



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Instituto de Bioquímica médica**

Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR); mapeamento de mutações em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células e efeito do Butirato de Sódio em linhagens celulares de câncer de pulmão.

**Nivea Dias Amoêdo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: **Franklin David Rumjanek**

Co-orientador: **Marcos Eduardo Paschoal**

Rio de Janeiro,

Outubro 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AMOEDO, Nivea Dias**

Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR); mapeamento de mutações em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células e efeito do Butirato de Sódio em linhagens celulares de câncer de pulmão/ Nivea Dias Amoedo. – Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM,2006.

XIII, II76

Orientador: Franklin David Rumjanek

Co-orientador: Marcos Eduardo Machado Paschoal

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/Instituto de Bioquímica Médica/Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, 2006.

Referências bibliográficas: f.72

1. Câncer de Pulmão de não pequenas células. 2. EGFR. 3. Alterações epigenéticas. 4. Acetilação e desacetilação. 5. Butirato de sódio. I.Rumjanek, Franklin David. II. Paschoal, Marcos Eduardo Machado. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. IV.Título.

Receptor do Fator de Crescimento Epidérmal (EGFR); mapeamento de mutações em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células e efeito do Butirato de Sódio em linhagens celulares de câncer de pulmão

Nivea Dias Amoêdo

Orientador: Franklin David Rumjanek  
Co-orientador: Marcos Eduardo Machado Paschoal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Aprovada em Outubro de 2006 por:

---

Orientador: Dr. Franklin David Rumjanek  
Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Dra. Claudete Esteves Klumb  
Médica - Hospital do Câncer HCI – Instituto Nacional do Câncer

---

Dr. Robson Queiroz Monteiro  
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Dr. José Roberto Lapa e Silva  
Professor Titular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Revisor: Dra Vivian Mary Barral Dood Rumjanek  
Professora Titular do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

*Aos Meus Pais, Ruben e Edna por  
todo Amor e Dedicação sempre  
disponíveis.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai do Céu por iluminar-me sempre nas decisões e acompanhar-me em todos os momentos.

À minha família, a base para esse sucesso! Ao meu pai Ruben, a minha mãe Edna e a minha irmã Silvia, por simplesmente me amarem.

À minha avó e tios por todo apoio e orientação.

Ao Marcos, por estar ao meu lado... Pelo seu Amor, Carinho e não posso negar, por toda orientação e paciência ao longo do período de realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Gamenses, Alan, Aline, Elisa Fernanda e Rafael pela companhia e momentos de muita alegria. E, principalmente à você Fefs pela sua amizade incondicional.

Aos meus amigos Desyreé, Ethel, Rodrigo Cíntia e Jéferson por nossas festas, que no momento estão suspensas, por motivos de trabalho.

Às minhas amigas Regilenne e Fabiana pela nossa amizade de sempre.

Ao meu sempre orientador Franklin Rumjanek pela sua Orientação e exemplo de saber em Ciência.

Ao Dr Marcos Paschoal pela sua orientação em toda parte clínica deste trabalho e, não posso esquecer de agradecer pela sua seriedade e alegria constantes.

À Professora Vivian pelos seus constantes ensinamentos e um exemplo para mim.

Às Professoras Ana Lucia Giannini e Andréa Góes, duas amigas de tão pouco tempo mas que parece de longas datas. Obrigada pela orientação! E, Ana obrigada por me ensinar a trabalhar com cultura de células!

Aos meus “Vizinhos de bancada” e quase minha família, pois passamos mais tempo no Laboratório do que em casa, por toda ajuda teórica e prática. Vocês não imaginam o quanto gosto de trabalhar no E22! Um agradecimento especial ao Jackson Menezes que me acolheu no laboratório e com quem comecei a fazer os primeiros experimentos.

À minha aluna Paula Pezzuto que tem me ajudado em grande parte de todos esses experimentos.

À Martinha, que apesar de não me fornecer os vermes para os experimentos, ajuda muito ao preparar os materiais de trabalho, principalmente para a cultura de células.

À Professora Vera Koatz por ceder seu laboratório para os experimentos com cultura de células. E também, aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia celular por nos agüentar todos os dias na sala de cultura.

Ao Rodrigo Madeiro pelo intenso trabalho com as fotos de microscopia de fluorescência.

À Dra. Claudete Klumb pelo seu apoio na realização do meu trabalho.

À Dra Concy Caldeira por acreditar em mim e no meu trabalho desde o início dessa caminhada científica.

Agradeço também aos amigos do Laboratório Sonda-UFRJ, Rosana, Marlúcia, Marcela, Humberto e também Daniela e Rosane.

Meus agradecimentos ao Serviço de Anatomia Patológica, pelas amostras em parafina. Com agradecimento especial aos Doutores Paulo Marcos, Ariovaldo Filho e Ana Beatriz Esperança.

## RESUMO

O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos. Este mal é considerado a primeira causa de morte por câncer em homens e a segunda em mulheres. Estimativas do INCA revelam que o câncer de pulmão deverá apresentar, somente no Rio de Janeiro, 2270 novos casos em 2006. Neste trabalho foi feito um levantamento das mutações predisponentes da tumorigênese no gene do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) em 48 biópsias com câncer de pulmão previamente diagnosticado, no Instituto de Doenças do Tórax, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Dos 48 pacientes analisados, em apenas um foi encontrada uma mutação já descrita na literatura. Essa mutação consiste em uma deleção de 15 pares de base do exon 19, é do tipo homozigótica e corresponde a eliminação do motivo **ELREA** que é altamente conservado entre os EGFRs de vertebrados. Ao mesmo tempo, foi analisado o efeito de butirato de sódio, um inibidor de histonas desacetilases em parâmetros relevantes à proliferação celular de linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células. Nossos resultados mostram que o butirato de sódio possui um efeito tempo/dose dependente, na regulação do crescimento das linhagens A549 e H460 estudadas, sendo a linhagem H460 mais resistente ao tratamento que a linhagem A549. Alterações morfológicas e reorganização do citoesqueleto de actina também foram observadas, através da marcação da actina com faloidina. A medida da expressão do mRNA do gene EGFR, por PCR em tempo real, mostrou que o tratamento com butirato de sódio induziu um aumento da expressão desse gene. No trabalho analisamos também o efeito do butirato de sódio sobre proteínas envolvidas no controle do ciclo celular que são reguladas por processos de acetilação e desacetilação. Nesse caso, a proteína p53, teve sua estabilidade aumentada pelo tratamento com butirato de sódio.

Esses resultados mostram, em conjunto o efeito do butirato de sódio na regulação do crescimento de células tumorais. No entanto, não se sabe ao certo os mecanismos pelos quais o butirato de sódio e outros inibidores de histona desacetilase atuam.

Palavras-chave: 1. Câncer de Pulmão de não pequenas células. 2. EGFR. 3. Alterações epigenéticas. 4. Acetilação e desacetilação. 5. Butirato de sódio.

## ABSTRACT

Lung cancers constitute the most frequent kind of malign tumors. This disease is considered to be the main cause of cancer death in males and the second in females. INCA estimates that, in 2006, 2270 new cases of lung cancer should be reported only in Rio de Janeiro. In the present work, we have analyzed 48 biopsies of previously diagnosed lung cancer patients (diagnosed at the Instituto de Doenças do Tórax, from Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) trying to find predisposing tumorigenic mutations in the gene of Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR). Among all the analyzed patients, only a single previously reported mutation was identified. This mutation was shown to be homozygotic and was characterized by a 15 base pair deletion in exon 19, leading to the loss of the **ELREA** motif, a highly conserved sequence in vertebrate EGFRs. Besides, we also analyzed the effects of sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor on cell proliferation and morphology using two different lineages of non small cell cancer cells, A549 and H460. Our results indicate that sodium butyrate presents a time and dose dependent effect in regulation of growth of both cells, being its action more pronounced in A549 lineage. Morphological changes and an actin rearrangement were also observed in the cells through actin staining with phalloidin. EGFR expression was monitored by real time PCR and was shown to be increased by butyrate treatment. In relation to the control of cell cycle, exposure to butyrate increased the stability of P53.

Keywords: 1. Non small cell lung cancer. 2. EGFR. 3. Epigenetics modifications. 4. Acetylation and Deacetylation. 5. sodium butyrate.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título da Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1.1	Representação esquemática da proteína EGFR	09
Figura 1.2	Estrutura primária do EGF	10
Figura 1.3	Formação de Homodímeros e Heterodímeros no EGFR humano	11
Figura 1.4	Cascata de Sinalização intracelular gerada pela ativação de EGFR.	12
Figura 1.5	Representação esquemática das mutações presentes no domínio tirosina quinase do EGFR.	14
Figura 1.6	Esquema representativo da interação entre RNA, modificações de histonas e metilação de DNA no silenciamento da transcrição gênica.	15
Figura 1.7	Processo transcricional e sua regulação por modificação de histonas.	18
Figura 1.8	Esquema geral de alguns processos biológicos (a-j) regulados por eventos de acetilação e desacetilação.	18
Figura 1.9	Estrutura representativa de principais inibidores de histona desacetilase.	20
Figura 4.1	Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação obtido a partir do sistema ASPCR do exon 19 do gene EGFR.	37
Figura 4.2	Perfil do sequenciamento automático da mutação no gene EGFR.	38
Figura 4.3	Alinhamento das seqüências normal do Exon19 do gene EGFR com a deleção de 15 pares de base encontrada no paciente 2 deste estudo.	39
Figura 4.4	Curva de crescimento celular das linhagens A549 (A) e H460 (B).	42
Figura 4.5	Análise da Viabilidade celular das linhagens A549 (A) e H460 (B).	43
Figura 4.6	Curva de crescimento celular (A) e análise da viabilidade celular (B) na linhagem IMR-90.	44
Figura 4.7	Efeito do butirato de sódio na expressão de mRNA do gene EGFR nas células A549 (A) e H460 (B)	47
Figura 4.8	Expressão de mRNA de EGFR nas linhagens A549 e H460 após 48 horas em cultura sem tratamento	48
Figura 4.9	Efeito do butirato de sódio na expressão da proteína p53 das linhagens A549 e H460	50
Figura 4.10	Efeito do tratamento, por 24 horas, com 10mM butirato de sódio na expressão do mRNA da p53 das linhagens A549 e H460	51
Figura 4.11	Linhagens A549 e H460, em cultura, tratadas com 10mM Butirato de Sódio	53
Figura 4.12	Linhagem IMR-90, em cultura tratada com 1mM, 3mM e 10mM Butirato de Sódio	53
Figura 4.13	Marcação dos filamentos de f-actina com faloidina (verde) e do núcleo com iodeto de propídeo (vermelho) e DAPI (azul) das	

	linhagens A549 (A), H460 (B) e IMR-90 (C) tratadas ou não com 10mM de butirato de sódio por 24 horas e 48 horas.	57
Figura 5.1	Mutações nos exons 18 a 21 do domínio tirosina quinase do gene EGFR e suas frequências em 3023 pacientes.	63

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Título da Tabela</b>	<b>Página</b>
Tabela 1.1	Sistema de Classificação TNM, atualizado por Mountain em 1997	05
Tabela 1.2	Estadiamento completo	05
Tabela 1.3	Sobrevida em cinco anos nos vários estadiamentos	25
Tabela 3.1	Seqüência dos iniciadores para amplificação do domínio tirosina quinase do gene EGFR de tecidos incluídos em parafina.	26
Tabela 3.2	Seqüência dos iniciadores alelo-específico para amplificação das mutações presentes no domínio tirosina quinase do gene EGFR de tecidos incluídos em parafina.	26
Tabela 3.3	Seqüência de iniciadores correspondentes ao exon 19 do gene EGFR e ao exon 5 do p53, utilizada para a medida da expressão do EGFR e p53 respectivamente nas linhagens A549 e H460 tratadas com butirato de sódio.	32
Tabela 4.1	Informações clínicas dos pacientes estudados.	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
bp	Pares de bases
cDNA	DNA complementar
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CPNPC	Câncer de pulmão não pequenas células
DAPI	Diidrocloreto de 4,6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
g	grama
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase
HAT	Histonas acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
HDACi	Inibidores de Histona desacetilases
HUCFF/UFRJ	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IDT	Instituto de Doenças do Tórax
IDT/HUCFF	Instituto de Doenças do Tórax
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	quilodalton
L	litro
M	Molar
mAbs	Anticorpos monoclonais
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-brometo de difenil tetrazolium
NaBu	Butirato de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato 10mm 0,15M nacl
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH quinase
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TAE	Tampão tris-acetato EDTA
TGF $\alpha$	Fator de crescimento transformador
TKIs	Inibidores tirosina quinase
TSA	Tricostatina A
X	Veze concentrado
Xg	Gravidade

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	v
<b>RESUMO</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	x
<b>SUMARIO</b>	xi
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	01
<b>1.1 – Câncer de Pulmão</b>	01
1.1.1 – Epidemiologia e Fatores de risco	01
1.1.2 Classificação Histológica do Câncer de Pulmão	03
1.1.3 Diagnóstico no Câncer de Pulmão	03
1.1.4 Tratamentos no Câncer de Pulmão	07
<b>1.2 – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)</b>	08
1.2.1 EGFR : um alvo molecular em tumores sólidos	11
1.2.2 Mutações no gene EGFR: Implicações para o Biologia Tumoral e Tratamento	13
<b>1.3 – Alterações epigenéticas e Câncer</b>	15
1.3.1 Modificações de Histonas em Câncer: a função das histonas desacetilases	16
1.3.2 Inibidores de Histona desacetilases (HDACi)	19
1.3.3 Butirato de sódio – um alvo terapêutico para o câncer de pulmão	20
<b>2 – OBJETIVOS</b>	22
2.1 – Geral	22
2.2 – Específicos	22
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	23
3.1 Seleção de Pacientes	23
3.2 Diagnóstico Clínico Histopatológico	23
3.3 Extração de DNA Genômico	23
3.4 Eletroforese do DNA genômico	24
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase: Amplificação dos éxons 18 a 21 do gene EGFR	24
3.6 Eletroforese em gel de agarose do DNA amplificado	26
3.7 Purificação de material para sequenciamento	26
3.8 Sequenciamento automático	26
3.9 Análise das seqüências obtidas	27
3.10 Cultura de células	27
3.11 Tratamento das Linhagens com Butirato de Sódio – medida da proliferação celular Medida de Viabilidade Celular ( MTT)	28
3.12 Tratamento das Linhagens com Butirato de Sódio – alterações morfológicas do citoesqueleto	29
3.13 Obtenção do Extrato Protéico Total das Células - SDS-PAGE e Western-blot	29
3.14 Extração de RNA das células tratadas	31
3.15 Medida da Expressão do Gene EGFR e p53 por Real Time PCR	31
<b>4.0 RESULTADOS</b>	33
4.1 Análise de mutações nos exons 18-21 do gene EGFR em uma população brasileira de indivíduos com câncer de pulmão – revisão clínica dos pacientes	33
4.2 Mutações do gene EGFR – identificação da deleção E746_A750 do exon19, no domínio tirosina quinase do gene EGFR	35

4.3 O Butirato de sódio induz uma redução da proliferação celular nas linhagens A549 e H460	40
4.4 O butirato de sódio induz um aumento da expressão de mRNA de EGFR nas linhagens A549 e H460	45
4.5 O tratamento com butirato de sódio aumenta a expressão da proteína p53 nas linhagens A549 e H460	49
4.6 Análise morfológica das Linhagens A549 e H460 tratadas com Butirato de Sódio	52
4.7 Análise morfológica das linhagens A549 e H460 – reorganização dos filamentos de actina após o tratamento com butirato de sódio	56
<b>5.0 DISCUSSÃO</b>	61
5.1 Parte I – Mutações no gene EGFR	61
5.2 Parte II - Efeito do Butirato de sódio, um inibidor de histona desacetilase, no crescimento de linhagens tumorais de câncer de pulmão	63
<b>6.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	70
<b>REFERÊNCIAS</b>	72

## ***1 - INTRODUÇÃO***

### ***1.1 – Câncer de Pulmão***

#### ***1.1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco***

O câncer de pulmão é a malignidade mais letal e uma das mais incidentes. Para o ano de 2006 foram estimados nos Estados Unidos, 1.372.900 casos novos de câncer. Destes, o câncer de pulmão contribui com 172.570 (13%) casos com parcelas de 93.010 e 79.560 para homens e mulheres respectivamente (1,3H:1M). Para o mesmo período, foram previstos 570.200 óbitos por câncer onde o pulmão responde por 163.500 (29,32%) do total, com 90.490 e 73.020 para homens e mulheres. A relação incidência / óbito é de 1:1. (JEMAL,2006)

O número de casos novos de câncer de pulmão, estimados para o Brasil em 2006, é de 17.850 entre homens e de 9.320 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 19 casos novos a cada 100 mil homens e 10 para cada 100 mil mulheres. No estado do Rio de Janeiro, estimativas prevêm 3460 novos casos de câncer de pulmão. (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2006).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais freqüente nas regiões SuL (36/100.000), Sudeste (23/100.000) e Centro-Oeste (15/100.000). Sendo nas regiões Norte (8/100.000) e Nordeste (8/100.000) o terceiro mais freqüente. Para as mulheres, é o quarto mais freqüente nas regiões SuL (16/100.000), Sudeste (11/100.000), Centro-Oeste (8/100.000) e Norte (5/100.000), sendo o quinto mais freqüente na região Nordeste (5/100.000).

A fumaça de cigarro e, conseqüentemente o tabagismo, constitui o fator etiológico mais importante na gênese do câncer de pulmão. A correlação com o tabagismo ocorre em 80 a 90% dos casos, devido à exposição de elementos carcinogênicos inalados na fumaça do cigarro principalmente de forma ativa, mas também passiva.

O câncer de pulmão é 10 vezes mais freqüente nos fumantes que nos não fumantes e 15 a 30 vezes mais comum nos fumantes de maior carga de tabaco (40 maços / ano), demonstrando claramente a relação dose / efeito. Quanto maior o período de suspensão do tabagismo, menor o risco de desenvolver câncer; porém, este nunca se iguala ao do não fumante com a incidência crescente da doença em ex-tabagistas. Mesmo sendo altamente relacionado ao tabagismo, nem todos os fumantes obrigatoriamente terão câncer de pulmão. Um em cada 11 fumantes poderá desenvolver a doença, direcionando para uma predisposição genética individual (RUCKDESCHEL,2004).

O risco de não fumantes, expostos a fumaça de cigarro, para câncer de pulmão é de 1,2 a 1,5 maior que o do não fumante não exposto ao fumo dos seus pais ou cônjuges. A exposição de não fumantes à fumaça do tabaco, em ambiente de trabalho, é difícil de ser determinada (UEHARA, 1998). Também estão relacionados ao câncer de pulmão a exposição ao asbesto, a exposição ocupacional a minerais radioativos, como o urânio , mas sua incidência associada a exposição a radiação ambiental, como o radônio, permanece sob investigação. O desenvolvimento de câncer de pulmão também está relacionado com a exposição ocupacional ao formaldeído, arsênio, níquel, cromo, éter clorometil, gás mostarda , poeira de carvão, óleos minerais e hidrocarbonetos, problemas nutricionais isolados, como deficiência de vitamina A e  $\beta$  caroteno. Fatores genéticos também podem contribuir para o aumento do risco de câncer de pulmão, principalmente porque os carcinógenos levam ao desenvolvimento do câncer através de diversas vias metabólicas que são geneticamente determinadas. As anormalidades mais freqüentes observadas em câncer de pulmão são expressão anormal de p53, dos fatores de crescimento tais como Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e oncogenes como K-Ras. No entanto essas anormalidades podem ser resultados de mecanismos de carcinogênese ou da instabilidade genética presente na transformação maligna (RUCKDESCHEL,2004).



### ***1.1.2 Classificação Histológica do Câncer de Pulmão***

A classificação histológica do câncer de pulmão mais aceita pela literatura mundial é a da Organização Mundial de Saúde (OMS). São encontrados basicamente dois grupos de câncer de pulmão: carcinoma de pulmão não pequenas células (CPNPC) que corresponde a um grupo de três tipos histológicos: carcinoma de células escamosas (epidermóide), adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, ocorrendo em cerca de 75% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão, os quais geralmente se disseminam lentamente para outros órgão e possuem difícil detecção em estágios precoces. O outro grupo celular é o carcinoma de células pequenas. Este, caracterizado por um rápido crescimento, grande capacidade de disseminação e, inclusive com invasão cerebral precoce. Apesar do alto grau de resposta ao tratamento, apresenta baixo percentual de cura (UEHARA,1998).

Dados do Instituto de Doenças do Tórax do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (IDT/HUCFF) com um registro de 1664 pacientes de carcinoma de pulmão mostram uma distribuição em 42% carcinoma escamoso, 27% adenocarcinoma, 15% pequenas células, 8% grandes células, 2% tumor carcinóide.

### ***1.1.3 Diagnóstico no Câncer de Pulmão***

Como mais de 85% dos pacientes com câncer de pulmão morrem nos primeiros cinco anos pós-diagnóstico, a importância do diagnóstico oportuno, em estágio inicial, especialmente no estágio I, onde a sobrevida global é de 60 a 90% com o tratamento cirúrgico, deve ser realçada. A presença de sintomas é sinal de mau prognóstico. Observa-se 25% de sobrevida em cinco anos para pacientes com neoplasia de pulmão, sintomáticos, enquanto que foi de 56% para os assintomáticos (MOUNTAIN,1997;UEHARA,1998).

Para definir a estratégia terapêutica dos pacientes com câncer de pulmão são fundamentais o diagnóstico histopatológico e o estadiamento da doença. O diagnóstico pode ser confirmado por exames simples e não-invasivos, como a citologia de escarro, e através da realização de toratocomia (ressecção da lesão). A escolha do exame é particularizada a cada paciente.

Após o diagnóstico, é necessário que se determine o estadiamento da neoplasia. Este tem como objetivos definir anatomicamente a extensão da neoplasia; determinar a evolução e prognóstico mais prováveis para cada tipo de tumor e orientar a escolha da melhor opção terapêutica para cada caso. Atualmente, o sistema **T** (tumor primário) **N** (linfonodos regionais) **M** (metástases à distância) é o mais utilizado para o estadiamento no câncer de pulmão de não pequenas células e baseia-se na extensão anatômica da neoplasia, foi atualizado por Mountain em 1997 (MOUNTAIN,1997). Conforme as características do TNM definiram-se sete diferentes grupos denominados de estádios (DESLAURIER,2000). O Sistema de Classificação TNM e o estadiamento completo estão representados nas tabelas 1.1 e 1.2

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>
<i>T Tumor primário</i>	<i>Estadiamento de Câncer de pulmão em relação a extensão do tumor primário.</i>
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor <3cm, sem evidência de invasão de bronquiófonte
T2	Tumor >3cm, com ou sem invasão de pleura visceral, ou associado com atelectasia de menos que um pulmão inteiro.
T3	Tumor invadindo a parede torácica, diafragma, pleura mediastinal ou pericárdio, nervo frênico ou tumor a <2cm da carina.
T4	Tumor invadindo o mediastino, coração, traquéia, esôfago, os corpos vertebrais, ou a carina, ou com derrame, pleural neoplásico.

<i>N</i> linfonodos regionais	<i>Estadiamento do câncer de pulmão em relação a extensão do acometimento de linfonodos.</i>
N0	Sem envolvimento nodal
N1	Metástases em linfonodos peribrônquicos ou hilares
N2	Linfonodos mediastinais ipsilaterais
N3	Metástases em linfonodos mediastinais contralaterais ou supraclaviculares, ou escalênicos
<i>M</i> Metástases à distância	<i>Estadiamento de câncer de pulmão em relação a extensão da disseminação metastática à distância.</i>
M0	Sem metástases
M1	Metástases à distância

**Tabela 1.1: Sistema de Classificação TNM, atualizado por Mountain em 1997.**

<b>Estádio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	0	0
IA	1	0	0
IB	2	0	0
IIA	1	1	0
IIB	2	1	0
	3	0	0
IIIA	1-3	2	0
	3	1	0
IIIB	1-4	3	0
	4	0-3	0
IV	1-4	0-3	1

**Tabela 1.2: Estadiamento completo MOUNTAIN, 1997**

O sistema TNM não é aplicado rotineiramente no carcinoma de pulmão de pequenas células, este é classificado pelo sistema de dois estádios:

- Doença localizada: quando o tumor é confinado a um hemitórax e os linfonodos comprometidos são os mediastinais, supraclaviculares ipsilaterais hilares contralaterais. Tumor que apresenta derrame pleural ipsilateral, envolvimento de nervo laringo esquerdo, obstrução de veia cava superior.

- Doença extensa: doença avançada localmente e à distância, incluindo envolvimento de pericárdio e parênquima bilateral.

O estadiamento dos carcinomas não pequenas células é um fator de prognóstico independente e importantíssimo. Na medida em que progredimos no estadiamento, menor será a sobrevida global em cinco anos, dados estes mostrados na tabela 1.3. Para os tumores de pequenas células esta afirmação também é válida, no sentido que a sobrevida dos pacientes com doença localizada é maior que àqueles com doença extensa (UEHARA,1998).

Dados do IDT/HUCFF, mostram em uma amostra de 1664 registros de carcinoma de pulmão a seguinte distribuição nos estádios do câncer de Pulmão IA (3,8%); IB (17,5%) IIA (0,6%) IIB (7,6%) IIIA(7,3%) IIIB(25%) IV(37,9%) .

No carcinoma de pequenas células em (15% de 1664) há 60% doença extensa e 40% limitada.

Estágio	T	N	M	Sv 5a %
0	is	-	-	80-100
IA	1	0	0	60-80
IB	2	0	0	60-80
IIA	1	1	0	25-40
IIB	2	1	0	25-40
	3	0	0	10-30
IIIA	3	1	0	10-30
	1-3	2	0	10
IIIB	4	1-3	0	-
	1-4	3	0	<5
IV	1-4	0-3	1	<5

MOUNTAIN,1997

**Tabela 1.3: Sobrevida global em cinco anos nos vários estadiamentos do câncer de pulmão de não pequenas células.**

### ***1.1.4 Tratamentos no Câncer de Pulmão***

Como já foi dito, o câncer de pulmão é um dos tipos de câncer que mais leva o paciente à morte. Cerca de 15% ou menos dos pacientes diagnosticados têm a taxa de sobrevida em cinco anos a partir do diagnóstico da doença. As razões relacionadas a esse baixo índice de sobrevida são a identificação e diagnósticos tardios da doença, a propensão a metástases e a incapacidade das terapias sistêmicas em curar pacientes com doença metastática.

O tratamento de escolha para o câncer de pulmão é a ressecção cirúrgica, porque é a modalidade que oferece a maior chance de cura. No entanto, na maioria dos casos, o diagnóstico é feito tardiamente e o tumor já avançou além dos limites de ressecabilidade o que inviabiliza a intervenção cirúrgica. Assim, as outras formas de tratamento tornam-se de grande importância para a diminuição da morbidade e prolongamento da sobrevida (RUCKDESCHEL,2004; UEHARA,1998).

A radioterapia é uma outra terapia utilizada para doença localizada ou disseminada e é indicada para pacientes sem condições clínicas ou cirúrgicas para a ressecção do tumor primário (RUCKDESCHEL,2004).

O tratamento quimioterápico sistêmico é o mais comum e é responsável por uma redução de 26 – 32% no risco de morte em pacientes de CPNPC nos estágios avançados (III/IV). A quimioterapia reduz os sintomas clínicos relacionados ao câncer de pulmão, tais como dor torácica, tosse, dispnéia, derrame pleural, dentre outros. A quimioterapia sistêmica mais utilizada consiste na combinação de duas drogas, dentre elas a platina.

O IDT/HUCFF utiliza nas situações de adjuvância, cito redução e palição, nos CPNPC o esquema EP platina – etoposide nas doses de 80mg/m<sup>2</sup> e 100 mg/m<sup>2</sup>, 3 dias ciclos de 21 dias, como primeira linha. Nos CPPC, doença limitada ou extensa, o mesmo tratamento é empregado. A taxa global de cura no IDT/ HUCFF é de 5,4% (MORA,2004)

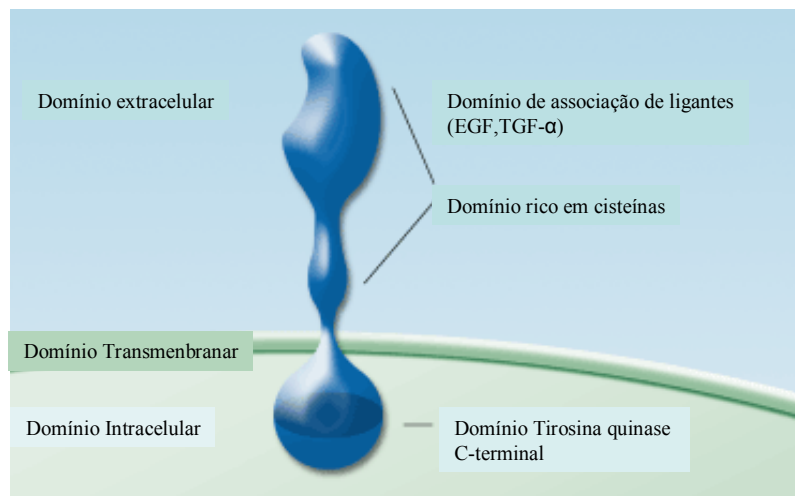
A quimioterapia apresenta uma série de limitações citotóxicas, como a ação não específica em células normais e os efeitos no paciente como náusea, vômito, perda de cabelo, fadiga, retenção de fluidos, toxicidade hematológica, este último acarretando riscos a vida do paciente. Essa ação tóxica resulta em ajustes no tratamento como por exemplo, redução da dose e interrupção da medicação, o que muitas vezes favorece o desenvolvimento, por parte das células tumorais, de resistência a múltiplas drogas.

Diante de uma série de restrições ao tratamento quimioterápico percebe-se a necessidade de novas terapias, com mecanismos de ação mais eficazes, menos tóxicos e convenientes aos pacientes. Os principais estudos são em torno de agentes inibidores específicos de moléculas relacionadas a vias de sinalização intracelular envolvidos na angiogênese, metástase e apoptose (DY,2002; FERREIRA,2002). Esses agentes inibem moléculas associadas aos tumores incluindo metaloproteinases de matriz, farnesiltransferase, e algumas proteínas quinases. As abordagens terapêuticas para inibir essas moléculas incluem desenvolvimento de anticorpos, moléculas inibidoras de tirosinas quinases, oligonucleotídeos antisense e vacinas (DY,2002; FERREIRA,2002). Há também o desenvolvimento de drogas, como inibidores de histona desacetilase que regulam a transcrição de genes como p21 e p53 (GUI,2004).

### ***1.2 – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)***

Em organismos multicelulares a comunicação entre células é requerida para a regulação de processos biológicos complexos, tais como crescimento, diferenciação, motilidade ou morte. Receptores do tipo tirosina quinase, que são mediadores primários de sinais extracelulares que levam a esses processos, constituem proteínas transmembranares localizadas na superfície das células que detectam a presença de pelo menos 12 diferentes ligantes, entre os quais o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento transformador ( $TGF \alpha$ )

(HACKEL,1999; HARRIS,2003). O receptor do fator de crescimento epidérmico é uma glicoproteína composta de três grandes domínios: um domínio extracelular rico em cisteínas no qual se associam os ligantes (EGF, TGF $\alpha$ ); um domínio transmembranar e o domínio intracelular, que apresenta atividade catalítica tirosina quinase e mais um sítio de autofosforilação (JORISSEN,2003) (Figura 1.1). O EGFR (ErbB1) pertence a família de receptores tirosina quinase que incluem HER2/*neu* (ErbB2), HER3 (ErbB3), e HER4 (ErbB4).

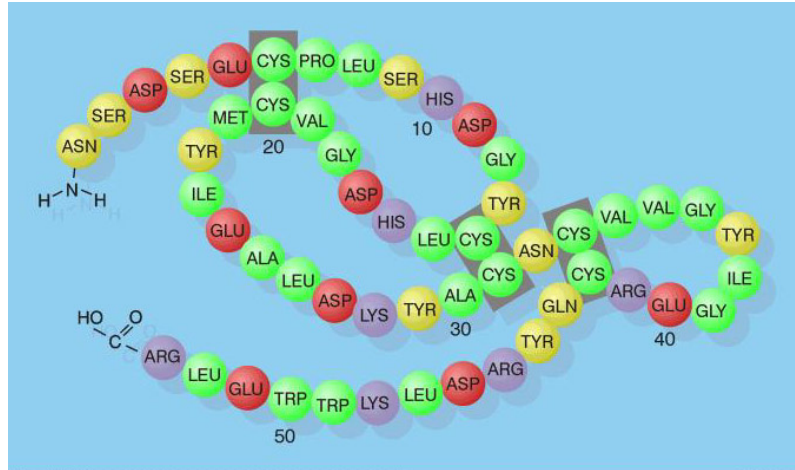


[www.merck.com](http://www.merck.com) (modificado)

**Figura 1.1: Representação esquemática da proteína EGFR.**

Sua estrutura é composta de três grandes domínios: um domínio extracelular no qual se associam os ligantes (EGF, TGF- $\alpha$ ); um domínio transmembranar e o domínio intracelular, contendo atividade catalítica tirosina quinase e um sítio de autofosforilação.

O EGF é um fator com importante função na regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular. O EGF humano é uma proteína de 6045 Da com 53 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto intramoleculares. Sua estrutura primária está representada na figura 1.2.



[www.ust.hk/roundtable/hi-tech.series/](http://www.ust.hk/roundtable/hi-tech.series/)

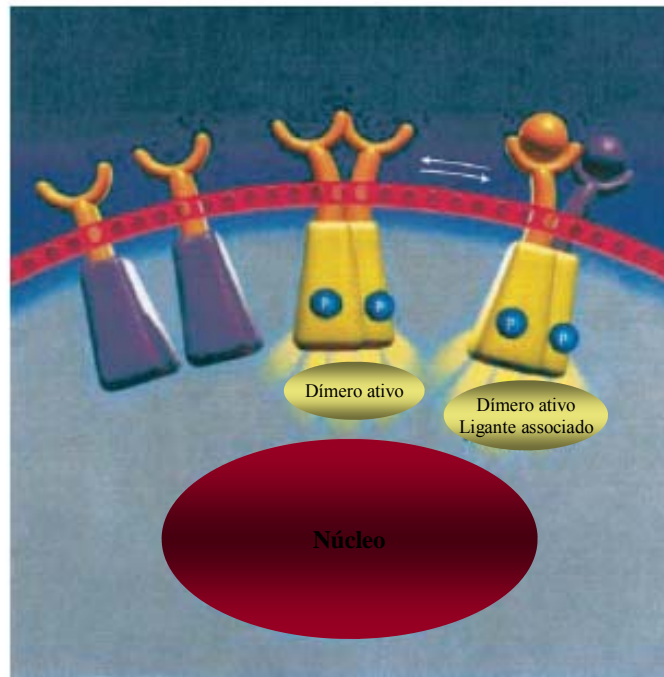
**Figura 1.2:** Estrutura primária do EGF – 53 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto.

O gene EGFR possui cerca de 200 kb e 28 exons e localiza-se no cromossomo 7p11.2. A proteína EGFR possui 1186 resíduos de aminoácidos, e em função da glicosilação, exibe uma massa de 170 kDa (JORISSEN,2003). A associação com ligantes como o EGF ao receptor produz um grande aumento de sua atividade intrínseca de tirosina quinase. Em um primeiro momento, a atividade tirosina quinase do EGFR leva a uma autofosforilação em resíduos de tirosina deste receptor em seu sítio de ligação de ATP, localizado no domínio C-terminal da molécula de EGFR. O EGFR também interage com os homólogos ErbB2 e ErbB4 formando hetero-dímeros, uma etapa importante no processo de ativação que leva ao aumento de sua atividade tirosina quinase (Figura 1.3). Embora o mecanismo de ativação deste receptor ainda não esteja inteiramente compreendido, sabe-se que em função da ligação de EGF ao receptor ocorre autofosforilação e transfosforilação resultando no recrutamento de outros efetores que ativam vários elementos nucleares (CARPENTER,2003). Após a proteólise e internalização do domínio intracelular da molécula de EGFR, a região da molécula que contém os domínios fosforilados migra para o núcleo, onde deflagra toda uma cascata de eventos que culmina na ativação de componentes da via Ras/MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) presentes no núcleo, Protein Kinase B (AKt) e Jnk (EL-RAYES,2004). Desse modo, os sinais



extracelulares transmitem ao núcleo informações que governam diretamente o ciclo celular, a proliferação, a sobrevivência das células (inibição de apoptose), a diferenciação celular e o metabolismo.

A perda de controle destes processos celulares vitais é parte importante do processo de oncogênese.



Clinical Cancer Research Vol. 9, 5813–5824, December 1, 2003 (modificado)

**Figura 1.3: Formação de Homodímeros e Heterodímeros no EGFR humano**

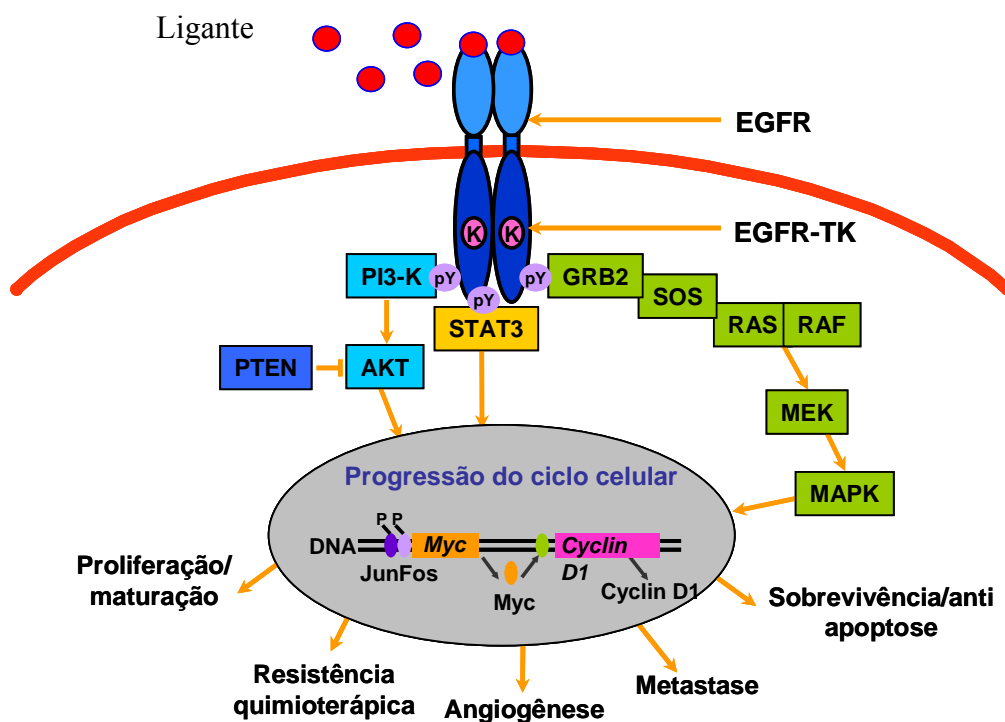
### ***1.2.1 EGFR : um alvo molecular em tumores sólidos***

Múltiplos caminhos de transdução de sinal são iniciados pela autofosforilação do EGFR, dentre eles a cascata de sinalização RAS-MAPK, a qual é utilizada por fatores de crescimento como o EGF e o TGF para induzir a transcrição e promover diversas respostas celulares. (PRENZEL,2001;KIM,1999).

A proliferação celular em consequência da ativação de EGFR pode ocorrer através de diversos caminhos de transdução de sinal; entretanto, os sinais de proliferação são mediados fortemente pela via de MAPK. Após a ativação do complexo EGFR, segue-se a

autofosforilação do receptor e a ativação sequencial de Ras, de Raf, de MAP/Erk (MEK1) kinases, levando ao aumento de fatores de transcrição, tais como Elk1 e c-fos, moléculas chaves que iniciam a proliferação celular e ativam a progressão do ciclo celular (PRENZEL,2001).

Outros caminhos de sinalização do EGFR são mediados por fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K), que ativa Akt, uma importante molécula sinalizadora dos caminhos antiapoptóticos. Akt também regula a atividade de Ras-MAPK que é importante para a proliferação celular, e os caminhos mediados pelo transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT), conforme mostrado na figura 1.4 (PRENZEL,2001). Os caminhos envolvidos na transdução de sinal do EGFR constituem um interessante alvo anticâncer e também para o desenvolvimento de drogas que atuem especificamente no EGFR.



Adaptado de Baselga J. New Technologies in Epidermal Growth Factor Receptor Targeted cancer therapy. Signal 2000; 1:12-21

**Figura 1.4: Cascata de Sinalização intracelular gerada pela ativação de EGFR.**

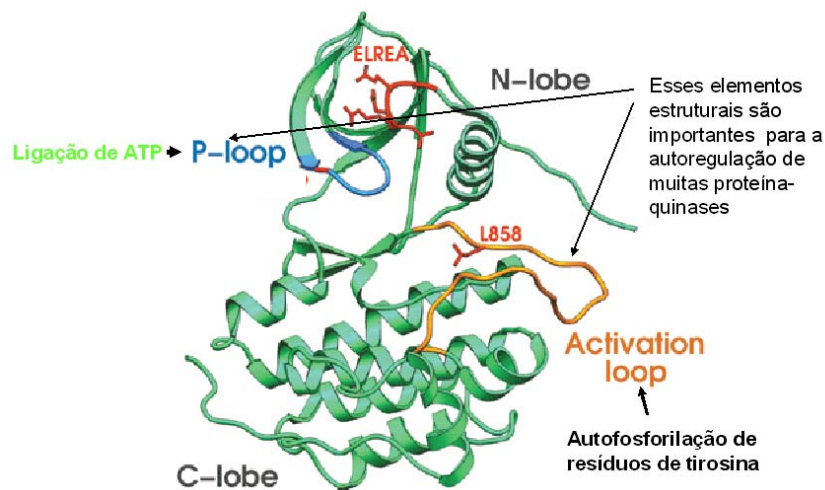
### ***1.2.2 Mutações no gene EGFR: Implicações para o Biologia Tumoral e Tratamento***

Como observado na figura 1.4 a ativação de EGFR pode estar associada com eventos de progressão tumoral como proliferação celular, angiogênese e metástase. A expressão protéica aumentada de EGFR tem sido associada a uma alta porcentagem de tumores como pulmão, mama, cólon, próstata, cabeça, pescoço, esôfago e cérvix. Em CPNPC, o EGFR apresenta-se de 43% a 89% mais expresso, sendo este aumento de 70% em carcinoma escamoso e 50% em adenocarcinoma (KIM,1999).

No entanto, outros mecanismos celulares, além da alta expressão de EGFR, podem influenciar na atividade deste receptor em células tumorais (ARTEAGA,2002). Por exemplo, alguns tumores apresentam mutações no gene EGFR que resultam na expressão de proteínas de EGFR com a atividade tirosina quinase constitutivamente ativa ou em defeitos nos mecanismos de inativação (por exemplo, sensibilidade a fosfatases, endocitoses e degradação do receptor). Um dos mutantes de EGFR mais comum é o EGFRvIII que não possui um domínio de associação do ligante externo e representa sua atividade tirosina quinase constitutivamente ativa (WELLS,2000; PEDERSEN,2001). Esse mutante foi encontrado em tumores de cérebro, mama e próstata e não foi localizado em células normais e está relacionado com um fenótipo mais agressivo do tumor (RAYMOND,2000; PEDERSEN,2001).

Nos últimos anos uma série de agentes terapêuticos vêm sendo desenvolvidos de forma a atuar especificamente na regulação da atividade do EGFR. Dentre eles há uma série de anticorpos monoclonais (mAbs) que bloqueiam a associação do ligante ao domínio extracelular do EGFR e também o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras (TKIs) que competem com o ATP para a ligação ao domínio tirosina quinase intracelular do EGFR, não permitindo que este funcione.

Trabalhos recentes mostraram que algumas mutações no domínio tirosina quinase do EGFR estão associadas com a sensibilidade de CPCNP à droga inibidora de tirosina quinase Gefitinib® (Iressa). O efeito desse composto, tanto em células em cultura como em pacientes com CPNPC que não respondem aos tradicionais compostos de platina, é bloquear o crescimento das células transformadas. Os EGFRs contendo algumas dessas mutações caracterizam-se por possuírem um maior período de estado ativado, a partir do momento que são estimulados pela associação de um ligante, como o EGF (LYNCH,2004). Essas mutações, que em geral possuem uma natureza heterozigótica, são encontradas em diferentes tumores o que sugere um ganho de função específico e localizam-se agrupadas próximas ao sítio de ligação do ATP, no domínio tirosina quinase (LYNCH,2004). Na Figura 1.5, estão esquematizadas as duas mais abundantes mutações encontradas em biópsias tumorais de pacientes com câncer de pulmão, em um estudo de revisão envolvendo 3023 pacientes (CHAN,2006).

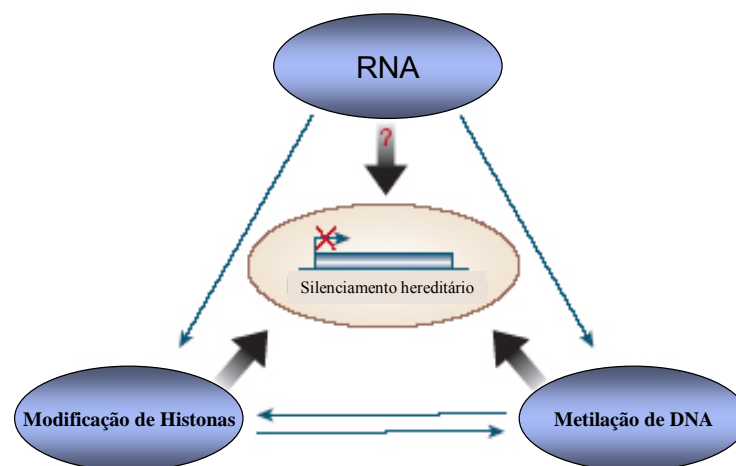


Fonte: Nikola Pavletich, Structural Biology Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer (modificado)

**Figura 1.5: Representação esquemática de mutações presentes no domínio tirosina quinase do EGFR.** Em vermelho estão representadas duas mutações (ELREA, e L858R) relacionadas a maior sensibilidade aos inibidores de tirosina quinase.

### 1.3 – Alterações epigenéticas e Câncer

Na regulação do ciclo celular, além da ativação/supressão do conjunto de fatores de transcrição que participam da cascata iniciada pelo EGFR, existem também modificações ao nível da cromatina, também chamadas alterações epigenéticas. Estas consistem em mudanças hereditárias na expressão gênica ocorridas sem alterações na seqüência do DNA. Por exemplo, a metilação de DNA, silenciamento de RNA e modificação de histonas, (metilação, acetilação e fosforilação) são mecanismos utilizados no silenciamento epigenético (EGGER,2004; BOWMAN,2006). Embora diferentes esses mecanismos interagem entre si e estabilizam-se e, em consequência disso, a ruptura de um ou outro leva a expressão e silenciamento inapropriados de genes. Podemos dizer que as modificações epigenéticas são centrais para a regulação da expressão gênica, replicação de DNA e estabilidade genômica. (EGGER,2004; JAENISCH,2003 – figura 1.6)



*Nature* 429, 457–463 (2004) modificado

**Figura 1.6: Esquema representativo da interação entre RNA, modificações de histonas e metilação de DNA no silenciamento da transcrição gênica.**

### ***1.3.1 Modificações de Histonas em Câncer: a função das histonas desacetilases.***

A subunidade fundamental de compactação da cromatina, o nucleossomo, é composta por um octâmero de quatro histonas, ou seja, um tetrâmero H3/H4 e dois dímeros H2A/H2B envolvidos por um fragmento de DNA dupla-hélice de 146 pares de base (Figura 1.7A). Essa estrutura da cromatina é reconhecida como um importante fator na regulação da expressão gênica, pois para que haja a ativação da transcrição de um determinado gene, é necessário uma modificação na estrutura do nucleossomo que permita o acesso de proteínas ligantes de DNA (DE RUIJTER,2003). Essas modificações gerais, também denominadas de remodelagem da cromatina, podem ser uma consequência da acetilação de resíduos conservados de lisina, na porção N-terminal das histonas, que acarreta uma perda de cargas positivas, reduzindo assim, a afinidade entre histonas e o DNA e conseqüentemente desenovelando este, que permite o acesso da RNA polimerase e fatores de transcrição.

O nível de acetilação das histonas é resultado de um balanço entre as atividades contrárias de histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC). Em geral, o aumento no nível da acetilação de histonas é associado com o aumento da atividade transcricional, ao passo que, um decréscimo no nível de acetilação é associado com a repressão da expressão gênica. Um balanço entre as funções de HAT e HDACs é essencial para o crescimento normal de células.

Há três grandes classes de HDACs: Classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), Classe II (HDACs 4, 5, 6 e 7) e Classe III (proteínas da família Sir2 dependentes de  $\text{NAD}^+$ ). As HDACs de classe I localizam-se no núcleo e as de classe II trafegam para dentro e fora do núcleo. Seus mecanismos de ação envolvem a remoção do grupo acetil de histonas, comprimindo o nucleossomo. Uma hipoacetilação resulta no decréscimo do espaço entre o nucleossomo e o DNA que o envolve (Figura 1.7B). As HDACs têm sido intensivamente estudadas por

estarem mecanisticamente associadas a um desequilíbrio de acetilações e desacetilações relacionados a patogênese do câncer e outras doenças. Genes que codificam enzimas HAT (p300, PCAF e CBP) assim como HDACs são muito mais expressos em diversos tumores, sejam eles hematológicos ou epiteliais. A leucemia promielocítica, por exemplo, é caracterizada por uma parada das células leucêmicas na fase de diferenciação. Isto é ocasionado pela fusão de proteínas com receptores de ácido retinóico que associam-se a complexos de HDAC e levam ao silenciamento transcricional (MINUCCI,2001).

Já em tumores sólidos, experimentos com linhagens de câncer gástrico mostram que o nível de expressão de HDACs está relacionado com o nível de expressão de genes ligados ao câncer, dentre eles genes reguladores do ciclo celular como p21 e p53 (TOH,2004). Em câncer de pulmão, um estudo com 102 biópsias de CPNPC, mostrou que a expressão protéica e de RNA mensageiro de HDAC1 estava aumentada em pacientes nos estádios III e IV da doença em comparação com os estádios I e II. A expressão de mRNA foi diferente entre amostras tumorais e o tecido normal adjacente ao tumor. Uma correlação com o prognóstico da doença também foi realizada indicando que uma baixa expressão de HDACs de classe II estava relacionada a um prognóstico ruim após a cirurgia (SASAKI,2004; OSADA,2004 ).

Esses resultados nos mostram um potencial papel das HDACs na patogênese do câncer. Além disso há uma série de pequenas moléculas, os inibidores de HDAC (HDACi), que interferem na atividade das HDACs e estão relacionados a eventos de regulação do ciclo celular e indução de apoptose através da reversão da repressão de genes tais como *P21*, p53 e BAX (MINUCCI,2006; DE RUIJTER,2003– figura 1.8).

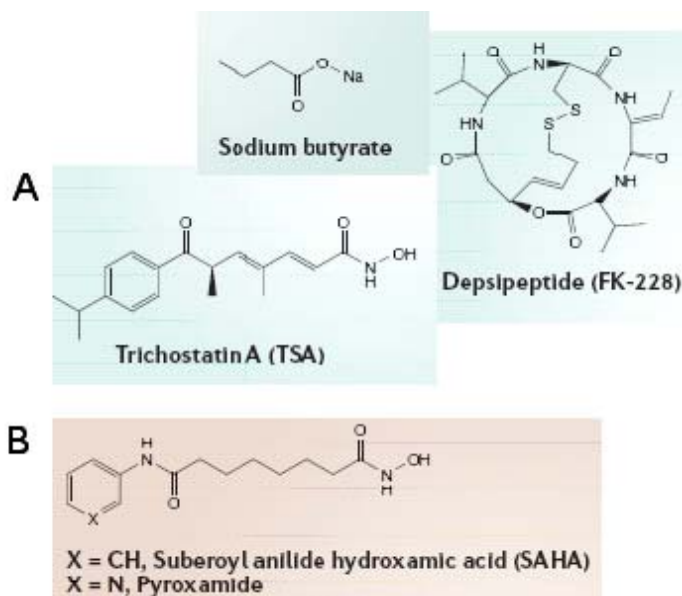




### ***1.3.2 Inibidores de Histona desacetilases (HDACi)***

Os HDACis são compostos que se ligam no domínio catalítico das HDACs e são capazes de inibir a atividade de HDACs de classe I, II e IV. Podem ser de origem natural como FK-228, Tricostatina A (TSA) e Butirato de sódio sendo extraídos, por exemplo, a partir do intestino grosso humano (como é o caso do butirato de sódio) ou podem ser sinteticamente produzidos como os HDACis SAHA e MS-227. Os inibidores são subdivididos em quatro grupos: hidroxamatos, ácidos alifáticos, peptídios cíclicos e benzamidas (MINUCCI,2006; DOKMANOVIC,2005 – Figura 1.9). Membros de cada uma dessas classes têm sido empregados em ensaios clínicos humanos (KOURAKLIS,2006).

O mecanismo de ação dos HDACi ainda não está muito claro, mas sabe-se que eles induzem parada no crescimento celular, diferenciação e apoptose *in vitro* e *in vivo*. Em alguns casos, a parada no crescimento celular acontece em resposta a baixas doses de HDACi; já a apoptose somente ocorre em altas doses; em outros casos a parada no crescimento antecede a apoptose. No entanto, as células normais mostram-se mais resistentes a HDACi que células tumorais (JOHNSTONE,2002). Cerca de 20% de todos os genes conhecidos são afetados por HDACi, mas nem todos possuem a sua expressão aumentada com o tratamento (GLASER,2003).



Adaptado de Minucci S, et al *Nat. Rev. Cancer* 2006; **6**: 38–51

**Figura 1.9: Estrutura representativa de principais inibidores de histona desacetilase.** (A) HDACis de origem natural; (B) HDACis de origem sintética.

### 1.3.3 Butirato de sódio – um possível agente terapico para o câncer de pulmão

O butirato de sódio é um ácido graxo de cadeia curta que ocorre naturalmente no cólon intestinal, como resultado da fermentação de carboidratos e fibras (ROYALL,1990). O butirato de sódio é conhecido como um agente que induz diferenciação celular e, nos últimos anos, uma série de trabalhos tem mostrado o seu potencial em inibir o crescimento celular, regular a expressão gênica e induzir diferenciação em diversas linhagens celulares tumorais (PRASAD,1980).

O tratamento com butirato de sódio da linhagem A549 de CPNPC mostra uma hiperacetilação global de histonas, descondensação de cromatina e intensa acetilação nas margens do núcleo; esses mesmos efeitos são observados nas linhagens H69, de CPPC tratadas com TSA, indicando assim efeitos biológicos de HDACi em linhagens de câncer de pulmão (BARTOVA,2005).

Em linhagens de CPNPC, o tratamento com FK228, um inibidor de histona desacetilase, inibiu o crescimento celular, induziu apoptose e alterou os caminhos de sinalização mediados por AKt (KODANI,2005). Em outros estudos, a TSA reduziu a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2, aumentou a expressão da proteína pro-apoptótica BAX e aumentou a expressão do mRNA da ciclooxigenase 2 (COX 2) (CHOI,2005).

Esses resultados mostram a importância do estudo de HDACi em processos relacionados ao desenvolvimento do câncer de pulmão. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses inibidores; sendo necessário um estudo mais específico do efeito de cada um dos HDACi.

## **2 – OBJETIVOS**

**2.1 - Geral:** Determinar a correlação entre a estrutura de EGFR e o efeito de inibidores da desacetilação de histonas em vários parâmetros relevantes à proliferação celular de câncer de pulmão não pequenas células.

### **2.2 – Específicos**

#### **PARTE I**

4.1 Determinar em biópsias de pacientes com câncer de pulmão a presença de mutações no gene EGFR, com ênfase nos exons 18-21;

#### **PARTE II**

4.2 Determinar os efeitos de butirato de sódio na proliferação celular usando linhagens de câncer de pulmão de não-pequenas células (A549 e H460) e fibroblastos normais de pulmão (IMR-90);

4.3 Pesquisar o efeito do butirato de sódio na estabilidade da p53, analisando sua expressão protéica e seus níveis de expressão de mRNA;

4.4 Verificar a expressão de RNA mensageiro do EGFR nas linhagens celulares A549, H460 e IMR-90, tratadas ou não com butirato de sódio;

4.5 Verificar o efeito do butirato de sódio na morfologia das linhagens A549, H460 e IMR-90 e na organização de proteínas do citoesqueleto;

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### ***3.1 Seleção de Pacientes***

Foram selecionados, de forma retrospectiva, 48 pacientes através dos arquivos do Instituto de Doenças do Tórax (IDT) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ) em um período de cinco anos (2000-2005). A seleção dos pacientes foi realizada com base em informações clínicas da apresentação inicial da doença, tipo histológico de câncer de pulmão, estadiamento da doença, data do diagnóstico, sexo e carga tabágica. A obtenção do material da biópsia obedeceu a todos os requisitos estipulados pelo Conselho Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP).

#### ***3.2 Diagnóstico Clínico Histopatológico***

Após a seleção de pacientes, buscava-se no Serviço de Patologia do HUCFF as lâminas contendo os cortes histológicos dos blocos de parafina com a biópsia tumoral fixada. Essas lâminas, em geral, são coradas com hematoxilina e eosina para o diagnóstico de rotina. Identificadas as lâminas, fazia-se uma análise criteriosa junto com o Patologista responsável, para confirmar o diagnóstico presente nas fichas dos pacientes e identificar os blocos com uma quantidade de tecido tumoral suficiente (>70 %) para a posterior extração de DNA genômico.

#### ***3.3 Extração de DNA Genômico***

Para a extração de DNA genômico das biópsias de tumor sólido fixados em bloco de parafina foram feitos cortes de 10µm cada, utilizando um micrótomo. Visando evitar a contaminação entre um corte e outro, a lâmina do micrótomo foi limpa com xileno e álcool 70 % a cada bloco, assim como as pinças utilizadas no procedimento. Em seguida, 2 cortes de 10µm eram

colocados em tubos eppendorfs estéreis e mantidos a temperatura de 4° C até o momento da extração.

Para a extração de DNA genômico foi realizado inicialmente um procedimento para remoção da parafina dos cortes de tecidos. Para isso, foi adicionado 1 mL de xileno aos cortes de tecido e realizada a mistura por inversão durante 30 segundos. Em seguida as amostras eram incubadas em um banho-maria por 5 minutos a 50° C. Após a incubação, as amostras eram centrifugadas a 16000 g por 5 min a temperatura ambiente. Esse procedimento era repetido por 2 vezes até a retirada completa do xileno. Em seguida, era adicionado 1mL de etanol 100%, repetia-se o procedimento anterior e fazia-se uma nova lavagem com etanol 70 %. O etanol foi então removido por aspiração, com cuidado para não perturbar o precipitado e procedia-se com a secagem das amostras a uma temperatura de 37° C. Obtida a massa tecidual seguia-se a extração de DNA utilizando o DNA Tissue Kit (QUIAGEN) seguindo instruções do fabricante.

### ***3.4 Eletroforese do DNA genômico***

Os resultados da extração e a integridade do DNA foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada com o tampão TAE 1 X (Tris-base, EDTA 0,5 M pH 8,0, Acido acético glacial) a 80Volts.

### ***3.5 Reação em Cadeia da Polimerase: Amplificação dos exons 18 a 21 do gene EGFR***

Para a análise de possíveis mutações presentes no gene EGFR dos pacientes em estudo, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores correspondentes aos exons 18 a 21, os quais representam o domínio tirosina kinase de EGFR. Foram desenhados também iniciadores, usando a técnica ASPCR (Allele-specific Polimerase Chain Reaction) para a mutação E746-

A750, presente no exon 19 e para a substituição L858R do exon 21. Essas mutações destacam-se por serem mais freqüentes em pacientes com câncer de pulmão (CHAN,2006). Todos os iniciadores foram desenhados a partir da seqüência genômica do EGFR depositada no GenBank (N° de acesso NT\_079592). Para a PCR, as reações eram de 25µl contendo 100-500 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada iniciador, 0,2mM de dNTPs (Invitrogen), 1U de Taq polimerase (PhNeutria) e 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. O programa de PCR consistia em uma desnaturação a 95° C por 3 min; seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 min; anelamento dos iniciadores a 55° C por 1 min (a temperatura de anelamento foi ajustada para cada par de iniciadores); extensão a 72° C por 1 min; seguida de 1 ciclo de extensão final a 72° C por 7 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp (Applied Biosystems) disponível no laboratório. As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se nas tabelas 3.1 e 3.2.

Nome dos iniciadores	Seqüência utilizada	amplicom
Exon18 18F 18R	5'GGCTGAGGTGACCCTTGTCTC 3' 5'CCCCACCAGACCATGAG 3'	220bp
Exon19 19F 19R	5'GGTGCATCGCTGGTAACATCC 3' 5'TGGGCCTGAGGTTTCAGA 3'	246 bp
Exon 20 20F 20R	5'AAGCCACACTGACGTGCCTCT 3' 5'GCGCAGACCGCATGTGAGGAT 3'	285 bp
Exon 21 21F 21R	5'CTTCTTCCCATGATGATCTGT 3' 5'CCCTGCATGTGTAAACAATA 3'	297 bp

**Tabela 3.1: Seqüência dos iniciadores para amplificação do domínio tirosina quinase do gene EGFR de tecidos incluídos em parafina.**

Nome dos iniciadores	Seqüência utilizada	Amplicon
Exon 19- Dele746-A750		
19F_selvagem	5' TATCAAGGAATTAAGAGAAGC 3'	190bp
19F_mutante	5'TAAAATTCCCGTCGCTATCAAAACA3'	190bp
19R	5'AGGGAAAGACATAGAAAGTGA 3'	
Exon 21- SubstituiçãoL858R		
21F_selvagem	5'AGATCACAGATTTTGGGCT 3'	200bp
21F_mutante	5'AGATCACAGATTTTGGGCG 3'	200bp
21R	5'TGCTGCGAGCTCACCCAGAAT3'	

**Tabela 3.2: Seqüência dos iniciadores alelo-específico para amplificação das mutações presentes no domínio tirosina quinase do gene EGFR de tecidos incluídos em parafina.**

### *3.6 Eletroforese em gel de agarose do DNA amplificado*

Os produtos de PCR foram analisados por meio de uma corrida eletroforética a 120Volts, Tampão TAE 1 X, em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio. Foram misturados 10 µL de produtos da PCR em 2 µL de Loading Buffer 6 X (0,25% azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol FF, 30 % Glicerol). O marcador de peso molecular utilizado foi um padrão composto por múltiplos de 100 pares de base (Gene Ruler<sup>TM</sup> - Fermentas).

### *3.7 Purificação de material para sequenciamento*

Para a reação de sequenciamento automático, as amostras eram amplificadas em quintuplicata, sendo em seguida purificadas com o uso do kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA (Amersham Biosciences) segundo as instruções do fabricante.

### *3.8 Sequenciamento automático*

Após a purificação, as amostras eram submetidas ao sequenciamento automático da Macrogen inc. (Coréia do Sul) utilizando os iniciadores específicos para cada exon.



### ***3.9 Análise das seqüências obtidas***

A análise das seqüências, isto é, o alinhamento das seqüências obtidas a partir das amostras de DNA genômico dos pacientes com a seqüência de EGFR depositadas no GenBank, foi feita utilizando-se os programas Blast (National Center for Biotechnology Information - NCBI), Omiga, Gene Doc e Vector NTI Advance 10 (Invitrogen).

### ***3.10 Cultura de células***

As linhagens celulares de câncer de pulmão de não pequenas células A549 e H460 foram obtidas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) e informações detalhadas como origem e genótipos podem ser obtidas no website do American Type Culture Collection ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Ambas as linhagens não possuem mutações no gene EGFR, expressam p53 selvagem e K-RAS e H-RAS ativados. Para controle dos experimentos com relação aos efeitos citotóxicos do butirato de sódio, foi utilizada a linhagem IMR-90, uma linhagem de fibroblasto normal de pulmão. A549, H460 e IMR-90 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 contendo 10 % de soro fetal bovino (ambos da Cultilab) em placas de 100 x 20 mm na estufa a 37° C em atmosfera úmida de 96 % O<sub>2</sub> e 4 % de CO<sub>2</sub>. Todos os procedimentos do cultivo se realizaram em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), observando-se possíveis contaminações. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

Após a ocupação de cerca de 70 % da placa, era feita a passagem das células. Para este procedimento o meio de cultura era removido e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-salina sem cálcio e magnésio. Em seguida, as células eram separadas com 2 mL de solução Tripsina-EDTA 2,5 g/L (Cultilab) durante aproximadamente 5 minutos a 37° C. As células em suspensão eram transferidas para um tubo de centrifugação contendo meio

de cultura novo com soro fetal. Alíquotas da suspensão eram redistribuídas em novas placas de 100 x 20mm e levadas de volta para a estufa.

### ***3.11 Tratamento das Linhagens com Butirato de Sódio – medida da proliferação celular e Viabilidade Celular (MTT)***

As linhagens A549, H460 e IMR-90 foram cultivadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço). Após 24 horas, as células foram tratadas com três concentrações diferentes de butirato de sódio (1 mM, 3 mM ou 10 mM) diluído no meio, por 24, 48 e 72 horas. O meio de cultura das células tratadas e controle (sem Butirato de sódio) foi trocado a cada 24 horas. Para a medida da proliferação celular, a metodologia utilizada foi contagem do número total de células em cada tratamento. Para isso, o meio de cultura contido nas células era transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL, as células aderidas eram lavadas com PBS e soltas da placa com a adição de 100 $\mu$ L de tripsina e em seguida transferidas para o eppendorf contendo o meio anteriormente removido. O procedimento seguinte foi a contagem do número total de células utilizando a Câmara de Neubauer e o ensaio de MTT para a medida da viabilidade celular. As contagens de cada experimento foram realizadas em triplicata.

Para a medida da viabilidade das linhagens em cultura durante o tratamento com butirato de sódio as células foram incubadas durante 3 horas a 37 °C na presença de 1 mg/mL de MTT (3,4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-brometo de difenil tetrazolium - Sigma, St Louis, MO, USA), em uma placa de 96 poços. Após a incubação as células foram centrifugadas por 7 minutos a 300 g, o sobrenadante foi removido e 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido DMSO adicionado para a solubilização dos cristais de formazan. A medida da viabilidade foi feita medindo-se a absorbância a 490 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices corp.).

### ***3.12 Tratamento das Linhagens com butirato de sódio – alterações morfológicas do citoesqueleto***

Para verificar possíveis alterações morfológicas no citoesqueleto das linhagens A549, H460 e IMR-90 tratadas com butirato de sódio, as células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços e tratadas com 10 mM butirato de sódio por 24 e 48 horas. Após o tratamento as células foram fixadas com 3 % paraformaldeído por 15-30 minutos. Em seguida as células foram lavadas, três vezes, com PBS 1X e permeabilizadas por 1 minuto com 0,2 % Triton X-100 em 150 mM, NaCl e 50 mM Tris-Cl pH 7.6. Os passos seguintes foram três lavagens com PBS 1 X seguida pela incubação com fluoresceína-faloidina (1:100), e Iodeto de propídeo (1:10000) e DAPI (1:10000), por 15 minutos e diluídos em PBS 1X e 0,5% BSA. Em seguida as lamínulas foram montadas para análise ao Microscópio de fluorescência NIKON-7200.

A faloidina é uma toxina obtida a partir do fungo *Amanita phalloides*. Caracteriza-se por ser um heptapeptídeo bicíclico que se liga entre as subunidades F-actina polimerizadas, muito mais fortemente do que aos monômeros de actina. A faloidina é um importante marcador usado para quantificar e identificar f-actina em tecidos ou células fixados com formaldeído.

### ***3.13 Obtenção do Extrato Protéico Total das Células - SDS-PAGE e Western-blot***

Para os ensaios de Western blot as células foram cultivadas em placas de 40 x 11mm e tratadas por 06 e 24 horas com a concentração de 10mM de butirato de sódio. Após o tratamento, as células foram lavadas com 2 mL de PBS gelado e em seguida lisadas com tampão de lise (1 % NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 20 mM Tris pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 5 µg/mL antipainá, 5 µg/mL chymostatina, 5 µg/mL pepstatina A e 10 µg/mL leupeptina) no gelo por 15 minutos e em seguida o extrato foi transferido para tubos de 1.5 mL e centrifugados a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e as

proteínas foram quantificadas utilizando o reagente Bio-Rad protein Assay (Biorad), segundo instruções do fabricante.

Aproximadamente 25-50 µg de proteínas de cada amostra foram desnaturadas por fervura na presença de tampão de amostra (50 mM Tris pH 6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % AzuL de Bromofenol, 10 % glicerol) e separadas em gel de SDS-PAGE 10 % utilizando tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris, 250 mM Glicina pH 8.3, 0.1 % SDS). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Para isso o gel foi incubado no tampão de transferência por 5 minutos e em seguida colocado sobre três camadas de papel de filtro banhados em tampão de transferência (39 mM Glicina, 48 mM Tris base, 0.037 % SDS, 20 % Metanol). A nitrocelulose, também banhada no tampão de transferência é colocada sobre o gel e sobre ela são colocados mais três camadas de papel de filtro umedecidos no mesmo tampão. Em seguida este “sanduíche” é colocado entre esponjas cobertas com o mesmo tampão e uma corrente elétrica de 100 V é aplicada por 1 hora de forma que as proteínas (negativamente carregadas) migram para o pólo positivo e são assim transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose (o sistema de transferência da BioRad foi utilizado). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com tampão PBS/0.1% Tween, 5 % leite desnatado, por 60 minutos. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal mouse anti-human p53 (DAKO). O anticorpo foi utilizado na diluição 1:1000. Após três lavagens de 5 minutos com PBS/0.1% Tween as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse), conjugado a peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Após 5 lavagens de 5-10 minutos, as membranas foram reveladas utilizando o kit de quimioluminescência ECL (Amersham) seguindo instruções do fabricante e em seguida expostas a filme de raio-X por 30 minutos.

### ***3.14 Extração de RNA das células tratadas***

Para a medida da expressão dos genes EGFR e p53,  $2 \times 10^5$  células das linhagens A549 e H460 foram cultivadas em placas de 35x10mm e tratadas com 3 mM ou 10 mM butirato de sódio por 24, 48 e 72 horas. As células foram observadas diariamente e o meio, contendo butirato de sódio diluído ou não, foi trocado a cada 24 horas. Em seguida, o RNA total das células, foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A síntese de primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi feita, utilizando 2 $\mu$ g de RNA total, com o sistema SUPERSCRIT II (Invitrogen) segundo protocolo do fabricante. Reações controle sem a adição da enzima transcriptase reversa também foram realizadas.

### ***3.15 Medida da Expressão do Gene EGFR e p53 por PCR em tempo real***

O PCR utilizando o cDNA como molde, para a medida da expressão dos genes EGFR e p53 foi feito utilizando o sistema 7500 Real time PCR (Applied Biosystems). Para este procedimento, foi desenhado um par de iniciadores exon-exon para cada gene (tabela 3.3) com a finalidade de evitar amplificação devido a possíveis contaminações com DNA genômico. Os iniciadores foram desenhados de acordo com a seqüência do EGFR cujo número de acesso no GenBank é NT\_079592e de acordo com a seqüência do p53, número de acesso no GenBank é NT\_010718. A reação foi feita com 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de cada iniciador e uma quantidade padrão de cDNA, determinada a partir de uma curva de diluições. Todos os experimentos de análise de expressão por RT-PCR foram realizados na presença de controle negativo da reação, em que H<sub>2</sub>O estéril era adicionada no lugar do cDNA e foram feitos em duplicatas e repetidos 3 vezes em experimentos independentes. Para identificar os produtos de PCR específicos, após cada reação utilizando SYBR Green era realizada uma curva de desnaturação térmica do DNA de 65 a 95°C em uma taxa de 0,5°C a cada 10segundos. A reação somente era utilizada se um

único pico de desnaturação fosse observado (indicando a presença de um único produto de PCR). Como controle endógeno da reação foi utilizado o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (TaqMan, Assay by design - Applied Biosystems), o qual contém uma sonda específica para o gene em questão. Neste caso, a reação foi preparada com 1X TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1X “Assay by design” GAPDH e cDNA.

O ponto de cruzamento da linha de base (Ct) era então determinado para cada amostra como sendo o número de ciclos de amplificação em que a curva de crescimento exponencial da fluorescência das amostras era paralela e cruzava a linha de base de fluorescência definida pelo software (7500 system software, Applied Biosystems). Os valores de  $\Delta C_t$  eram obtidos pela subtração do Ct do controle endógeno (GAPDH) do valor de Ct experimental (EGFR ou P53) de cada amostra. Cada valor de  $\Delta C_t$  representa o valor médio das duplicatas.  $\Delta\Delta C_t$  era calculado então como a diferença entre o  $\Delta C_t$  entre as amostras e o normalizador escolhido (células não tratadas). A expressão relativa de cada gene com relação ao normalizador era então calculada utilizando-se a fórmula  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  (User Bulletin 2 - The Perkin-Elmer Corporation – 1997).

Nome do iniciador	Seqüência utilizada	Amplicon
Exon-exon 19F	5'GCGTTCGGCACGGTGTATAAG 3'	140bp
Exon-exon 19R	5'CTGGCCATCACGTAGGCTTCA 3'	
P53-F	5'ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC 3'	139bp
P53-R	5' TGT GCT GTG ACT GCT TGT AGA 3'	

**Tabela 3.3: Seqüência de iniciadores correspondentes ao exon 19 do gene EGFR e ao exon 5 do p53, utilizada para a medida da expressão do EGFR e p53 respectivamente nas linhagens A549 e H460 tratadas com butirato de sódio.** Na tabela, F corresponde a forward (senso) e R, reverse (anti-senso)

## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 Análise de mutações nos exons 18-21 do gene EGFR em uma população do Estado do Rio de Janeiro de indivíduos com câncer de pulmão – revisão clínica dos pacientes

O primeiro objetivo do nosso trabalho consistiu em mapear as mutações no domínio tirosina quinase, do gene EGFR, na população brasileira com câncer de pulmão. Para atingir este objetivo realizamos um levantamento clínico de 1652 pacientes, selecionando 48 destes pacientes para o nosso estudo. Os parâmetros utilizados para a escolha de pacientes estão descritos no item 3.1. e a tabela 4.1 mostra um perfil geral das informações clínicas dos pacientes analisados. Pela análise desta tabela, observamos que o estudo envolve pacientes de todos os tipos histológicos de câncer de pulmão e em diversos estádios da doença. Em geral, os pacientes são fumantes e com média de idade de 62 anos.

Pacientes	Sexo	Diagnóstico Histopatológico	Estadiamento	Fumante/Não-fumante
A1	M	ADENO	IV	Fumante
<b>A2</b>	<b>M</b>	<b>ADENO</b>	<b>IV</b>	<b>Não-fumante</b>
A3	M	ADENO	IV	Ex-fumante
A4	M	SQUAM	IV	Fumante
A5	M	CPPC	DE	Fumante
A6	F	CPPC	DE	Fumante
A7	F	BAC	IV	Não-fumante
A8	M	SQUAM	IV	Fumante
A9	M	ADENO	IV	Fumante
A10	M	ADENO	IB	Fumante
A11	M	CPPC	DL	Fumante
A12	F	ADENO	IB	Fumante
A13	F	ADENO	IV	Fumante
A14	M	SQUAM	IB	Não-fumante
A15	F	SQUAM	IB	Fumante
A16	M	ADENO	IA	Fumante
A17	M	GC	IA	Fumante
A18	M	ADENO	IIIB	Fumante

A19	M	ADENO	IB	Fumante
A20	F	BAC	IIB	Fumante
A21	M	ADENO	IV	Fumante
A22	F	ADENO	IIB	Fumante
A23	M	ADENO	IIB	Fumante
A24	M	SQUAM	IV	Ex-Fumante
A25	F	BAC	IB	Ex-fumante
A26	F	ADENO	IIIA	fumante
A27	M	ADENO	IV	fumante
A28	M	CPNPC	IV	Ex-fumante
A29	M	ADENO	IIB	fumante
A30	M	SQUAM	IV	fumante
A31	M	SQUAM	IB	fumante
A32	M	ADENO	IB	fumante
A33	M	CPPC	DL	fumante
A34	M	SQUAM	IV	Ex-fumante
A35	F	SQUAM	IB	fumante
A36	F	SQUAM	IV	fumante
A37	F	CPPC	DE	fumante
A38	F	BAC	IV	Não-fumante
A39	F	SQUAM	IIIA	Ex-fumante
A40	M	SQUAM	IV	fumante
A41	F	ADENO	IV	Não-fumante
A42	F	ADENO	IIIB	fumante
A43	M	ADENO	IV	Não-fumante
A44	F	BAC	IV	fumante
A45	M	SQUAM	IIIA	Ex-fumante
A46	F	SQUAM	IIB	Ex-fumante
A47	M	SQUAM	IV	fumante
A48	F	ADENO	IIIB	fumante

**Tabela 4.1: Informações clínicas dos pacientes estudados.** Na tabela as siglas dos diagnósticos histopatológicos são: CPNPC – Câncer de pulmão de não pequenas células (o diagnóstico não foi conclusivo); GC – Câncer de pulmão de grandes células; ADENO - Adenocarcinoma; SQUAM - Carcinoma Escamoso; BAC – Carcinoma Bronquioalveolar; CPPC – Câncer de pulmão de pequenas células. Em vermelho está destacado o paciente no qual identificamos a mutação no gene EGFR.

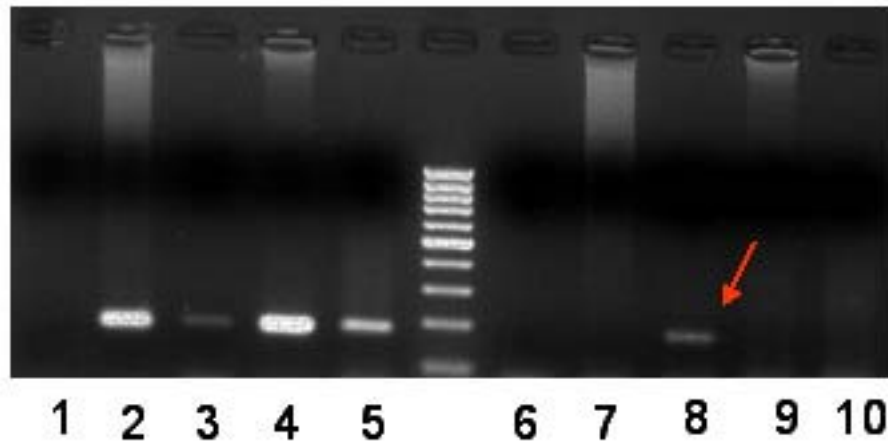


#### ***4.2 Mutações do gene EGFR – identificação da deleção E746-A750 do exon19, no domínio tirosina quinase do gene EGFR***

Devido ao grande número de amostras, para a identificação de possíveis mutações no domínio de tirosina quinase de EGFR, foi feita uma varredura inicial que consistia em ampliações por PCR para mutações nos exons 19 e 21, já descritas e mais frequentes, em outras populações estudadas (CHAN,2006).

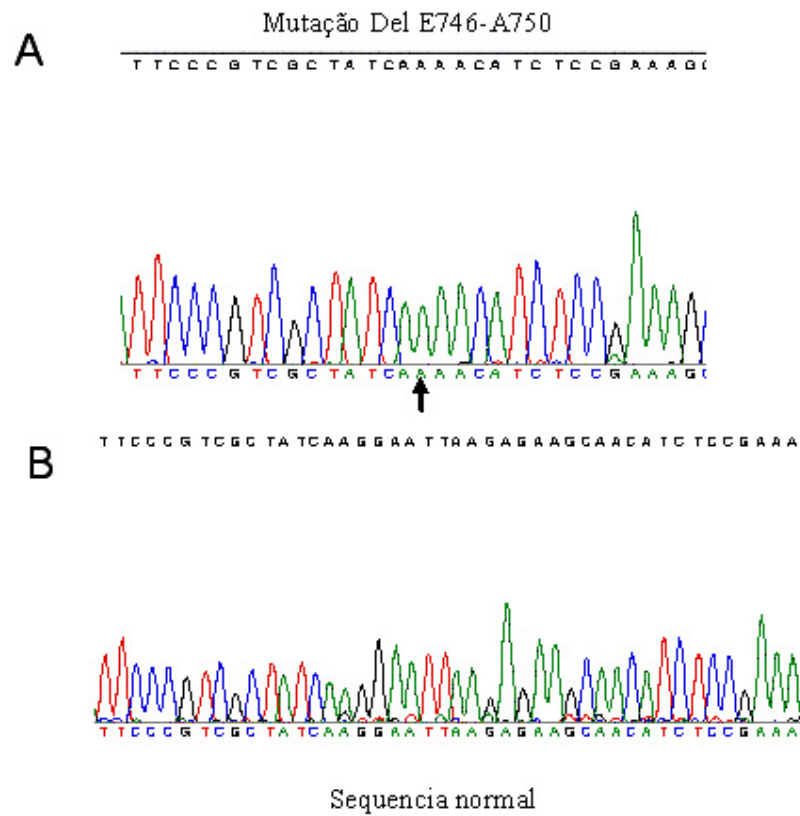
Em uma das 48 amostras analisadas (paciente destacado em vermelho na tabela 4.1) foi encontrada uma única mutação descrita anteriormente (PAEZ,2004). Essa mutação é do tipo homozigótica e consiste em uma deleção de 15 pares de base do exon 19, que corresponde a eliminação do motivo **ELREA** que é altamente conservado entre os EGFRs de vertebrados. A figura 4.1, mostra um gel de agarose no qual foram analisados os resultados de uma amplificação utilizando dois iniciadores distintos. A reação utilizando o iniciador 19F\_selvagem gera fragmentos de 190 bp em amostras normais, a seta vermelha indica o produto de amplificação de 190bp, esperado em caso de presença de mutação, quando o iniciador 19F\_mutante é utilizado. As linhas 2, 4 e 5, são produtos de amplificação de outros pacientes, nos quais a mutação no exon 19 não foi identificada. Isso pode ser confirmado pela ausência de bandas nas linhas 7, 9 e 10. A fraca banda na linha 3 provavelmente corresponde ao produto de amplificação normal da A2, o que nos leva a supor uma mistura de DNA proveniente de células normais e mutadas. Realizada essa varredura inicial, os amplicons obtidos a partir da reação com os oligonucleotídeos descritos na tabela 3.1 (que englobavam, inteiramente, os exons em estudo) foram seqüenciados para a confirmação da seqüência mutante. As figuras 4.2 e 4.3 mostram respectivamente, o eletroferograma obtido a partir da reação de sequenciamento e o alinhamento deste, realizado no programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) contra a seqüência do exon 19 do gene EGFR depositada no GenBank (Nº de acesso NT\_079592).

Na tabela 4.1 podemos observar que o paciente (A2) no qual identificamos a mutação no exon 19, era do sexo masculino, e abaixo da média de idade dos outros pacientes pertencentes ao estudo possuindo 45 anos no momento do diagnóstico; não fumante e foi diagnosticado com um adenocarcinoma de pulmão. O paciente estava no estágio avançado da doença (estádio IV) e apresentava pouca resposta à quimioterapia combinada convencional.

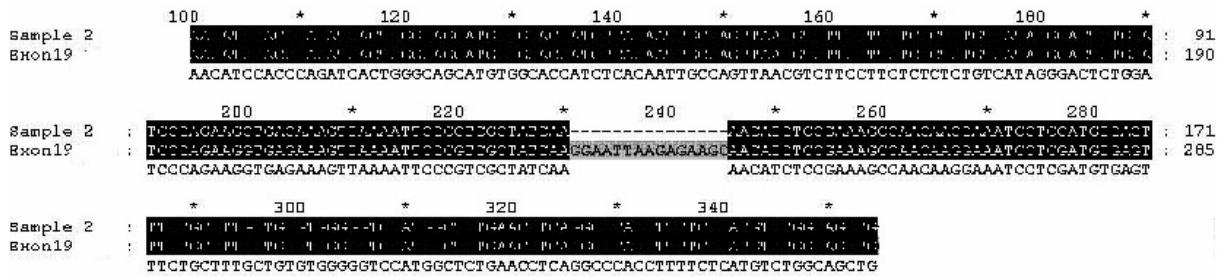


**Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação obtido a partir do sistema ASPCR do exon 19 do gene EGFR.**

Perfil eletroforético em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação pela PCR, utilizando os iniciadores desenhados no sistema ASPCR. Linhas **1-5** são respectivamente Controle negativo (C-), A1, A2, A25 e A31 com iniciador para a seqüência normal e nas linhas **6-10**, as mesmas amostras com o iniciador para a seqüência mutante. O marcador de peso molecular utilizado foi um padrão composto por múltiplos de 100 pares de base (Gene Ruler<sup>TM</sup> - Fermentas). A seta vermelha indica a amplificação da seqüência mutada no exon 19 da amostra 02.



**Figura 4.2: Perfil do sequenciamento autom tico da muta o no gene EGFR.** Em A, Seq ncia nucleot dica da biopsia tumoral com a dele o no exon 19 do dom nio tirosina quinase do EGFR. A seta indica o local em que est  a dele o. Em B, seq ncia nucleot dica normal, para compara o.



Amostra 2            GLWIPEGEKVKIPVAIK**ELREA**TSPKANKEILD  
 EGFR Ex 19 Proteina    GLWIPEGEKVKIPVAIK - - - - TSPKANKEILD

↑  
 Sítio de ligação  
 de ATP

**Figura 4.3:** Alinhamento das seqüências normal do Exon19 do gene EGFR e com a deleção de 15 pares de base encontrada no paciente 02 deste estudo. Logo abaixo, a seqüência de aminoácidos indicando a deleção do domínio **ELREA**, localizado ao lado do sítio de ligação do ATP.

### ***4.3 O Butirato de sódio induz uma redução da proliferação celular nas linhagens A549 e H460***

Nos últimos anos, a literatura tem descrito a importância dos inibidores de desacetilases (HDACis) na terapia dos mais diversos tipos de câncer, no entanto, a base molecular dessa atividade anti-câncer dos HDACis ainda não está clara. Nesse sentido, uma série de trabalhos têm mostrado o efeito anti-proliferativo e apoptótico dos inibidores SAHA, FK228, Tricostatina A e também do butirato de sódio em diversos tipos de câncer, epiteliais ou hematológicos (MINUCCI,2006; BOWMAN,2006).

Para verificar o efeito citotóxico ou anti-proliferativo do butirato de sódio tratamos duas linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células, A549 e H460 e uma linhagem normal de fibroblasto de pulmão, IMR-90, com concentrações de 1 mM, 3 mM e 10 mM por 24, 48 e 72 horas. As células foram tratadas como descrito no item 3.11 desta dissertação sendo em seguida submetidas a determinação do número total de células, utilizando a Câmara de Neubauer, e a medida da viabilidade celular através do ensaio de MTT. As contagens de cada experimento foram realizadas em triplicata. Os resultados mostrados são representativos de três repetições dos experimentos.

As curvas de crescimento da figura 4.4 foram obtidas pela contagem do número total de células em triplicata (descrito em Materiais e Métodos) e mostram uma regulação tempo e dose dependente do crescimento celular das linhagens A549 (A) e H460 (B) induzida pelo tratamento com butirato de sódio. Após 24 horas de tratamento, poucas alterações foram observadas com a linhagem A549 e as células apresentam crescimento semelhante independente da concentração de butirato de sódio utilizada. No entanto, a partir de 48 horas de tratamento, há uma redução de aproximadamente 50 %, no crescimento celular quando comparamos as células não tratadas com as tratadas com 1mM de butirato de sódio. No caso da linhagem A549, esta redução de 50 % no crescimento se manteve quando comparamos os tratamentos de 1 mM e 3 mM entre si e também quando analisamos as curvas obtidas com 3

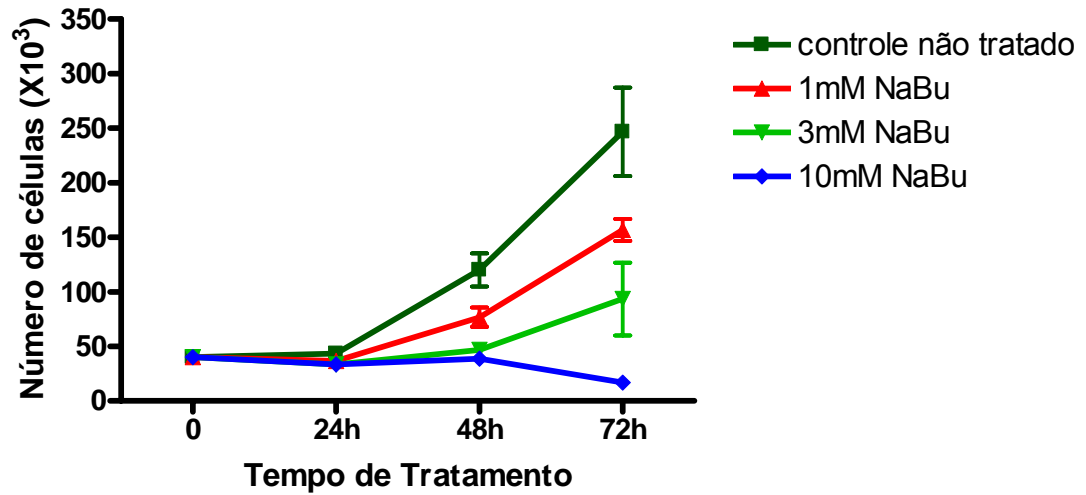
mM e 10 mM. Após 72 horas, porém há uma redução de crescimento desta linhagem com 10 mM de butirato enquanto que a inclinação das curvas de crescimento com 1 mM e 3 mM permanece a mesma observada no intervalo de 48 horas.

Com relação a linhagem H460, as células, com o tratamento de 1 mM butirato de sódio, crescem por até 48 horas. No entanto, com o tratamento de 3 mM parece não haver variação no perfil de crescimento e com 10 mM de tratamento a média de crescimento celular não se altera.

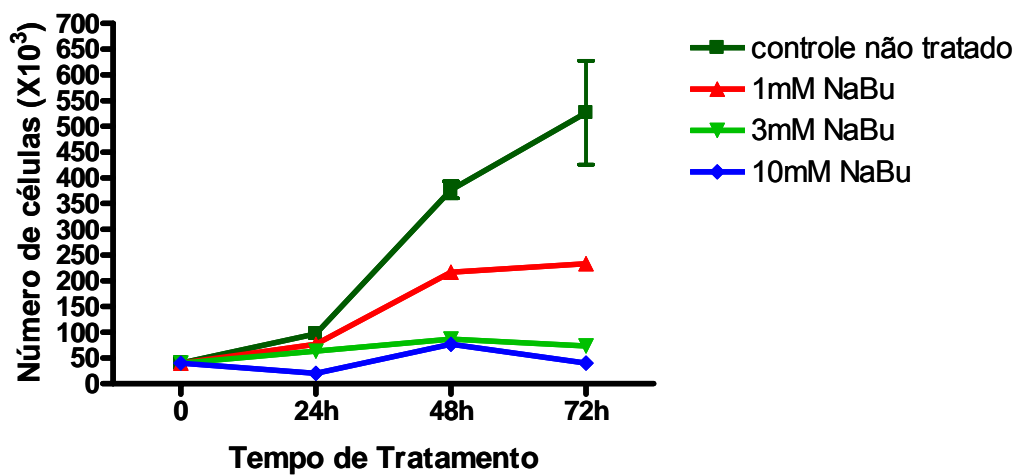
A viabilidade das células tratadas ou não com butirato de sódio foi medida por ensaio de MTT (descrito em materiais e métodos). Os resultados obtidos estão na figura 4.5 e corroboram os resultados obtidos com a contagem do número de células após o tratamento com o butirato de sódio. Ao verificar a viabilidade das linhagens A549 e H460 durante o tratamento com butirato de sódio observamos uma queda tempo e dose dependente no percentual de células viáveis e a linhagem H460 apresentou uma maior resistência ao tratamento mantendo uma viabilidade de cerca de 48 % com relação ao controle ao fim de 72 horas de tratamento com 10 mM butirato de sódio.

Com relação à linhagem normal de pulmão IMR-90, as figuras 4.6 A e B mostram que o tratamento com butirato de sódio também afeta a proliferação desta linhagem. O crescimento dessas células tratadas com 1 mM, 3 mM e 10 mM ocorre mais lentamente no intervalo de 24 horas e em seguida há uma queda no crescimento entre 24 e 48 horas com todas as concentrações de butirato de sódio. Já no intervalo entre 48 e 72 horas as células tratadas com 1 mM de butirato apresentam uma redução de aproximadamente 50 % comparado com a curva do controle não tratado. Observamos também que neste mesmo intervalo de tempo as células tratadas com 3 mM de butirato sódio proliferam discretamente, em torno de 10 % comparado ao controle.

A

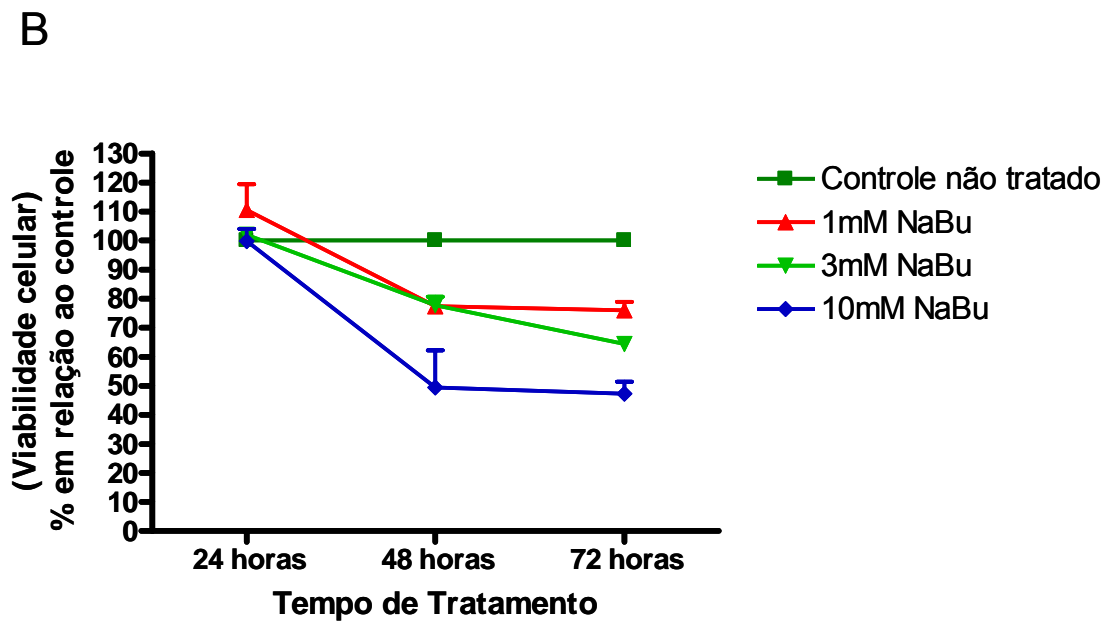
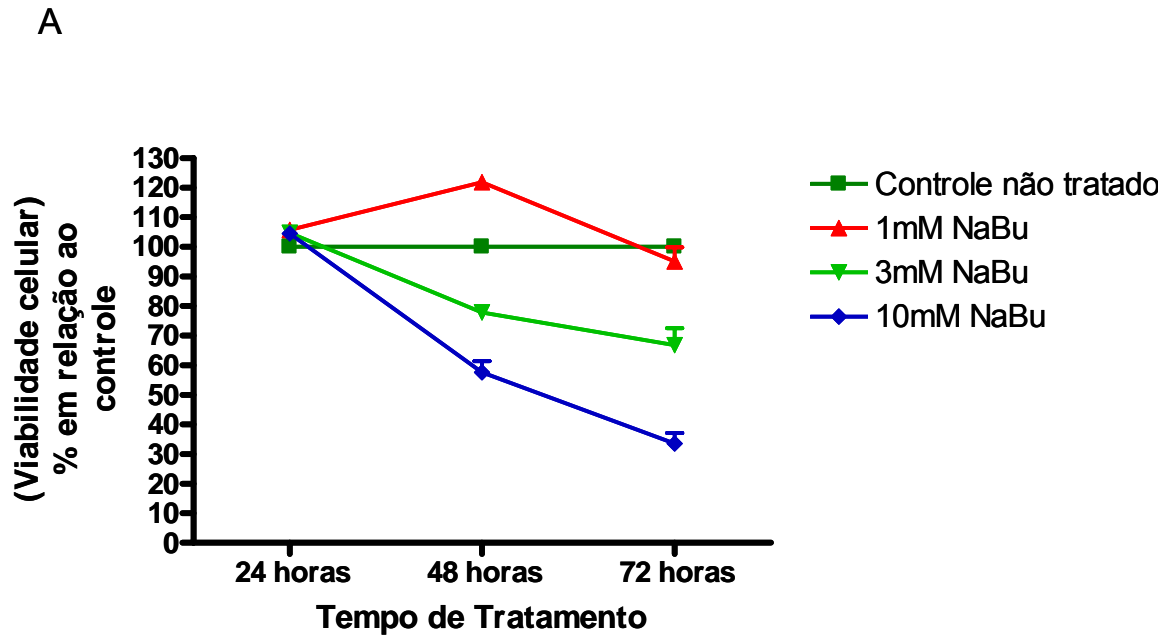


B



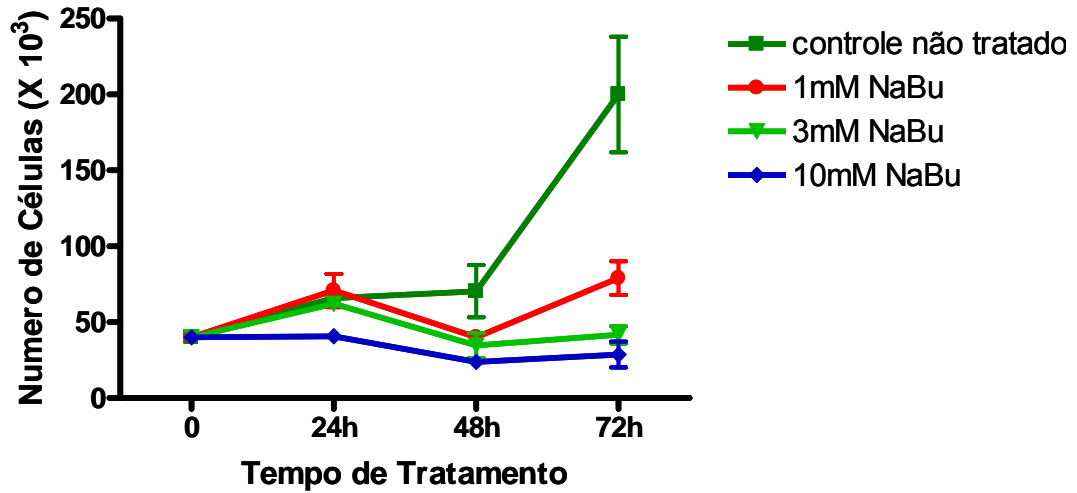
**Figura 4.4: Curva de crescimento celular das linhagens A549 (A) e H460 (B).** As células foram tratadas com as concentrações de 1 mM, 3 mM e 10 mM de Butirato de sódio (NaBu) nos tempos de 24, 48 e 72 horas e o número total de células foi contado. O experimento iniciou-se com  $4 \times 10^4$  células e o tratamento era realizado diariamente.



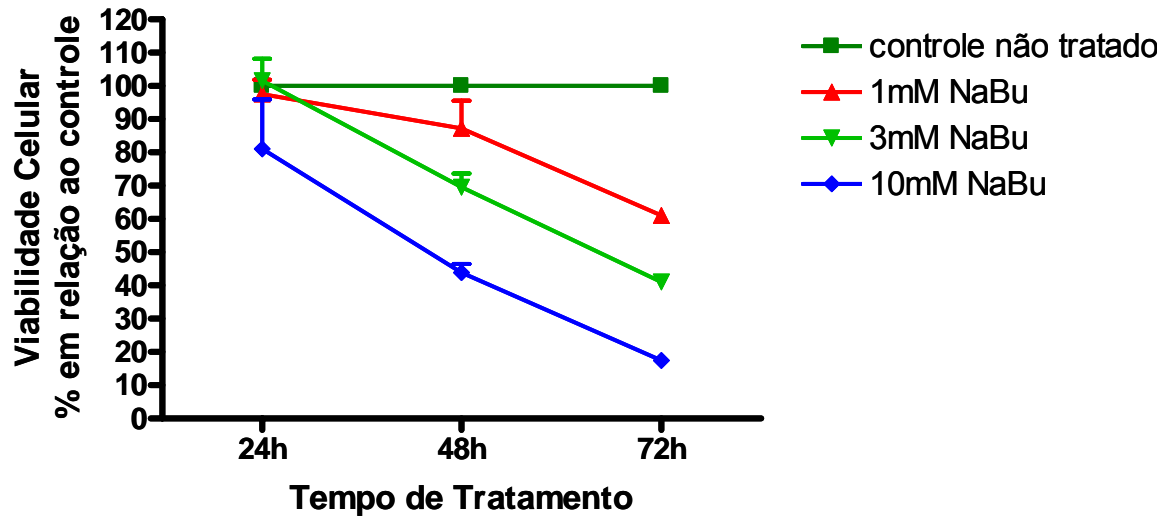


**Figura 4.5: Análise da viabilidade celular das linhagens A549 e H460.** As células foram tratadas com as concentrações de 1 mM, 3 mM e 10 mM de Butirato de sódio por 24, 48 e 72 horas e a cada dia de tratamento eram incubadas por 3 horas a 37°C na presença 1 mg/mL de MTT; em seguida era feita a leitura em uma absorbância de 490 nm no leitor de ELISA. Os resultados são mostrados em relação às células controle, ou seja, não tratadas com butirato de sódio, em cada dia de experimento.

A



B



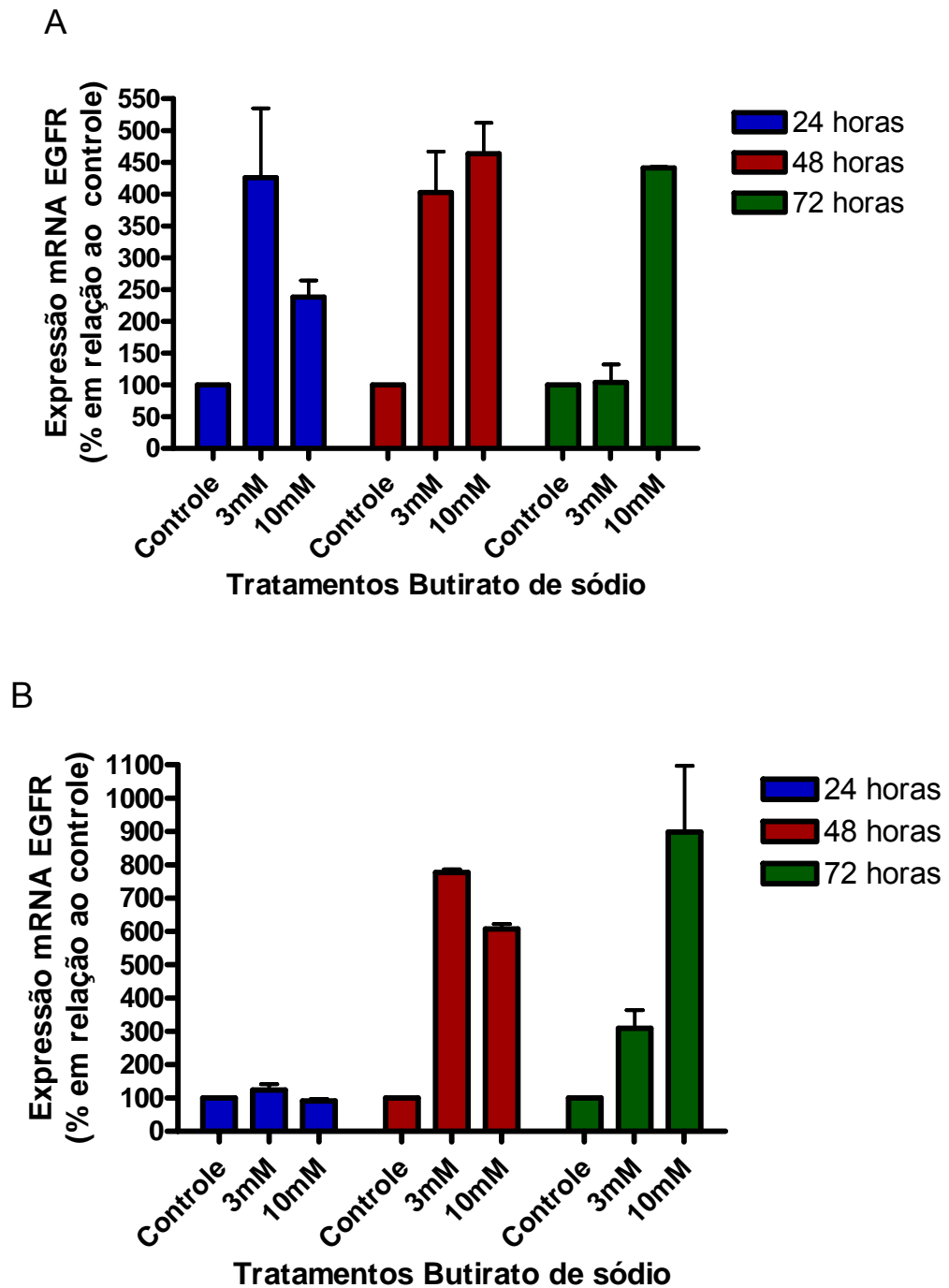
**Figura 4.6: Curva de crescimento celular (A) e análise da viabilidade celular por ensaio de MTT (B) na linhagem IMR-90.** As células foram tratadas com as concentrações de 1 mM, 3 mM e 10 mM de Butirato de sódio por 24, 48 e 72 horas e a cada dia de tratamento eram incubadas por 3 horas a 37°C na presença 1 mg/mL de MTT; em seguida era feita a leitura em uma absorbância de 490 nm no leitor de ELISA. Os resultados são mostrados em relação às células controle, ou seja, não tratadas com butirato de sódio, em cada dia de experimento.

#### ***4.4 O butirato de sódio induz um aumento da expressão de mRNA de EGFR nas linhagens A549 e H460.***

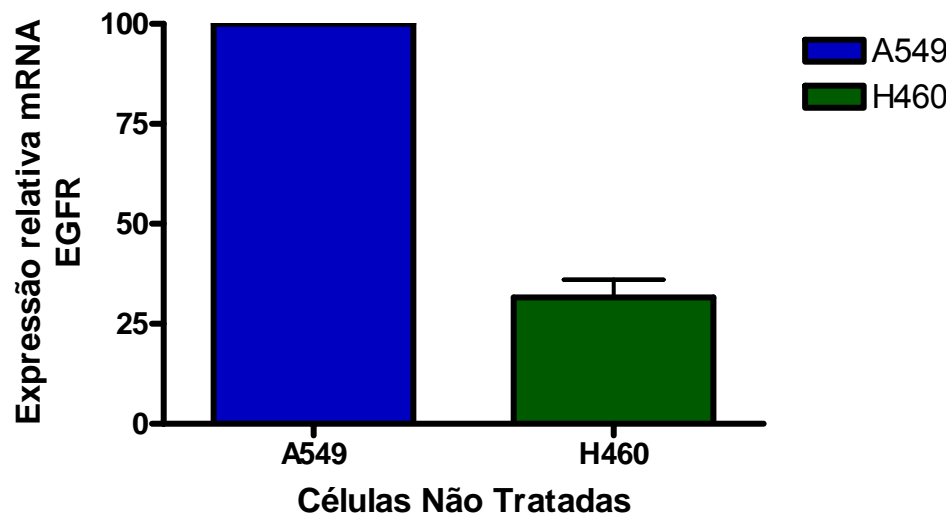
Para investigar o mecanismo de ação do butirato de sódio na inibição do crescimento observada nas linhagens A549 e H460, analisamos por PCR em tempo real, a expressão de mRNA de um importante gene envolvido no ciclo celular, o EGFR. Para esse experimento as linhagens A549 e H460 foram cultivadas em placas de 40 x 11mm e tratadas com as concentrações de 3 mM e 10 mM de butirato de sódio por 24, 48 e 72 horas. Nos diferentes tempos, o RNA total foi extraído e 2 µg, deste, utilizado para a síntese de cDNA, como descrito em materiais e métodos. Este cDNA foi utilizado para a análise do PCR em tempo real. Como controle endógeno e normalizador da quantidade de cDNA presente na reação, foi utilizado o gene GAPDH que se caracteriza por ser constitutivamente expresso nessas linhagens.

A análise dos gráficos da figura 4.7, nos indica que, em uma visão geral, em cada dia de tratamento, em relação ao controle, é observado um aumento da expressão de mRNA para EGFR, induzido pelo tratamento com butirato de sódio, nas linhagens A549 e H460. Na linhagem A549 (Figura 4.7A), com 24 e 48 horas de tratamento há um aumento da expressão com 3 mM e 10 mM de tratamento. Já após 72 horas, com 3 mM parece não haver alteração de expressão e em 10 mM a expressão aumenta cerca de 5X. No entanto, na linhagem H460 (Figura 4.7B), não há alteração de expressão do mRNA EGFR com 24 horas de tratamento, nas duas concentrações estudadas, e com 3 mM e 10 mM há uma aumento da expressão em 48 e 72 horas de tratamento, sendo em 72 horas de tratamento, a 10 mM observado um aumento evidente na expressão de mRNA EGFR (cerca de 10X em comparação com o controle não tratado).

A figura 4.8 mostra que na situação controle, ou seja, sem o tratamento com butirato de sódio, o mRNA de EGFR é cerca de 3 vezes mais expresso na linhagem A549 do que na linhagem H460.



**Figura 4.7:** Efeito do butirato de sódio na expressão de mRNA do gene EGFR nas células A549 (A) e H460 (B), medida por PCR em tempo real. Nas figuras, célula não-tratada (controle), tratadas com 3 mM butirato de sódio (3 mM) e tratadas com 10 mM butirato de sódio (10 mM). Os resultados são mostrados em proporção ao controle não-tratado e correspondem a média±desvio padrão de dois experimentos independentes. Como controle endógeno foi utilizado o gene GAPDH.



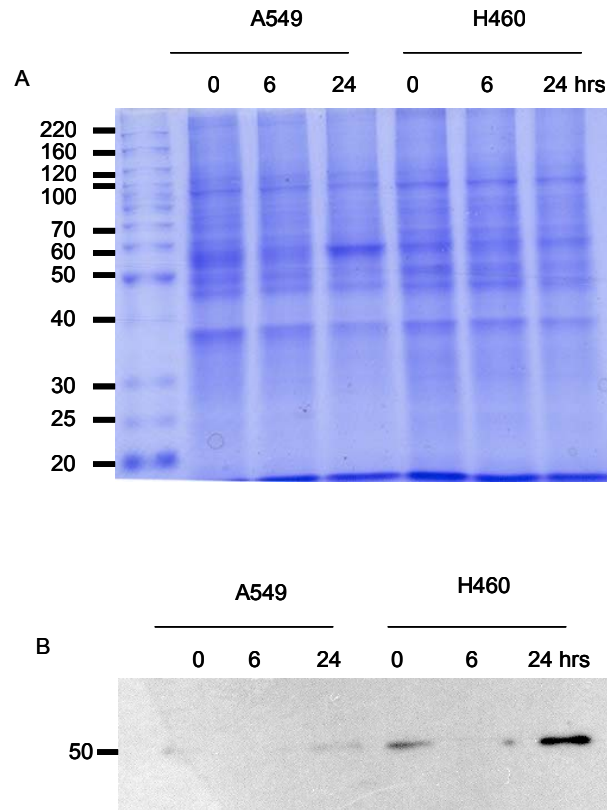
**Figura 4.8:** Expressão de mRNA de EGFR, medida por PCR em tempo real, nas linhagens A549 e H460 após 48 horas em cultura sem tratamento. Os resultados são mostrados em relação à expressão do mRNA de EGFR da linhagem A549. Como controle endógeno foi utilizado o gene GAPDH.

#### ***4.5 O tratamento com butirato de sódio aumenta a expressão da proteína p53 nas linhagens A549 e H460.***

Ainda buscando entender os mecanismos envolvidos na regulação do crescimento celular por butirato de sódio, verificamos se o tratamento com o mesmo afeta a expressão da proteína p53, relacionada ao controle do ciclo celular. Nesse experimento, as linhagens A549 e H460 foram cultivadas em placas de 40 x 11mm e tratadas com 10mM de butirato de sódio por 06 e 24 horas. O extrato total protéico foi feito e este separado por eletroforese em gel de acrilamida SDS-page 10%. Dois géis idênticos foram corridos em paralelo, um foi corado por Coomassie Blue (Figura 4.9A) para comparação da quantidade de proteínas entre os diferentes poços e o outro foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e incubado com o anticorpo murino anti-p53 (descrito em materiais e métodos).

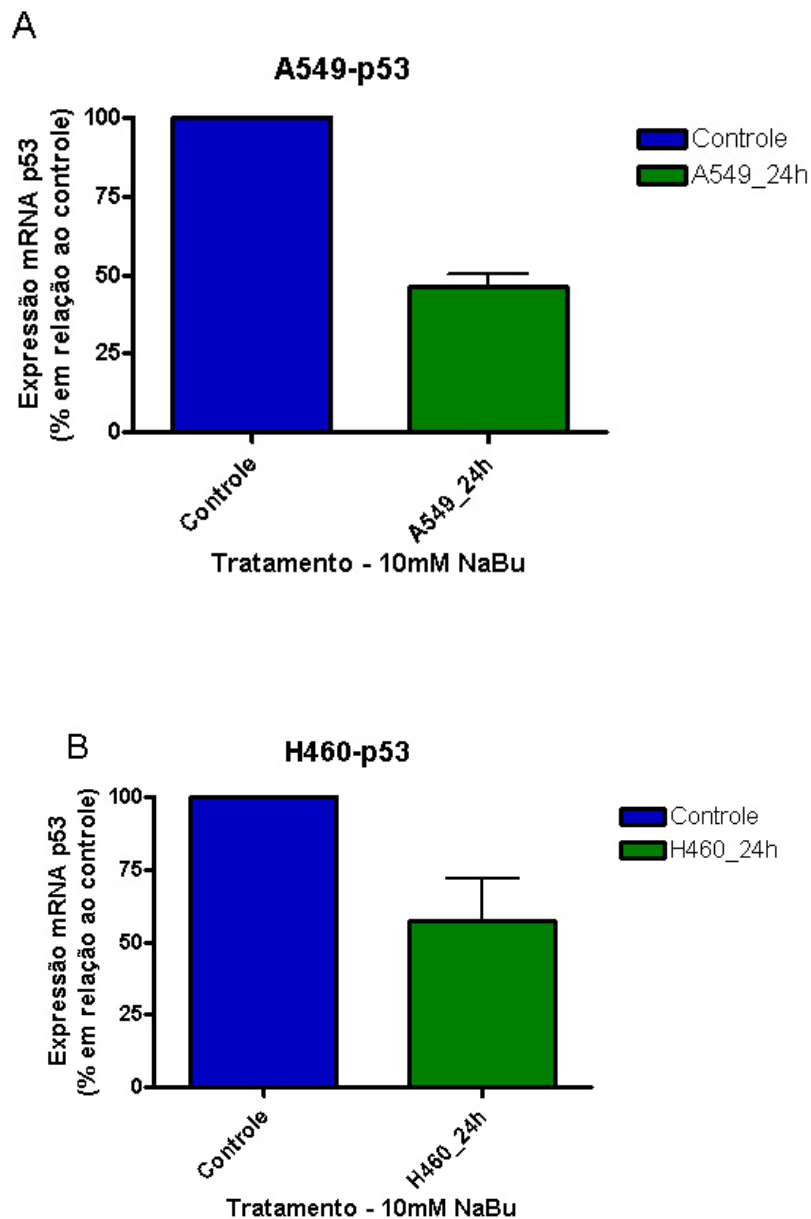
No western blot (Figura 4.9B) observamos claramente um aumento na concentração da proteína p53 nas linhagens H460 e A549 com 24 horas de tratamento. Em 06 horas de tratamento não é observada uma alteração evidente na expressão de p53.

O aumento na quantidade de proteína p53 após o tratamento com o butirato de sódio pode ser explicado de várias formas. Ele pode ser: consequência de um aumento na transcrição de mRNA para p53; consequência de um aumento na tradução do mRNA de p53; um aumento na estabilidade da proteína p53; um aumento na meia vida do mRNA para p53. Com isso, analisamos por PCR em tempo real se o tratamento com butirato de sódio causava uma alteração na quantidade de mRNA para p53. Os resultados mostrados na figura 4.10 indicam que a expressão do mRNA do gene p53 cai aproximadamente 50% em ambas linhagens A549 e H460 tratadas com 10mM butirato de sódio, por 24 horas.



**Figura 4.9: Efeito do butirato de sódio na expressão da proteína p53 das linhagens A549 e H460.** Células foram tratadas por 06 e 24 horas com 10mM de butirato de sódio e a quantidade de p53 analisada por western blot. Na figura, **A** corresponde ao gel de acrilamida 10% corado com Comassie Blue e **B** western blot com anticorpo murino anti-p53. **A549** e **H460** são as linhagens de câncer de pulmão utilizada e **0, 06 e 24** horas os tempos de tratamento com 10 mM de butirato de sódio. Os números a esquerda indicam as massas moleculares estimadas.





**Figura 4.10: Efeito do tratamento, por 24 horas, com 10mM butirato de sódio na expressão do mRNA da p53, das linhagens A549 e H460.** Os resultados são mostrados em relação ao controle não tratado. Como controle endógeno foi utilizado o gene GAPDH. O resultado apresentado corresponde a média±desvio padrão de dois experimentos independentes. Células foram tratadas por 24 horas com 10 mM de butirato de sódio e a quantidade de mRNA para p53 foi medido por PCR em tempo real como descrito em materiais e métodos.

#### ***4.6 Análise morfológica das linhagens A549 e H460 tratadas com Butirato de Sódio***

Na literatura, um dos efeitos conhecidos do butirato de sódio é da indução de diferenciação celular (PRASAD,1980). Assim, procuramos ao longo do tratamento das células observar possíveis alterações morfológicas.

Para acompanhar a morfologia das linhagens A549, H460 e IMR-90 durante o tratamento com butirato de sódio, as células foram mantidas em placas de 40 x 11mm e tratadas por 24, 48 e 72 horas nas concentrações de 1 mM, 3 mM e 10 mM butirato de sódio, com já descrito. Antes da contagem das células, estas foram fotografadas utilizando uma câmera digital ligada ao microscópio.

A figura 4.11 mostra os pontos do tratamento em que observamos alterações significativas na morfologia das linhagens A549 e H460. Na foto, observa-se uma redução significativa no número de células da linhagem A549 no intervalo de tempo de 24 horas para 48 horas acarretando em um grande número de células destruídas (mortas) em 48 horas de tratamento.

O tratamento da linhagem H460 com butirato de sódio produziu visíveis alterações morfológicas, a partir de 24 horas de tratamento. As células passaram a apresentar uma forma mais alongada assemelhando-se as células da linhagem A549 controle.

A figura 4.12 mostra a linhagem de fibroblasto normal de pulmão (IMR-90), tratada com butirato de sódio por 48 horas nas concentrações de 1 mM, 3 mM e 10 mM. Nesta figura, observa-se uma redução no número de células nos tratamentos de 3 mM e 10 mM, o que está de acordo com o perfil da curva de crescimento (Figura 4.6 A), mas não há alterações óbvias na morfologia dessas células.

**Figura 4.11: Linhagens A549 e H460, em cultura, tratadas com 10 mM Butirato de Sódio** por 24 e 48 horas. As células em cultura foram observadas em um microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100) no aumento de 20X. Na figura: controle são as linhagens A549 e H460 não tratadas e NaBu corresponde ao tratamento com butirato de sódio.

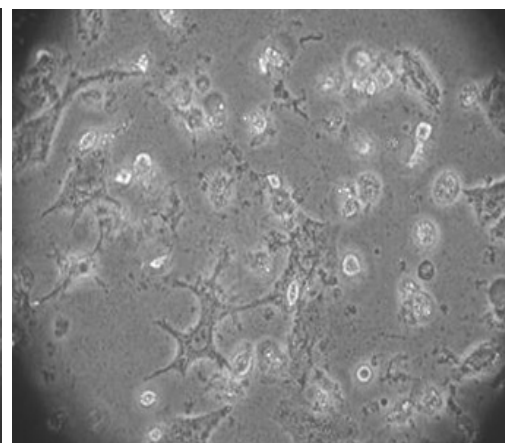
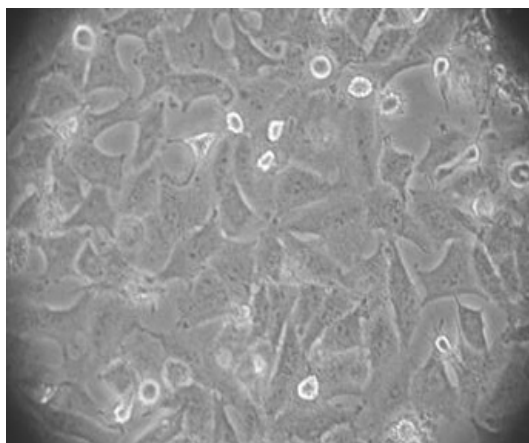
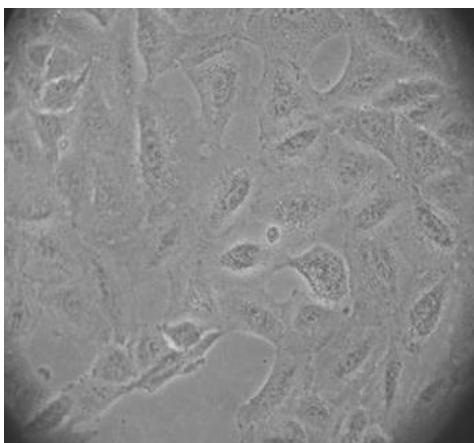
**Figura 4.12: Linhagem IMR-90, em cultura tratada com 1mM, 3mM e 10mM Butirato de Sódio** por 48 horas. As células em cultura foram observadas em um microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100) no aumento de 20X. Na figura: controle são as células não tratadas e NaBu corresponde ao tratamento com butirato de sódio.

Controle não tratado

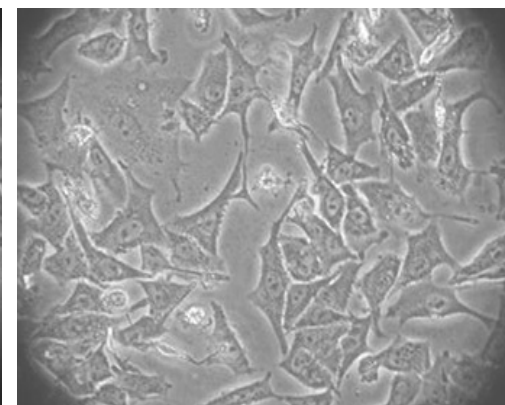
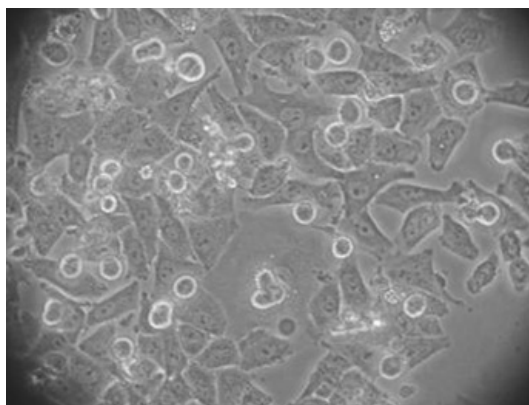
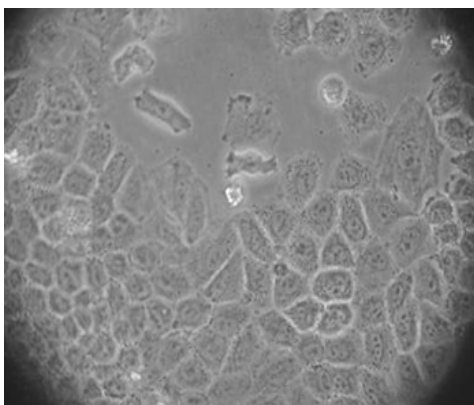
10 mM NaBu - 24h

10 mM NaBu - 48h

A549  
→

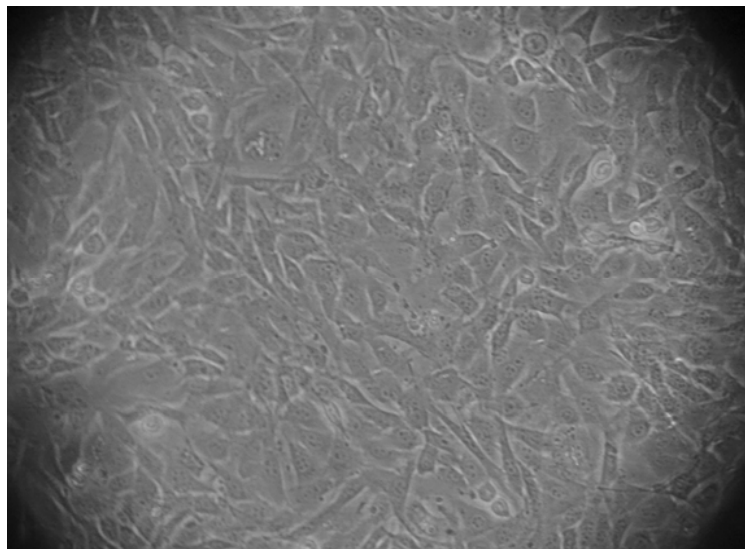


H460  
→

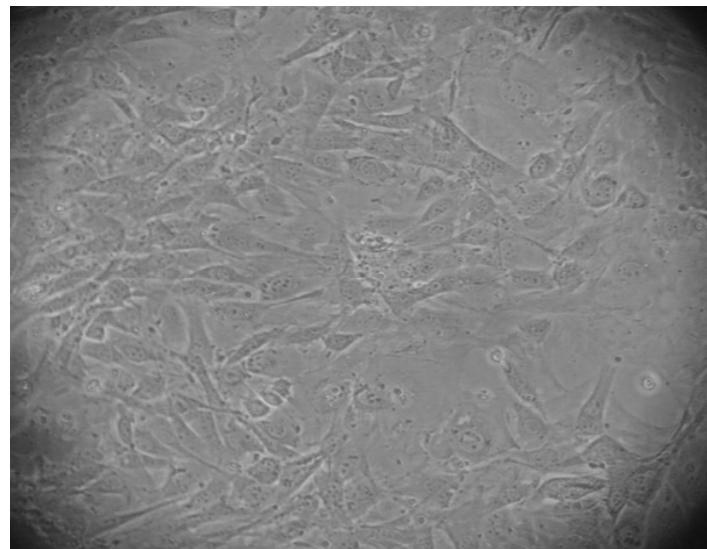


Aumento 20X

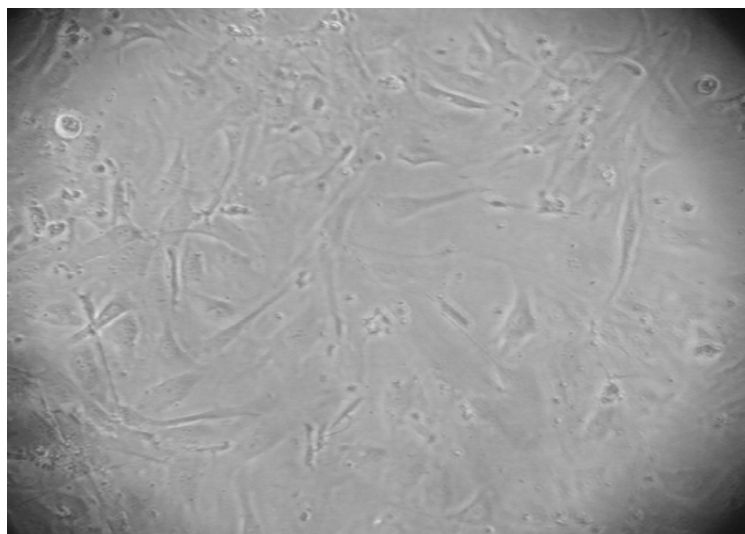
Controle não tratado



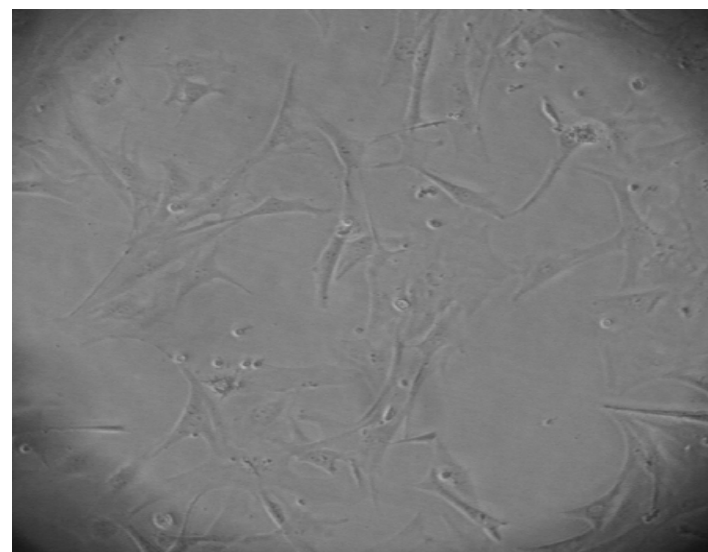
1 mM NaBu - 48h



IMR-90  
→



3 mM NaBu - 48h



10 mM NaBu - 48h

Aumento 20X

#### ***4.7 Análise morfológica das linhagens A549 e H460 – reorganização dos filamentos de actina após o tratamento com butirato de sódio***

Como mostrado na figura 4.11, há claras mudanças na morfologia das células A549 e H460 induzidas pelo tratamento com o butirato de sódio. Esta observação, associada ao fato de que os estudos com o HDACi Trisostatina A mostraram um efeito desta droga na formação de novos filamentos de actina (ROMBOUTS,2002), nos induziu a pesquisar a disposição do citoesqueleto de actina nas linhagens A549, H460 e IMR-90 tratadas com o butirato de sódio. Para isso, as células foram coradas com faloidina, uma toxina que se liga entre as subunidades f-actina, em um filamento de actina polimerizado. A faloidina constitui desta maneira, um marcador importante, usado para quantificar e identificar f-actina em tecidos ou células fixados.

As linhagens A549, H460 e IMR-90 foram cultivadas em lamínulas e tratadas com 10 mM butirato de sódio por 24 e 48 horas. Esta foi a concentração de butirato de sódio escolhida por induzir mudanças morfológicas acentuadas das linhagens em estudo.

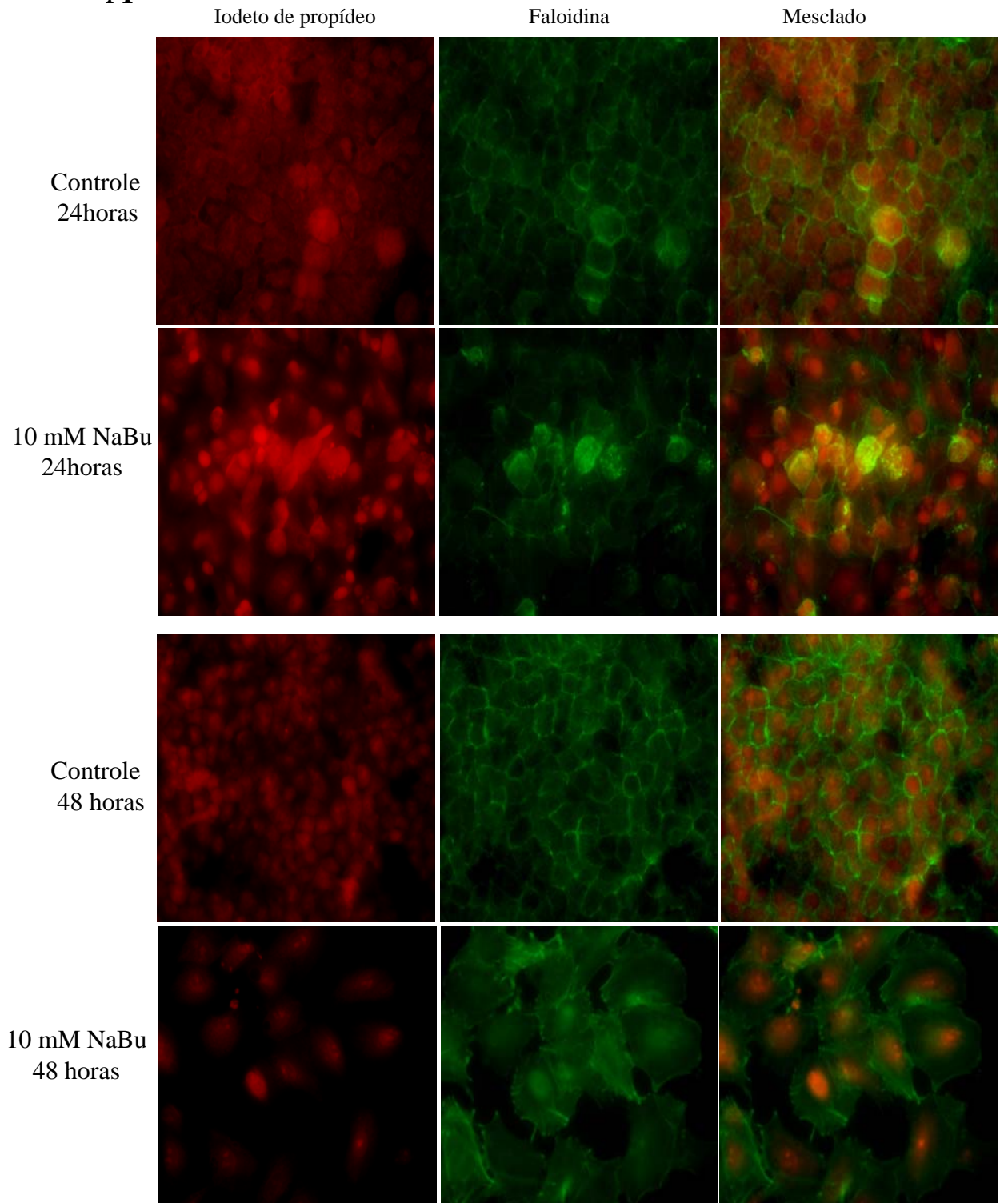
Na figura 4.13A, que corresponde a linhagem A549, observamos, que nas primeiras 24 horas de tratamento, ocorreram poucas alterações nos filamentos de actina. Estes se encontram organizados em filamentos no citoplasma das células. No entanto, após 48 horas de tratamento, as células parecem mais estiradas com os filamentos dispostos de maneira desorganizada no citoplasma. Com 48 horas, também observamos que as células aparentam um volume aumentado, tanto do citoplasma quanto do núcleo (marcado com iodeto de propídeo) o que pode nos sugerir um processo de necrose celular. Na figura 4.13B, referente à linhagem H460 pode-se perceber alterações na disposição dos filamentos de actina, já no tratamento durante 24 horas. Nesse caso, os filamentos não se encontram mais dispostos contornando as células e sim espalhados pelo citoplasma. Após 48 horas de tratamento, o mesmo pode ser observado. Essas alterações do citoesqueleto das células H460 confirmam as

alterações morfológicas observadas na figura 4.11. A figura 4.13C mostra a disposição dos filamentos de actina na linhagem IMR-90 tratadas ou não com butirato de sódio. Podem-se observar claramente os filamentos de actina formando as fibras de stress e as células apresentam-se alongadas, a forma típica dessa linhagem de fibroblasto. Não há diferenças evidentes, quanto à morfologia e disposição dos filamentos de actina entre as células tratadas ou não.

**Figura 4.13: Marcação dos filamentos de f-actina com faloidina (verde) e do núcleo com iodeto de propídeo (vermelho) e DAPI (azul) das linhagens A549 (A), H460 (B) e IMR-90 (C) tratadas ou não com 10mM de butirato de sódio por 24 horas e 48 horas.** As fotos foram tiradas em um Microscópio de fluorescência NIKON-7200. As fotos das linhagens A549 e H460 foram tiradas em um aumento de 60X, enquanto as fotos da linhagem IMR-90 estão em um aumento de 100X.

# Linhagem A549

A



Aumento 60X



# Linhagem H460

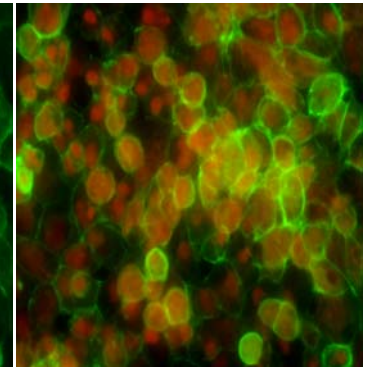
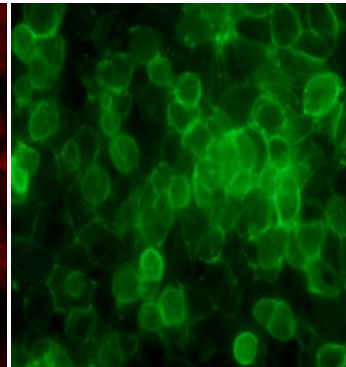
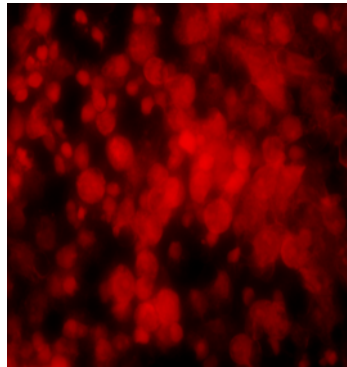
**B**

Iodeto de propídeo

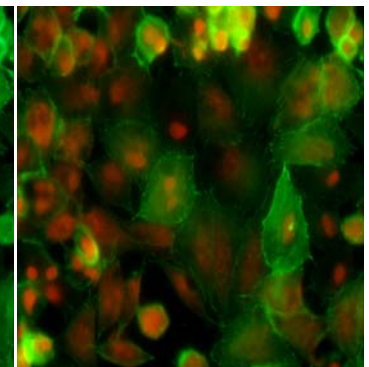
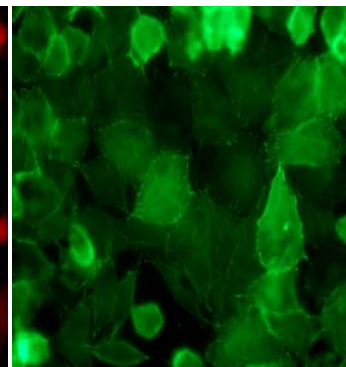
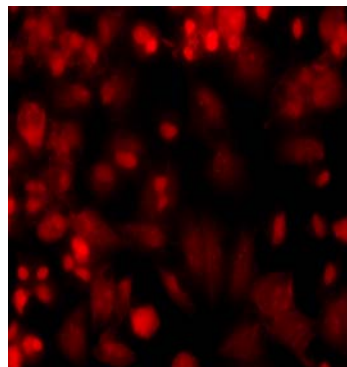
Faloidina

sobreposição

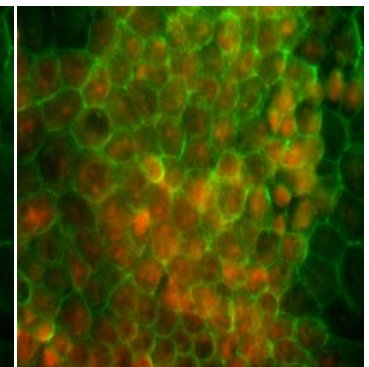
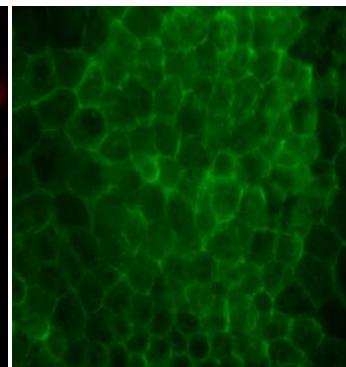
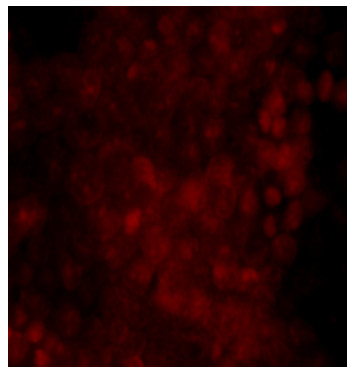
Controle  
24 horas



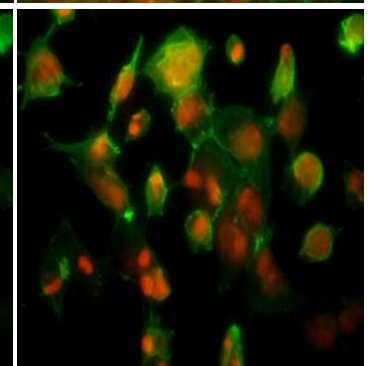
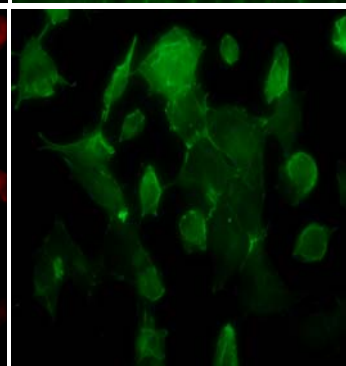
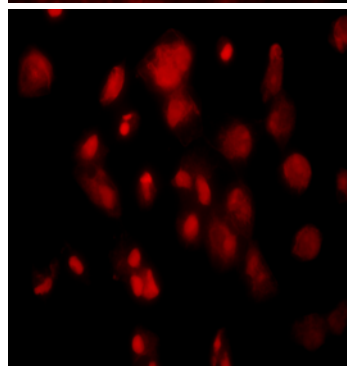
10 mM NaBu  
24 horas



Controle  
48 horas

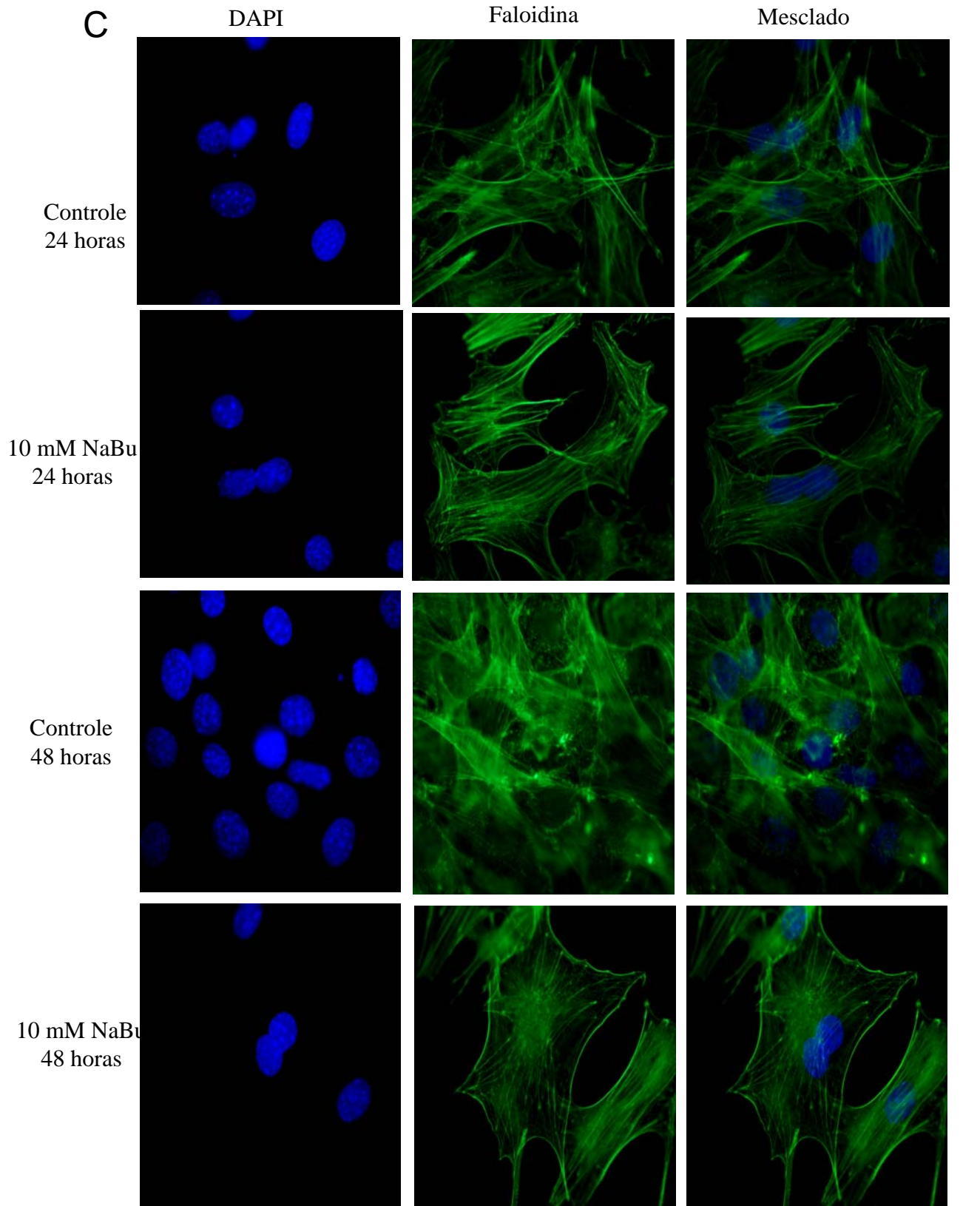


10 mM NaBu  
48 horas



Aumento 60X

# Linhagem IMR-90



Aumento 100X

## **5.0 DISCUSSÃO**

A discussão a seguir está dividida em duas partes. A parte I envolve a identificação de mutações no domínio tirosina quinase do gene EGFR em uma população do estado do Rio de Janeiro diagnosticada com câncer de pulmão. A parte II concentra-se em identificar o efeito do butirato de sódio, um inibidor de histona desacetilase, no crescimento de linhagens tumorais de câncer de pulmão e uma possível relação com o EGFR.

### **5.1 Parte I – Mutações no gene EGFR**

Como já foi descrito no tópico 1.1, o câncer de pulmão é um dos tipos de câncer que mais leva os pacientes à morte em todo o mundo e no CPNPC, dados mostram que apenas um terço dos pacientes sobrevivem por um ano ou mais após o início da combinação quimioterápica convencional (SCHILLER,2002; D'ADDARIO,2005). Essas observações mostram a necessidade de um tratamento com resultados mais precisos e eficientes. Para isso, foram desenvolvidas drogas que atuam inibindo o sistema EGFR, por exemplo, pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinase, como as drogas Gefitinib (Iressa) e Erlotinib (Tarcerva). No entanto, dados clínicos mostram que somente um pequeno número de pacientes respondem a esse tratamento (KRIS, 2003).

A partir de 2004, uma série de trabalhos vêm sendo publicados descrevendo mutações no domínio tirosina quinase do gene EGFR que parecem estar envolvidas numa maior sensibilidade às drogas inibidoras de tirosina kinase (LYNCH,2004; PAEZ,2004; PAO,2004). De uma forma geral, o perfil clínico dos pacientes que apresentam mutações são, asiáticos (30,6%) em relação aos Caucasianos (7,6%); não-fumantes (34,8%) enquanto em fumantes

(7,8%) e em pacientes do tipo histológico adenocarcinoma (23,2%) comparado com bronco-alveolar (17,9%) e outros tipos histológicos (2,2%) (CHAN,2006).

Uma variedade de mutações já foi descrita; os tipos de mutações e suas frequências na população estão representadas na figura 5.1. Essas mutações são somáticas, em muitos casos heterozigóticas sugerindo um efeito dominante levando a ganho de função e vantagens de sobrevivência da célula tumoral (PAO,2004).

Um dos tipos de mutação mais freqüente é a deleção de 15 pares (E746-A750) de base no exon 19 do domínio tirosina quinase do gene EGFR. Essa mutação suprime o domínio ELREA que flanqueia o sítio de ligação do ATP, exatamente o local de interação de drogas como Gefitinib e Erlotinib (CHAN,2006).

Como pode ser visto nas figuras 4.2 e 4.3, a mutação encontrada no Paciente 2, pertencente a população analisada, foi a deleção E746-A750. Na tabela 4.1 estão em destaque as características clínicas do paciente em questão: Sexo masculino, tipo histológico adenocarcinoma, estágio IV e não-fumante. Suas características encaixam-se no perfil de pacientes com maior frequência de mutações (CHAN,2006). Até o momento, nosso estudo revela que dos 48 pacientes analisados, nos exons 18 a 21 do gene EGFR, apenas um contém uma mutação (2,08%), mostrada nas figuras 4.2 e 4.3 desta dissertação. Esta frequência está dentro da faixa de valores obtidos em outros estudos multi-cêntricos envolvendo populações caucasianas (CHAN,2006).



### ***5.1 Parte II - Efeito do Butirato de sódio, um inibidor de histona desacetilase, no crescimento de linhagens tumorais de câncer de pulmão.***

Como foi discutido no tópico 1.3.2 da introdução, os inibidores de histona desacetilases constituem uma interessante classe de agentes anti-neoplásicos que atuam no controle de acetilação e desacetilação de histonas, levando ao desenovelamento do DNA e assim permitindo a ativação de uma série de genes, dentre eles aqueles envolvidos na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose. Grande parte dos estudos com HDACi procuram elucidar mecanismos pelos quais esses agentes alteram proteínas reguladoras do ciclo celular (p21, p53) e regulam caminhos de transdução de sinal, como por exemplo a via RAS-RAF-MAPK, representada na figura 1.4 (XIAODAN,2002; SANDOR,2000; DEFAZIOS,1992).

Neste trabalho, descrevemos o efeito do butirato de sódio em parâmetros relacionados a proliferação celular nas linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células (A549, H460) e na linhagem de fibroblasto normal de pulmão (IMR-90).

Como o efeito do butirato de sódio em linhagens de câncer de pulmão é pouco caracterizado, a primeira análise que fizemos foi com relação a sua regulação na proliferação das linhagens estudadas. Como mostrado nas figuras 4.4A e B, o butirato de sódio induz uma inibição tempo-dose dependente no crescimento das células. O efeito regulatório do butirato de sódio, em ambas as linhagens é observado a partir da concentração de 1 mM após 48 horas de tratamento. De acordo com as figuras 4.5 A e B pode-se perceber que a linhagem H460 apresenta maior viabilidade em comparação a linhagem A549, sugerindo uma resistência ao tratamento. Ao analisar o efeito citotóxico do butirato de sódio nas linhagens normais de pulmão, observamos que assim como nas linhagens tumorais, esse inibidor também regula o crescimento dessas células (Figuras 4.6 A e B). No entanto, é necessário o ensaio de

proliferação celular com a marcação com timidina radioativa, para que possamos confirmar a viabilidade das células (A549, H460 e IMR-90) e assim inferir com mais certeza sobre a maior resistência da linhagem H460. Ainda buscando confirmar a viabilidade das células tratadas, realizamos os ensaios de apoptose através da marcação de Anexina V e TUNEL e, em ambos os experimentos não foi visualizada a morte celular por apoptose. No entanto, como não tínhamos um controle positivo apoptótico adequado não pudemos validar o experimento (dados não mostrados). Além desses ensaios, nas figuras 4.13A, B e C, nos núcleos corados com iodeto de propídeo e DAPI também não observamos núcleos apoptóticos. Dados da literatura mostram que o butirato de sódio e TSA são ineficientes em induzir apoptose (MAYO,2003). Esse efeito de regulação da proliferação celular mediada por um HDACi em células de câncer de pulmão, já foi demonstrado por XIAODAN (2002), nessas mesmas linhagens em estudo, mas com o inibidor de histona desacetilase FK228.

Recentes estudos mostram que inibidores de histona desacetilases regulam o crescimento celular, mas apenas as células transformadas são levadas à morte (UNGERSTEDT,2005). Os autores atribuem este efeito ao fato que o HDACi, no caso SAHA, induz um acúmulo de espécies reativas de oxigênio e aumento da atividade de caspases, nas células transformadas e não nas normais (UNGERSTEDT,2005). No entanto, na figura 4.6 a ação do butirato de sódio no crescimento da linhagem de células normais de pulmão (IMR-90), mostra-se comparável a inibição observada sobre a proliferação das demais células estudadas, que são carcinogênicas. Não podemos descartar a possibilidade da linhagem IMR90 ter acumulado mutações durante o tempo que tem sido mantida em cultura, já que não a obtivemos diretamente no ATCC e sim do Instituto Ludwig – São Paulo. Assim a linhagem IMR90 com a qual trabalhamos pode não mais ser representativa de uma linhagem de pulmão não tumoral. Neste sentido, o ideal seria realizarmos os mesmos experimentos em uma cultura primária de pulmão, que poderia

ser obtida em colaboração com o Serviço de Patologia do Hospital Universitário, onde obtivemos as biópsias embebidas em parafina.

Para verificar possíveis mecanismos que estariam mediando a regulação do crescimento dessas células verificamos a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, como por exemplo, EGFR e p53. Ambas as linhagens apresentam p53 selvagem e, portanto não há diferenças quanto a atividade desta proteína. Assim, com a técnica de western blot, utilizando um anticorpo anti p53, observamos que há um aumento na quantidade da proteína com o tratamento de 10mM butirato de sódio por 24 horas na linhagem H460 (Figura 4.9B). Essa diferença no nível da proteína p53 não pode ser atribuída a maior expressão do seu RNA mensageiro, já que pela análise do RT-PCR em tempo real, representada na figura 4.10, há uma queda na expressão de p53 após o tratamento.

Conjuntamente, esses resultados sugerem uma estabilização da proteína p53, induzida por butirato de sódio. Não podemos eliminar, porém, a possibilidade de uma maior estabilidade do mRNA para p53 e um aumento da tradução deste mRNA. Resultado semelhante foi obtido por XIAODAN (2002) utilizando o HDACi FK228. Neste caso, a maior quantidade de p53 foi obtida pela estabilização da última mediada por interações com a proteína chaperona Hsp90. Este trabalho, também indica que o HDACi, no caso FK228, preferencialmente estabilize a p53 selvagem. O mecanismo pelo qual este evento ocorre ainda é desconhecido, mas no trabalho citado a estabilização de p53 foi atribuída a acetilação da Hsp 90. Esse processo é esquematizado na figura 1.8, que mostra também que a p53, quando acetilada tem a sua ubiquitinação mediada por MDM-2 inibida, o que a protege da degradação, e conseqüentemente mantém a sua atividade supressora tumoral (COLMAN,2000;LUO,2004)

Como descrito no tópico 1.2, o EGFR, quando ativado, dispara uma série de sinalizações seqüenciais que culminam com a regulação da transcrição de vários genes responsáveis pelo crescimento celular. Com isso, o EGFR se mostra um importante alvo no estudo do



mecanismo de ação de inibidores de HDAC. As figuras 4.7A e B, mostram um aumento da expressão de mRNA de EGFR nas células quando tratadas com butirato de sódio. A linhagem A549 possui o EGFR mais expresso que o H460, o que pode estar relacionado às diferentes respostas dessas duas linhagens ao butirato de sódio. No entanto, ainda não temos informações da expressão protéica de EGFR e da atividade deste receptor nas linhagens tratadas. É possível que o tratamento com butirato esteja induzindo a degradação do receptor ativado, ou afetando sua internalização e sua reciclagem de volta a membrana plasmática. Pretendemos investigar estas possibilidades no futuro, através de western blots com anticorpos específicos contra EGFR ativado ou não e também realizando ensaios de internalização.

DEFAZIO (1992), mostrou que o butirato de sódio aumenta a expressão de mRNA EGFR nas linhagens MCF-7 e T47D, de câncer de mama. Já XIAODAN (2002) mostrou que os inibidores de HDAC FK228 e TSA reduzem a expressão da proteína ERB1 (família a qual o EGFR pertence) o que nos permite levantar a hipótese de que um possível mecanismo de ação dos HDACi se dá através da redução da atividade de oncoproteínas.

Quando acompanhamos o desenvolvimento dessas células tumorais (A549 e H460), em cultura, observamos alterações morfológicas, e verificamos a ausência de tais modificações na linhagem IMR-90 mesmo ao fim de 48 horas de tratamento na concentração máxima de butirato de sódio utilizada (10mM). As células IMR90 tratadas possuem uma aparência semelhante a das células não tratadas (Figura 4.12). No entanto, a figura 4.11, mostra que a linhagem A549, ao fim do tratamento descrito acima, possui um aspecto mais alongado com filamentos protusos e disformes e no caso da linhagem H460, a morfologia é totalmente alterada, se assemelhando a das células da linhagem A549 não tratadas.

Essas observações morfológicas corroboram os resultados de maior sensibilidade da linhagem A549 e nos permitem levantar a questão de que a linhagem H460 sofre um processo

de diferenciação celular, induzido pelo tratamento com butirato de sódio. Este efeito na diferenciação, já foi demonstrado em diversas linhagens de câncer e, além disso, historicamente, o butirato de sódio é conhecido como um agente indutor de diferenciação celular (KURODA,2005;PRASAD,1980). Um outro ponto que pode reforçar esta hipótese é que a linhagem H460 é obtida a partir de um carcinoma indiferenciado de grandes células ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Ainda não temos dados suficientes que confirmem a ocorrência de um processo de diferenciação na linhagem H460.

Adicionado ao perfil morfológico dessas linhagens em cultura, a figura 4.13 mostra os resultados da organização dos filamentos de actina nas células tratadas em comparação com as não tratadas. E, o que pode ser destacado é uma evidente reorganização dos filamentos de actina, nas linhagens A549 e H460, com os filamentos bem mais difusos e heterogêneos, principalmente, na linhagem H460 tratada com 10mM butirato de sódio por 24 ou 48 horas. Na Figura 4.13C, observamos que a linhagem IMR-90 não apresenta reorganizações em seu citoesqueleto de actina. Observamos também na coloração do núcleo com DAPI, células em processo de divisão celular, mesmo com o tratamento de 10 mM butirato de sódio, o que nos leva a confirmar a resistência dessas células ao tratamento. ROMBOUTS (2002) mostra que o HDACi TSA afeta o “desenvolvimento” do citoesqueleto, regulando a expressão de genes relacionados a formação do citoesqueleto de actina em células hepáticas.

O interesse no estudo dos efeitos do butirato de sódio aumentou em 1977, quando RIGGS (1977), ao tratar células em cultura com butirato observou a hiperacetilação de histonas. Como está descrito no tópico 1.3, o equilíbrio nos eventos de acetilação e desacetilação é importante na manutenção da estrutura da cromatina e nas atividades transcricionais. Desde então, numerosos efeitos biológicos de proliferação e diferenciação celular têm sido discutidos e relacionados ao butirato de sódio dentre outros inibidores de histona desacetilase.

Com isso esses inibidores constituem novos agentes anti-neoplásicos já validados em ensaios clínicos de fase I e II, em associação ou não com clássicas drogas quimioterápicas ou drogas inibidoras de receptores tirosina quinase, como por exemplo, EGFR. (KOURAKLIS,2006; ZHANG,2006).

## **6.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

### ***Parte I – Mutações no gene EGFR***

A análise de mutações no gene EGFR em um grupo de pacientes pertencente à população brasileira consiste em um estudo pioneiro e importante, no sentido que o EGFR e seu mecanismo de ação constituem um dos principais alvos de estudo para terapias em câncer. Neste trabalho, 48 pacientes diagnosticados com câncer de pulmão foram analisados e destes, um possui uma mutação já descrita, no exon 19 do domínio tirosina quinase do EGFR (delE746-A750). Isso corresponde a uma frequência de 2,08% de mutações no domínio tirosina quinase do gene EGFR na nossa população estudada. Essa frequência é baixa, mas se aproxima da frequência de mutações na população caucasiana (CHAN,2006).

No entanto é desejável ampliar esse estudo para cerca de 100 pacientes representativos da população regional.

### ***Parte II - Efeito do Butirato de sódio, um inibidor de histona desacetilase, no crescimento de linhagens tumorais de câncer de pulmão.***

Na segunda parte do trabalho, baseado no fato de que existem várias vias que podem ligar direta ou indiretamente, a sinalização ao nível de membrana celular (EGFR) ao controle do ciclo celular, pesquisamos o outro extremo da cascata de eventos bioquímicos relevantes à proliferação celular, ou seja, as alterações ao nível nuclear.

Com isso, observamos que o inibidor de histona desacetilase, butirato de sódio, regula o crescimento celular e viabilidade das linhagens A549, H460 e IMR-90. Seu mecanismo de ação, ainda é desconhecido, mas o que observamos é um efeito desse HDACi na regulação de possíveis “oncoproteínas”, tais como a p53 e EGFR. Nesse trabalho verificamos um aumento

da expressão da proteína p53, nas células estudadas, com o tratamento por butirato de sódio. Quanto ao EGFR observamos um aumento da expressão do seu mRNA nas linhagens tratadas. Não temos informações sobre a biossíntese da proteína e a atividade do EGFR os quais obteremos a partir de ensaios com anticorpos específicos. Nesse caso, verificaremos a expressão protéica do EGFR ativado ou não e como se passa a internalização e degradação do EGFR nas células tratadas com butirato de sódio.

As linhagens estudadas possuem o EGFR selvagem e assim, na tentativa de relacionar o efeito do butirato de sódio a atividade do EGFR, analisaremos o efeito deste HDACi em linhagens de CPNPC que possuem a mutação no gene EGFR identificada na população em estudo deste trabalho.

Um outro ponto a pesquisar, e que também está relacionado a regulação da atividade do EGFR e ao mecanismo de ação do butirato de sódio é a avaliação do nível geral de fosforilação das proteínas (MAPK Akt), pertencentes à cascata de ativação iniciada pelo EGFR nas linhagens celulares.

Nos resultados mostrados nas figuras 4.11, 4.13 A e B notamos que o butirato de sódio induz alterações morfológicas nas linhagens A549 e H460, sendo estas mais evidentes na linhagem H460. Essas mudanças na morfologia são acompanhadas de uma reorganização do citoesqueleto confirmadas pela marcação dos filamentos de f-actina por faloidina. Não há alterações morfológicas, evidentes na linhagem IMR-90.

Essas mudanças morfológicas, principalmente na linhagem H460, nos permitem sugerir a hipótese de um processo de diferenciação celular induzido pelo tratamento com butirato de sódio. No entanto, é necessário caracterizar melhor o efeito do butirato de sódio como indutor de diferenciação em linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células.

## REFERÊNCIAS

- ARTEAGA, C. Epidermal Growth Factor Receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The Oncologist*, 7 (suppl4):31-39, 2002.
- BARTOVA, E.; PACHERNIK, J.; HARNICAROVA, A.; KOVARIK, A.; KOVARIKOVA, M.; HOFMANOVA, J.; SKALNIKOVA, M.; KOZUBEK, M.; KOZUBEK, S. Nuclear Levels and Patterns of Histone H3 Modification and HP1 Proteins after inhibition of Histone Deacetylases. *J Cell Sci*. Nov 1;118(Pt 21):5035-46, 2005.
- BOWMAN,R.V.; YANG,I.A.; SEMMLER,A.B.T.; FONG,K.M. Epigenetics of Lung Câncer. *Respirology* 11:355–365,2006.
- CARPENTER, G. Nuclear Localization and Possible Functions of Receptor Tyrosine Kinases. *Curr.Op.Cell Biol.* 15:143-148,2003.
- CHAN, SK.; GULLICK, WJ.; HILL, ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer - search and destroy. *Eur J Cancer*. 42:17-23,2006.
- CHOI, YH. Induction of Apoptosis By Trichostatin A, a Histone Deacetylase inhibitor, is Associated With inhibition of Cyclooxygenase-2 Activity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* 27:473–9,2005.
- COLMAN, MS.; AFSHARI, CA.; BARRETT, JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 462:179–88,2000.
- D'ADDARIO, G.; PINTILIE, M.; LEIGHL NB.; FELD, R.; CERNY, T.; SHEPHERD, F.A. Platinum-Based Versus Non-Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of the Published Literature. *J Clin Oncol* 23:2926–36,2005.
- DE RUIJTER, A.J.; VAN GENNIP, A.H.; CARON, H.N.; KEMP, S.; VAN KUILENBURG, A.B. Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family. *Biochem. J.* 370:737–49,2003.
- DEFAZIO, A.; CHIEW, Y.E.; DONOGHUE, C.; LEE, C.S.; SUTHERLAND, R.L. Effect of Sodium Butyrate on Estrogen Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor Gene Expression in Human Breast Cancer Cell Lines. *J Biol Chem*. Sep 5;267(25):18008-12,1992.
- DESLAURIERS, J.; GRÉGOIRE, J.; Clinical and Surgical Staging of Non-Small Cell Lung Cancer. *Chest* 117: 96s – 103s,2000.
- DOKMANOVIC, M.; MARKS, P.A. Prospects: Histone Deacetylase inhibitors. *J. Cell Biochem.* 96:293–304,2005.
- DY, G. K.; ADJEI, A.A. Novel Targets for Lung Cancer Therapy: Part II. *J. Clin. Oncol.* 20: 3016–3028,2002.

EGGER,G.;LIANG, G.; APARICIO, A; JONES, P.A. Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature* 429:457–463,2004.

EL-RAYES, B.F.; LORUSSO, P.M. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *Br. J. Cancer* 91: 418-24,2004.

FERREIRA,C.G.;HUISMAN,C.;GIACCONE, G.Novel Approaches to the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 41: 57–77,2002.

GLASER,K.B.;STAVER, M.J.; WARING, J.F.; STENDER, J.; ULRICH, R.G.; DAVIDSEN, S.K. Gene Expression Profiling of Multiple Histone Deacetylase (HDAC) inhibitors: Defining a Common Gene Set Produced By HDAC inhibition in T24 and Mda Carcinoma Cell Lines. *Mol. Cancer Ther.* 2:151–163,2003.

GUI,C.Y.; NGO,L.; XU,W.S; RICHON,V.M.; MARKS,P.A. Histone Deacetylase (HDAC) inhibitor Activation of P21waf1 involves Changes in Promoter-Associated Proteins, including HDAC1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:1241–1246,2004.

HACKEL,P.O.;ZWICK,E.;PRENZEL,N.;ULLRICH,A. Epidermal Growth Factor Receptors: Critical Mediators of Multiple Receptor Pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11: 184–189,1999.

HARRIS,R.C.;CHUNG,E.;COFFEY,R.J. EGF receptor Ligands. *Exp Cell Res* 284:2–13,2003.

JAENISCH,R.;BIRD,A. Epigenetics regulation of the gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33:245-54,2003.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M.J.; *Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin.* Mar;56(2):106-30,2006.

JOHNSTONE, R. W. Histone-Deacetylase inhibitors: Novel Drugs for the Treatment of Cancer. *Nature Rev. Drug Discov.* 1:287–299,2002.

JORISSEN,R.N.;WALKER, F.; POULIOT, N.;GARRETT, T.P.J.; WARD, C.W.; BURGESS, A.W. Epidermal Growth Factor Receptor: Mechanisms of Activation and Signaling. *Exp. Cell Res.* 284: 31-53,2003.

KIM, H.; AND MULLER, W. J. The Role of The Epidermal Growth Factor Receptor Family in Mammary Tumorigenesis and Metastasis. *Exp. Cell Res.*, 253: 78–87,1999.

KODANI, M.; IGISHI, T.; MATSUMOTO, S.; CHIKUMI, H.; SHIGEOKA, Y.; NAKANISHI, H.; MORITA, M.; YASUDA, K.; HITSUDA, Y.; SHIMIZU, E. Suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway is a determinant of the sensitivity to a novel histone deacetylase inhibitor, FK228, in lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 13:477-83,2005.

KOURAKLIS,G.; THEOCHARIS, S. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review). *Oncol Rep.* 15:489-94,2006.

KRIS, M.G.; NATALE, R.B.; HERBST, R.S.; LYNCH, T.J.; PRAGER, D.; BELANI, C.P.; SCHILLER, J.H.; KELLY, K.; SPIRIDONIDIS, H.; SANDLER, A.; ALBAIN, K.S.; CELLA, D.; WOLF, M.K.; AVERBUCH, S.D.; OCHS, J.J.; KAY, A.C. Efficacy of Gefitinib, an inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in Symptomatic Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Randomized Trial. *Jama* 290:2149–58,2003.

KURODA, J.; URADE, M.; KISHIMOTO, H.; NOGUCHI, K.; HASHITANI, S.; SAKURAI, K.; NISHIMURA, N.; HASHIMOTO-TAMAOKI, T. Promotion of cell differentiation, and suppression of cell growth and cyclooxygenase-2 expression by differentiation-inducing agents in human oral squamous carcinoma SCC25 cells. *Int J Oncol.* 26:361-7,2005.

LUO, J.; LI, M.; TANG, Y.; LASZKOWSKA, M.; ROEDER, R.G.; GU, W. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2259–2264,2004.

LYNCH, T.J.; BELL, D.W.; SORDELLA, R.; GURUBHAGAVATULA, S.; OKIMOTO, R.A.; BRANNIGAN, B.W.; HARRIS, P.L.; HASERLAT, S.M.; SUPKO, J.G.; HALUSKA, F.G.; LOUIS, D.N.; CHRISTIANI, D.C.; SETTLEMAN, J.; HABER, D.A. Platinum-Based Versus Non-Platinum-Based Chemotherapy in advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of The Published Literature. *J Clin Oncol* 23:2926–36,2005.

LYNCH, T.J.; BELL, D.W.; SORDELLA, R.; GURUBHAGAVATULA, S.; OKIMOTO, R.A.; BRANNIGAN, B.W.; HARRIS, P.L.; HASERLAT, S.M.; SUPKO, J.G.; HALUSKA, F.G.; LOUIS, D.N.; CHRISTIANI, D.C.; SETTLEMAN, J.; HABER, D.A. (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer To Gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129–39.

MAYO, M.W.; DENLINGER, C.E.; BROAD, R.M.; YEUNG, F.; REILLY, E.T.; SHI, Y.; JONES, D.R. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway. *J. Biol Chem.* May 23;278(21):18980-9,2003

Ministério da Saúde/INCA. Estimativas da incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Em [Http://www.inca.org.br/Estimativas/2006/Versaofinal.Pdf](http://www.inca.org.br/Estimativas/2006/Versaofinal.Pdf)

MINUCCI, S.; PELICCI, P.G. Histone Deacetylase inhibitors and the Promise of Epigenetic (and More) Treatments for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6:38–51,2006.

MINUCCI, S.; NERVI, C.; LO COCO, F.; PELICCI, P. G. Histone Deacetylases: A Common Molecular Target for Differentiation Treatment of Acute Myeloid Leukemias? *Oncogene* 20:3110–3115,2001.

MORA, PAR. (2004.) Análise de sobrevivência em pacientes com câncer de pulmão [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro;

MOUNTAIN, C.F. Revisions in the international System for Staging Lung Cancer. *Chest.*;111(6):1710-7,1997.



NEWTON, C.R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L.E.; POWELL, S.J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J.C. AND MARKHAM, A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) *Nucl. Acids Res.* 17: 2503-2516,1989.

OSADA, H.; TATEMATSU, Y.; SAITO, H.; YATABE, Y.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. Reduced Expression of Class I Histone Deacetylase Genes is Associated With Poor Prognosis in Lung Cancer Patients. *In t. J. Cancer* 112:26–32,2004.

PAEZ, J.G.; JANNE, P.A.; LEE, J.C.; TRACY, S.; GREULICH, H.; GABRIEL, S.; HERMAN, P.; KAYE, F.J.; LINDEMAN, N.; BOGGON, T.J.; NAOKI, K.; SASAKI, H.; FUJII, Y.; ECK, M.J.; SELLERS, W.R.; JOHNSON, B.E.; MEYERSON, M. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation With Clinical Response To Gefitinib Therapy. *Science* 304:1497–500,2004.

PAO, W.; MILLER, V.; ZAKOWSKI, M.; DOHERTY, J.; POLITI, K.; SARKARIA, I.; SINGH, B.; HEELAN, R.; RUSCH, V.; FULTON, L.; MARDIS, E.; KUPFER, D.; WILSON, R.; KRIS, M.; VARMUS, H. EGF Receptor Gene Mutations are Common in Lung Cancers From “Never Smokers” and are Associated With Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib. *Proc Natl Acad Sci Usa* 101:13306–11,2004.

PEDERSEN, M.W.; MELTORN, M.; DAMSTRUP, L.; POULSEN, H.S. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 12:745–760,2001.

PRASAD, K.N. Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sci* 27: 1351,1980

PRENZEL, N.; FISCHER, O. M.; STREIT, S.; HART, S. AND ULLRICH, A. The Epidermal Growth Factor Receptor Family as a Central Element for Cellular Signal Transduction and Diversification. *Endocr. Relat. Cancer*, 8: 11–31,2001.

RAYMOND, E.; FAIVRE, S.; ARMAND, J.P. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 60(suppl 1):15-23,2000.

REINMUTH, N.; BRANDT, B.; KUNZE, W.P.; JUNKER, K.; THOMAS, M.; ACHATZY, R.; SCHELD, H.H.; SEMIK, M. Ploidy, Expression of erbB1, erbB2, p53 and amplification of erbB1, erbB2, erbB3 in Non small Cell Lung Cancer. *Eur Resp J* 16:991–6,2000.

RIGGS, M. G.; WHITTAKER, R. G.; NEUMANN, J. R.; INGRAM, V. M. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells *Nature* 268, 462–464,1977.

ROMBOUTS, K.; KNITTEL, T.; MACHESKY, L.; BRAET, F.; WIELANT, A.; HELLEMANS, K.; DE BLESER, P.; GELMAN, I.; RAMADORI, G.; GEERTS, A. Actin Filament formation, Reorganization and Migration Are Impaired in Hepatic Stellate Cells Under influence of Trichostatin A, a Histone Deacetylase inhibitor. *Journal of Hepatology* 37:788–796,2002.

ROYALL, D.; WOLEVER, T.M.S.; JEEJEEBHOY, K. Clinical significance of colonic fermentation. *The Am J Gastroenterol* 85:1307-12,1990.

RUCKDESCHEL, J.C.; SCHWARTZ, A.G.; BEPLER, G.; COPPAGE, L.; LONARDO, F.; KUCUK, O. Cancer of the lung: non-small cell lung cancer and small cell lung cancer. in : Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. *Clinical Oncology*. 3 ed. Philadelphia: Elsevier in c. 2004:3205.

SAMBUCETTI, L.C.; FISCHER, D.D.; ZABLUDOFF, S.; KWON, P.O.; CHAMBERLIN, H.; TROGANI, N.; XU, H.; COHEN, D. Histone Deacetylase inhibition Selectively Alters the Activity and Expression of Cell Cycle Proteins Leading to Specific Chromatin Acetylation and Antiproliferative Effects. *J Biol Chem* 274:34940–7,1999.

SANDOR, V.; SENDEROWICZ, A.; MERTINS, S.; SACKETT, D.; SAUSVILLE, E.; BLAGOSKLONNY, M.V. and BATES, S.E. P21-Dependent G(1) Arrest With Downregulation of Cyclin D1 and Upregulation of Cyclin E by the Histone Deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer* 83:817–25,2000.

SASAKI, H.; MORIYAMA, S.; NAKASHIMA, Y.; KOBAYASHI, Y.; KIRIYAMA, M.; FUKAI, I.; SCHILLER, J.H.; HARRINGTON, D.; BELANI, C.P.; LANGER, C.; SANDLER, A.; KROOK, J.; ZHU, J.; JOHNSON, D.H. Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 346:92–8,2002.

TOH, Y.; OHGA, T.; ENDO, K.; ADACHI, E.; KUSUMOTO, H.; HARAGUCHI, M.; OKAMURA, T.; NICOLSON, G.L. Expression of the Metastasis- Associated MTA1 Protein and its Relationship to Deacetylation of the Histone H4 in Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Int. J. Cancer* 110:362–7,2004.

UEHARA, C.; JAMNIK, S.; SANTORO, I.L. Câncer de pulmão. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 266-276, abr./jun. 1998.

UNGERSTEDT, J.S.; SOWAM Y.; XU, W.S.; SHAO, Y.; DOKMANOVIC, M.; PEREZ, G.; NGO, L.; HOLMGREN, A.; JIANG, X.; MARKS, P.A. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:673–678,2005.

User Bulletin 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System - The Perkin-Elmer Corporation – 1997 ([http://www.ukl.uni-freiburg.de/core-facility/taqman/user\\_bulletin\\_2.pdf](http://www.ukl.uni-freiburg.de/core-facility/taqman/user_bulletin_2.pdf))

WELLS, A. The epidermal growth factor receptor (EGFR) – a new target in cancer therapy. *Signal* 1:4-11,2000.

XIAODAN, YU, Z. SHENG GUO, MONICA G. MARCU, LEN NECKERS, DAO M. NGUYEN,G. AARON CHEN, DAVID S. SCHRUMP. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228 *J Natl Cancer in st.* 94:504-13,2002.

YAMAKAWA, Y.; FUJII, Y. Histone Deacetylase 1 mRNA Expression in Lung Cancer. *Lung Cancer* 46:171–8,2004.

ZHANG, X.; YASHIRO, M.; REN, J.; HIRAKAWA, K. Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, increases the chemosensitivity of anticancer drugs in gastric cancer cell lines. *Oncol Rep. Sep*;16(3):563-8,2006.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)