 1985); (c) mutações com ganho de função ou pequenas deleções no resíduo tirosina quinase, como por exemplo no *KIT* em tumores estromais do sistema digestivo (Majunder *et al.*, 1988); e (d) amplificação gênica, resultando em uma superexpressão de tirosina quinase (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Todas estas alterações tornam os representantes desta família alvos importantes na terapêutica do câncer.

Atualmente, um dos membros mais importantes desta família na pesquisa do câncer é o EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou ErbB1 ou ainda HER1. A molécula do EGFR foi descoberta em 1975 por Cohen e colaboradores, sendo identificada como uma glicoproteína de 170kDa

constituída de uma única cadeia protéica com 1186 aminoácidos, cujo gene esta localizado no braço curto do cromossomo 7 (Davies *et al.*, 1980). O gene do EGFR possui 28 éxons, sendo mostrado na figura abaixo cada éxon e suas respectivas áreas codificadoras (Figura 3).

Este receptor apresenta um segmento transmembrânico hidrofóbico (éxons 1 a 16) de 23 aminoácidos ligados ao domínio intracelular que apresenta uma atividade tirosina quinase (éxon 18 a 24) e um domínio regulatório do receptor (Schlessinger, 1988).

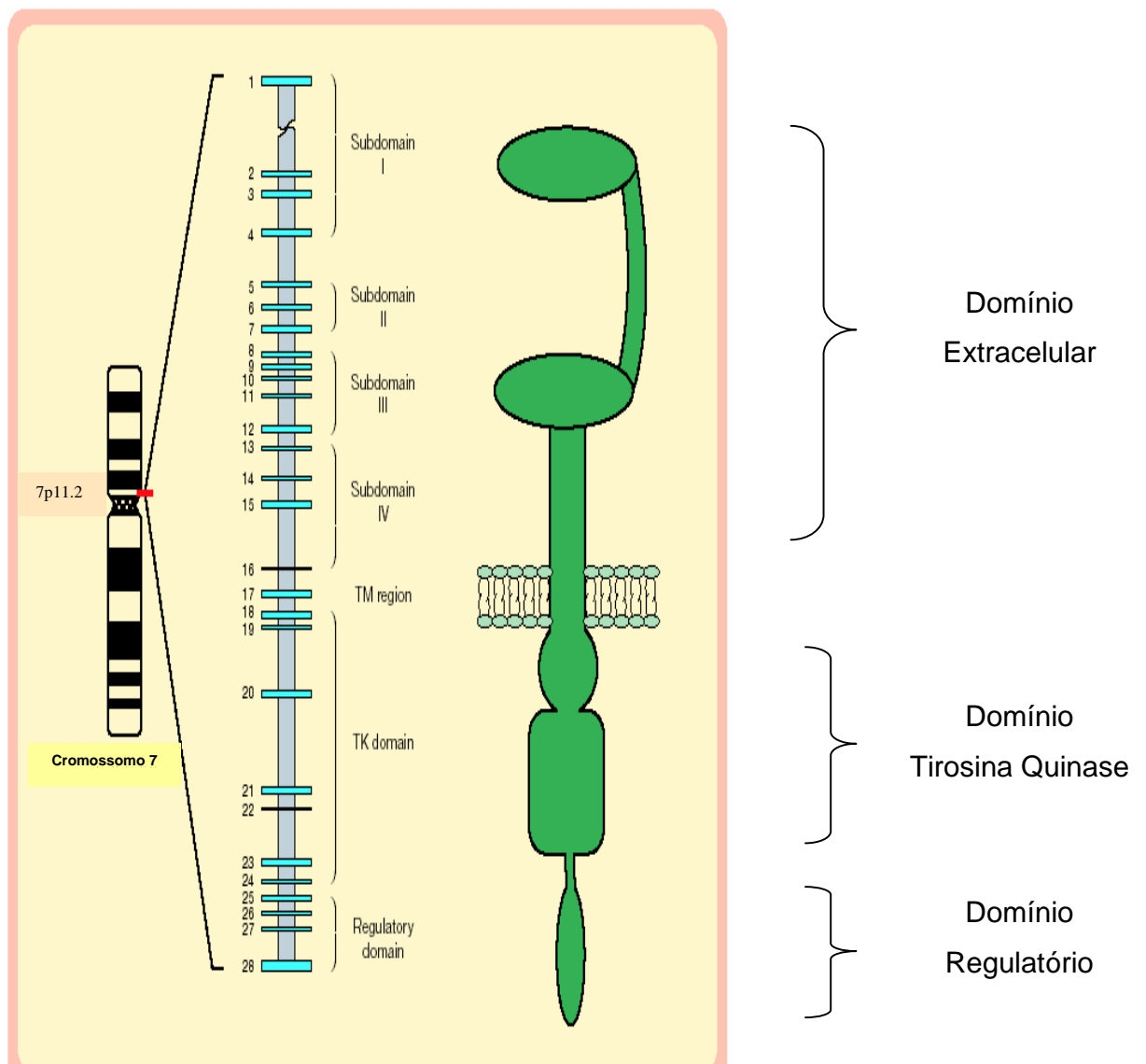


Figure 1. Chromosomal location of the EGFR gene, its exon structure and the EGFR protein domains encoded by these exons. Exons are shown as blue boxes and introns as grey boxes. Intron 1, which is approximately 123 kilobases in length, has been truncated for the purpose of this illustration (TK = tyrosine kinase; TM = transmembrane).

Figura 3: Localização cromossômica do gene do EGFR, seus éxons e respectivos domínios. O gene do EGFR se localiza no cromossomo 7, na região 7p11.2. Os éxons estão em azul e os íntrons em cinza. O íntron 1, que tem aproximadamente 123Kb, foi truncado neste esquema. FONTE: www.egfr-info.com

mostraram que esta ausência era letal ao embrião ou estava envolvida na falha do desenvolvimento de diversos órgãos, como por exemplo, pele, pulmão e trato gastrointestinal (Gscwind *et al.*, 2004). Atualmente, já foram descritos vários ligantes endógenos sendo o EGF e TGF- α os principais (Yarden & Sliwkowski, 2001).

Em células normais existem cerca de 40.000 a 100.000 receptores/célula. Já em células tumorais, principalmente de tumores sólidos como mama, pulmão, cabeça e pescoço, cólon, entre outros, podem apresentar 2×10^6 moléculas de HER por célula (Herbst, 2004), sendo observada uma superexpressão do EGFR1 em cerca de 80-100% de tumores de cabeça e pescoço, 14-91% nos tumores de mama, 50-90% dos tumores renais, 40-80% dos tumores pulmonares entre outros (Grandis & Sok, 2004), o que o torna o EGFR1 um excelente alvo na terapêutica do câncer.

A imortalização celular ou proliferação celular observada no câncer, dentre outras doenças, está relacionada a um descontrole no ciclo celular. A via de transdução do sinal do EGFR/HER1 leva a ativação da ciclina D1 que está envolvida no controle do ciclo celular. Normalmente, quando as células normais atingem certa densidade, elas param de crescer e entram em quiescência (G0). Contudo, o estímulo de fatores de crescimento tais como o EGF pode fazer com

que estas células saiam do seu estado quiescente e entrem novamente na fase G1 do ciclo celular. Na fase G1 existe um ponto de checagem que as células tem que passar para progredir no ciclo celular. A ciclina D1 faz com que estas células passem da fase G1 para fase de síntese (S) do ciclo celular, resultando em uma rápida divisão celular (Harari & Yarden, 2000).

O crescimento tumoral parece estar associado a um aumento do tecido vascular, necessário para o crescimento e nutrição celular (Hanahan & Folkman, 1996). Desta forma, a via de transdução do sinal do EGFR/HER1 envolvida na promoção da angiogênese segue dois mecanismos principais: primeiro, ocorre estimulação da produção de fatores angiogênicos, via ativação do EGFR/HER1, tais como VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular), o que leva a produção de novos tecidos vasculares; e segundo, há um aumento na produção de enzimas especializadas denominadas metaloproteinases (MMP) que facilita a remodelagem da matriz tecidual (O-charoenrat *et al.*, 1999).

A ativação do EGFR1/HER1 também pode apresentar um efeito anti-apoptótico que promove reparo e aumento da sobrevivência celular após exposição à agentes tóxicos, tais como quimioterapia e radioterapia. Em células normais, o dano ao DNA induzido por agentes tóxicos induz a expressão da proteína Bax que entra na mitocôndria e inicia o processo de apoptose. O mecanismo proposto para o envolvimento do EGFR1/HER1 na sobrevivência celular baseia-se na ativação do receptor com conseqüente indução da expressão da Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica que bloqueia a atividade da proteína Bax, levando à célula a sobreviver e conseqüentemente, proliferar, podendo promover o desenvolvimento e o crescimento tumoral (Jost *et al.*, 1999).

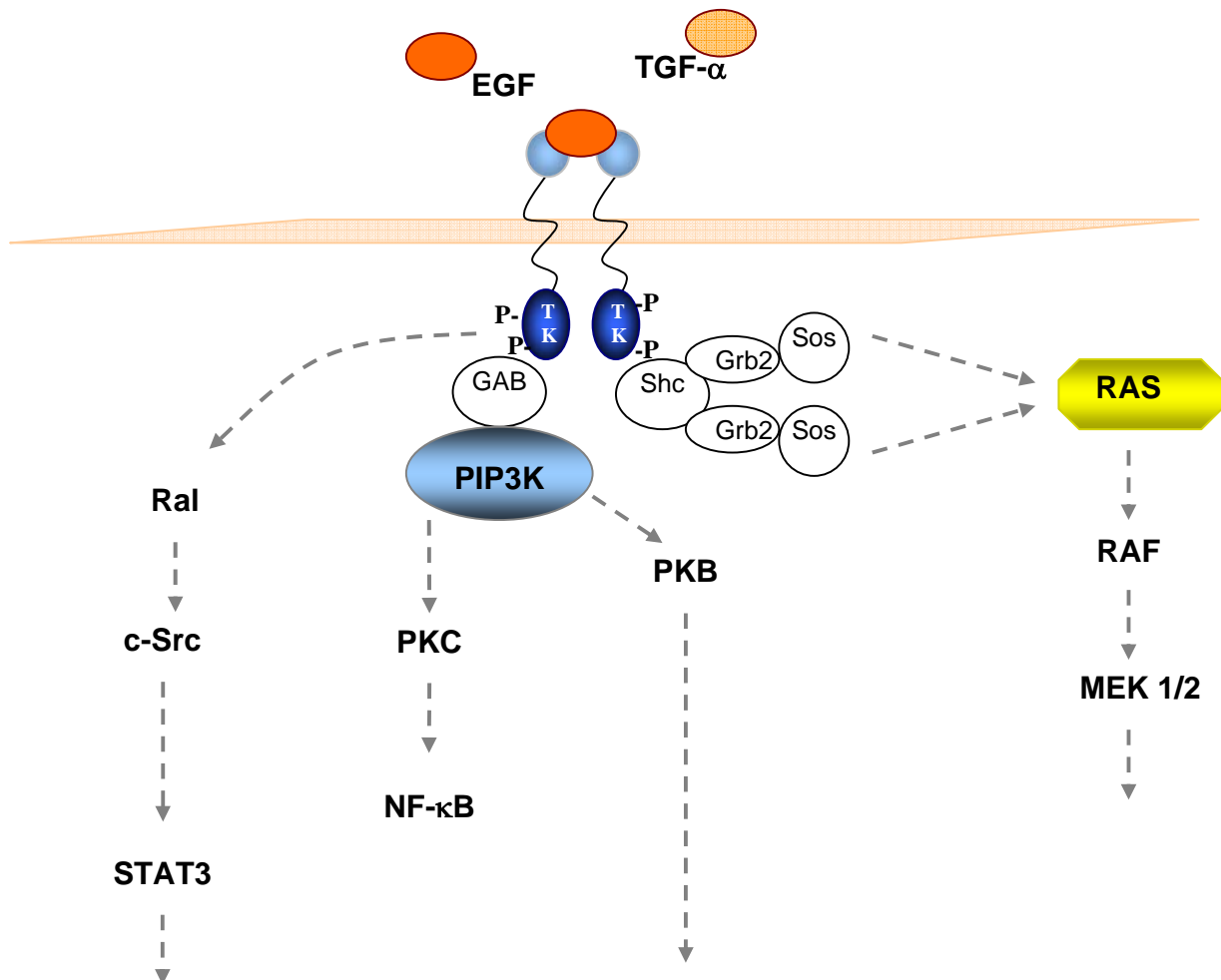
A complexidade da cascata de transdução do sinal via ativação do EGFR1 não se resume a um só evento celular específico. Contudo, algumas vias já foram identificadas, sendo as principais (Figura 4): via ras/raf/MAPK, via quinase fosfatidilinositol-3 (PI3K) e via STAT (Tibes *et al.*, 2005; Knight *et al.*, 2004).

Quando o EGFR1 é fosforilado, este recruta a proteína adaptadora Shc e Grb2, que agem via Sos que por fim ativa a proteína Ras. Subseqüentemente,

ocorre uma cascata de ativação via Raf e MAP quinase/Erk or MEK, levando a fosforilação das MAP quinase ERK1/2, que por fim, induz a expressão de fatores de crescimento (Figura 4). A ativação das vias MAP quinases esta associada com a divisão celular e sua atividade aberrante podem estar correlacionadas ao descontrole da proliferação celular observada no câncer (Pal & Pegram, 2005).

O envolvimento do EGFR1 na promoção do ciclo celular parece estar relacionado com a via PI3K. Acredita-se que proteína adaptadora Gab1 ativa PI3K o que, por fim, leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Figura 4). Esta via parece estar envolvida na progressão do ciclo celular em alguns tipos de câncer (Pal & Pegram, 2005).

Uma outra via iniciada pela ativação do EGFR1 é mediada por uma tirosina quinase citoplasmática, c-Src. A proteína c-Src ativa a transcrição de fatores de transcrição da família STAT (Figura 4), o que parece ser importante na proliferação e sobrevivência celular observada no câncer. A ativação da via da proteína STAT3 parece estar envolvida na resistência de células tumorais a agentes citotóxicos (Pal & Pegram, 2005).



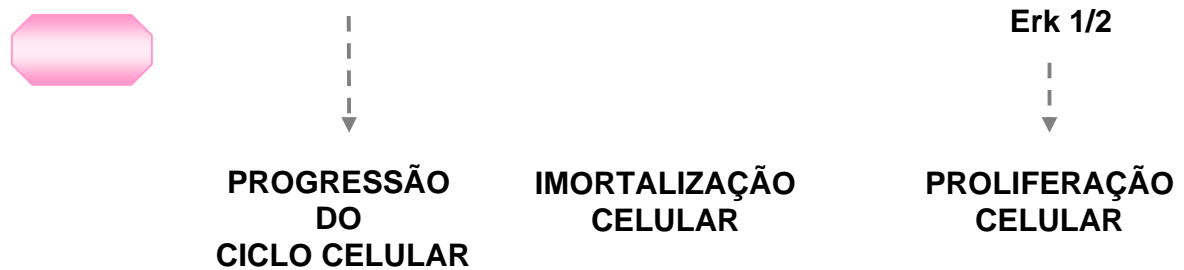


Figura 4: Transdução do sinal via EGFR. Quando o ligante EGF ou TGF- α se liga ao receptor, há uma dimerização do receptor com o conseqüente desencadeamento da transdução do sinal que pode ser via ras, PIP3 e STAT levando aos diferentes tipos de atividade biológica.

É sabido que o EGFR1 apresenta-se desregulado no câncer e que esta desregulação pode se apresentar de diferentes formas. Dentre elas podemos citar: defeitos na internalização dos receptores, amplificação gênica levando a uma superexpressão do receptor e de ligantes, sendo esta última importante nos casos de tumores de mama e próstata dependentes de hormônio.

1.5 INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

É sabido que o EGFR1 apresenta-se superexpresso em inúmeros tipos de tumores, tornando-o um alvo atrativo na terapêutica do câncer. Diferentes estratégias vêm sendo propostas tais como ligantes e/ou anticorpos conjugados a toxinas e anticorpos que tem alta afinidade por ligantes do EGFR, anticorpos monoclonais e pequenas moléculas inibidoras dos resíduos tirosina quinase do receptor do EGFR1. Atualmente, os dois últimos mecanismos vêm sendo bastante explorados na clínica médica.

Anticorpos monoclonais ligam-se na porção externa do receptor, fazendo com que não haja interação entre ligante e o receptor, bloqueando, assim a sinalização intracelular. Um dos mais novos representantes desta classe é o

cetuximab (Mendelsen, 1997; Giaccone, 2005; Jimeno & Hidalgo, 2005), aprovado para o tratamento de câncer colorretal metastático.

Já as pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinase bloqueiam o receptor na porção intracelular, no resíduo tirosina quinase, podendo se reversíveis ou irreversíveis. Inúmeras moléculas vêm sendo testadas e usadas em ensaios experimentais como o AG1478, PD153035 entre outras. Até o presente momento, as únicas moléculas disponíveis comercialmente são Gefitinib e o Erlotinib.

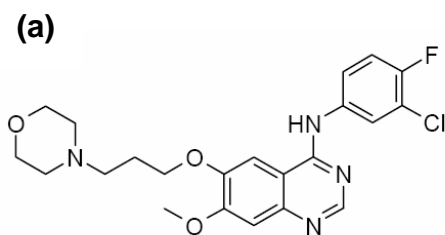
1.5.1 AG1478

A molécula do inibidor de tirosina quinase AG1478 faz parte da família das quinazolininas, denominada 4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina (Figura 5). Estudos anteriores demonstraram que esta droga é capaz de parar o ciclo celular e inibir a proliferação celular em diferentes tipos de câncer (Zhu *et al.*, 2001; Shushan *et al.*, 2004).

Figura 5 - Estrutura química do inibidor de tirosina quinase AG1478.

1.5.2 Gefitinib (Iressa®) e Erlotinib (Tarceva®)

Gefitinib e o Erlotinib são inibidores de tirosina quinase do receptor de crescimento epidermal tipo 1, também conhecido com HER1, erbB1 ou EGFR. O gefitinib e o erlotinib são medicamentos orais e fazem parte da família das quinazolinamina com nome N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-4-morfolin propoxi] e N-(3-ethynylfenil)-6,7bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina, respectivamente (Figura 6). O gefitinib apresenta-se em comprimidos de 250mg (AstraZeneca) e o erlotinib em comprimidos de 25 mg, 100 mg e 150 mg (OSI-Pharmaceutical/Genetech).



(b)

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

Figura 6: Estrutura química dos inibidores de tirosina quinase gefitinib (a) e erlotinib (b).

O mecanismo de ação destes medicamentos ainda não foi completamente elucidados. O gefitinib inibe a porção intracelular do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), bloqueando a fosforilação de proteínas no citoplasma. Este compete com o ATP no seu sitio de ligação (Cohen *et al.*, 2004).

Os estudos de fase I englobaram pacientes com diferentes tipos de tumores sólidos que apresentavam superexpressão do EGFR1. Dentre todos os tipos de tumores avaliados, os pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas foram os que apresentaram melhor resultado, onde alguns deste pacientes apresentaram estabilização da doença (Baselga *et al.* 2002; Ranson *et al.*, 2002) e redução de 50 a 90% da massa tumoral. Com isso, o FDA aprovou, em maio de 2003, o uso de gefitinib em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas que falharam a dois ou mais tratamentos prévios, apesar de estudos clínicos realizados pela companhia AstraZeneca

mostrarem que apenas 10% dos pacientes foram bastante beneficiados com esta droga (Cohen *et al.*, 2004).

A observação de um subgrupo de paciente responsivo ao gefitinib, levou a comunidade científica a tentar entender as causas desta seleção. Em 2004, Lynch e colaboradores demonstraram que deleções e mutações pontuais no éxon 19 e 21 do gene EGFR poderiam estar relacionadas à resposta terapêutica, visto serem estas regiões codificadoras do resíduo tirosina quinase. Biópsias de 9 pacientes que responderam a terapia com gefitinib, revelaram que em 8 delas, as mutações estavam presentes. É importante ressaltar que o tecido normal destes pacientes não apresentou estas mutações, levando a conclusão de que estas são adquiridas no surgimento do câncer ou após exposição radio-ou quimioterápica. Além disso, os pacientes que não responderam a terapia com gefitinib, também não possuíam mutações ou deleções nos éxons 19 e 21 (Lynch *et al.*, 2004). Na mesma época, em 2004, Paez e colaboradores também encontraram uma correlação entre mutações pontuais e deleções e a resposta ao gefitinib. Um outro fator importante na resposta terapêutica é a amplificação do gene EGFR1 (Cappuzzo *et al.*, 2005; Moroni *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2005). A mesma correlação entre mutação e resposta para inibidores de tirosina quinase não pode ser afirmada para outros tipos de tumores, mesmo que estes tenham respondido a esta terapia (Su *et al.*, 2005; Nagahara *et al.*, 2005).

A vantagem do uso da terapia guiada em relação a terapia convencional esta na atenuação dos efeitos colaterais. O *rash* cutâneo e a diarreia são os efeitos adversos mais severos observados em pacientes que usam qualquer inibidor de tirosina quinase do EGFR1.

Estudos preliminares demonstraram que existe uma forte associação entre a ocorrência de *rash* cutâneo e a resposta terapêutica com conseqüente prolongamento da sobrevida destes pacientes. Esta correlação foi observada em pacientes com diferentes tipos de câncer que estavam sob terapia anti-tirosina quinase do EGFR1 (Pérez-Soler *et al.*, 2003; Pérez-Soler & Saltz, 2005; Mohamed *et al.*, 2005; Dudek *et al.*, 2006).

Complilando todos os estudos anteriores podemos observar que como os inibidores de tirosina quinase são específicos para o EGFR1 e como há uma evidente correlação entre *rash* cutâneo e resposta terapêutica, existe alguma alteração presente na célula normal que também está na célula tumoral, que não aquelas mencionadas anteriormente (deleções e mutações pontuais), visto que estas não estão presentes em células normais. Com isso, se faz importante o estudo de polimorfismos que possam vir a ajudar na seleção de pacientes que irão se beneficiar da terapêutica com inibidores de tirosina quinase.

1.6 MUTAÇÃO E POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DO EGFR1

O projeto genoma permitiu o seqüenciamento de todo DNA genômico humano, o que culminou no surgimento de novas áreas da ciência. Não basta apenas saber a seqüência, um código, mas o que ele significa, quais as suas implicações moleculares e celulares e como podemos utilizá-lo no entendimento de processos fisiológicos e patológicos no organismo. A descoberta de mutações, polimorfismos, microsatélites, entre outros só tem importância clínica se forem associados a estudos funcionais.

O gene do EGFR apresenta inúmeras alterações, mas se estas possuem significado clínico ainda não se sabe por completo. Esse é um processo de busca incessante: ter ou não um significado esperado. Um fenômeno bastante importante no estudo do EGFR1 são as mutações e os polimorfismos encontrados no gene responsável por este receptor. As definições de mutação se confundem com as de polimorfismo. Uma mutação pode ser definida como uma alteração permanente no material genético. Existem diferentes tipos de mutação, dentre elas: mutação pontual (troca, perda ou inserção de 1 pb), mutação *missense* (substituição errada de um aminoácido) e mutação *nonsense* (produz um códon de terminação levando a formação de um produto gênico completamente errado) (Passarge, 2001).

Uma das mutações mais comuns no câncer é a forma mutante EGFRvIII. Esta variante forma uma proteína truncada, onde a porção externa do receptor é

ausente, logo ocorre ativação constitutiva do domínio tirosina quinase desencadeando uma cascata de eventos independente do ligante (Pedersen *et al.*, 2001). Esta mutação é comum em tumores do sistema nervoso central, principalmente glioblastomas e não é encontrada em células normais (Wilstrand *et al.*, 1995). Como esta forma mutante não necessita de ligante ou dimerização para que o receptor seja ativado, também não existe uma baixa regulação por endocitose o que significa que está sempre ativo (Huang *et al.*, 1997).

Atualmente, o estudo de polimorfismos funcionais vem ganhando uma enorme atenção por parte da comunidade científica. O polimorfismo é a existência de um ou mais alelos “normais” em um locus gênico onde a frequência do alelo mais raro deve ser maior que 1% na população. Um polimorfismo pode existir em diferentes níveis, tais como variante na seqüência de DNA, na seqüência de aminoácidos, na estrutura cromossômica ou até mesmo a níveis fenotípicos, quando há a observação de dois ou mais fenótipos (Passarge, 2001).

Diferentes polimorfismos foram identificados no EGFR1. Um dos primeiros polimorfismos funcionais observados no EGFR apresenta-se como uma mudança de apenas 1 nucleotídeo (SNP) de guanina (G) para adenina (A), levando a substituição do aminoácido arginina pela lisina no códon 497 (HER-1 R497K), no domínio extracelular do EGFR1 (Zhang *et al.*, 2005) (Figura 7). Acredita-se que o domínio extracelular do EGFR de alguma forma modula a eficiência no recrutamento de substratos intracelulares e/ou permite a ativação de uma via de sinalização alternativa que não leva a indução nuclear eficiente de proto-oncogenes e subsequente estimulação do crescimento (Moriai *et al.*, 1994).

Um estudo *in vitro* comparou a forma selvagem do receptor, HER-1 497R, com a variante HER-1 497K e demonstrou que, em células normais, não há diferença em relação a interação receptor-ligante, contudo a variante HER-1 497K parece reduzir a resposta mitogênica em relação a forma selvagem, via diminuição da expressão do RNAm das proteínas *myc*, *fos* e *jun*, conhecidas como estimuladoras da proliferação celular (Moriai *et al.*, 1994).

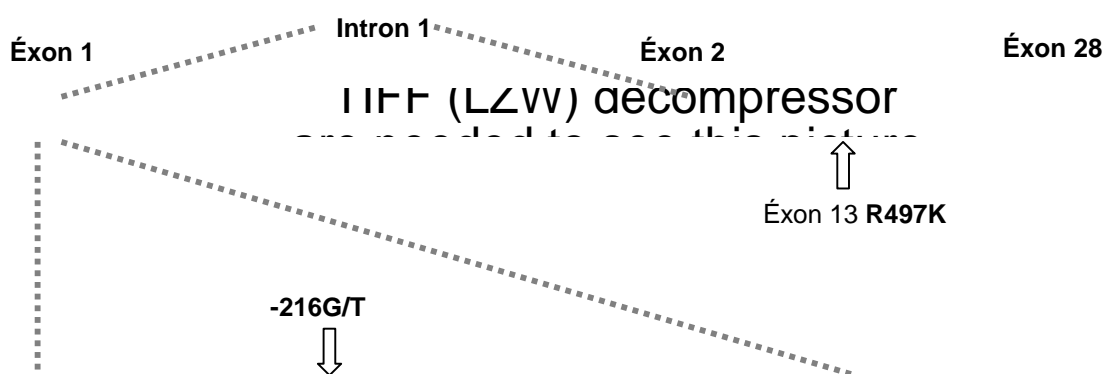
Em 2005, Zhang e colaboradores observaram que paciente com câncer retal com genótipo homozigoto GG (arginina-arginina) e heterozigotos GA (arginina-lisina) apresentaram uma maior probabilidade de recorrência da doença local pélvica em 5 anos. Já nos pacientes homozigotos AA (lisina-lisina) não foi observada nenhum tipo de recorrência.

O nível de expressão do EGFR1 é primariamente regulado pela abundancia no RNAm. A transcrição do gene EGFR1 é iniciada em múltiplos sítios do promotor rico em GC fora das regiões conhecidas como iniciadoras TATA e CAAT box, que são ausentes neste receptor (Ishii *et al.*, 1985). Chi e colaboradores (1992) demonstraram que o primeiro intron do EGFR (Figura 7) apresentava uma região altamente polimórfica constituída de repetições dinucleotídicas (citosina e adenina) e que esta estava envolvida na transcrição gênica . Posteriormente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o número de vezes que estas repetições ou microssatélites ocorriam era importante na regulação e nos níveis de transcrição deste gene; quanto mais repetições menores o nível de transcrição gênica. Esta redução na transcrição poderia chegar a 80% nos casos de alelos com 21 repetições em comparação com o alelo com 16 repetições (Gebhardt *et al.*, 1999). Estudos clínicos preliminares demonstraram uma associação entre polimorfismo e resposta clínica ao tratamento com 5-fluorouracil/oxaliplatina em pacientes com câncer de colon metastático; pacientes com genótipo16/16 apresentavam menor resposta e menor sobrevida global do que os pacientes com genótipo 16/18 e 16/20 (Zhang, 2002).

Em relação a etnicidade, Liu e colaboradores (2003) demonstraram que japoneses apresentam alelos com maior número de repetições quando comparados a caucasianos e negros americanos. Em 2004, Brandt e colaboradores não conseguiram demonstrar a associação entre o tamanho do alelo e o risco de câncer de mama, mas demonstraram que mulheres com histórico familiar de câncer de mama e com os dois alelos maiores que 19 repetições apresentavam um alto risco para este câncer. Em 2005, Zhang e colaboradores demonstraram uma tendência a recorrência local de câncer retal

em pacientes com alelos menores que 20 repetições. Outros estudos estão sendo desenvolvidos para confirmação da influência deste polimorfismo no estudo do câncer, não só em relação a susceptibilidade ao câncer mas também à resposta terapêutica.

Como dito anteriormente, existem inúmeras modificações no gene do EGFR1, o importante é saber o que elas significam. Uma alteração na região promotora pode ser de grande importância visto que esta pode alterar a transcrição deste gene. Recentemente, um outro polimorfismo funcional foi descrito na região promotora do gene EGFR1 (Liu *et al.*, 2005). Em 2005, Liu e colaboradores demonstraram que uma substituição de guanina (G) por timina (T) na posição -216 do promotor (Figura 7) alterava a atividade do promotor *in vitro* e *in vivo*, sendo observada tanto em células tumorais como em células normais. A presença do alelo T foi associada a um aumento em 40% na expressão de EGFR1 em relação ao alelo G. Os autores demonstraram que existe variação interindividual nesta posição e que nela se encontra o sítio de ligação de um fator de transcrição, a proteína Sp1 (Liu *et al.*, 2005).



indivíduos possa levar a uma maior compreensão da importância deste polimorfismo na resposta terapêutica via EGFR1.

Como dito anteriormente, a toxicidade cutânea é um dos eventos adversos mais comuns dos inibidores de tirosina quinase. Existem evidências da relação entre resposta anti-tumoral e *rash* cutâneo onde estas não estão relacionadas com a dose administrada (Cohen *et al.*, 2002), levando à hipótese de que há um componente genético associado a resposta anti-tumoral e inibidores de tirosina quinase. Considerando-se o aumento da expressão de EGFR no tecido epidermal e o proposto efeito dos microssatélites no Intron1 (CA)_n na expressão do EGFR, é razoável acreditar que exista uma correlação entre o número de repetições (CA)_n e sensibilidade à inibidores do EGFR1 tanto no tecido epidermal como no tecido tumoral. Em 2004, Amador e colaboradores demonstraram que indivíduos com alelos com repetições intrônica curtas apresentaram maior incidência de toxicidade cutânea à inibidores de EGFR1. O número de repetições encontrado foi igual no tecido tumoral e no tecido normal do mesmo paciente, levando aos autores a concluírem que nesta região não ocorrem mutações somáticas no curso de desenvolvimento tumoral. Este achado é bastante importante, pois este polimorfismo pode vir a funcionar como um marcador de resposta biológica.

Visto que apenas 10% dos pacientes respondem a terapia com inibidores de tirosina quinase (Cohen *et al.*, 2004) faz-se necessário a descoberta de um marcador biológico que possa selecionar estes pacientes. Como são drogas com alvo específico para a tirosina quinase do EGFR e como há uma nítida correlação entre resposta terapêutica e *rash* cutâneo, alterações no EGFR encontradas nas células normais podem ser utilizadas para a seleção de pacientes que poderiam se beneficiar com essa terapia.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de polimorfismos no gene do EGFR em fibroblastos de indivíduos sadios e correlacionar estes polimorfismos a resposta citotóxica *in vitro* para dois inibidores de tirosina quinase, AG1478, Erlotinib e Gefitinib.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica do AG1478, Erlotinib e do Gefitinib em fibroblastos humanos;
- Avaliar a presença do polimorfismo R497K no gene do EGFR em fibroblastos humanos;
- Avaliar a presença do polimorfismo -216G/T no gene do EGFR em fibroblastos humanos;
- Avaliar o número de repetições CA no intron 1 do gene EGFR
- Avaliar o nível de expressão do EGFR em fibroblastos;
- Estudar a correlação entre indivíduos heterozigotos para o polimorfismo -216G/T e para o número de repetições CA;
- Avaliar a existência ou não de correlação entre fenótipo e genótipo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

MEM (Minimum Essential Media) – GIBCO

RPMI – GIBCO

SBF – GIBCO

L-GLUTAMINA – GIBCO

FRASCOS DE CULTURA E PLACAS- COSTAR

DMSO – SIGMA

AG1478 - Calbiochem

Iressa[®] - Biaffin GmbH & Co KG.: PKI-GFTB

Tarceva[®] - Biaffin GmbH & Co KG.: PKI-ELTB
AlamarBlue[™] – Biosource
DNeasy – Qiagen
RNA later[®] - Qiagen
RNeasy – Qiagen
Agarose PA Ultra Pura – Gibco
Tampão TBE 10X- Ambion (Applied Biosystems)
Água Livre de DNase e RNase – Ambion (Applied Biosystems)
*Bst*NI – BioLabs
*Bse*RI – BioLabs
Acrilamida - Sigma
Bis-Acrilamida – Sigma
Brometo de Etídeo - Sigma
Marcador de Peso Molecular 100pB - Invitrogen
Hotstar Taq Polimerase – Qiagen
Taq PCR Core Kit - Qiagen
ABI PRISM[®] SNaPshot[®] Multiplex Kit – Applied Biosystem
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) - Promega
Exo I (Exonuclease I) - USB
Primers: IDT (Integrated DNA Technologies, Inc)
kit High Capacity cDNA Archive – Applied Biosystems
Kit iQ[™]SYBR[®] Green Supermix - BioRad

3.2 Métodos

3.2.1 CULTURA DE CÉLULAS

Foram selecionados 70 biópsias de pele de voluntários saudáveis adquiridos no banco de células Coriell e cultivados em meio MEM (Minimum Essential Media), suplementado com 5% de L-glutamina e 15% de soro fetal bovino (SFB) ativado. Para controle de atividade dos inibidores de tirosina quinase, foram utilizadas células tumorais de pulmão, H-1993 e H-2170, cultivadas em meio

RPMI 1640 com 10% de SFB inativado. Ambas as células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade de Chicago, Chicago, IL – EUA.

3.2.2 EXPANSÃO DAS CÉLULAS

As células foram cultivadas e quando confluentes foram tratadas com 1mL de tripsina por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 8mL de meio nos frascos de cultura, sendo em seguida transferido 3mL desta mistura (células mais meio) para 3 frascos de cultura: um para plaqueamento e congelamento, outro para extração de DNA e mais um para extração de RNA. As células foram então mantidas em estufa de CO₂ a 37°C.

3.2.3 CONTAGEM E PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS

As células foram cultivadas e quando confluentes foram tratadas com tripsina por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado meio de cultura correspondente a cada tipo celular e retirada uma amostra para contagem celular pelo método da exclusão por azul de tripan. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de 5000 células/poço.

3.2.4 INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

Para o estudo foram utilizados três inibidores de tirosina quinase: AG1478 (Calbiochem; Cat.: 658552), Gefitinib (Biaffin GmbH & Co KG.: PKI-GFTB) e Erlotinib (Biaffin GmbH & Co KG.: PKI-ELTB). Todos foram dissolvidos em DMSO, sendo a concentração final do solvente na placa mantida menor que 0.03%. As concentrações utilizadas para AG1478 foram: 5, 10, 15 e 20µM e 20, 40, 60 e 80µM; para Gefitinib: 10, 20, 40, 60µM e 10, 20, 30 e 40µM; e para Erlotinib: 5, 10, 20, 30, 60µM.

3.2.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA PELO MÉTODO DO ALAMAR BLUE

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 5000 células/poço e incubadas por 24 horas, em estufa de CO₂ a 37°C, para permitir a sua aderência à placa. No dia seguinte, as drogas foram diluídas e adicionadas à placa, sendo incubadas por 72 horas em estufa CO₂ a 37°C. Vite quatro horas antes do término da incubação, foi adicionado 20µL de AlamarBlue™, sendo lida em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 570 e 600nm. Os resultados foram analisados de acordo com o fabricante, sendo calculado a concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI50).

O princípio do método se baseia na redução deste corante pelas células em proliferação. O AlamarBlue™ interage com metabólitos produzidos pela respiração celular. Essa interação resulta na substituição de oxigênio por hidrogênio. Essa substituição é contínua em células em crescimento e acompanhada da habilidade de mudança de coloração do meio, que passa de azul para róseo.

3.2.6 EXTRAÇÃO DE DNA

As células foram cultivadas e quando confluentes foram tratadas com tripsina por 5 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram coletadas, centrifugadas a 10000 rpm por 1 minuto, retirado o sobrenadante, sendo armazenadas em freezer -70°C. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo do Kit DNeasy de extração de DNA total de células animais da Qiagen®. O método de extração é baseado na ruptura da membrana celular

através de tampão de lise, precipitação de proteínas seguida de centrifugação e precipitação do DNA através de lavagens com álcool e centrifugações. Ao término das lavagens, o DNA precipitado foi hidratado e congelado. Quando todas as amostras foram extraídas, foi realizada a leitura de DNA por espectrofotômetro em 280 e 260nm e corrida em gel de agarose 2% para dosagem e comprovação de qualidade do material. O DNA foi então diluído na concentração de 20ng/ μ L.

3.2.7 EXTRAÇÃO DE RNA

As células foram cultivadas e quando confluentes foram tratadas com tripsina por 5 minutos a 37°C. Em seguida, estas foram centrifugadas (1200 rpm por 5 minutos), descartado o sobrenadante e ressuspendidas em tampão RNA lyster[®] e armazenadas em freezer -70°C. A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do Kit RNeasy de extração de RNA total de células animais da Qiagen[®]. O método de extração é baseado na ruptura da membrana celular por força mecânica seguida de captura do RNA em uma mini coluna acoplada a um tubo de microcentrífuga seguido de limpeza e eluição do RNA por meio de tampões. Quando todas as amostras foram extraídas, foi realizada a leitura de RNA por espectrofotômetro em 280 e 260nm para dosagem e comprovação de qualidade do material. As leituras foram realizadas no mesmo dia com todas as amostras para um maior controle em caso que variação do aparelho. O RNA foi diluído para 120ng/ μ L.

3.2.8 RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

Essa técnica baseia-se na amplificação do segmento de interesse por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de corte da fita dupla de DNA através do uso de enzimas de restrição. Ao ser submetido a clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado ou não nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Essa

técnica foi utilizada para genotipagem dos polimorfismos 497G/A (ou R497K) e -216G/T. As enzimas utilizadas foram *BstN I* e *BseR I*, respectivamente. Os primers utilizados foram: 5'-CTTGTCCACTTCCCTGC-3'; 5'-GTCTGCCATGCCTTGTGCTC-3'; 5'-TCTGCTCCTCCCGATCCCTCCT-3'; e 5'-CAGGTGGCCTGTCGTCCGGTCT-3'. As condições da reação de PCR para R497K foram: 1 ciclo de 95°C (12''); 35 ciclo de 95°C (10''), 56°C (10''), 72°C (20''); e a extensão final a 72°C (7'). Produto de PCR de 102pb. Digestão com *BstN I* por 3 horas a 60°C. Para -216 as condições foram as seguintes: 1 ciclo de 98°C (12''); 98°C (10''); 8 ciclo touchdown 68 - 60°C (15''); 72°C (20''); 30 ciclo de 98°C (10''), 59°C (15''), 72°C (20''); e a extensão final a 72°C (7'). Produto de PCR de 224pb. Digestão com *BseR I* por 3 horas a 37°C. A visualização dos fragmentos foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e revelado com brometo de etídeo.

3.2.9 ELETROFORESE CAPILAR – SEQUENCIAMENTO

3.2.9.1 DETECÇÃO DE MICROSSATÉLITES

Microssatélite pode ser definido como DNA repetitivo presente no genoma dos eucariontes. As seqüências de DNA que se repetem variam de 2 a 6 pb. Cada repetição encarrilhada se constitui em um loco de microssatélite cujos alelos se diferenciam por variações no tamanho total do microssatélite. São co-dominantes, multialélicos e de distribuição ampla no genoma; por isso são usados como marcadores em estudos de genética de populações e mapeamento (CIB – Conselho de Informação sobre Biotecnologia, 2006). A detecção de mcrossatélites no intron 1 do gene EGFR foi realizada por análise de microssatélite fluorescente a partir de PCR. Os primers utilizados foram: 5'-Fam-GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC-3' (primer marcado); e 5'-TTCTTCTGCCACACTTGGCAC-3'. As condições da reação de PCR foram: 95°C (10''); 35 ciclos de 95°C (10''), 55°C (10'') e 72°C (20''); e uma extensão final a 72°C (7'). Em seguida, os produtos de PCR foram levados ao Applied

Biosystems ABI377 genetic analyzer para determinação dos alelos. A análise dos cromatogramas foi realizada no programa Gene Mapper v3.7.

3.2.9.2 SNaPshot

Essa técnica tem como objetivo identificar um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP). O SNP é um tipo de marcador molecular capaz de diferenciar indivíduos por meio de variações em apenas um nucleotídeo de seqüências de DNA que codificam (ou não) genes. Essa variação alélica pode ser detectada por seqüenciamento direto na região de interesse ou pela técnica denominada SNaPshot. Esse método utiliza probes que se ligam imediatamente uma base antes do SNP de interesse. Com o auxílio de desoxirribonucleotídeos (dNTP) marcados, podemos identificar qual a base que será inserida na região de interesse. Os dNTPs utilizados nesta reação são dideoxi-nucleotídeos (ddNTP) que ao serem inseridos no DNA páram a reação. Por eletroforese capilar, ou sequenciamento, pode-se determinar qual base foi inserida. O cromatograma obtido possui cores diferentes, onde cada cor pertence a um nucleotídeo específico: adenina (A) – verde; citosina (C) – preto; guanina (G) – azul; e timina (T) – vermelho.

Essa técnica foi utilizada para genotipagem do polimorfismo 787C/T. Inicialmente foi realizado PCR da região de interesse, onde os primers utilizados foram: 5'-AAGCCTACGTGATGGCCAGC-3'; e reverso 5'-GCGATCTGCACACACCAGTTGA-3'. Em seguida, a reação de PCR é purificada com o auxílio de duas enzimas SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e EXO I (exonuclease). A primeira remove os dNTPs não utilizados e a segunda remove o excesso de primers. Estas são incubadas a 37°C por 1 hora seguido de 15 minutos a 95°C. Depois de limpa, a reação de PCR é submetida a reação snapshot, onde os probes irão se ligar imediatamente antes do SNP de interesse e o nucleotídeo incorporado será o ddNTP. As seqüências dos probes utilizados foram: 5'-ATCTGCCTCACCTCCACCGTGCA-3' e 5'-AGCCGAAGGGCATGAGCTGCGTGATGAG-3. As condições utilizadas foram:

30 ciclos de 96°C (10''), 54°C (5'') e 60°C (30''). Em seguida, a reação de snapshot é purificada com a enzima SAP e então as amostras são encaminhadas para o seqüenciador ABI-3100/3700. Os cromatogramas foram gerados no software GeneScan e analisados de acordo com a coloração do pico no caso de indivíduos homocigotos ou dois picos para heterocigotos.

3.2.9.3 Long Range PCR

Esta metodologia baseia-se na amplificação de amplicon longo e pode ser utilizada, dentre outras utilidades, para determinação de haplótipos. A técnica foi utilizada para estudar haplótipos G ou T na região -216 e o número de repetições CA no intron 1 do gene do EGFR. Para isso, foram realizadas duas reações de PCR por amostra; uma para o alelo T outra para o alelo G. Em cada uma destas reações foi adicionado primers para região de repetição CA, obtendo-se ao final um amplicon com as duas regiões. Os primers utilizados foram: EGFR-G 5'-CGCGGCCGCAGCAGCCTCCG-3' e EGFR-T 5'-CGCGGCCGCAGCAGCCTCCT-3'. As condições utilizadas foram: 98°C (15'); 35 ciclos de 98°C (30''), 70°C (2'); e extensão final de 70°C por 7 minutos. Em seguida, os produtos de PCR foram levados ao Applied Biosystems ABI377 genetic analyzer para determinação dos alelos. A análise dos cromatogramas foi realizada no programa Gene Mapper v3.7.

3.3 PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR em tempo real permite o acompanhamento de todo o processo de amplificação do molde de RNA (cDNA) onde esta amplificação é monitorada continuamente durante os ciclos que compõem uma reação habitual de PCR. A síntese de cDNA foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Archive* e as condições usadas foram as sugeridas pelo fabricante. A detecção direta do produto de PCR é monitorada pela mensuração do aumento de fluorescência causada pela ligação de um corante que se liga a fita dupla de DNA. Quando

essa ligação ocorre há um aumento da fluorescência deste composto sendo então detectado no momento em que os ciclos estão acontecendo. Essa reação foi realizada de acordo com o Kit iQTMSYBR[®] Green Supermix. Como controle foi utilizado o gene da subunidade ribossomal 18S. Os primers utilizados foram: 18S-RNA-5'-CGATGCCTTAGCTGAGATAT-3'; 18S-RNA-5'-GGTCCAAGAATTTACCTCT-3'; EGFR-5'-CCTACGTGATGGCCAGCGTG-3'; e EGFR-5'-GCTGGCCATGTAGGCTT-3'. Para a reação e detecção dos produtos de PCR foi utilizado o aparelho Mx3000P.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism versão 3.02 pelo Dr. Wei Zang, bioestatístico responsável do grupo de Farmacogenética da Universidade de Chicago. Foram utilizados os testes de Mann-Whitney U-Test ou não paramétrico Kruskal-Wallis test e Sperman, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O estudo foi realizado fibroblastos adquiridos no banco de células Coriell (EUA). Dos indivíduos estudados, 33,8% eram do sexo feminino e 66,2% do sexo masculino (gráfico 1), com idade variando entre 1 ano e 96 anos (gráfico 1). De acordo com a raça (Nebert & Menon, 2001), 69% eram caucasoídes, 15,5% negroídes, 1,4% mongolóides e 14,1% outras raças ou ausência de informação (gráfico 2).

Distribuição da Idade dos indivíduos de acordo com o sexo

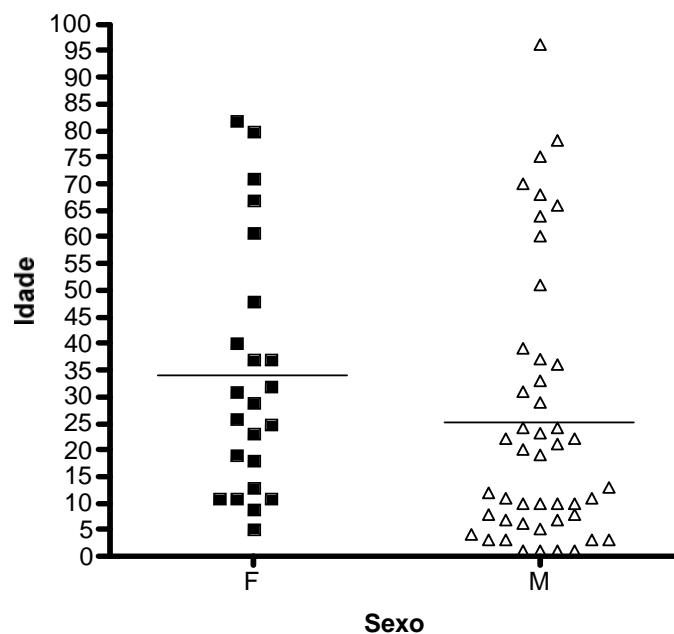


Gráfico 1: Distribuição dos voluntários doadores das amostras de fibroblastos utilizados para a avaliação dos polimorfismos no gene do EGFR de acordo com a sexo e a idade. F- Feminino; M – Masculino.

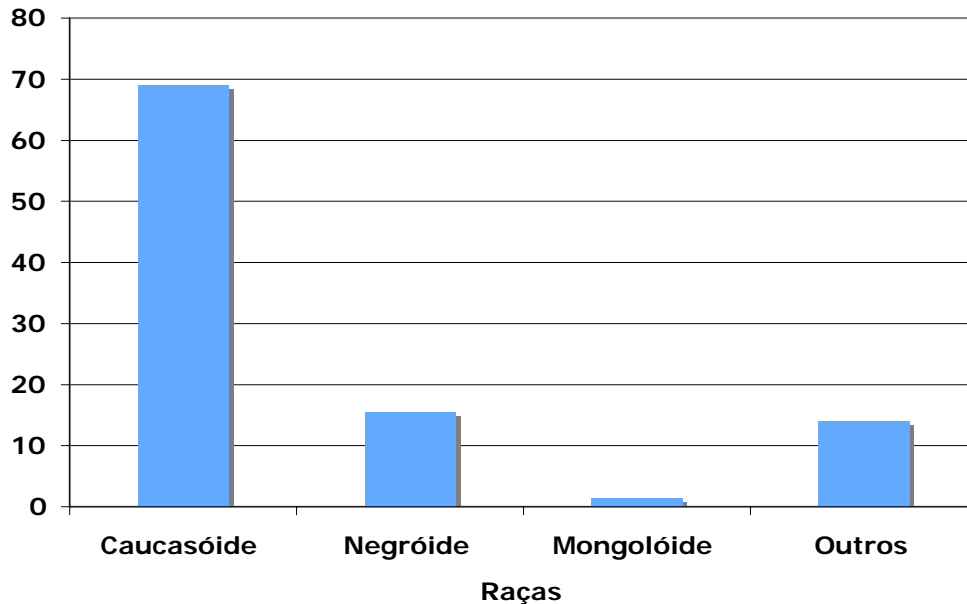


Gráfico 2: Distribuição da raça dos voluntários doadores das amostras de fibroblastos utilizados para a avaliação dos polimorfismos no gene do EGFR.

4.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DOS FIBROBLASTOS

4.2.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA DA DROGA AG1478

A atividade citotóxica foi avaliada pelo método colorimétrico do AlamarBlue. As células cultivadas e plaqueadas na concentração de 5000 células/poço foram incubadas com o AG1478 nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 μ M por 72 horas sendo lidas em seguida no espectrofotômetro 570 e 600 nm (gráfico 3). As células resistentes, foram tratadas com as doses de 20, 40, 60 e 80 μ M até que se obtivesse a CI50 (concentração que inibe 50% do crescimento celular) (gráfico 4). Os dados foram então analisados por um programa de cálculo de CI50 (tabela 1, 2 e 3) que é utilizado e foi aprovado pelo grupo de Farmacogenética (PharmGkB) americano, disponibilizado pelo Hospital Saint

Judes Children Hospital no Tennesse. A atividade da droga foi confirmada nas células tumorais H-1993 e H-2170 com CI50 de 2,369 e 1,406 μ M, respectivamente.

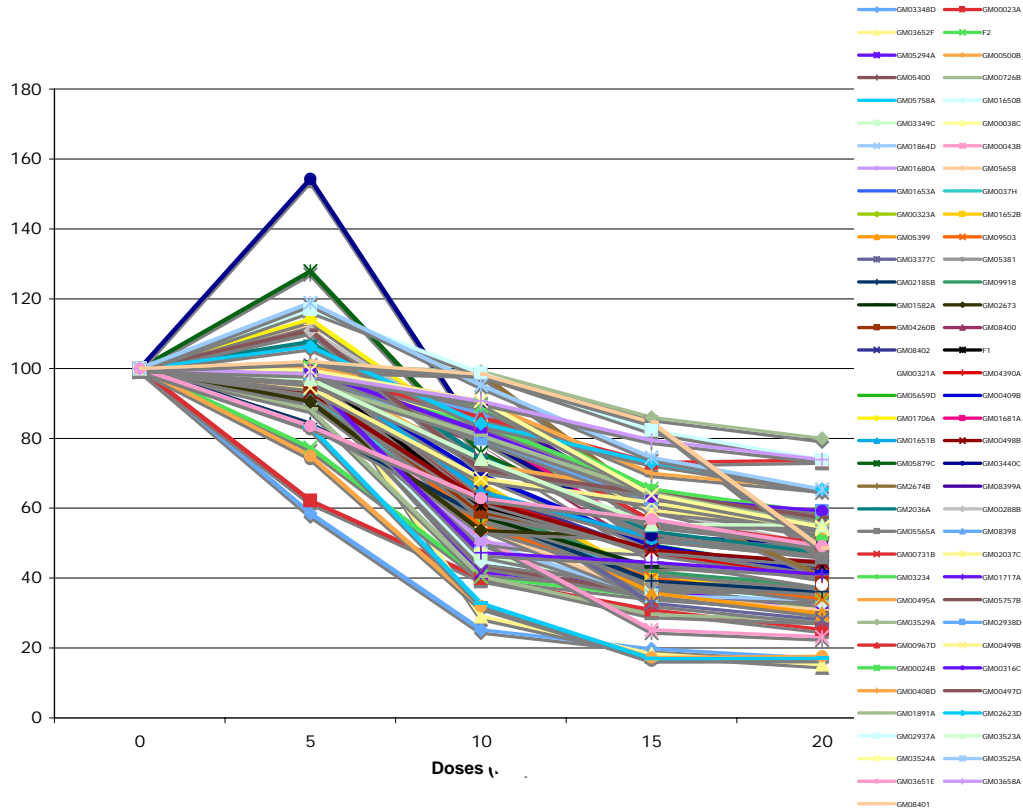


Gráfico 3: Curva Dose-Resposta de fibroblastos tratados por 72 horas com inibidor de tirosina quinase do EGFR AG1478 nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 μ M.

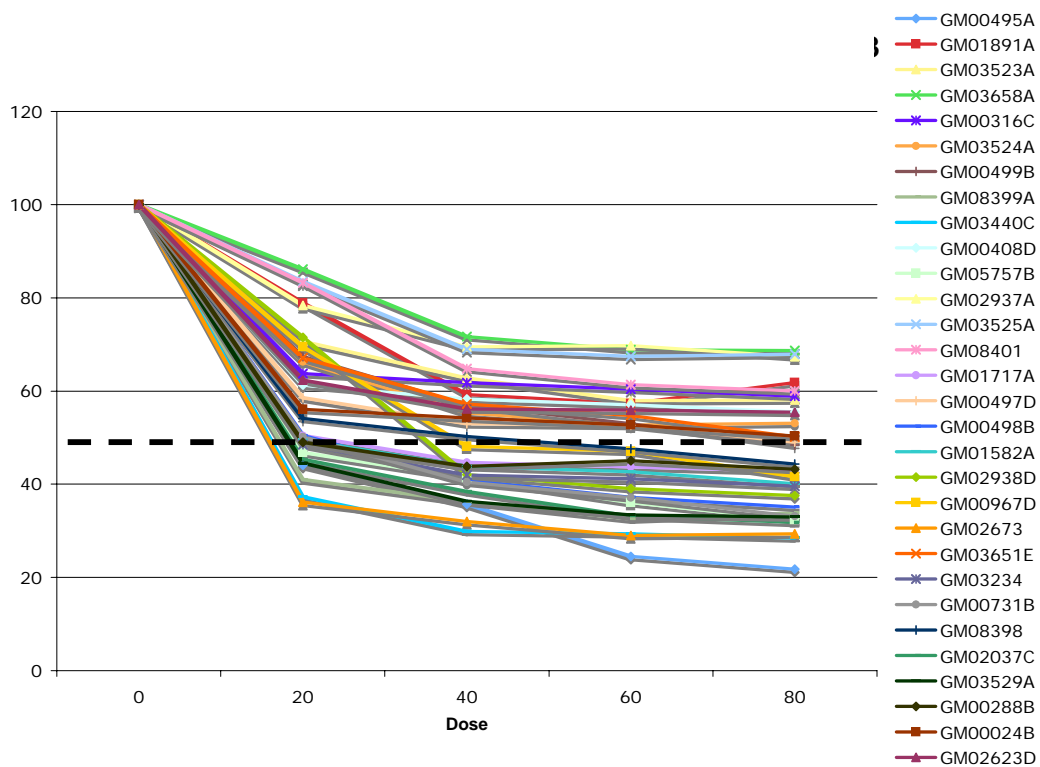


Gráfico 4: Curva Dose-Resposta de fibroblastos com CI50 maior que 20µM tratados com inibidor de tirosina quinase do EGFR AG1478 nas doses de 20, 40, 60 e 80µM por 72 horas. A linha tracejada em preto, indica o limite entre as células com resistentes a AG1478 na dose de 80µM .

De acordo com o gráfico 4, observamos que mesmo na dose máxima testada (80µM) existem células que não atingiram 50% de inibição de crescimento.

Tabela 1: Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblasto sensíveis (CI50 < 10µM).

Fibroblastos	AG1478 5µM (%)	AG1478 20µM (%)	CI50 (µM)
GM03348D	58,46	17,14	5,54
GM00023A	62,13	25,42	6,98
GM03652F	100,95	15,30	7,16
F2	77,32	31,44	7,50
GM05294A	96,37	30,10	8,36
GM00500B	74,93	17,71	8,47
GM05400	94,21	30,21	8,60
GM00726B	88,42	27,85	8,60
GM05758A	83,30	17,11	8,74
GM01650B	94,80	32,58	8,84
GM03349C	96,68	37,00	8,98
GM00038C	100,46	44,39	9,87

Tabela 2: Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblastos com CI50 entre 10µM e 70µM.

Fibroblastos	AG1478 5µM (%)	AG1478 20µM (%)	CI50 (µM)
GM01864D	91,61	33,82	10,1
GM00043B	96,32	23,21	10,1
GM01680A	94,93	40,26	10,2
GM05658	112,69	30,85	10,7
GM01653A	100,02	36,28	11,1
GM0037H	92,51	38,66	11,1
GM00323A	96,31	35,00	11,3
GM01652B	100,27	38,72	11,4
GM05399	100,16	29,83	11,4
GM09503	97,82	34,03	11,4
GM03377C	100,97	28,01	11,5
GM05381	98,86	37,09	11,5
GM02185B	84,25	36,03	11,7
GM09918	100,23	37,58	11,9
GM01582A	101,74	44,46	12,8
GM02673	90,55	47,17	13,5
GM04260B	94,80	38,27	13,6
GM08400	99,25	44,68	13,6
GM08402	99,26	39,74	13,7
F1	99,17	43,24	13,8
GM00321A	96,52	38,14	13,8

Tabela 2 (continuação): Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblastos com CI50 entre 10µM e 70µM .

Fibroblastos	AG1478 5µM (%)	AG1478 20µM (%)	CI50 (µM)
GM04390A	101,62	40,45	13,9
GM05659D	98,37	41,65	14,1
GM00409B	99,41	41,70	14,7
GM01706A	114,10	46,99	15,2
GM01681A	98,99	47,32	15,8
GM01651B	101,16	46,62	15,9
GM00498B	93,43	44,34	16,0
GM05879C	127,88	46,79	16,4
GM03440C	154,26	49,58	16,4
GM2674B	100,81	40,65	16,5
GM08399A	98,94	52,54	18,5
GM2036A	107,70	47,25	19,0
GM00288B	110,85	49,00	19,1
GM05565A	99,80	45,83	19,5
GM08398	99,68	50,073	19,6
GM00731B	98,57	49,96	19,8
GM02037C	100,10	54,43	20,3
GM03234	96,46	51,68	20,4
GM01717A	96,47	41,03	21,5
GM00495A	99,76	52,77	22,0
GM05757B	99,18	56,72	22,4
GM03529A	101,09	79,94	25,8
GM02938D	98,77	59,22	26,2
GM00967D	99,68	73,81	42,5
GM00499B	94,51	53,95	70,4

Tabela 3: Porcentagem de efeito inibitório do AG1478 nas doses de 5µM e 20µM no grupo de fibroblastos resistentes (CI50 > 80µM).

Fibroblastos	AG1478 5µM (%)	AG1478 20µM (%)	CI50 (µM)
GM00024B	100,38	58,50	>80
GM00316C	99,38	59,19	>80
GM00408D	100,43	65,46	>80
GM00497D	110,91	57,25	>80
GM01891A	95,99	55,06	>80
GM02623D	106,34	65,39	>80
GM02937A	117,04	73,77	>80
GM03523A	96,93	55,07	>80
GM03524A	99,60	54,56	>80
GM03525A	118,95	65,35	>80
GM03651E	83,53	49,11	>80
GM03658A	98,53	73,94	>80
GM08401	102,01	48,57	>80

De acordo com as CI50, existe variabilidade entre as células analisadas: 17,14% foram sensíveis ao AG1478 (tabela 1), apresentando CI50 menores que 10µM, 65,72% apresentaram CI50 variando entre 10 e 70µM (tabela 2) e 17,14% foram resistentes ao tratamento com AG1478, não sendo possível calcular a CI50 destas células, mesmo na concentração de 80µM (tabela 3). Entretanto, podemos observar que há diferenças individuais na porcentagem de efeito na dose de 20µM no grupo resistente, onde alguns indivíduos possuem mais de 73% de sobrevida nesta dose enquanto outros possuem apenas 48% de sobrevida (tabela 3). A média do coeficiente de variabilidade dos índices de sobrevida das células nas concentrações testadas foi de 26%.

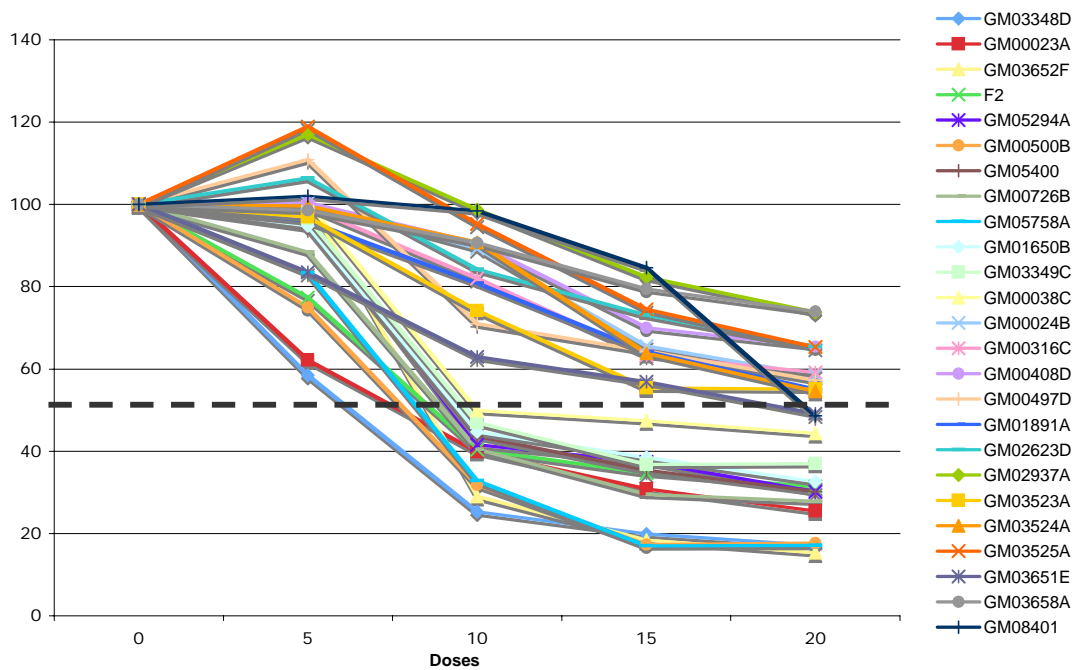


Gráfico 5: Comparação das curvas dose-resposta dos grupos resistente ($CI_{50} > 80\mu M$) e sensível ($CI_{50} < 20\mu M$) ao AG1478. A linha tracejada em preto, indica o limite entre as células com CI_{50} abaixo de $10\mu M$ e acima de $80\mu M$.

Quando são comparados os grupos de fibroblastos sensíveis à AG1478 ($CI_{50} < 10\mu M$) e os resistentes a AG1478 ($CI_{50} > 80\mu M$) observamos mais claramente que há diferença inter-individual entre eles (gráfico 5).

4.2.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO GEFITINIB

A avaliação da atividade citotóxica do Gefitinib foi realizado pelo método colorimétrico do AlamarBlue e obedecendo as mesma condições da droga AG1478, descrita anteriormente. As células foram cultivadas e plaqueadas na concentração de 5000 células/poço, sendo incubadas com o Gefitinib nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 μ M por 72 horas e lidas em seguida no espectrofotômetro (gráfico 6). A atividade da droga foi confirmada nas células tumorais H-1993 e H-2170 sendo a CI50 de >5 e 0,73 μ M, respectivamente.

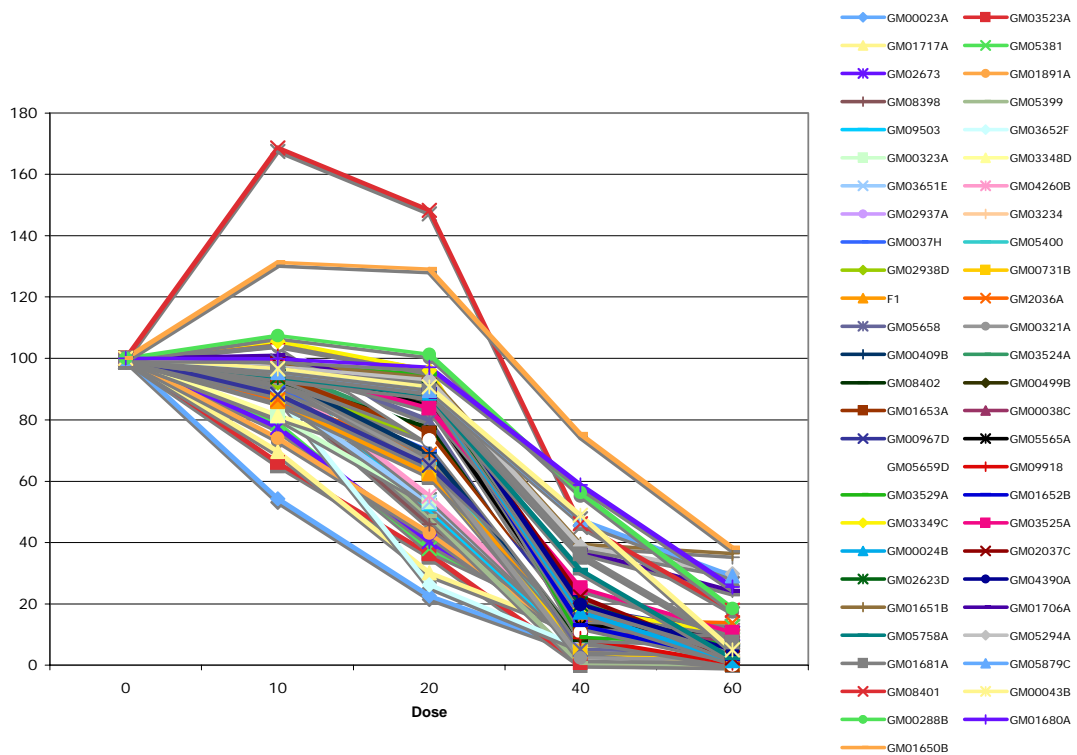


Gráfico 6: Curva Dose-Resposta de fibroblastos tratados por 72 horas com inibidor de tirosina quinase do EGFR gefitinib nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 μ M.

As células que não foram possíveis determinar a CI50, foram submetidas a um novo tratamento com as doses de 10, 20, 30 e 40 μ M (gráfico 7). Os dados

foram então analisados por um programa de cálculo de CI50 utilizado e aprovado pelo grupo de Farmacogenética (PharmGkB) americano, disponibilizado pelo Hospital Saint Judes Children Hospital no Tennessee.

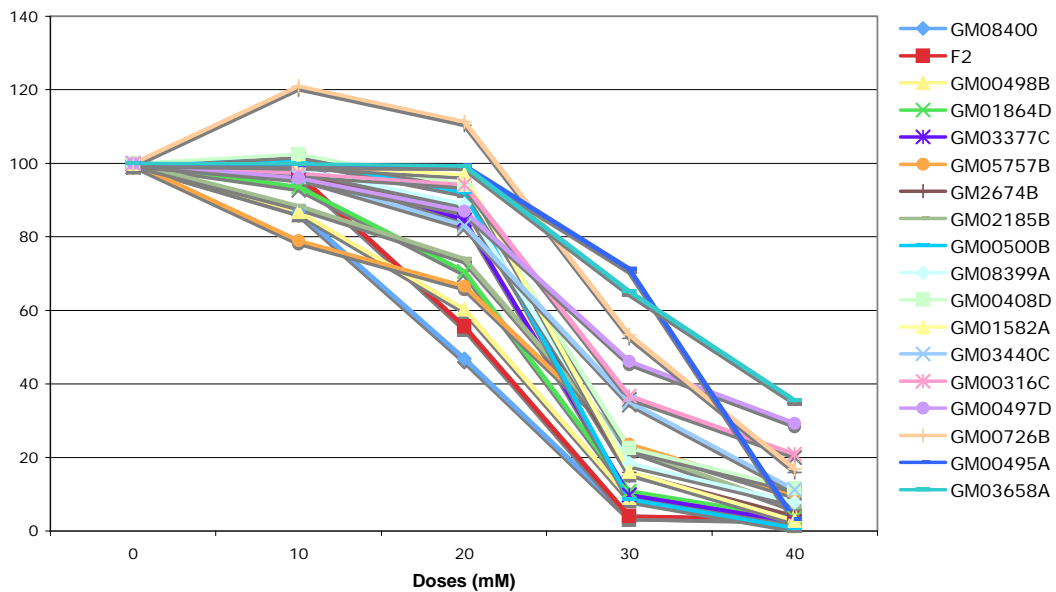


Gráfico 7: Curva Dose-Resposta de fibroblastos sensíveis ao tratamento com gefitinib por 72 horas. As células foram re-incubadas com gefitinib nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 μM.

De acordo com as CI50, observamos que 12,68% foram sensíveis ao Gefitinib (tabela 4), apresentando CI50 menores que 20 μM, 61,97% apresentaram CI50 maior que 20 μM e menor que 30 μM (tabela 5) e 25,35%

maior que 30 μ M (tabela 6). A variação entre os grupos não parece evidente para o modelo com o gefitinib como agente inibidor de tirosina quinase. A média do coeficiente de variabilidade dos índices de sobrevivência das células nas concentrações testadas foi de 69%.

Tabela 4: Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 20 μ M e 40 μ M no grupo de fibroblastos sensíveis (CI50 < 20 μ M).

Fibroblastos	Gefitinib 20μM (%)	Gefitinib 40μM (%)	CI50 (μM)
GM00023A	22,49	4,87	12,29
GM03523A	36,20	0,69	14,77
GM01717A	30,16	11,00	14,88
GM05381	37,98	14,75	17,09
GM02673	40,30	12,19	17,6
GM01891A	43,14	7,60	18,35
GM08398	45,93	10,43	18,93
GM05399	48,65	0,54	19,65
GM08400	46,91	3,10	19,71

Tabela 5: Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 10 μ M e 40 μ M no grupo de fibroblastos sensíveis com CI50 maior que 20 μ M e menor que 30 μ M.

Fibroblastos	Gefitinib 20µM (%)	Gefitinib 40µM (%)	CI50 (µM)
GM09503	50,73	6,11	20,04
GM03652F	26,17	5,83	20,1
F2	55,62	3,27	20,3
GM00323A	53,09	8,05	20,31
GM03348D	65,07	5,719	20,72
GM03651E	53,04	8,48	20,94
GM04260B	55,16	8,51	20,99
GM00498B	60,31	4,11	21,31
GM02937A	65,17	7,62	21,34
GM03234	73,53	10,65	22,1
GM0037H	69,86	13,14	22,13
GM05400	65,95	7,98	22,22
GM02938D	73,72	9,37	22,3
GM01864D	70,55	3,59	22,46
GM00731B	62,77	4,56	22,91
F1	62,47	11,86	22,95
GM2036A	68,75	14,87	23,1
GM03377C	84,68	2,43	23,39
GM05658	79,85	5,08	23,5
GM00321A	65,70	2,39	23,57
GM00409B	69,23	10,29	23,61
GM05757B	66,60	9,93	23,66
GM2674B	88,65	3,97	23,68
GM02185B	73,98	6,32	24,34
GM03524A	76,37	7,75	24,35

Tabela 5 (continuação): Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 10µM e 40µM no grupo de fibroblastos sensíveis com CI50 maior que 20µM e menor que 30µM.

Fibroblastos	Gefitinib 20µM (%)	Gefitinib 40µM (%)	CI50 (µM)
GM08402	77,37	8,14	24,4
GM00500B	92,02	0,85	24,43
GM00499B	86,24	9,51	24,45
GM01653A	75,69	11,01	24,67
GM08399A	88,92	7,84	24,97
GM00408D	94,10	11,58	25,51
GM00038C	87,56	11,98	25,63
GM00967D	65,15	18,81	25,68
GM05565A	84,56	12,89	25,79
GM05659D	73,52	10,69	25,85
GM09918	96,08	8,78	25,98
GM01582A	96,86	2,86	26,24
GM03440C	83,08	11,25	26,81
GM00316C	94,22	20,84	27,73
GM03529A	94,84	9,019	28,79
GM00497D	87,05	29,27	28,84
GM01652B	89,93	12,91	28,86
GM03349C	96,01	18,20	29,31
GM03525A	83,85	25,18	29,98

Tabela 6: Porcentagem de efeito inibitório do gefitinib nas doses de 10µM e 40µM no grupo de fibroblastos (CI50 > 30µM).

Fibroblastos	Gefitinib	Gefitinib	CI50 (µM)
---------------------	------------------	------------------	-------------------

	20µM (%)	40µM (%)	
GM00024B	88,78	17,32	30,27
GM00726B	111,27	16,85	30,46
GM00495A	99,35	3,17	31,33
GM02037C	91,17	22,21	31,64
GM02623D	90,14	19,89	31,66
GM04390A	92,63	19,77	31,82
GM01651B	93,84	39,43	32,16
GM03658A	99,21	35,55	32,75
GM01706A	87,65	37,33	33,11
GM05758A	88,00	31,01	33,79
GM05294A	93,06	38,80	34,29
GM01681A	89,45	36,17	34,91
GM05879C	89,678	47,46	38,39
GM08401	148,23	46,08	38,75
GM00043B	90,81	48,92	39,41
GM00288B	101,31	56,34	42,31
GM01680A	97,12	58,82	43,63
GM01650B	129,02	75,38	51,54

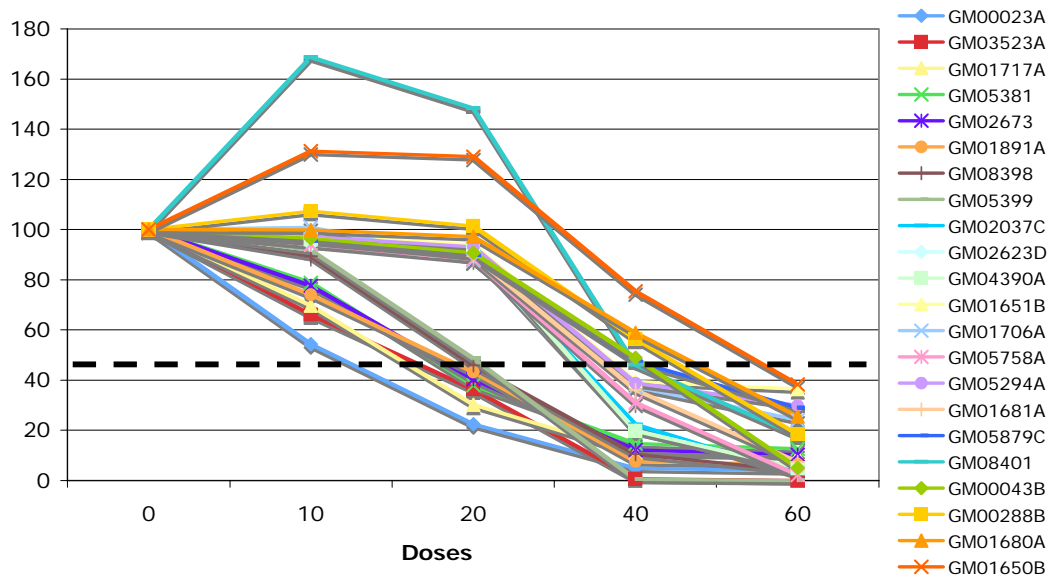


Gráfico 8: Comparação das curvas dose-resposta dos grupos resistente ($CI_{50} > 30\mu M$) e sensível ($CI_{50} < 20\mu M$) ao gefitinib. A linha tracejada em preto, indica que na dose de $20\mu M$ podemos observar que há uma diferença na resposta celular.

De acordo com o gráfico 8, podemos observar que existe variabilidade entre as células, mas essa parece ser tênue quando comparamos com os valores das CI_{50} (tabelas 4, 5 e 6). Entretanto, quando observamos o gráfico 8 e a porcentagem do efeito celular na dose de $20\mu M$ (tabelas 4, 5 e 6) em todos os indivíduos analisados, observamos que há uma diferença entre eles, onde uns apresentam sobrevida de apenas 23% enquanto outras apresentam sobrevida de 100% na dose de $20\mu M$.

4.2.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ERLOTINIB

De acordo com as doses testadas, não foi possível utilizar o Erlotinib para os ensaios de citotoxicidade, pois a concentração máxima tolerada pelo meio não foi suficiente para inibir 50% do crescimento celular. A atividade da droga foi confirmada nas células tumorais, H-1993 e H-2170, com CI50 correspondentes a >5 e 1,3 μ M, respectivamente.

4.3 AVALIAÇÃO DO GENÓTIPO DOS FIBROBLASTOS PARA O GENE DO EGFR

O gene do EGFR possui 28 éxons. O polimorfismo na região promotora do gene (-216 G/T) e no éxon 13 (R497K) foi realizada através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Para genotipagem do polimorfismo 787C/T no éxon 20 foi utilizado snapshot (ou single base extension). Para detecção de microssatélite no Intron 1 foi utilizado GENESCAN e para análise o software GENE MAPPER v3.7. Para confirmação dos produtos de PCR foi utilizado gel de agarose a 2% e para a genotipagem gel de poliacrilamida a 10%. Duas células tumorais de pulmão (H-1993 e H-2170) foram utilizadas como controle dos genótipos.

4.3.1 POLIMORFISMO R497K

As células foram cultivadas em meio completo MEM (15% SFB e 2 μ M de L-glutamina) até atingir a confluência, para posteriormente ser extraído o DNA. As amostras foram digeridas pela enzima Bst1 que tem especificidade para alelo G e analisadas em gel de poliacrilamida 10 % (Figura 8). Das células analisadas, 56,34% apresentaram genótipo GG, 33,80% genótipo GA e 9,86% genótipo AA. Em relação a freqüência, o alelo G esta presente em 73,24% dos fibroblastos e o alelo A em 26,76%.

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

1651B 316C 5294A 3658A 1653A 43B 5399 8399A 500B 2673 F2 3440C 2037C 3349C

Figura 8: Genotipagem do SNP R497K no éxon 13 do gene EGFR 1. Os produtos de PCR foram submetidos a tratamento com a enzima de restrição *BstN I*, sendo observado dois padrões homozigotos (GG e AA) e um padrão heterozigoto (GA).

4.3.2 POLIMORFISMO -216 G/T

As células foram cultivadas em meio completo MEM (15% SFB e 2 μ M de L-glutamina) até atingir a confluência, para que posteriormente ser extraído o DNA. As amostras foram digeridas pela enzima Bse RI que tem especificidade para alelo T e analisadas em gel de poliacrilamida 10% (Figura 9). Das células analisadas, 8,45% apresentaram genótipo TT, 47,89% genótipo GT e 43,66% genótipo GG. Em relação à frequência, o alelo G esta presente em 67,60% dos fibroblastos e o alelo T em 32,40%.

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

2036A 3529A 23A 1582A 8401 1864D 5381 5659D 1651B 316C 5294A 3658A 1653A

Figura 9: Genotipagem do SNP -216G/T na região promotora do gene EGFR 1. Os produtos de PCR foram submetidos a tratamento com a enzima de restrição *BseR I*, sendo observado dois padrões homocigotos (GG e TT) e um padrão heterocigoto (GT).

4.3.3 POLIMORFISMO 787 C/T

O DNA das células cultivadas foi submetido a reação de PCR para o polimorfismo 787C/T no gene do EGFR. Depois de confirmada a amplificação da seqüência de interesse e a reação de “*snapshot*”, as amostras foram submetidas ao GENESCAN e analisadas no gene mapper v3.7, onde vermelho indica o alelo T e preto o alelo C (Figura 10). Das células analisadas, 35,60% apresentaram genótipo TT, 49,15% genótipo CT e 15,25% genótipo CC. Em relação à freqüência, o alelo C esta presente em 39,83% da amostra e o alelo T em 60,17%.

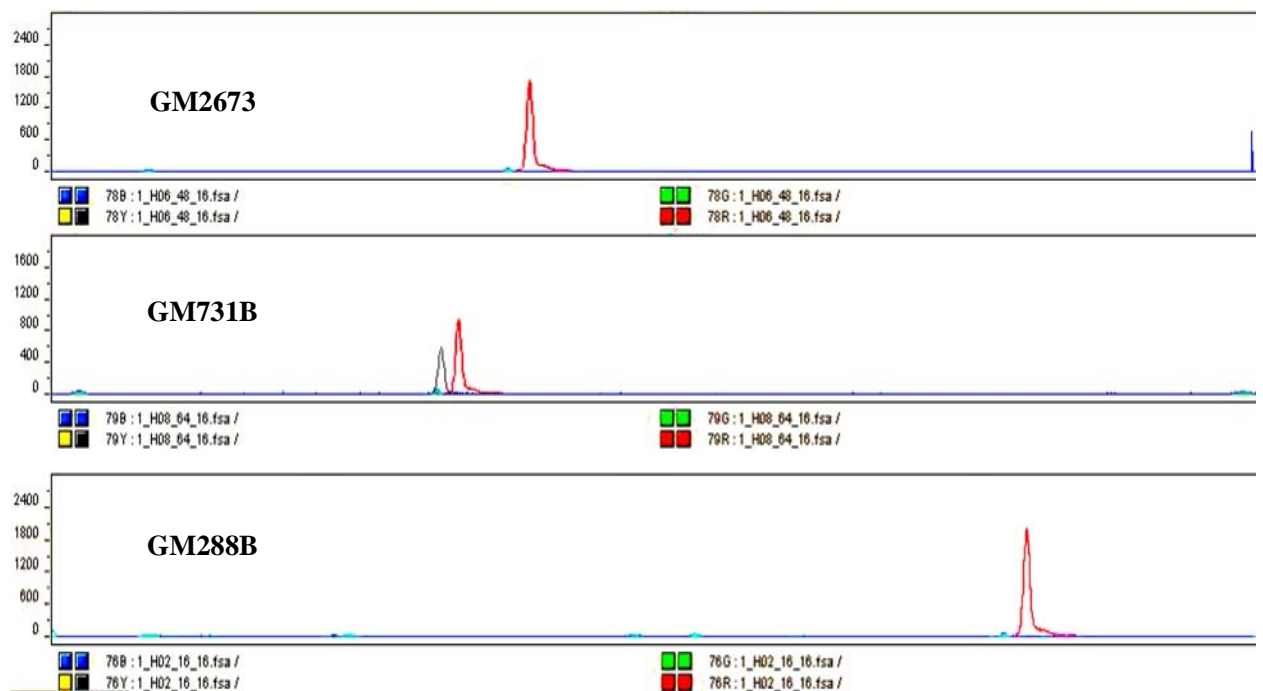


Figura 10: Genotipagem do SNP 787C/T no gene do EGFR. O pico vermelho representa o alelo C e o pico preto representa o alelo T. Um pico indica os indivíduos homocigotos e dois picos indica indivíduos heterocigotos.

4.3.4 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITE NO INTRON 1

Para análise de microsatélite foi utilizado reação de PCR com primer marcado com fluorescência. Depois de confirmada a amplificação da seqüência de interesse, as amostras foram submetidas ao GENESCAN e analisadas no gene mapper v3.7 (Figura 11). Como controle foi usado uma amostra de fibroblasto (GM 4260B) com genótipo conhecido (heterocigoto) previamente. Os resultados mostram que existem diversas combinações de alelos CA entre os indivíduos: 14/17 (1), 15/16 (1), 15/21 (1), 16/16 (10), 16/17 (6), 16/18 (11), 16/19 (2), 16/20 (11), 16/21 (6), 17/17 (1), 17/20 (3), 17/21 (3), 18/18 (2), 18/20 (5), 19/20 (2), 19/21 (1), 20/20 (3) e 20/21 (2). Entretanto, podemos observar que mais da metade dos indivíduos (67%) possuem pelo menos 1 alelo com 16 repetições.

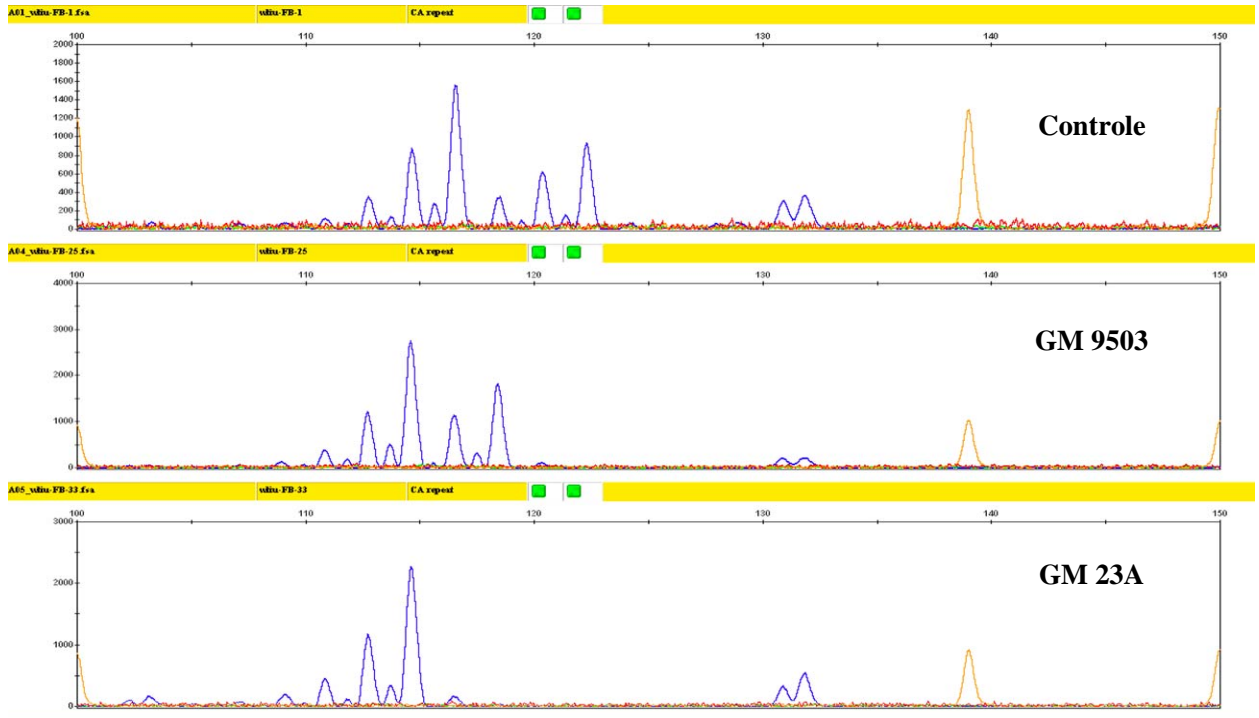


Figura 11: Análise de Microssatélites CA no Intron 1 do gene EGFR. Para determinação do número de repetições CA, deve-se usar um controle previamente seqüenciado e então comparar os maiores picos com os maiores picos dos fibroblastos usados no trabalho. Gráficos com pico único refere-se a homozigoto para o número de repetições. Na figura acima, o controle possui um alelo com 16 repetições e o outro alelo com 20 repetições.

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A avaliação da expressão de EGFR nas células foi realizada com a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). Para isso, o RNA das células foi isolado, sendo realizado RT-PCR para obtenção de cDNA e em seguida PCR em tempo real. Como controle interno foi utilizado a subunidade ribossomal 18S. De acordo com os resultados, a variabilidade entre as amostras foi de 60% para o EGFR e de 40% para a subunidade 18S. Como a análise deve ser realizada

com a razão entre estes dois genes, não foi observada variabilidade na expressão do EGFR nas amostras.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS

Para identificação de haplótipos com o polimorfismo -216 encontrado na região promotora e o número de repetições CA no intron 1, foram selecionada as amostras duplo heterozigoto ou heterozigoto composto para os dois polimorfismos ao mesmo tempo. Para cada indivíduo, foi realizada uma reação de PCR alelo específico G ou T do polimorfismo -216G/T e o intron 1 (Figura 12). Em seguida, as amostras foram levadas ao sequenciador GENESCAN v3.7 para determinação do numero de repetições CA em cada alelo independente (adendo 5).

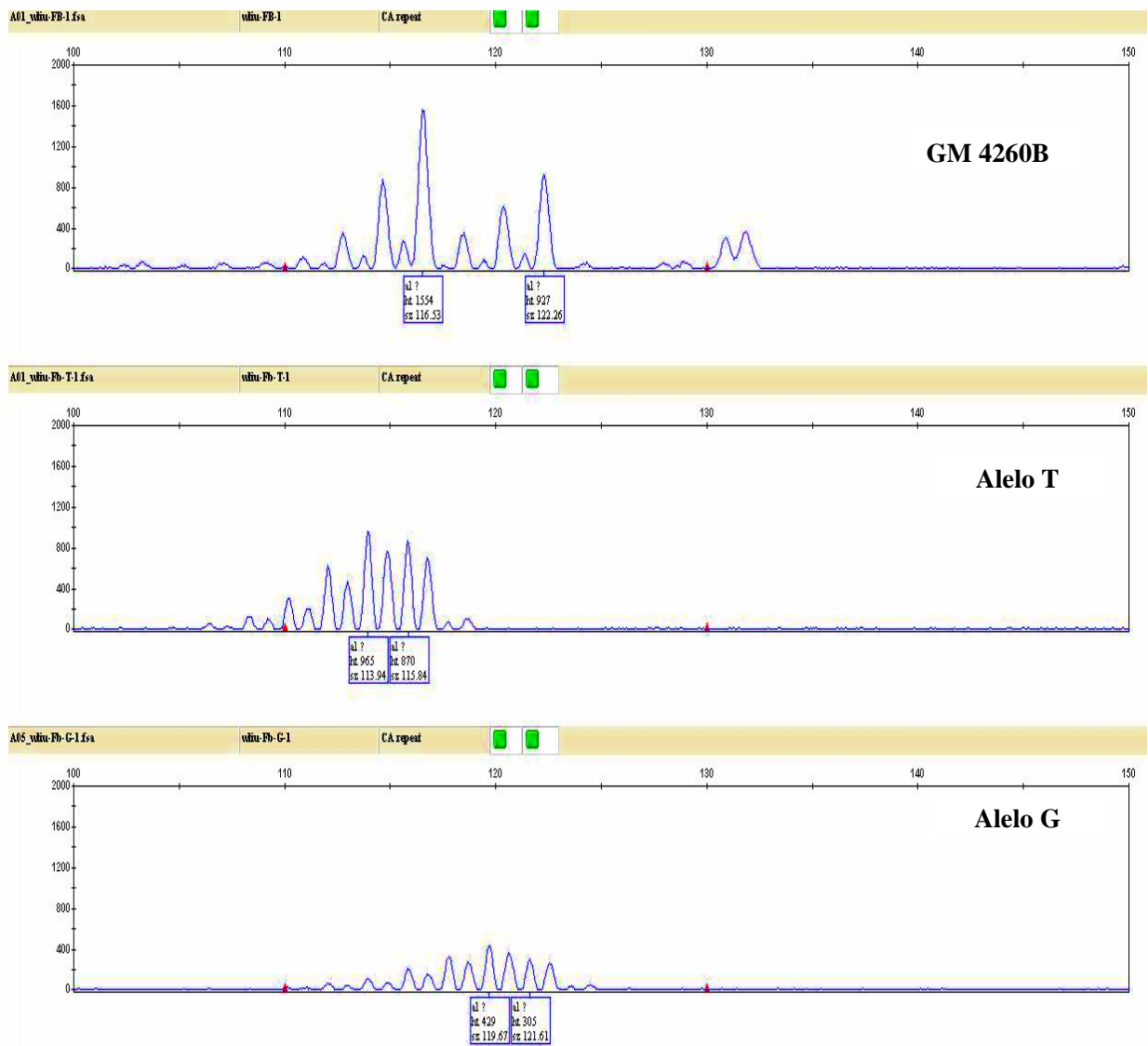


Figura 12: Análise do número de repetições CA no Intron 1 e os alelos G e T na região promotora do gene EGFR. Cada alelo foi discriminado por PCR e em seguida submetido a análise de microssatélite. Como controle foi utilizada uma amostra conhecida com 16 e 20 repetições CA. Para genotipagem, cada alelo foi analisado observando-se o último pico detectado pelo seqüenciador, sendo então comparado com o controle.

De acordo com os dados gerados, observamos que dentro do grupo heterozigoto há uma correlação ($p < 0,02$) entre um menor número de repetições

CA e o alelo T (gráfico 9). Entretanto, se forem considerado todos os alelos, homocigotos e heterocigotos, tanto para -216G/T como intron1, não observamos essa correlação, provavelmente pela maior frequência de alelo (67%) encontrado na população estudada.

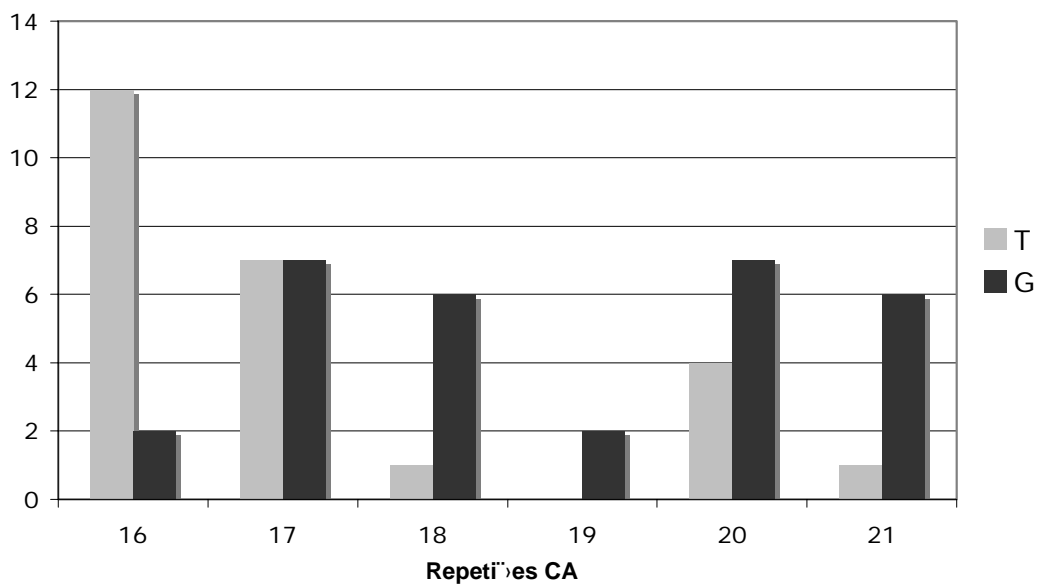


Gráfico 9: Determinação do número de repetições CA no intron 1 em cada alelo (G e T) da região promotora do gene do EGFR. Observa-se que no alelo T há menos repetições CA no íntron 1.

4.6 ESTUDO FUNCIONAL: ASSOCIAÇÕES ENTRE FENÓTIPO E GENÓTIPO

As indicações de variabilidade fenotípica nos dois modelos experimentais (AG1478 e Gefitinib) e as diferentes influências dos polimorfismos na biologia celular desencadearam o interesse de determinar se há ou não influência desses polimorfismos tanto na resposta citotóxica quanto na expressão de EGFR.

De acordo com as análises, há correlação entre a dose de 5 μ M e 10 μ M de AG1478 e o polimorfismo R497K ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), com uma maior inibição do crescimento celular em alelos com a variação K (lisina) em comparação com a variação R (arginina). Para os demais polimorfismos não foi observada nenhuma correlação entre atividade citotóxica do AG1478 e -216G/T, 787C/T e intron 1. Entretanto, há uma tendência dos indivíduos sensíveis a AG1478 apresentarem o genótipo CC para o polimorfismo 787C/T. Esse achado se torna importante visto o desconhecimento da função deste polimorfismo.

Em relação à expressão de RNAm, observou-se que há um aumento de 27% na expressão de EGFR nos indivíduos homocigotos -216T em relação aos homocigotos -216G. Não foi observada correlação entre a expressão de RNAm e a atividade citotóxica de AG1478 e gefitinib, bem como com os polimorfismos 787C/T, intron 1 e R497K.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Entende-se por câncer, um conjunto de doenças que se caracteriza por um crescimento desordenado das células levando a formação de tumores. As células tumorais costumam ser agressivas e de difícil controle podendo espalhar-se para outras partes do corpo (metástase) através da corrente sanguínea, dando origem a novos tumores. Um dos tratamentos mais conhecidos no combate ao câncer é a quimioterapia. Diferente da cirurgia e da radioterapia, a quimioterapia é uma forma de tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo o corpo, no entanto, quando há formação de metástases muitas vezes, a quimioterapia passa a ser a melhor forma de tratamento.

Os quimioterápicos, no entanto, não atuam exclusivamente sobre as células tumorais, as estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pêlos e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas pela ação dos quimioterápicos. Há uma margem muito tênue entre os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos, onde a ocorrência desses efeitos depende, do tempo de exposição, da concentração plasmática da droga (Instituto Nacional do Câncer-INCA, 2006) e mais recentemente do padrão genético de cada paciente. O ajuste da dose pela área de superfície corpórea não corrige essas diferenças interindividuais (Innocenti & Ratain, 2002).

A observação de que um paciente apresentou uma resposta exagerada ou desenvolveu uma reação inesperada à droga, tem sido ponto inicial para muitos estudos farmacogenéticos. Tal variação se dá desde uma falha na resposta a um medicamento, ocorrência de reações adversas e interações droga-droga, quando várias delas são administradas concomitantemente. As conseqüências clínicas variam desde um desconforto do paciente até uma fatalidade ocasional. Com isso, a potência intrínseca dos agentes anti-neoplásicos e a sua administração na dose máxima tolerada pelo paciente torna o tratamento quimioterápico um grande risco para pacientes que estão fora dos padrões populacionais de “normalidade” (Innocenti & Ratain, 2002). Esses “padrões de normalidade” podem estar relacionados com a idade, a etnicidade, o uso de medicamentos ou suplementos alimentares concomitantes ao tratamento, costumes, estilo de vida.

Embora se tenha reconhecido durante anos que a toxicidade a agentes quimioterápicos fosse um problema clínico substancial, apenas na última década foram desenvolvidos medicamentos denominados alvo-específico, como o gefitinib, erlotinib, cetuximab que são inibidores de tirosina quinase do EGFR. Estes medicamentos se ligam a moléculas específicas inibindo o crescimento tumoral, tendo como principal atrativo à baixa toxicidade nas células normais, e com isso aumentando a tolerabilidade ao tratamento (de Bono *et al.*, 2003; Jimeno & Hidalgo, 2005). Entretanto, nem sempre há uma ausência total de toxicidade nas células normais. Este fato se torna bastante interessante na busca de marcadores biológicos de predição terapêutica ou toxicológica. Sendo um medicamento de alvo conhecido, teoricamente torna-se “mais fácil” a identificação deste marcador.

O estudo com inibidores de tirosina quinase do EGFR teve como suporte as observações clínicas de correlação entre resposta terapêutica e *rash* cutâneo (Pérez-Soler, 2003; Pérez-Soler & Saltz, 2005). Este trabalho, no entanto, é o primeiro que avaliam as possíveis correlações entre polimorfismo no gene EGFR de células normais (germline polymorphism) e a resposta terapêutica.

Um dos fatores importantes no estudo da farmacogenética é o sexo e a raça. Dos indivíduos incluídos no estudo, 33,8% eram do sexo feminino e 66,2% do sexo masculino, com idade variando entre 1 e 96 anos. Já em relação a raça, 69% eram caucasoídes, 15,5% negroídes e 1,4% mongolóides. Não houve correlação entre sexo, raça e resposta anti-proliferativa. A análise fenotípica foi realizada com dois inibidores da tirosina quinase do EGFR, o gefitinib e o AG1478, onde se pode observar que há diferença de comportamento ou mecanismo entre estas duas drogas, apesar de ambas agirem no mesmo alvo. Essa variação de mecanismo também foi observada por Amann e colaboradores (2005) em células tumorais (NSCLC) *in vitro* tratadas com diferentes inibidores de EGFR.

Estudos prévios com inibidores de tirosina quinase, demonstraram que apenas 10% dos pacientes com câncer se beneficiam desta terapia (Cohen *et al.*, 2004). Os resultados fenotípicos mostram que 17,14% dos indivíduos foram

sensíveis ao AG1478 e 12,68% foram sensíveis ao gefitinib. As células tratadas com AG1478 apresentam evidências de inter-variabilidade entre os doadores em relação à resposta a esse agente, onde 17,14% foram sensíveis ao AG1478 ($CI_{50} < 10\mu M$), 65,72% tiveram uma sensibilidade intermediária (CI_{50} variando entre 10 e $70\mu M$) e 17,14% foram resistentes ($CI > 80\mu M$). Analisando cada indivíduo em relação ao percentual de crescimento das células na dose de $20\mu M$ observou-se que houve diferença expressiva entre a inibição destas células: no grupo sensível há indivíduos com 82% de inibição e outros com 66%; no intermediário, os com CI_{50} entre $10\mu M$ e $20\mu M$ possuem uma variação de 77% de inibição em alguns indivíduos e 50% em outros, já os com CI_{50} maior que $20\mu M$ e menor que $80\mu M$, essa variação chega a ser de 48% em alguns indivíduos e 26% em outros; e, no grupo resistente à inibição varia de 51% a 26%. Os dados mostraram que mesmo aumentando a dose de AG1478 o percentual de inibição, em algumas células, não muda, essa observação é mais evidente nos indivíduos considerados resistentes ao tratamento com AG1478, onde não houve variação da percentagem de inibição mesmo com o aumento da dose de $20\mu M$ para $80\mu M$, por isso, provavelmente, não foi possível calcular a CI_{50} destes indivíduos.

No modelo com gefitinib a faixa de variabilidade não foi tão ampla como no modelo com AG1478, 12,68% foram sensíveis ao gefitinib ($CI_{50} < 20\mu M$), 61,97% teve uma sensibilidade intermediária (CI_{50} maior que 20 e menor que $30\mu M$) e 25,35% ($CI_{50} > 30\mu M$). A relação do percentual de crescimento das células na dose de $40\mu M$ em cada indivíduo mostrou uma diferença expressiva entre eles. No grupo sensível há indivíduos com 99,5% de inibição e outros com 85%; no intermediário, os com CI_{50} entre $20\mu M$ e $30\mu M$ possuem uma variação de 99,1% a 71%; e, no grupo com $CI_{50} > 30\mu M$ encontrou-se indivíduos com 97% de inibição enquanto outros apresentam apenas 25%.

De acordo com Herbst (2004), nas células normais existem cerca de 40.000 a 100.000 receptores/célula. De acordo com estudos farmacogenéticos existentes na literatura, existem variações inter-individuais que tornam cada indivíduo único, podendo assim, cada célula apresentar quantidades de

receptores diferentes. Quando ocorre saturação destes receptores nas células pelos inibidores de tirosina quinase, o aumento da dose não influencia mais na resposta terapêutica. Este processo de saturação total pode levar ao processo de apoptose e assim diminuir a massa tumoral de pacientes com câncer. Em células onde não houve saturação total dos receptores, elas podem desenvolver um mecanismo de resistência, sobreviver e voltar a se dividir (Pao *et al.*, 2005) ou necessitar de um maior tempo de exposição para desencadear a resposta inibitória esperada. Estudos em células tumorais *in vitro* demonstraram que algumas células melhoraram sua resposta terapêutica aos inibidores de tirosina quinase quando já haviam sido expostas a algum tipo de terapia, seja radio ou quimioterapia (Knight *et al.*, 2004). O mecanismo de resistência estabelecido por essas células pode ser um outro mecanismo pela qual se observa variação na resposta das células tratadas com AG1478 e gefitinib, já que não existiu nenhuma informação sobre os tratamentos e drogas utilizadas previamente pelos doadores das células estudadas.

Em 2004, Lynch e colaboradores e Paez e colaboradores demonstraram o envolvimento de deleções e mutações pontuais no éxon 19 e 21 do gene EGFR, regiões codificadoras do resíduo tirosina quinase, com a resposta ao gefitinib e que o tecido normal destes pacientes não apresenta estas mutações. Pacientes que não responderam a terapia com gefitinib, também não possuíam mutações ou deleções nos éxons 19 e 21. Estudos preliminares também demonstraram que existe uma forte associação dose-dependente entre a ocorrência de *rash* cutâneo e a resposta terapêutica (Pérez-Soler *et al.*, 2003; Pérez-Soler & Saltz, 2005), entretanto, essa associação é menos consistente com o uso do gefitinib (Pérez-Soler & Saltz, 2005), o que pode explicar a pequena intervariabilidade observada na CI50 no modelo com este medicamento.

Estudos com células tumorais demonstraram a existência de diferentes polimorfismos que podem interferir na funcionalidade do EGFR, ou alterando a transdução do sinal (Moriai *et al.*, 1994), ou aumentando a sua transcrição (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). Como há uma correlação entre resposta e

manifestações cutâneas, deve-se tentar encontrar o que existe em comum entre a célula tumoral e a célula normal. De acordo com os polimorfismos estudados, R497K, -216G/T, 787C/T e repetição CA no intron 1, não houve associação entre estes e as CI50 das drogas testadas. No entanto, quando analisado o percentual de efeito em cada dose individualmente, observou-se que há correlação entre resposta ao tratamento com AG1478 nas doses de 5 μ M ($p < 0,01$) e 10 μ M ($p < 0,05$) e os indivíduos portadores do alelo K observado no polimorfismo R497K. Esse polimorfismo é caracterizado por uma mudança de apenas um nucleotídeo no éxon13, região codificadora do domínio extracelular do EGFR, levando a uma substituição de arginina (EGFR-497R) para lisina (EGFR-497K) no códon 497 (Moriai *et al.*, 1993). Células que expressam a variante EGFR-497K demonstraram ativar uma via menos mitogênica que as que carregam a variante EGFR-497R (Moriai *et al.*, 1994). Logo, proliferando menos, torna-se mais fácil o bloqueio do EGFR nestas células, saturando os seus receptores mais rápido e com isso melhorando a resposta nos indivíduos que possuem este polimorfismo. Além disso, é possível que, de alguma forma, o domínio extracelular do EGFR que possui a substituição arginina-lisina module a eficiência no recrutamento de substratos intracelulares para o receptor ativado e/ou permita a ativação de vias de sinalização alternativas que não levam a indução eficiente de proto-oncogenes nucleares e subsequente estímulo do crescimento celular.

A hipótese de que a porção extracelular do receptor EGFR pode representar uma importante região reguladora é suportada pela observação de que 7 resíduos *upstream* do códon 497 e 5 resíduos *downstream* são conservados nos receptores de ratos, camundongos e humanos (Moriai *et al.*, 1994). Nossos resultados corroboram com estes achados. O fato de haver significância nas duas doses menores (5 e 10 μ M) e não nas duas maiores dose (15 e 20 μ M) indica que, provavelmente, estes indivíduos doadores destas células necessitam de uma menor dose para desencadear a resposta terapêutica desejada. Nos indivíduos resistentes (>80mM) outros mecanismos podem estar envolvidos como mutações no gene *ras* que demonstrou estar

presente em células tumorais resistentes ao tratamento com inibidores de EGFR (Eberhard *et al.*, 2005; Pao *et al.*, 2005).

A variabilidade individual na resposta a inibidores de tirosina quinase tem levado a busca incessante de um marcador biológico que possa selecionar os pacientes que se beneficiaram com esta terapia. Em 2005, Liu e colaboradores demonstraram a presença do polimorfismo -216G/T na região promotora do gene EGFR. O polimorfismo -216G/T se localiza no sítio de reconhecimento do fator de transcrição Sp1, sendo este fator importante na atividade promotora do gene EGFR. Não houve correlação entre este polimorfismo e a CI50, entretanto, de acordo com a genotipagem dos fibroblastos, foi observado um aumento de 27% na expressão de EGFR nos indivíduos homocigotos T em comparação com os heterocigotos G. Esse resultado mostra uma correlação positiva com os achados de Liu e colaboradores (2005) que demonstraram que a afinidade para proteínas nucleares foi maior no alelo T do que no alelo G e que o nível de expressão de EGFR foi 40% maior nos alelos T.

Os estudos funcionais de alterações encontradas no gene do EGFR podem levar a uma maior elucidação do seu envolvimento na resposta terapêutica e no desenvolvimento do *rash* cutâneo nos pacientes tratados com inibidores de tirosina quinase. O estudo funcional do polimorfismo 787C/T no domínio tirosina quinase do EGFR parece não exercer influência nos níveis de expressão do EGFR e na atividade citotóxica dos dois agentes testados. Entretanto, foi observado uma tendência no genótipo CC para os indivíduos sensíveis ao AG1478. Provavelmente, um estudo multicêntrico, com um maior número de indivíduos e com etnicidades diferentes, torne essa correlação mais evidente.

Em 1992, Chi e colaboradores demonstraram que repetições dinucleotídicas (citosina e adenina) no intron 1 do EGFR possui uma relação intrínseca com a transcrição gênica. De acordo com diferentes autores (Gebhardt *et al.*, 1999; Amador *et al.*, 2004), há uma relação inversa entre o número de repetições CA e a transcrição gênica. De acordo com os resultados observados no presente estudo, não houve correlação entre o número de

repetição CA no intron 1 e a C150 das células tratadas com AG1478 e gefitinib e os níveis de RNAm nos fibroblastos. Os estudos encontrados na literatura até o presente momento referem-se ao tratamento de células tumorais. Os mecanismos envolvendo as alterações genéticas são diferentes na célula normal e na células tumoral, o que pode influenciar na resposta terapêutica (Amador *et al.*, 2004). Outros estudos e variações no protocolo devem ser realizados para elucidação do provável envolvimento deste polimorfismo na resposta aos inibidores de tirosina quinase e o *rash* cutâneo apresentado pelos pacientes, visto que há evidência que este polimorfismo é detectado nas células normais e se mantém nas células tumorais do mesmo indivíduo (Amador *et al.*, 2004).

A influência de polimorfismos na resposta biológica pode ser individual ou em grupo. A ocorrência de um polimorfismo pode ou não vir acompanhada de um outro polimorfismo, desencadeando o efeito biológico. Em 2005, Liu e colaboradores demonstraram que o polimorfismo -216G/T e o microsatélite no intron1 (CA)_n não estão em *linkage disequilibrium* (LD), indicando que a ocorrência de um não depende da ocorrência do outro. No estudo proposto também não foi observado LD entre o polimorfismo -216G/T e o intron1. Entretanto, quando analisado apenas os indivíduos heterozigotos foi observado que indivíduos portadores do alelo T apresentam também uma seqüência mais curta de repetições CA. O aumento do número de casos poderia levar a um aumento na correlação entre esse dois polimorfismos.

Apesar, da vasta literatura sobre o EGFR e seus inibidores, muitas dúvidas ainda precisam ser elucidadas. Observações clínicas indicam que há uma estreita ligação entre resposta terapêutica e polimorfismo e resposta terapêutica e *rash* cutâneo. Resta descobrir a interseção entre eles e assim apresentar um preditor de resposta terapêutica para os pacientes que se beneficiariam com o uso de inibidores de tirosina quinase do EGFR.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados observados sugerem que há diferença entre os mecanismos de ação dos inibidores de tirosina quinase do EGFR1 e que há diferença de resposta nos diferentes indivíduos tratados com AG1478, sendo este o melhor modelo para se estudar a citotoxicidade *in vitro* destes agentes. Apenas o polimorfismo R497K está associado a resposta terapêutica nas células tratadas com AG1478. Este polimorfismo deve ser investigado em um maior número de indivíduos podendo ser utilizado no futuro como um marcador de resposta terapêutica. Outros alvos como oncogenes, transportadores e mediadores podem estar contribuindo para a ausência ou presença de resposta nos indivíduos tratados com esses inibidores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASE, L. Mayo Clinic Brings First Broad Pharmacogenomics Test to Cancer Patients: Genetic test will screen for adverse, potentially life-threatening chemotherapy reactions. Acesso em: 10 de fevereiro de 2006. Disponível em: www.mayoclinic.org

ALEXANDERSON, B., EVANS, D. A. & SJOQVIST, F. Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. **Br Med J.**, v.4, 764–768, 1969.

ALVING, A. S., CARSON, P. E., *et al.* Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. **Science.**, 124 (3220): 484-5, 1956.

AMADOR, M. L., OPPENHEIMER, D. *et al.* An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. **Cancer Res.**, 64 (24): 9139-43, 2004.

AMANN, J., KALYANKRISHNA, S. *et al.* Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. **Cancer Res.**, 65 (1): 226-35, 2005.

ANDO, Y AND HASEGAWA, Y. Clinical pharmacogenetics of irinotecan (CPT-11). **Drug Metab Rev.**, 37 (3): 565-74, 2005.

BASELGA, J., RISCHIN, D. *et al.* Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. **J Clin Oncol.**, 20 (21): 4292-302, 2002.

BLUM, M., DEMIERRE, A. *et al.* Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88 (12): 5237-41, 1991.

BLUME-JENSEN, P. AND HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, 411 (6835): 355-65, 2001.

BOSMA, P. J., CHOWDHURY, J. R. *et al.* The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. **N Engl J Med.**, 333 (18): 1171-5, 1995.

BRANDT, B., HERMANN, S. *et al.* Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the egfr gene. **Cancer Res.**, 64 (1): 7-12, 2004.

CAPPUZZO, F., HIRSCH, F. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst.**, 97 (9): 643-55, 2005.

CHI, D. D., HING, A. V. *et al.* Two chromosome 7 dinucleotide repeat polymorphisms at gene loci epidermal growth factor receptor (EGFR) and pro alpha 2 (I) collagen (COL1A2). **Hum Mol Genet.**, 1 (2): 135, 1992.

CIB – Conselho de Informação sobre Biotecnologia. Glossário de Biotecnologia: Microssatélite. Capturado em: 20 de março de 2006, no no site:

<http://www.cib.org.br/glossario.php>.

CLAYMAN, C. B., ARNOLD, J. *et al.* Toxicity of primaquine in Caucasians. **J Am Med Assoc.**, 149 (17): 1563-8, 1952.

COHEN, E., ROSEN, F. *et al.* Phase II study of ZD1839 (Iressa) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). **Proc Am Soc Clin Oncol.**, 21:225a, 2002.

COHEN, M. H., WILLIAMS, G. A. *et al.* United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. **Clin Cancer Res.**, 10 (4): 1212-8, 2004.

COHEN, S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). **Dev Biol.**, 12 (3): 394-407, 1975.

COLLIE-DUGUID, E. S., ETIENNE, M. C. *et al.* Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. **Pharmacogenetics**, 10 (3): 217-23, 2000.

DAVIES, R. L., GROSSE, V. A. *et al.* Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. **Proc Natl Acad Sci USA**, 77 (7): 4188-92, 1980.

DE BONO, J. S., TOLCHER, A. W. *et al.* The future of cytotoxic therapy: selective cytotoxicity based on biology is the key. **Breast Cancer Res.**, 5 (3): 154-9, 2003.

DIASIO, R. B., BEAVERS, T. L., *et al.* Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. **J Clin Invest.**, 81 (1): 47-51, 1988.

DUDEK, A. Z., KMAK, K. L. *et al.* Skin rash and bronchoalveolar histology correlates with clinical benefit in patients treated with gefitinib as a therapy for previously treated advanced or metastatic non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, 51 (1): 89-96, 2006.

EBERHARD, D. A., JOHNSON, B. E. *et al.* Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. **J Clin Oncol.**, 23 (25): 5900-9, 2005.

EPPENBERGER-CASTORI, S., KUENG, W. *et al.* Prognostic and predictive significance of ErbB-2 breast tumor levels measured by enzyme immunoassay. **J Clin Oncol.**, 19 (3): 645-56, 2001.

EVANS, D. A. P., MANLEY, F. A. & MCKUSICK, V. A. Genetic control of isoniazid metabolism in man. **Br Med J.**, 2 485–491, 1960.

FDA – Food and Drug Administration. FDA Approves New Drug for the Most Common Type of Lung Cancer (2004). Capturado em 11/02/2006, no site: <http://boeree.hq.inverse.dk/bbs/topics/news/2004/NEW01139.html>

FDA – Food and Drug Administration. GLEEVEC™ (imatinib mesylate) Capsules. Package Insert. Capturado em 10/02/2006, no site: <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2001/21335lbl.pdf>

FDA - Food and Drug Administration. DAKO Herceptest (1998). Capturado em 11/02/2006, no site: <http://www.fda.gov/cdrh/pma/pmasep98.html>.

FDA - Food and drug Administration. PathVysion TM; HER-2 DNA Probe Kit (2001). Capturado em 11/02/2006, no site: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf/p980024s001.html>

GARROD, A. E. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. **Lancet**, 1616-1620, 1902.

GEBHARDT, F., ZANKER, K. S. *et al.* Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. **J Biol Chem.**, 274 (19): 13176-80, 1999.

GIACCONE, G. HER1/EGFR-targeted agents: predicting the future for patients with unpredictable outcomes to therapy. **Ann Oncol.**, 16 (4): 538-48, 2005.

GRANDIS, J. R. AND SOK, J. C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. **Pharmacol Ther.**, 102 (1): 37-46, 2004.

GONZALEZ, F. J. *et al.* Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. **Nature**, 331: 442-446, 1988.

GSCHWIND, A., FISCHER, O. M. *et al.* The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nat Rev Cancer.**, 4 (5): 361-70, 2004.

GUPTA, E., LESTINGI, T. M. *et al.* Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Res.**, 54 (14): 3723-5, 1994.

GUT, J. *et al.* Debrisoquine-type polymorphism of drug oxidation: purification from human liver of a cytochrome P450 isozyme with high activity for

bufuralol hydroxylation. **FEBS Lett.**, 173: 287–290, 1984.

HANAHAN, D. AND FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, 86 (3): 353-64, 1996.

HARARI, D. AND YARDEN, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. **Oncogene**, 19: 6102-6114, 2000.

HEIM, M. AND MEYER, U. A. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. **Lancet**, 336: 529–532, 1990.

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, 59 (2 Suppl): 21-6, 2004.

HUANG, H. S., NAGANE, M. *et al.* The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. **J Biol Chem.**, 272 (5): 2927-35, 1997.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Quimioterapia. Capturado em 27 de março de 2006, no site: www.inca.gov.br.

INNOCENTI, F. AND RATAIN, M. J. Update on pharmacogenetics in cancer chemotherapy. **Eur J Cancer.**, 38 (5): 639-44, 2002.

ISHII, S., XU, Y. H. *et al.* Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 82 (15): 4920-4, 1985.

IYER, L., KING, C. D. *et al.* Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. **J Clin Invest.**, 101 (4): 847-54, 1998.

IYER, L., DAS, S. *et al.* UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. **Pharmacogenomics J.**, 2 (1): 43-7, 2002.

JIMENO, A. AND HIDALGO, M. Blockade of epidermal growth factor receptor (EGFR) activity. **Crit Rev Oncol Hematol.**, 53 (3): 179-92, 2005.

JOHANSSON, I. *et al.* Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 *CYP2D* locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.**, 90: 11825–11829, 1993.

JOST, M., Class, R. *et al.* A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. **J Invest Dermatol.**, 112 (4): 443-9, 1999.

KALOW, W. *Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs* (W. B. Saunders & Co., Philadelphia, USA, 1962).

KALOW, W. & STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. **Can J Med Sci.**, 35:1305–1320, 1957.

KLOETZER, W., KURZROCK, R. *et al.* The human cellular *abl* gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K562 has an associated tyrosine protein kinase activity. **Virology**, 140 (2): 230-8, 1985.

- KNIGHT, L. A., DI NICOLANTONIO, F. *et al.* The in vitro effect of gefitinib ('Iressa') alone and in combination with cytotoxic chemotherapy on human solid tumours. **BMC Cancer.**, 4: 83. 2004.
- KRYNETSKI, E. Y., SCHUETZ, J. D. *et al.* A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 92 (4): 949-53, 1995.
- LIU, W., INNOCENTI, F. *et al.* Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. **Clin Cancer Res.**, 9 (3): 1009-12, 2003.
- LIU, W., INNOCENTI, F. *et al.* A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. **Cancer Res.**, 65 (1): 46-53, 2005.
- LYNCH, T. J., Bell, D. W. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med.**, 350 (21): 2129-39, 2004.
- MACKENZIE, P. I., OWENS, I. S. *et al.* The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. **Pharmacogenetics**, 7 (4): 255-69, 1997.
- MAHGOUB, A., IDLE, J. R., *et al.* Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. **Lancet**, 2: 584–586.1977.
- MAJUMDER, S., BROWN, K. *et al.* c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. **Mol Cell Biol.**, 8 (11): 4896-903, 1988.

- MARCUELLO, E., ALTES, A. *et al.* UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. **Br J Cancer**, 91 (4): 678-82, 2004.
- MEIER, P. J., MUELLER, H. K., *et al.* Hepatic monooxygenase activities in subjects with a genetic defect in drug oxidation. **Gastroenterology**, 85: 682–692, 1983.
- MENDELSON, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. **Clin Cancer Res.**, 3 (12 Pt 2): 2703-7, 1997.
- MEYER, U. A. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. **Nat Rev Genet.**, 5 (9): 669-76, 2004.
- MILANO, G., ETIENNE, M. C. *et al.* Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. **Br J Cancer.**, 79 (3-4): 627-30, 1999.
- MILLER, W. E. AND RAAB-TRAUB, N. The EGFR as a target for viral oncoproteins. **Trends Microbiol.**, 7 (11): 453-8, 1999.
- MOHAMED, M. K., RAMALINGAM, S. *et al.* Skin rash and good performance status predict improved survival with gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Ann Oncol.**, 16 (5): 780-5, 2005.
- MORAIS, S. M. F. *et al.* Identification of a new defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in Japanese. **Mol Pharmacol.**, 46: 594–598, 1994.
- MORIAI, T., KOBRIN, M. S. *et al.* Cloning of a variant epidermal growth factor receptor. **Biochem Biophys Res Commun.**, 191 (3): 1034-9, 1993.

- MORIAI, T., KOBRIN, M. S. *et al.* A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 91(21): 10217-21, 1994.
- MORONI, M., VERONESE, S. *et al.* Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. **Lancet Oncol.**, 6 (5): 279-86, 2005.
- MOTULSKY, A. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. **JAMA**, 165: 835–837, 1957.
- NAGAHARA, H., MIMORI, K. *et al.* Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. **Clin Cancer Res.**, 11 (4): 1368-71, 2005.
- NAGASUBRAMANIAN, R., F. INNOCENTI, *et al.* Pharmacogenetics in cancer treatment. **Annu Rev Med.**, 54: 437-52, 2003.
- NEBERT, D. W. AND MENON, A. G. "Pharmacogenomics, ethnicity, and susceptibility genes." **Pharmacogenomics J.**, 1 (1): 19-22, 2001.
- NOWELL, P. C. AND HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, 142: 1497, 1960.
- O-CHAROENRAT, P., RHYS-EVANS, P. *et al.* Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. **Clin Exp Metastasis.**, 17 (7): 631-9, 1999.
- PAEZ, J. G., JANNE, P. A. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, 304 (5676): 1497-500, 2004.

PAL, S. K. AND PEGRAM, M. Epidermal growth factor receptor and signal transduction: potential targets for anti-cancer therapy. **Anticancer Drugs**, 16 (5): 483-94, 2005.

PASSARGE, E. Color Atlas of Genetics. Thieme. Ed 2nd. Pg 434-35. New York, NY., 2001.

PAO, W., MILLER, V. A. *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. **PLoS Med.**, 2 (3): e73, 2005.

PAO, W., WANG, T. Y. *et al.* KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. **PLoS Med.**, 2 (1): e17, 2005.

PEDERSEN, M. W., MELTORN, M. *et al.* The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. **Ann Oncol.**, 12 (6): 745-60, 2001.

PEGRAM, M. D., FINN, R. S. *et al.* The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. **Oncogene**, 15 (5): 537-47, 1997.

PEREZ-SOLER, R. Can rash associated with HER1/EGFR inhibition be used as a marker of treatment outcome? **Oncology (Williston Park)**, 17 (11 Suppl 12): 23-8, 2003.

PEREZ-SOLER, R. AND SALTZ, L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? **J Clin Oncol.**, 23 (22): 5235-46, 2005.

RANSON, M., HAMMOND, L. A. *et al.* ZD1839, a selective oral epidermal growth

factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. **J Clin Oncol.**, 20 (9): 2240-50, 2002.

RAIDA, M., SCHWABE, W. *et al.* Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls. **Clin Cancer Res.**, 7 (9): 2832-9, 2001.

ROCHA, J. C., CHENG, C. *et al.* Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 105 (12): 4752-8, 2005.

ROWLEY J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, 243: 290-3, 1973.

SCORDO, M. G., AKLILLU, E. *et al.* Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. **Br J Clin Pharmacol.**, 52 (4): 447-50, 2001.

SENECHAL, K. AND SAWYERS, C. L. Signal transduction-based strategies for the treatment of chronic myelogenous leukemia. **Mol Med Today.**, 2 (12): 503-9, 1996.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, 103 (2): 211-25, 2000.

SHI, M. M., BLEAVINS, M. R. *et al.* Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. **Drug Metab Dispos.**, 29 (4 Pt 2): 591-5, 2001.

SHUSHAN, A., ROJANSKY, N. *et al.* The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth. **Hum Reprod.**, 19 (9): 1957-67, 2004.

SU, M. C., LIEN, H. C. *et al.* Absence of epidermal growth factor receptor exon 18-21 mutation in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.**, 224 (1): 117-21, 2005.

TAKANO, T., OHE, Y. *et al.* Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol.**, 23 (28): 6829-37, 2005.

TIBES, R., TRENT, J. *et al.* Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, 45: 357-84, 2005.

TSAO, A. S. AND HERBST, R. S. Factors that determine response to EGFR inhibitors. *Signal.* (2003) 4 (4):4-9. Capturado em 06/04/2005 no site: www.egfr-info.com.

van KUILENBURG, A. B., HAASJES, J. *et al.* Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. **Clin Cancer Res.**, 6 (12): 4705-12, 2000.

van KUILENBURG, A. B., MULLER, E. W. *et al.* Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. **Clin Cancer Res.**, 7 (5): 1149-53, 2001.

YARDEN Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur J Cancer.**, 37 (suppl.4):S3-S8. 2001.

YARDEN, Y. AND SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 2: 127-137, 2001.

ZHU, X. F., LIU, Z. C. *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. **Cancer Lett.**, 169 (1): 27-32, 2001.

ZHANG W., STOEHLMACHER J., *et al.* A polymorphic dinucleotide repeat in intron 1 of *EGFR* (*epithelial growth factor receptor*) gene is associated with clinical response to platinum based chemotherapy in patients with advanced colorectal disease. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 21: 134a, 2002.

ZHANG, W., PARK, D. J. *et al.* Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. **Clin Cancer Res.**, 11 (2 Pt 1): 600-5, 2005.