Izabella Costa Santos

Análise das proteínas EGFR e p-Akt como fatores preditivos a resposta terapêutica à Quimioterapia e Radioterapia combinada ao Erlotinibe em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, localmente avançado.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Pedro Michaluart Júnior

São Paulo

2010

Izabella Costa Santos

Análise das proteínas EGFR e p-Akt como fatores preditivos a resposta terapêutica à Quimioterapia e Radioterapia combinada ao Erlotinibe em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, localmente avançado.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Pedro Michaluart Júnior

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Izabella Costa

Análise das proteínas EGFR e p-Akt como fatores preditivos a resposta terapêutica à quimioterapia e radioterapia combinada ao Erlotinibe em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, localmente avançado / Izabella Costa Santos. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Pedro Michaluart Júnior.

Descritores: 1.Receptor do fator de crescimento epidérmico 2.Erlotinibe
3.Neoplasias de cabeça e pescoço 4.Radioterapia 5.Carcinoma de células escamosas

USP/FM/DBD-430/10

Agradecimentos

Aos meus pais, Novais e Izabel, por todo apoio, incentivo e orientação durante toda minha vida.

Ao meu filho Matheus, que muitas vezes sem a atenção devida, soube no seu modo infantil me incentivar nesse período.

Ao Bruno, que mais do que com incentivo e apoio, foi um companheiro nessa jornada.

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram pertos para o apoio necessário nas dificuldades.

Ao Prof Dr Pedro Michaluart Júnior, pela atenção, orientação, incentivo e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Prof Dr Fernando Dias pelo apoio, incentivo e oportunidades na minha formação.

Aos Drs Emilson Q Freitas, Terence P Farias, Pedro Medeiros, José Roberto N Soares, Roberto A Lima, Mauro Barbosa, Walber Jurema, Geraldo M Sá (in memorium) e Fernando Botelho (in memorium) pela amizade e os ensinamentos durante minha formação em Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Ao Prof Dr Alberto Ferraz pela confiança, incentivo e oportunidade proporcionada com a realização deste trabalho.

Aos componentes da banca de Qualificação Prof Dr Marcos Kulesar, Prof Dr Sérgio Arap e Prof Dr Dorival Carlucci pelas sugestões e orientações na melhoria deste trabalho.

Ao Dr Paulo Antônio Farias pela confiança, apoio e colaboração.

Aos Pesquisadores Luís Felipe R Pinto, Vagner Bernardo, Tatiana Simão, Davy Raposo, Paulo Thiago que foram mais que colaboradores do estudo e permitiram com que hoje o estudo estivesse concluído.

Aos pacientes e familiares que participaram e acreditaram neste estudo e que continuam a ser acompanhados no INCA.

Normatização Adotada

Tese de acordo com as normas em vigor no momento da Publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors
(Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e
Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anelliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F.
Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª
edição São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação: 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in
Index medicus.

Tese escrita conforme o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	V
LISTA DE SIGLAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
SUMMARY	X
PREÂMBULO	XI
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estatística	1
1.2 Conceitos	2
1.3 Estudos	15
2.0 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo principal	21
2.2 Objetivo secundário	21
3.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1 Elegibilidade do paciente	23
3.2 Terapêutica utilizada	25
3.3 Aquisição do material para análise histopatológica e molecular	26
3.4 Descrição da técnica da metodologia empregada	27
3.5 Análise Estatística	36
4.0 RESULTADOS	37
4.1 Disposição e características dos pacientes	37
4.2 Análise da expressão do EGFR e p-Akt por imuno-histoquímica	40
4.3 Análise do perfil mutacional de EGFR, Braf e Kras	46
5.0 DISCUSSÃO	49
6.0 CONCLUSÕES	52
7.0 REFERÊNCIAS	53

LISTA DE SIGLAS

EGF Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

TGF Transforming Growth Factor

GPCR Proteincoupled Receptors

IGFI Insulin-like Growth Factor

RTK Receptor Tirosina Quinase

MAPK Mitogen-activated Protein Kinase

PI3-K Fosfatidilinositol 3 Cinase

Akt Cinase Treonina-serina

MAbs Anticorpos Monoclonais

CECCP Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

PCR Polimerase Chain Reaction

VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios de Inclusão do Estudo.

Tabela 2- Critérios de Exclusão do Estudo.

Tabela 3- Especificações dos anticorpos utilizados para análise do EGFR e p-Akt.

Tabela 4- Índice de positividade da Imuno-histoquímica.

Tabela 5- Condições das reações de PCR.

Tabela 6- Características iniciais dos pacientes.

Tabela 7- Resposta ao tratamento.

Tabela 8- Expressão do EGFR e do p-Akt por sítio anatômico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do EGFR e suas alterações após sua fosforilação.

Figura 2- Vias de sinalização do EGFR e seus efeitos celulares.

Figura 3- Fotomicrografia representativa da imunoexpressão de EGFR.

Figura 4- Análise de EGFR e p-Akt por sítio.

Figura 5- Análise da sobrevida relacionando sítio anatômico e estadiamento.

Figura 6- Análise da sobrevida relacionando as proteínas EGFR e p-Akt de acordo com sítio anatômico.

Figura 7- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação dos éxons 18,19,20 e 21 do *EGFR*.

Figura 8- Gel de agarose a 2% mostrando amplificação do Braf.

Figura 9- Sequenciamento do EGFR sem mutação.

RESUMO

Santos I C. Análise das proteínas EGFR e p-Akt como fatores preditivos a resposta terapêutica à Quimioterapia e Radioterapia combinada ao Erlotinibe em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, localmente avançado. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução: O Erlotinibe é um inibidor oral da tirosina quinase localizada no domínio intracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). É uma droga ativa contra o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECCP) que apresenta alta expressão deste receptor, demonstrando desta forma possível sinergismo com a quimioterapia e a radioterapia. **Objetivo:** Avaliar a expressão do EGFR e da proteína Akt fosforilada por imuno-histoquímica como fator preditivo a resposta terapêutica ao Erlotinibe em um estudo fase II que incluiu 32 pacientes com CECCP localmente avançado; também foram analisados mutações do gene EGFR nos éxons 18,19,20 e 21. **Pacientes e métodos:** Neste estudo pacientes portadores de CECCP localmente avançado foram tratados com uma combinação de Cisplatina 100mg/m² intravenoso, administrada nos dias 8, 29 e 50 do tratamento; e radioterapia na dose de 70 Gy administrada em 39 frações a partir do dia 8. O Erlotinibe foi iniciado uma semana antes da radioterapia e mantido até o último dia da radioterapia. Biópsias pré-tratamento, extraídas dos blocos de parafina, foram analisadas por imuno-histoquímica para avaliar a expressão do EGFR e da Akt fosforilada. O resultado dessas amostras foi quantificado por um programa de análise digital de imagem. O status mutacional do gene EGFR (nos éxons 18, 19,20 e 21) foi analisado utilizando PCR convencional e sequenciamento. **Resultados:** A resposta completa ao tratamento ocorreu em vinte pacientes (62,5%), sendo que dois foram tratados com Laringectomia de resgate e ficaram sem evidência de doença. A análise de sobrevida com relação ao estadiamento e com o sítio anatômico evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p=0.05$). A análise das proteínas EGFR e p-Akt por imuno-histoquímica, quando os sítios estavam agrupados não apresentou valor preditivo de resposta ao tratamento; no entanto ao avaliarmos os sítios anatômicos separadamente, apenas a quantificação de EGFR em hipofaringe foi uma variável preditiva de resposta ao tratamento com erlotinibe ($p=0.05$). Em relação às análises moleculares nenhuma mutação foi detectada no sequenciamento dos éxons estudados da proteína EGFR. **Conclusão:** A expressão do EGFR parece ser um fator preditivo à resposta terapêutica, no entanto outros estudos com identificação de outros biomarcadores e amostras maiores são necessários para elucidar quais pacientes com CECCP podem ser beneficiados com este tratamento.

Descritores: Receptor do fator de crescimento epidérmico, Erlotinibe, Neoplasias de cabeça e pescoço; Radioterapia; Carcinoma de células escamosas.

SUMMARY

Expression of EGFR and p-Akt proteins as predictive factors of therapeutic response to Erlotinib Combined with Cisplatin and Radiotherapy in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.

Purpose: Erlotinib, an oral tyrosine-kinase inhibitor, is active against squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) and possibly has a synergistic interaction with chemotherapy and radiotherapy. We investigated the expression of EGFR and phosphorylated AKT by immunohistochemistry as predictors of response to Erlotinib in a cohort of 32 locally advanced HNSCC, enrolled in a Phase II trial. In addition, we assessed mutation on hotspots of EGFR gene (exons18,19,20,21). **Patients and Methods:** This study was conducted in a Phase I/II trial of cisplatin 100 mg/m² on days 8, 29 and 50; and radiotherapy 70 Gy starting on day 8. Erlotinib was started orally 1 week before chemo radiation and continued daily just to the last day of chemo radiation. Pretreatment archival tumor specimens were evaluated for EGFR and phosphorylated-Akt (p-Akt) by immunohistochemistry. These immunostains were quantified by digital image analysis. EGFR gene mutational status was also assessed using conventional PCR and sequencing. **Results:** Complete response to treatment occurred in twenty patients (62.5%), and two were treated with salvage laryngectomy and were without evidence of disease. Survival analysis in relation to the staging and the tumor site showed a statistically significant difference ($p = 0.05$). Analysis of EGFR protein and p-Akt by immunohistochemistry, when sites were grouped showed no predictive value for treatment response, however when evaluating the anatomical sites separately, only the quantification of EGFR in the hypopharynx was a significant predictor of response to treatment with erlotinib ($p = 0.05$). Regarding the molecular analysis no mutations were detected in the sequencing of the exons studied EGFR protein. **Conclusion:** The expression of EGFR seems to be a predictive factor for response to therapy, although other studies with identification of other biomarkers and larger samples are needed to elucidate which patients may benefit HNSCC with this treatment.

Keywords: chemotherapy; epidermal growth factor receptor; erlotinib; head and neck neoplasms; radiotherapy; squamous cell carcinoma.

Preâmbulo:

Esse é um estudo clínico fase I/II cujo protocolo foi desenhado no Serviço de Oncologia Clínica em 2002, quando os dados iniciais da atividade das drogas anti-EGFR foram publicados. Nesta época, dados preliminares demonstravam a importância do EGFR como fator prognóstico, bem como sua possível relação com a proliferação celular e com a radioresistência. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Inca em 2003. A inclusão dos pacientes ocorreu entre abril de 2004 e novembro de 2006; foram colhidas biópsias para exame histopatológico e biópsias a fresco as quais foram armazenadas no Departamento de Anatomia Patológica e no Banco de Tumores do Inca visando estudos moleculares futuros na tentativa de desenvolver modelos preditivos e prognósticos.

Nenhuma mudança no desenho do estudo foi realizada, os pacientes haviam autorizado no termo de Consentimento Livre e Esclarecido a coleta e armazenamento do material biopsiado para que fosse estudado posteriormente.

O trabalho inicial do estudo clínico fase I/II foi concluído e foi publicado no *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*; 2010 abril 24.

INTRODUÇÃO

1.1 Estatística

O Câncer de Cabeça e Pescoço corresponde ao sexto mais comum no mundo. Segundo as estimativas da Sociedade Americana de Câncer ocorreram cerca de 48.010 casos-novos de neoplasia maligna de cabeça e pescoço em 2009 nos Estados Unidos ¹. No Brasil, segundo a estimativa de 2009 do Instituto Nacional de Câncer, o número de novos casos de câncer de boca e laringe em 2009 correspondeu a 14.120 e 9320, respectivamente ². O número estimado de mortes devido a estes sítios foi de 6064 mortes por câncer de boca e 3402 mortes por câncer de laringe. Grande parte destes pacientes se apresentava em estágios avançados na ocasião do seu diagnóstico².

A grande maioria dos pacientes com estas neoplasias tem diversas comorbidades associadas, sejam conseqüentes diretamente ao tabagismo e/ou etilismo ou devido a outras doenças crônicas, além disso, trata-se de uma população com elevado risco de tumores primários em sítios distintos pelo fenômeno descrito como “campo de cancerização”.

O tratamento padrão para pacientes com tumores da cabeça e pescoço avançado é Cirurgia associada à RXT. Isso implicará em seqüelas físicas, funcionais, sociais e psíquicas que afetam negativamente a qualidade de vida. O tratamento combinado com quimioterapia e radioterapia se estabeleceu como tratamento padrão para pacientes com tumores de cabeça e pescoço irresssecáveis. O tratamento combinado tem sobrevida global semelhante em alguns estudos de tumores avançados. O principal foco de inúmeros estudos de fase I, fase II e de consensos

internacionais passou a ser a busca da maior sobrevida ou da cura, associada à preservação anatômica do órgão e de sua função ³. Porém quais pacientes irão responder aos protocolos de preservação de órgão, é uma questão ainda sem resposta.

1.2 Conceitos

O câncer é uma doença genética complexa derivada do acúmulo de várias modificações no genoma celular. As novas técnicas de biologia molecular permitiram um maior conhecimento da cascata bioquímica que converte as células benignas normais em malignas. Existe enorme interesse mundial na caracterização das alterações genéticas dos tumores malignos para o uso de biomarcadores que possam prever o comportamento clínico e possíveis alvos de terapia gênica e quimio-prevenção.

A descoberta dos oncogenes e seus precursores os proto-oncogenes, destacou-se pelo fato de como estes agindo por meio de seus produtos, as proteínas, alteravam o comportamento celular. Alterações desses genes que afetam o controle da sua expressão ou a estrutura das suas proteínas codificadas podem levar ao excesso de genes ativos promotores do crescimento. Uma vez formados, tais oncogenes procedem a multiplicação celular e, assim, tem um papel central na patogênese do câncer ⁴.

Muito do funcionamento das oncoproteínas derivam de estudos de como as células normais regulam seu crescimento e divisão. Células normais recebem de seus arredores sinais estimulatórios do crescimento, estes são processados e integrados por

circuitos complexos dentro da célula que decide se crescimento celular e divisão são ou não apropriados. A necessidade de receber sinais extracelulares na superfície e transferi-los para o citoplasma gera um problema biológico. Os espaços intra e extracelulares são separados pela membrana plasmática que é uma bicamada lipídica, que bloqueia efetivamente o movimento da grande maioria das moléculas, excetuando-se as muito pequenas, o que resulta em concentrações muito diferentes da maioria das moléculas (incluindo íons) em cada um dos lados. O processo de transdução (passagem) de sinais através da membrana faz parte de um processo de sinalização na comunicação célula-célula. Na maior parte os sinais transmitidos entre células são carregados por proteínas. Existem células com capacidade de liberar proteínas para o espaço extracelular e células receptoras que são capazes de sentir a presença dessas proteínas nos seus arredores. Muitas vezes a regulação ineficaz dos sinais que as células normais recebem do ambiente que as circunda tem papel central na formação de células cancerígenas ⁴.

A arquitetura apropriada dos tecidos depende totalmente da manutenção de proporções adequadas de diferentes constituintes de tipos celulares em um tecido, substituindo células que estejam faltando ou descartando células excedentes ou desnecessárias. Todas essas funções dependem da cooperação entre grandes grupos de células, em um tecido vivo as células estão constantemente trocando informações umas com as outras. Muito dessa troca é mediado por fatores de crescimento (GFs); que são pequenas proteínas liberadas por algumas células que transitam pelo espaço intercelular carregando consigo mensagens biológicas específicas e, eventualmente, influenciando outras células.

Estudos de como as células trocam sinais umas com as outras isolaram diversas proteínas envolvidas em sinalização célula-célula e determinaram a sequência de aminoácidos dessas proteínas. Inesperadamente, conexões bastante próximas foram descobertas entre essas proteínas de sinalização e os produtos protéicos de certos oncogenes.

Um dos primeiros fatores de crescimento a ser descoberto foi o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF). Verificou-se que o EGF se ligava à superfície das células e que em algumas havia crescimento e que em outras isso não ocorria. Daí a observação de que havia o envolvimento de uma proteína de superfície celular, um receptor de EGF (EGF-R), que era capaz de reconhecer especificamente EGF no espaço extracelular, ligar-se a ele e informar ao interior celular que um encontro com EGF ocorreu.

O receptor do fator de crescimento epidérmico, também conhecido como EGFR (em inglês, Epidermal Growth Factor Receptor), pertence à família dos receptores tirosina quinase (RTK – Receptor Tyrosine Kinase) e está envolvido em processos normais de proliferação, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação celular. No entanto, a atividade exacerbada deste receptor parece estar envolvida com o desenvolvimento, progressão e invasão de células tumorais ^{5,6}.

Com o isolamento e sequenciamento da proteína do EGFR foi possível a descoberta de suas características estruturais principais e do seu funcionamento. Trata-se de uma proteína com três domínios: um domínio N-terminal de 621 resíduos de aminoácidos que está exposto no espaço extracelular, denominado ectodomínio, e que está envolvido no reconhecimento e ligação ao EGF. Um segundo domínio de glicoproteínas de superfície celular e 23 resíduos de aminoácidos, denominado

transmembrana; que faz seu caminho de fora da célula, através da bicamada lipídica da membrana plasmática, para o citoplasma; este possui uma linha contínua de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que residem bem no ambiente bastante hidrofóbico da bicamada lipídica da membrana plasmática. Por fim, um terceiro domínio de 542 resíduos na porção C-terminal do receptor que se estende para o interior do citoplasma.

Em humanos, a família do EGFR é composta de quatro membros, são eles o ErbB-1 (ou EGFR), ErbB-2 (ou HER2), ErbB-3 (ou HER3) e ErbB-4 (ou HER4). Quando ativos estes receptores formam dímeros entre eles e se transfosforilam, gerando sinais intracelulares. Os receptores EGFR e HER4 são considerados autônomos, pois após sua ligação com o ligante no domínio extracelular, eles formam dímeros e levam a formação da cascata de sinalização no interior da célula. Enquanto o HER2 não apresenta nenhum ligante solúvel descrito, se tornando ativo pela sua capacidade de formar dímeros espontaneamente. Este membro é considerado um bom receptor para a formação de heterodímeros com outros ErbBs ativados por ligantes. Já o receptor ErbB-3 não tem a capacidade de gerar sinais isoladamente, ele precisa de um dos componentes da família ErbB para levar a cascata de sinalização, pois sua estrutura tirosina quinase intracelular não apresenta atividade catalítica ^{5,6}.

Em 1984 com a sequência do EGFR identificada verificou-se que ele fazia parte da família de ErbB/HER. Essa família consiste em quatro receptores de tirosina-quinase (TK) que têm uma estrutura semelhante que inclui EGFR (Her1 ou Erb-1), Her2/neu ou Erb-2, Her3 ou Erb-3, e Her4 ou Erb-4. Todos esses receptores são glicoproteínas transmembrana formados por domínios: extracelular que é o ligante; o transmembrana hidrofóbico; e o domínio intracelular que é o domínio tirosina-

quinase e com fosforilação de múltiplos locais. Como esse fator de crescimento alterado poderia atuar como uma oncoproteína (?). Com o estudo da sequência protéica verificou-se que o Oncogene erbB do vírus da Eritroblastose aviária não possuía as seqüências presentes no ectodomínio N-terminal do receptor de EGF dessa forma ela não poderia reconhecer e ligar-se ao EGF, mas ainda assim atuava como um potente estimulador da proliferação celular. De alguma forma a deleção do ectodomínio permitiu que a proteína receptora EGF-truncada resultante enviasse sinais estimulatórios de crescimento para as células de modo constitutivo, completamente independente de EGF. Mutações em genes que codificam receptores de fatores de transcrição, incluindo os receptores especificamente truncados, podem desencadear uma ativação desses receptores de forma independente do ligante. A descoberta da conexão ErbB-EGF-R originou uma explicação simples e apropriada para um traço particular das células cancerígenas: a oncoproteína ErbB libera sinais muito similares àqueles emitidos por um receptor ativado pelo ligante EGF. No entanto, diferentemente do receptor EGF, a oncoproteína ErbB é capaz de enviar para a célula sinais estimuladores de crescimento constantes e insistentes, persuadindo, assim, a célula de que quantidades substanciais de EGF estão presentes em seus arredores, quando na verdade não há nenhum.

Doze ligantes da família de ErbB foram identificados. Os ligantes, tais qual o Transforming Growth Factor (TGF-) ou o Epidermal Growth Factor (EGF) ligam-se ao domínio EGFR extracelular, induzindo homo ou heterodimerização do receptor com outro receptor do mesmo tipo ou com outros da família ErbB/HER. O EGFR não só interage com outros ErbBs, mas também com outros receptores, posicionando o EGFR como um transdutor central de múltiplos sinais, como os da G protein-coupled

receptors (GPCRs), assim como vários receptores de tirosina quinase, como o insulin-like growth factor I receptor (IGFI). O resultado deste processo de ativação é promoção da função tirosina-quinase (TK) intrínseca do receptor e a autofosforilação.

A primeira etapa para o início da cascata de sinalização de receptores tirosina quinase (RTKs) é a auto-fosforilação, como é o caso do HER2, ou a interação entre o receptor e seu ligante, como ocorre com os outros três membros restantes da família do EGFR.

O receptor HER2 é o único membro da família que não possui nenhuma molécula ligante já descrita e, que possui a capacidade de auto-ativação através da formação espontânea de dímeros HER2:HER2 ou com outros membros da família ErbB, de maneira aleatória, devido à singularidade da sua estrutura extracelular. Ele é capaz de ativar outro membro da família sem este ter interagido com o seu ligante⁷.

Os outros membros, EGFR, HER3 e HER4, quando não ativados por HER2 espontaneamente, precisam ligar às suas respectivas moléculas para a sua ativação. Esta ligação ocorre na região extracelular deste receptor, constituída por quatro estruturas diferentes, são elas: domínios I, II, III e IV (também conhecidos como domínios L1, S1, L2 e S2). Estas estruturas extracelulares mantêm uma conformação de baixa afinidade ao ligante, antes da interação deste com o receptor. Esta conformação é caracterizada pela interação entre os domínios II e IV, através da molécula *dimerization loop*. Quando o EGF, por exemplo, se aproxima e passa a interagir com o receptor, ele muda sua conformação e aquela interação entre os domínios II e IV se desfaz, dando lugar a aproximação dos domínios I e III, gerando a forma ativa do receptor (com mais afinidade pelo EGF) (Figura 1A). Nesta fase de mudança estrutural do EGFR, a molécula *dimerization loop*, que antes ligava os

domínios II e IV, agora está exposta, no lado oposto da ligação receptor: ligante e, promoverá a interação com outro receptor EGFR, formando o dímero, sendo chamada agora de β -hairpin loop (Figura 1B) ^{8,9}.

FIGURA 1: (A) Estruturas do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Adaptado de Zhang *et al.* 2006 ¹⁰). (B) Alterações estruturais da molécula após a ativação do receptor pelo ligante (Adaptado de Bublil and Yarden 2007 ⁸). (C) Processo de ativação do EGFR pela ligação com seu ligante EGF. Na forma inativa, o receptor apresenta uma conformação com menos afinidade pelo ligante. Quando a molécula de EGF se aproxima, o receptor assume outra conformação estrutural, com maior afinidade pelo seu ligante, podendo interagir com o mesmo e formar dímero com outro receptor ativado. Após a formação do dímero, o domínio quinase intracelular é ativado e passa a fosforilar diversas moléculas, levando à cascata de sinalização (Adaptado de Zhang *et al.* 2006 ¹⁰).

Os sinais intracelulares produzidos pela família dos receptores EGF não apresentam uma única via. É um sistema complexo de possibilidades de fosforilação, que envolve a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK – mitogen-activated protein kinase), a sinalização do fosfatidil-inositol polifosfato (PIP – phosphatidylinositol polyphosphate), dentre outros ¹¹.

Todos os dímeros formados pela família dos receptores ErbB são capazes de ativar a via Ras/MAPK, enquanto apenas alguns dímeros de HER (HER3 e HER4) conseguem interagir diretamente com fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-K – phosphatidylinositol 3 kinase), os outros necessitam de uma proteína intermediária, Cbl-23, para mediar esta interação com PI3-K (Figura 2)⁷.

Figura 2: Ilustração das possíveis vias de sinalização do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e seus respectivos efeitos celulares.

Estas cascatas de sinalização podem levar a proliferação, adesão e diferenciação celular. Estas funções do receptor são determinantes para a atenção dos pesquisadores em observar a expressão e atividade de EGFR em células tumorais, já que este receptor é capaz de mediar uma série de etapas carcinogênicas ^{8,12}.

Observou-se um grande número de tumores humanos que carregam mutações pontuais em um dos três genes Ras presentes no genoma de mamíferos: H-ras, K-ras e N-ras. Significativamente, em cada um desses tumores, a mutação pontual que foi descoberta estava presente em um dos três códons específicos na fase de leitura de um gene ras. Como consequência, observou-se que todas as Oncoproteínas Ras (feitas tanto pelo gene H, K ou N-ras) carregavam substituições de aminoácidos nos resíduos 12, 61 ou 13 (menos freqüente). O oncogene ras claramente desencadeia muitas das mesmas mudanças nas células que haviam sido verificadas quando as células eram transformadas tanto com erbB/EGFR tanto com src ou sis. Em nível bioquímico, estava claro que ligantes de fatores de crescimento ativavam receptores de tirosina cinase, e que esses receptores respondiam ativando seus domínios de tirosina cinase citoplasmáticos. A fisiologia celular apontava fortemente para que erbB/EGFR e outros receptores de tirosina cinase operassem em uma via comum de sinalização com a Oncoproteína Ras. Essas várias oncoproteínas, possuidoras de funções bioquímicas diversas, foram identificadas como exercendo efeitos bastante similares nas células. Todas elas causaram o agrupamento de células em uma cultura em monocamada, a perda da inibição pelo contato, a aquisição de independência de ancoragem e a redução de requerimento celular de fatores de crescimento mitogênicos em seu meio de cultura. Essa função em comum sugeriu a participação em uma cascata comum de sinalização.

Uma conexão possível entre Ras e os receptores de tirosina cinase veio da descoberta de que um oncogene ras ativado fazia com que muitos tipos celulares produzissem e liberassem fatores de crescimento. Mais proeminente entre estes estava o fator de crescimento transformante α (TGF- α) um fator de crescimento similar ao EGF que foi identificado como sendo liberado por várias células transformadas por oncogenes ¹⁶. Ele atuaria de maneira autócrina para ativar receptores EGF presentes na superfície da célula desencadeando uma série de respostas similares às criadas por um mutante, constitutivamente ativado, receptor de EGF. Desta forma Ras parece operar upstream de um receptor de fator de crescimento em vez de ser um componente importante da cascata celular downstream do receptor. Esse esquema autócrino explica parte da função de ras que também é capaz de transformar células que não possuem receptores para os fatores de crescimento que ela (Ras) induziria. Evidências bioquímicas sugeriram que a ligação do ligante de receptores de fatores de crescimento leva rapidamente à ativação de Ras, havendo uma sinalização intracelular direta entre receptores de fatores de crescimento ativados por ligante e a proteína Ras.

Uma das rotas efetoras de Ras deriva da sua habilidade em associar-se e ativar PI3K, que é a Fosfatidilinositol 3 cinase, responsável por ligar um grupo fosfato ao hidroxil 3' da porção inositol do fosfatidilinositol imerso na membrana (PI). Uma vez que Ras tenha se associado e ativado PI3K, formando PIP3 _ grupo de cabeças de inositol fosforilados que irá atrair muitas proteínas citosólicas. A mais importante delas é a cinase treonina-serina chamada Akt, também conhecida como proteína cinase B (PKB). Essa associação de Akt/PKB com a membrana plasmática (junto com as fosforilações de Akt/PKB que se seguem) resulta na ativação funcional de Akt/PKB como uma cinase. Uma vez ativada por tais fosforilações, Akt/PKB passa a

fosforilar uma série de substratos protéicos que tem múltiplos efeitos na célula. Os três principais efeitos biológicos de Akt/PKB nas células são (1) auxiliar na sobrevivência celular ao reduzir a possibilidade de ativação do programa de suicídio apoptótico celular; (2) estimular a proliferação celular; (3) estimular o crescimento celular, no sentido mais estrito do termo, ou seja, estimulando aumentos no tamanho celular por aumento da síntese protéica. Além disso também exerce influência na motilidade celular. A rota envolvendo metabólitos de Akt/PKB é desregulada em uma série de tipos celulares de câncer humano a partir de modificações que em geral são bastante independentes da oncoproteína Ras. Em alguns tumores, como linfomas, cânceres de cabeça e pescoço e carcinomas de cólon, a enzima Akt/PKB é superexpressa e, presumivelmente, hiperativada ¹³.

A superexpressão do EGFR, gene amplificação, mutação, ou “rearrengement” tem sido demonstrada em tumores malignos de cabeça e pescoço. O EGFR é normalmente expresso no arranjo de células, e tem variabilidade na incidência de superexpressão ou na desregulação de tumores humanos.

O EGFR está presente em 90% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e a proteína é superexpressa em 38% a 47% dos casos. Esta superexpressão do EGFR é o resultado de um aumento da síntese do mRNA, assim como de uma diminuição de sua inibição. A superexpressão do EGFR é um evento que aparece cedo na carcinogênese do carcinoma de cabeça e pescoço; ela já está presente no campo de cancerização de pacientes com câncer, não existindo na mucosa de pacientes normais. Esta superexpressão vai aumentando continuamente em paralelo com as anormalidades histológicas, indo da hiperplasia para a displasia, carcinoma in

situ e finalmente carcinoma invasivo. O nível de EGFR está aumentado nos tumores avançados e pouco diferenciados.

A compreensão da estrutura e da função do EGFR permitiu o desenvolvimento de novas drogas específicas, cujo objetivo é inibir a ativação dos receptores e por consequência a transdução do sinal.

Existem diversas maneiras de bloquear a atividade do receptor de EGF. Podem ser usados anticorpos contra EGFR, inibidores de tirosina quinase específico para esta família de receptor e, a radioterapia combinando quimioterápicos para inibir EGFR e deixar a célula tumoral mais sensível ao tratamento.

Os anticorpos usados para bloquear a atividade de EGFR podem ser quiméricos, humanizados ou monoclonais. Os anticorpos quiméricos são aqueles em que a região constante das cadeias leves e pesadas são humanas e a região variável é proveniente de outro animal. Os anticorpos humanizados são aqueles em que a região constante das cadeias variáveis também são humanas e, apenas as regiões hipervariantes que provem de outro animal. Os anticorpos monoclonais (MAbs – *Monoclonal Antibodies*) são ou totalmente humanos, ou não. O ideal seria que todas as terapias fossem feitas com MAbs humanos, mas muitos anticorpos ainda estão sendo desenvolvidos. Enquanto isso, já se usa os três tipos de anticorpos para a terapia antitumoral. O anticorpo se liga ao EGFR e leva à sua degradação, ou a outros processos como: marca a célula tumoral para que esta seja destruída pelo sistema imune; ou pode interromper algumas etapas da tumorigênese, como proliferação, invasão e até mesmo levar a apoptose mediado pela mitocôndria. A resistência a esses anticorpos acontece pela ativação mutacional da via PI3K-Akt, em que passa haver um aumento na expressão dos receptores ErbB, refletindo um

possível efeito compensatório à degradação dos receptores mediados pelos anticorpos ¹⁴.

Os inibidores de tirosina quinase são moléculas que tem como alvo o bloqueio de receptores de tirosina quinase e, como estes receptores sempre apresentam algumas estruturas em comum, é possível desenvolver uma só droga capaz de bloquear dois receptores ao mesmo tempo. O Erlotinibe é um inibidor oral da Tirosina Quinase posicionada junto ao domínio intracelular do EGFR; é uma droga ativa contra Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (CECCP) avançado e possivelmente possui sinergismo com a quimioterapia e radioterapia ^{15, 16}.

A resistência contra estes fármacos é um pouco similar ao que acontece com os anticorpos, a célula passa a desenvolver uma via compensatória àquela bloqueada, fazendo com que a célula neoplásica não responda mais com eficiência ao tratamento. Outro fator de resistência são os receptores alvos se adaptarem ao tratamento e não serem mais bloqueados pela droga. Uma publicação de Normanno e Gullik, em 2006, mostrou a eficiência em bloquear a angiogênese, proliferação e invasão celular em tumores, por inibidores tirosina quinase ¹⁷.

Os tumores epidermóides de cabeça e pescoço estão entre os tumores sólidos que mais frequentemente expressam em grau elevado EGFR por PCR seqüencial, sendo, portanto, um candidato natural à utilização de inibidores do EGFR.

O status de mutação do Kras (gene intermediário na cascata de ativação da via do EGFR) foi recentemente correlacionado com o resultado de pacientes que usaram drogas que inibem a ação do EGFR. Pacientes com Kras mutado apresentam ativação contínua da cascata do EGFR independente do bloqueio da via pelo anticorpo.

Apesar desses resultados, o uso dos inibidores do EGFR como monoterapia tem tido resultados pequenos. A terapia direta com EGFR poderá ser otimizada pela identificação e seleção de quais pacientes terá benefício com a inibição do EGFR.

1.3 Estudos

Todos os progressos alcançados no ambiente das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, através do desenvolvimento de potentes combinações terapêuticas, só conseguirão atingir o resultado máximo caso empregados com critérios rigorosos.

É fundamental destacar que os pacientes deverão sofrer uma seleção em que pese o estado geral (*performance status*), as co-morbidades associadas, a idade e expectativa de vida, além de outros critérios a serem mais bem estudados, como: fatores prognósticos moleculares ou fatores preditivos de melhor resposta a terapia combinada, especialmente no que diz respeito à adição da terapia alvo-molecular.

O manejo desses pacientes é complexo e é de vital importância uma equipe multidisciplinar experiente e familiarizada com possíveis complicações relacionadas ao tratamento. Além do oncologista clínico, cirurgião de cabeça e pescoço e do radioterapeuta, há necessidade de diversos outros profissionais como: enfermagem, odontologista, fonoaudiólogo, nutricionista, psicólogo e assistente social. Toda a equipe deve atuar com o objetivo de oferecer o melhor suporte possível e buscar, além da máxima resposta terapêutica com preservação de órgão e sua função e do maior ganho em sobrevida global, com uma qualidade de vida digna.

Apesar dos melhores resultados com a incorporação da quimioterapia à radioterapia concomitante, grande parte dos pacientes com doença localmente

avanzada vai evoluir para progressão de doença regional ou à distância, o que não levou a grandes mudanças na sobrevida em cinco anos neste grupo.

Além disso, as toxicidades agudas e tardias são significantes, e podem impedir a adição de quimioterapia em grande parte dos pacientes. Assim, novas abordagens são justificadas na tentativa de melhorar os resultados de sobrevida com menor toxicidade.

Em 2000, Pignon et al.¹⁸ publicaram extensa meta-análise de dados individuais contendo 63 trabalhos e 10741 pacientes (*Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer – MACH-NC – Collaborative Group*), esta análise foi revista em 2004 com avaliação de 87 estudos e mais de 16.000 pacientes incluídos de 1965 até 2000. Nesta, demonstra-se um consistente, e estatisticamente significativo benefício em sobrevida com a adição da quimioterapia ao tratamento loco-regional. Atinge-se no grupo total, um benefício de 4% em cinco anos. Análises mais minuciosas demonstraram benefício reduzido tanto da quimioterapia adjuvante e da neoadjuvante.

No congresso American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2006, Machtay et al.¹⁹ analisaram 479 pacientes (3 estudos do RTOG) portadores de doença localmente avançada e submetidos a quimio-radioterapia concomitante. Em uma análise multivariada constataram que os seguintes fatores seriam preditores significativos de maior toxicidade tardia grave: idade avançada (OR 1,05/ano, $p = 0,002$), T avançado (OR 2,21, $p = 0,014$), sítio primário: laringe/hipofaringe (OR 3,2, $p = 0,011$) e esvaziamento cervical pós radioterapia (OR 2,22, $p = 0,029$).

Terapia “alvo molecular”

Atualmente, grandes esforços em oncologia têm se concentrado em pesquisar mutações específicas das células malignas e a relação dessas com a proliferação e progressão tumoral. Uma vez identificados e entendidos os seus mecanismos, eles se tornam alvos de novas intervenções terapêuticas. Assim, buscam-se tratamentos mais eficazes, específicos para cada neoplasia e menos tóxicos ao paciente. Um desses alvos é o receptor de fator de crescimento de epitélio (EGFR), que é membro da família dos receptores ErbB/ HER.

Em alguns estudos, a superexpressão EGFR ou de seus ligantes, têm sido correlacionada com pior prognóstico^{20, 21}. Quando ativado, o EGFR leva a uma série de respostas celulares, que incluem aumento da proliferação celular e inibição da apoptose.

Dados pré-clínicos indicam que a radioterapia pode aumentar a expressão do EGFR²², e que a hiper-expressão do EGFR confere resistência celular a radioterapia²³. A inibição do EGFR é assim um passo lógico no tratamento do câncer epidermóide de cabeça e pescoço²⁴.

O EGFR também se encontra expresso nas células endoteliais, portanto em estreita relação com a angiogênese tumoral. A sua interação com o endotélio adquire significado mais relevante nos casos em que a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) está limitada. Em um estudo de 2006, publicado por Adjei, sugeriu que a combinação de drogas inibidoras de via Ras-MAPK, e de VEGF, combinadas com inibidores de tirosina quinase de EGFR seria promissor para a terapia de câncer de pulmão em células não pequenas^{25, 26}.

Outro fator essencial para a avaliação da resposta do paciente ao tratamento são as mutações que ocorrem na via oncogênica Ras-Raf-MAPK. Mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* (genes que codificam as proteínas Ras e Raf, respectivamente) já estão estabelecidas como parâmetro essencial para previsão de resposta ao tratamento com mAbs. Estas mutações conferem uma alteração na estrutura destas proteínas, de forma que estas se mantenham ativadas de forma permanente. Desta maneira, pacientes que possuem estas mutações são totalmente refratários a esta terapia, pois o bloqueio da atividade de EGFR não interfere na ativação constante desta via oncogênica. De forma curiosa, estas mutações nunca se apresentam em conjunto nos tumores, apresentando um efeito excludente entre si.

O uso isolado de inibidores do EGFR ou de anticorpos anti-EGFR demonstrou eficácia limitada contra o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço metastático em estudos de fase II. As explicações variam desde mecanismo de resistência adquirida, mutações em receptores, mutações em etapas das vias de sinalização, mecanismos e vias compensatórias^{27, 28}.

Recentemente *Bonner et al* avaliaram, em um estudo randomizado de fase III, 424 pacientes portadores de carcinoma epidermóide localmente avançado de cabeça e pescoço. Os pacientes foram submetidos à radioterapia isolada ou radioterapia concomitante a Cetuximab semanal. Os resultados confirmaram um benefício estatisticamente significativo à combinação para controle loco-regional, sobrevida mediana e sobrevida livre de progressão, em um seguimento mediano de 54 meses (24,4m vs. 14,9m, $p = 0,005$; 49m vs. 29,3m, $p = 0,03$; 17,1m vs. 12,4m, $p = 0,006$, respectivamente)²⁹.

No grupo submetido ao tratamento com anticorpo monoclonal e radioterapia houve reações adversas tipo *rash* acneiforme e relacionadas à infusão, no entanto, efeitos tóxicos usualmente limitantes a combinações de quimioterapia como mucosite e disfagia não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Esse trabalho sugere uma nova e excelente opção a pacientes com muitas comorbidades e/ou estado geral comprometido, além de lançar a idéia para estudos futuros com quimioterapia, radioterapia e drogas alvo-dirigidas no ambiente de preservação de órgão. Salienta-se que no estudo apresentado o braço considerado padrão foi a radioterapia isolada e, portanto não sabemos a contribuição de tal droga a combinação padrão de cisplatina e radioterapia (estes estudos estão em andamento).

Um estudo de fase II, conduzido no *Memorial Sloan Kettering*, com a associação de radioterapia, cisplatina e cetuximab, foi interrompido precocemente após 22 pacientes terem sido incluídos, devido à toxicidade ocorrida durante o tratamento, não diretamente relacionada à droga em estudo. Acredita-se que tal fato tenha sido decorrente da seleção de pacientes e não à adição de toxicidade da combinação. Apesar das taxas de resposta completa não terem sido altas, a sobrevida livre de doença e global foram de 75%, consideradas superiores aos resultados de outros estudos na mesma população³⁰.

Erlotinibe (Tarceva, OSI-774; OSI Pharmaceuticals, Melville, NY), é um inibidor oral da tirosina quinase/ EGFR relacionado ao domínio intracelular do EGFR, ativo como agente isolado no CECCP. Modelos pré-clínicos mostraram evidências que o Erlotinibe pode potencializar os efeitos da radioterapia^{31,32}.

Em outro estudo de fase II, a combinação de Erlotinibe 150mg com docetaxel e cisplatina foi considerada promissora com resposta objetiva em 60% dos pacientes com doença avançada³³.

Assim sendo, existe um motivo racional para desenvolvimento de combinações incluindo a adição de erlotinibe à combinação de cisplatina e radioterapia em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localmente avançado. Esta combinação foi o objeto deste estudo de fase I/II.

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo principal:

- Avaliar se a expressão das proteínas EGFR e p-Akt, associado a análise do perfil mutacional de EGFR, KRAS e BRAF são fatores preditivos à resposta terapêutica da QT+RXT+Erlotinibe.

2.2 Objetivos secundários:

- Avaliar a Sobrevida Global com a combinação de Cisplatina,

Radioterapia e Erlotinibe.

- Avaliar a taxa da resposta patológica completa em pacientes tratados com essa combinação.

3.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente trabalho apresenta-se como um estudo prospectivo (fase II) realizado no Instituto Nacional de Câncer, cuja aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Inca e da USP (protocolo CAPPesq 1347;09). Foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido onde o paciente autorizava a coleta e armazenamento da amostra, descrevendo os procedimentos a serem realizados, sendo lido e esclarecido pelo investigador e assinado e datado pelo paciente, e, quando necessário, por uma testemunha e pelo investigador. Uma cópia deste documento assinado era entregue ao paciente. É importante frisar que, quando da divulgação dos resultados, os nomes dos pacientes não serão expostos, visto que o estudo manterá sigilo quanto à identidade dos mesmos. Dessa forma, exposições desnecessárias serão evitadas, mantendo, sobretudo uma postura ética e científica. Nenhuma mudança no desenho do estudo original foi realizada.

Foram colhidas biópsias antes do início do tratamento e nestas foram analisadas as proteínas descritas anteriormente, através de imuno-histoquímica e PCR seqüencial, realizado pelo Serviço de Anatomia Patológica e Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Câncer. Essa pesquisa seguiu as normas estabelecidas para pesquisa em seres humanos contidas na Resolução 196/96.

3.1 Elegibilidade do paciente

Todos pacientes foram avaliados pelo departamento de cirurgia de cabeça e pescoço do Instituto Nacional de Câncer do Brasil (INCA). Pacientes elegíveis tinham 18 anos ou mais, com histologia comprovada de carcinoma epidermóide, estágio III ou IV, M0, com sítio de lesão primária de orofaringe, laringe ou hipofaringe (de acordo com a 6ª. edição do American Joint Committee on Cancer)⁵⁶. Pacientes tinham que ser inelegíveis para ressecção cirúrgica primária, baseado na impossibilidade de conseguir margens cirúrgicas negativas sem resultados funcionais e estéticos aceitáveis, ou ressecção que poderia estar associada com traqueotomia definitiva (intuito de preservação de órgãos).

Outros critérios de elegibilidade incluíram doença mensurável, ausência de terapia anti-neoplásica prévia, um (ECOG) *performance status* 0 ou 1, *clearance* de creatinina estimado maior que 60ml/min., e testes de função hematológica e hepático normais. Resumo dos critérios no diagrama abaixo:

Crítérios de Inclusão:
▪ Idade acima de 18 anos
▪ Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço comprovado histo ou citologicamente
▪ Estágio III ou IV
▪ Doença Mensurável
▪ Doença considerada irressecável ou cirurgia associada a traqueostomia permanente
▪ Capacidade Funcional 0-1
▪ Neutrófilos $\geq 1500/\text{mm}^3$

▪ Hemoglobina $\geq 10\text{gm/L}$
▪ Plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$
▪ Clearance estimado de creatinina $\geq 60\text{ml/hr}$
▪ BetaHCG negativo para mulheres em idade fértil
▪ Capacidade de entender e assinar o Consentimento Informado
▪ Bilirrubina total $< 1,5\text{mg/dl}$
▪ Fosfatase alcalina no limite do normal para a Instituição (caso essa esteja elevada os pacientes devem ter uma cintilografia óssea normal)

Tabela 1

Os critérios de exclusão incluíam os seguintes: carcinoma nasofaríngeo; malignidade concomitante que não câncer de pele não melanoma ou carcinoma in-situ de cérvix; tratamento prévio para cabeça e pescoço; cirurgia para câncer de cabeça e pescoço nos últimos 60 dias (outra que não traqueotomia por obstrução das vias aéreas); pacientes grávidas ou amamentando; ou ausência de tecido de tumor viável para pesquisa da expressão do EGFR. Ver critérios no diagrama abaixo:

Critérios de Exclusão:
▪ Doença Metastática
▪ Gravidez
▪ Outro diagnóstico de doença maligna nos últimos 5 anos
▪ Cálcio $\geq 12\text{mg/dl}$ mesmo após o uso de bisfosfonados
▪ Infecção não controlada
▪ Doença psiquiátrica não controlada

Tabela 2

Todos pacientes proveram consentimento informado escrito e o estudo foi previamente aprovado pelo comitê institucional de ética do INCA.

3.2 Terapêutica utilizada

O medicamento Erlotinibe foi administrado oralmente, uma vez ao dia, na dose de 150mg. Foi iniciado uma semana antes da radioterapia e mantido até o último dia da radioterapia. Associado a Cisplatina intravenosa nos dias 8, 29 e 50 no período do tratamento. A radioterapia consistiu de uma dose total de 70.2Gy dada em 39 frações de 180 cGy num período de sete semanas, iniciando no dia 8 (junto com a cisplatina). O tumor primário e as cadeias regionais linfonodais foram tratadas com 2 campos laterais.

Durante todo o tratamento os pacientes foram acompanhados por uma equipe multidisciplinar que incluía: médico, enfermeira, nutricionista, fonoaudióloga. Pacientes realizaram tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RNM) do tumor primário e do pescoço e raio-X de tórax em até 21 dias do início da terapia, exames laboratoriais hematológicos, hepáticos e renais eram feitos até 7 dias antes do tratamento.

Resposta radiológica foi avaliada utilizando-se TC e RNM 6 semanas após a conclusão do tratamento com radioterapia e erlotinibe. Pacientes com status nodal inicial N2 ou N3 deveriam ser avaliados para esvaziamento eletiva do pescoço após término do protocolo terapêutico.

Resposta radiológica completa foi definida como a resolução da massa tumoral primária, sem linfonodo residual maior que 1,5 cm, e ausência de necrose central no linfonodo. Pacientes com anormalidades radiológicas residuais <1,5cm e

com exames clínicos e endoscópicos normais, com biópsia negativa, também eram considerados em resposta completa (critério de RECIST)³⁴.

A resposta era também determinada por endoscopia direta, com biópsia de qualquer lesão suspeita, e por dissecação negativa do pescoço nos pacientes que foram submetidos a tal procedimento. Outras categorias de resposta foram de doença residual com resgate completo após cirurgia, doença residual inoperável e progressão de doença (ausência de resposta).

3.3 Aquisição do material para análise histopatológica e molecular

Todos os pacientes fizeram biópsias para exame histopatológico. Em geral a biópsia foi realizada por videolaringoscopia utilizando pinças de saca bocado, sendo que alguns pacientes tiveram suas biópsias realizadas por microcirurgia do laringe para a aquisição do material.

Os pacientes também coletaram biópsias a fresco que foram encaminhadas para armazenamento, no entanto, este material não pode ser utilizado devido à degradação do mesmo. Portanto todas as análises foram feitas através da extração do bloco de parafina; tanto para as análises de imuno-histoquímica, como para as reações de PCR e sequenciamento.

3.4 Descrição da técnica da metodologia empregada

TÉCNICA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os casos selecionados foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para detecção do produto dos genes do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do Akt, esse em sua forma ativa (fosforilada), utilizando os anticorpos monoclonais descritos na tabela 3.

Esses anticorpos foram padronizados estabelecendo-se o protocolo a seguir. A desparafinização dos cortes foi realizada imergindo as lâminas em dois banhos de xilol aquecido (60°C) por 5 minutos cada. A seguir, em temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas em quatro banhos de xilol (cinco minutos cada) e hidratadas em cinco banhos de álcool absoluto e em um banho de álcool a 95% de três minutos cada, conforme procedimento histotécnico usual. O processo de hidratação foi finalizado com um banho de cinco minutos em água corrente.

Tampão EDTA foi utilizado como solução de recuperação antigênica para o anticorpo anti-EGFR e solução citrato de pH 9.9 (*Target antigen retrieval solution High pH 10X concentrate*, código S3307DAKOcytomatic - Carpinteria – USA) para o anticorpo anti p-AKT. As soluções de recuperação foram previamente aquecidas em banho-maria a 98°C por 20 minutos e então, as lâminas foram mergulhadas nessa solução, permanecendo também em banho maria a 98°C por 40 minutos. Após o resfriamento por 10 minutos em temperatura ambiente, os cortes foram imersos em água corrente por 5 minutos até serem delimitados (ciclados) com uma caneta

especial (*DAKO Cytomation pen* - ref S2002). Após a ciclagem, as lâminas foram submetidas a três banhos de cinco minutos cada em tampão de lavagem TBS-T.

Os reagentes utilizados nas reações imuno-histoquímicas foram os do kit Novolink (Novolink Max Polymer Detection System – Leica Microsystems, Newcastle, Reino Unido). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão das lâminas na solução de bloqueio do kit por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em três banhos de cinco minutos cada em tampão de lavagem TBS-T.

Com o objetivo de inibir as ligações inespecíficas foi utilizada uma solução de bloqueio proteico por 10 minutos, seguida por duas lavagens de cinco minutos cada em TBS-T. As lâminas com os respectivos anticorpos primários foram então incubadas em câmara úmida a 4°C por 16 a 18 horas. As especificações encontram-se descritas abaixo, na tabela 3.

Anticorpos	Código Catálogo	Fornecedor	Diluição	DAB
Anti-EGFR	D38B1	Cell Signaling	1:400	5 minutos
Anti-pAKT	24500	Santa Cruz	1:1200	5 minutos

Tabela 3

Após esse período de incubação as lâminas foram imersas em tampão de lavagem TBS-T em três banhos de cinco minutos. Em seguida, foi utilizada uma solução de bloqueio pós-anticorpo primário durante 30 minutos, seguido por dois banhos de cinco minutos de TBS-T. A seguir o polímero foi utilizado, mantendo as

lâminas nessa solução por 30 minutos. Após essa etapa foram feitos três novos banhos de cinco minutos em tampão de lavagem TBS-T. Para revelação das lâminas foi utilizado o substrato cromógeno diaminobenzidina (*DAB*) por cinco minutos. As lâminas foram então imersas em água destilada a fim de parar a reação de revelação. Lavagens em água corrente foram feitas para retirada do excesso do cromógeno e posteriormente os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos e lavados em água corrente por dois minutos.

Finalmente, foi feita a desidratação dos cortes em quatro banhos de álcool absoluto (um minuto cada) seguido pela clarificação por quatro banhos de xilol (um minuto cada). As lâminas foram então montadas para fixação das lamínulas e avaliadas à microscopia de luz.

Para cada bateria de reações imuno-histoquímicas, controles positivo e negativo foram utilizados. Para tal, cortes parafinados de um espécime de adenocarcinoma de pulmão com conhecida imunorreatividade para ambos anticorpos primários foram utilizados, sendo o controle negativo realizado pela omissão do anticorpo primário, substituído pela solução diluidora.

ANÁLISE QUANTITATIVA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A quantificação dos casos submetidos à técnica de imuno-histoquímica foi realizada através de análise digital de imagem. O sistema de captura de imagem era

composto de um microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), equipado com objetivas planeofluar de 4x, 10x, 20x, 40x e 100x e pela câmera de vídeo CCD DP72 (Olympus, Tóquio, Japão) conectada a um computador tipo *desktop*. A captura das imagens e a análise histomorfométrica foram realizadas com o auxílio do programa Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Um cenário reproduzível foi estabelecido antes de cada sessão de captura de imagens. A intensidade do potenciômetro do microscópio de luz foi mantida na posição 9 (nove). O número de abertura do condensador foi igualado ao número de abertura da objetiva (0,5), proporcionando imagens com adequado contraste e resolução. Após limpeza das lâminas com lenços de papel (para remoção de impurezas em sua superfície) e sua inserção na mesa do microscópio de luz, as imagens dos campos microscópios foram obtidas utilizando a objetiva de 20x, após o estabelecimento da iluminação de Köhler no monitor de vídeo. Todas as imagens apresentavam tamanho de 4140 x 3096 pixels e foram salvas no formato.tif.

De cada caso, um total de cinco campos foi capturado, selecionando-se aleatoriamente áreas com imunopositividade específica para cada um dos anticorpos. A metodologia utilizada para obtenção do índice de área (área imunopositiva/área total) encontra-se descrita em BERNARDO et al, 2009. Os limiares de positividade foram R(25-185), G (1-134) e B(0-119).

Para cada caso, foi obtido o índice de positividade (IP) representado pela razão da soma dos cinco campos, compreendendo a área tumoral imunopositiva sobre a área total tumoral, conforme a fórmula abaixo:

$IP = \frac{AP1 + AP2 + AP3 + AP4 + AP5}{AT1 + AT2 + AT3 + AT4 + AT5}$

AP – Área positiva, AT – Área total

Tabela 4

Macrocomandos foram criados para a contagem da área imunopositiva e da área total, com a finalidade de automatizar os procedimentos histomorfométricos. Os dados gerados foram automaticamente transferidos para planilhas do programa Excel, e armazenados para a realização dos testes estatísticos.

EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA dos blocos de parafina, foi utilizado o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Quiagen, Düsseldorf, Alemanha). Cortes de cada um dos blocos dos pacientes foram corados por hematoxilina e eosina e em seguida as áreas tumorais foram delimitadas. Cerca de 10 cortes da área tumoral de cada paciente foram então colocados em eppendorfs e submetidos a banhos de xilol para remoção da parafina. A seguir foi feita a lise do tecido sob condições desnaturantes com proteinase K, aquecimento a 90°C para reversão do entrecruzamento de macromoléculas do tecido causado pela ação do formol. A seguir pela passagem da solução resultante por colunas, a fim de separar o DNA dos contaminantes teciduais residuais, seguida pela eluição do DNA concentrado.

QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Após a extração, os DNAs foram quantificados através da absorvância medida em 260 e 280 nm em espectrofotômetro (UV- 160, *Shimadzu/Japão*). A razão de A_{260} e A_{280} deve ser igual ou superior a 1,75 para, então, calcular-se a concentração do DNA. (Sambrook *et al.*, 1989). Uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 50 µg/mL de DNA.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (*Polimerase Chain Reaction* - PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar as regiões dos DNAs genômicos correspondentes aos éxons 18 (136 pb) 19 (159 pb), 20 (192 pb) e 21 (205 pb) do gene *EGFR*, ao éxon 15 do gene *BRAF* e ao éxon 2 do gene *KRAS*. Estas regiões foram escolhidas, por serem conhecidas como regiões de *hotspot*, ou seja, são as regiões mais frequentemente alteradas em câncer. As seqüências de oligonucleotídeos iniciadores senso e antisenso foram sintetizadas pela IDT (Integrated DNA Technologies USA), como mostra a Tabela 5.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS	TA ^a (°C)	CICLOS	TAMANHO DO PRODUTO (pb ^b)
EGFR	S: 5'AGCTTGTGGAGCCTCTTACA3'	60	45	136
Exon 18	AS:5' AGGGACCTTACCTTATACACCGT3'			
EGFR	S:5'TAACGTCTTCCTTCTCTCTGTCA 3'	60	45	159
Exon 19	AS: 5' ATGGACCCCCACACAGCA 3'			
EGFR	S: 5' TGCCTCTCCCTCCCTCCA 3'	60	45	192
Exon 20	AS:5'ACACACCAGTTGAGCAGGTACTG 3'			
EGFR	S: 5'CTCACAGCAGGGTCTTCTCTGT 3'	60	45	205
Exon 21	AS: 5'TGACCTAAAGCCACCTCCTTACT 3'			
BRAF	S: 5'CCTTTACTTACTACCTCAGATA 3'	54	45	170
	AS: 5'AATCAGTGGAAAAATAGCCT 3'			
KRAS	S: 5'TGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGAC 3'	54	45	190
	AS: 5'CTCTATTGTTGGATCATATTCGTC 3'			

TA^a: Temperatura de anelamento; pb^b: pares de base; S^c: senso; AS^d: anti-senso.

TABELA 5 Condições da PCR: Oligonucleotídeos, temperatura de anelamento, número de ciclos e tamanho do produto.

A reação de PCR foi realizada utilizando tampão de PCR 1X (50 mM KCl, 200 mM, Tris-HCl pH 8,4), 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de mistura de dNTPs (1mM de dATP, 1mM de dCTP, 1mM de dGTP e 1mM de dTTP), 1,0 U de Go *Taq* DNA polimerase (Promega), 10 pmoles/μL de cada par de oligonucleotídeos (senso e antisenso), 600 ng do DNA a ser analisado e água deionizada estéril para completar o

volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada na termocicladora Veriti (Applied Biosystems), com uma pré-desnaturação (5 minutos a 94°C), seguida de 45 ciclos consistindo de três etapas: desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (45 segundos minuto a 60°C para *EGFR* e 54° C para os genes *BRAF* e *KRAS*) e extensão (1 minuto a 72°C) e um ciclo adicional de 10 minutos a 72°C.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 2µL do corante SYBR Safe DNA gel stain 10.000 X (Invitrogen) para cada 25 mL de gel, com a finalidade de verificar a os produtos da reação de PCR. Foram aplicados 10 µL de cada produto de PCR e a eletroforese foi realizada a 5 V/cm, por 30 minutos em cuba horizontal (Life Technologies). O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20) (SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. AND FRITSCH, E. F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1, 9.20).

PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Antes do seqüenciamento, todos os produtos de PCR foram purificados com o kit *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de acordo com o protocolo do fabricante (GE Healthcare, UK). A cada tubo, com 100 µL de produto de PCR foram adicionados 500 µL de tampão de captura. Posteriormente, essa solução foi colocada em uma coluna *GFX Microspin* com tubo coletor e foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 segundos. O líquido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi lavada com 500 µL de tampão de lavagem centrifugando a 14.000 rpm por 30 segundos. O tubo coletor foi desprezado e substituído por um microtubo de

1,5 mL. Em seguida, foram adicionados ao centro da coluna 20 µL de tampão de eluição que ficou agindo por 1 minuto. Por fim este material foi centrifugado a 14.000 por 1 minuto e no microtubo estava o DNA purificado.

SEQUENCIAMENTO

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando-se o kit *ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante. Para cada reação foram utilizados 2 µL do produto de PCR purificado, 10 pmoles de um dos oligonucleotídeos (senso ou anti-senso) e 4 µL do Kit. As reações foram feitas no termociclador Thermo Hybaid nas seguintes condições: 30 ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C para *EGFR* ou 54° C para *BRAF*. Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos da reação de PCR. Para cada produto foram feitas 4 reações de seqüenciamento, 2 com oligonucleotídeos senso e 2 com oligonucleotídeos anti-senso.

Cada reação de seqüenciamento foi precipitada com 26 µL de etanol absoluto (MERCK) e 1 µL de acetato de amônia 7,5 M (GE Healthcare, UK) por aproximadamente 18 horas. Após esta etapa, cada reação foi centrifugada (EPPENDORF 5415) por 30 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 100 µL de etanol 70% por 10 minutos a 4.000 rpm. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 10 µL de tampão *Loading* (GE Healthcare, UK) e a reação foi injetada no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare, UK). A análise das seqüências foi feita utilizando o programa *Chromas* (disponível no site: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

3.5 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA, USA). Os valores foram considerados significativos quando p menor que 0,05. As taxas de sobrevida livre de progressão e sobrevida global foram estimadas usando método de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida foram comparadas pelo teste de *log-rank*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS 13.0 para Windows.

4.0 RESULTADOS

4.1 Disposição e características dos pacientes

Trinta e dois pacientes foram incluídos no estudo entre Abril de 2004 e Novembro de 2006. A média de idade foi de 57 anos e a grande maioria era do sexo masculino (29 homens). Aproximadamente dois terços tinham doença estágio IV (9 apresentavam lesões T4, 13 com doença cervical N2 ou N3), e 5 apresentavam traqueotomia prévia devido obstrução das vias aéreas.

Cinco pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico após o término da terapia; devido à doença residual no sítio primário e doença residual cervical. Foram feitas quatro laringectomias (2 pacientes estão vivos e sem doença e 2 pacientes faleceram por progressão local após a cirurgia) e um esvaziamento cervical radical (evoluiu para o óbito por doença residual irresssecável).

Em relação ao sítio tumoral dez pacientes tinham o tumor primário na orofaringe, dezesseis na laringe e seis no hipofaringe. Vide tabela 6:

Tabela 6

Características iniciais dos pacientes (N=32).

Característica		N (%)
Média idade (variação), anos		57 (35 – 73)
Sexo		
	Masculino	29 (90.6)
	Feminino	3 (9.3)
Sítio primário do tumor		
	Laringe	16 (50.0)
	Orofaringe	10 (31.2)
	Hipofaringe	6 (18.7)
Estadio T		
	T2	4 (12.5)
	T3	19 (59.3)
	T4	9 (28.1)
Estadio N		
	N0	14 (43.7)
	N1	5 (15.6)
	N2	10 (31.2)
	N3	3 (9.37)
Estadio Tumoral		
	III	14 (43.7)
T3N0 - 11		
T3N1 - 3		
T2N2 - 4		
T3N2 - 3		
T4N0 - 3		
T4N1 - 2		
T4N2 - 3		
T3N3 - 2		
T4N3 - 1		
	IVA	15 (46.8)
	IVB	3 (9.37)

Tabela 7 . Resposta ao tratamento (N=20).

Categoria de resposta	Número, %
Resposta completa	56, 25%
Doença residual resgatada com cirurgia	6,25%

Os pacientes que não apresentaram resposta eram todos estágios IV, e em sua maioria evoluíram para o óbito devido à progressão de doença local (cinco pacientes), recidiva regional (cinco pacientes), um paciente evoluiu com metástase à distância após 24 meses e outro com segundo tumor primário de esôfago 34 meses após o término do tratamento.

4.2 Análise da Expressão de EGFR e p-Akt por Imuno-histoquímica

Resultados Qualitativos

A expressão da proteína *EGFR* foi como coloração acastanhada observada na membrana e no citoplasma das células epiteliais tumorais. Todos os 32 casos foram positivos para imunomarcacão de EGFR. Com relação a p-Akt, todos os tumores também foram positivos, mostrando marcação nuclear e citoplasmática (Figura 3). Tais padrões de marcação seguiram o padrão esperado de marcação nos compartimentos celulares.

Figura 3: Fotomicrografia representativa da imunoexpressão de EGFR(A) e p-Akt (B) em um mesmo paciente, mostrando o padrão de expressão encontrado. Barra de escala (100µm)

Resultados Quantitativos da Imuno-histoquímica

Para comparar quantitativamente a imunoexpressão de *EGFR* e de p-Akt, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar a normalidade das variáveis. Foi verificado que as imunomarcações satisfazem o critério de normalidade, implicando na utilização de métodos paramétricos para comparação das duas médias de expressão.

Os índices de área, representativos da fração do tecido imunopositivo para a proteína EGFR (n=32), variaram de 0,02 a 0,68, com média de 0,39 e desvio padrão de 0,166.

Com relação a p-Akt, os índices de área (n=32), variaram de 0,02 a 0,55, com média de 0,228 e desvio padrão de 0,122.

Não houve correlação entre a expressão de EGFR e p-Akt (coeficiente de correlação de Pearson: $r = -0,168$; $p=0.357$)

Estratificando os resultados por sítio, observamos que apenas a expressão de EGFR em hipofaringe (n=6) apresentou diferença em relação aos outros sítios, orofaringe (n=10) e Laringe (n=16).

	<i>EGFR</i>	<i>p-Akt</i>
Orofaringe	0.36	0.24
Hipofaringe	0.44	0.23
Laringe	0.39	0.22

Tabela 7: Expressão de EGFR e p-Akt estratificada por sítio

A análise estatística da sobrevida mostrou que, ao analisarmos agrupadamente os sítios, nem EGFR e nem p-Akt foram variáveis preditivas de resposta ao tratamento com erlotinibe, utilizando-se a média como ponto de corte.

Figura 4

Como esperado, o teste log rank evidenciou diferença estatisticamente significativa na análise de sobrevida tanto com relação ao estadiamento quanto com relação ao sítio anatômico.

Figura 5

Apenas a quantificação de EGFR em hipofaringe foi uma variável preditiva de resposta ao tratamento com erlotinibe, utilizando-se a média como ponto de corte conforme evidenciado na figura 6.

Survival of hipofaringe pAkt:Survival proportions

Survival of hipofaringe EGFR:Survival proportions

Survival of Laringe pAkt:Survival proportions

Survival of Laringe EGFR:Survival proportions

Survival of Orofaringe pAkt:Survival proportions

Survival of Orofaringe EGFR:Survival proportions

Figura 6

4.3 Análises do perfil mutacional de EGFR, BRAF e KRAS

Após a extração do material para a imuno-histoquímica, foi feita a extração do DNA para as análises moleculares em relação ao EGFR e as proteínas Kras e Braf. Foram feitas reações de PCR para avaliar amplificações dos éxons 18,19,20 e 21 que foram positivas, conforme figura 7. No entanto ao fazermos o sequenciamento dos éxons descritos nenhum perfil mutacional foi observado, ver figura 8(figura de sequenciamento).

Em relação às proteínas Kras e Braf, esta última ao ser analisada no PCR apresentou amplificação, porém no sequenciamento não apresentou leitura dos primers desenhados. A reação de PCR para Kras não apresentou amplificação para que pudesse ser sequenciada. Atribuímos esses resultados negativos devido à qualidade do material emblocado em parafina, que estaria mais sujeito à degradação neste tipo de armazenamento.

Exon 18 **Exon 19** **Exon 20** **Exon 21**

Figura 7 Gel de agarose a 2% mostrando amplificação dos éxons 18,19,20 e 21 do *EGFR*.

braf

Figura 8 Gel de agarose a 2% mostrando amplificação do Braf

Figura 9 Imagem do seqüenciamento do éxon 21 do EGFR que não apresentou mutação.

5.0 DISCUSSÃO

Historicamente os resultados desapontadores da radioterapia isolada para o tratamento dos carcinomas epidermóides localmente avançados em cabeça e pescoço, fizeram com que os investigadores procurassem testar novas estratégias de tratamento como a adição da quimioterapia. A metanálise desses estudos mostra significativo benefício de sobrevida em favor da quimioterapia (ganho de 8% em cinco anos) quando esta é dada em concomitância a radioterapia¹⁸. Porém as altas taxas de efeitos adversos com o tratamento combinado limitaram os estudos com drogas quimioterápicas adicionais além de resultados de sobrevida semelhantes ao tratamento cirúrgico.

Estratégias emergentes focaram na incorporação das chamadas terapias alvo-molecular. Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que a adição de erlotinibe a combinação de radioterapia e cisplatina foi segura e promissora em pacientes com carcinoma epidermóide localmente avançado.

Na mesma linha de investigação explorando o bloqueio da via do EGFR, Bonner *et al.* compararam radioterapia associada a cetuximab, com radioterapia isolada num trabalho controlado randomizado²⁹. Eles concluíram que a adição do anticorpo monoclonal cetuximab ofereceu melhora do controle loco regional, sobrevida livre de progressão, e sobrevida global sem aumento de incidência de mucosite severa ou alterações hematológicas. Embora esse trabalho não tenha comparado a combinação cetuximab e radioterapia com o corrente tratamento padrão

que é a quimio-radioterapia baseado em platina; a adição do anticorpo monoclonal trouxe um ganho inquestionável.

Estudos randomizados prévios com drogas anti EGFR combinadas com radioterapia mostraram apenas um pequeno aumento da toxicidade cutânea (23% versus 18%), embora Budach e col em 2007 tenha descrito reações severas cutâneas em dois pacientes submetidos a tratamento com radioterapia associada a cetuximab^{29,35}.

Mutações do EGFR (deleção no éxon 19, *missense L858R*) foram os preditores mais importantes de sensibilidade aos inibidores de tirosina quinase nos pacientes com câncer de pulmão, mas ainda não demonstraram sua importância em pacientes com câncer de cabeça e pescoço³⁶.

Soulieres et al., avaliaram 115 pacientes com doença avançada e previamente tratados com quimioterapia baseada em platina, cinco (4.3%) tiveram resposta parcial; adicionalmente, 38.3% mantiveram doença estável por pelo menos oito semanas²⁷.

Agulnik et al., em um estudo fase I/II utilizando Erlotinibe e Cisplatina analisaram 37 amostras procurando identificar vários biomarcadores, porém verificaram que um alto número de cópias do EGFR poderia predizer quais pacientes teriam uma melhor resposta ao Erlotinibe³⁷.

No nosso estudo procuramos identificar alguns marcadores relacionados com o mecanismo de ação do receptor, o EGFR, que é o foco da terapêutica empregada. Na etapa da análise por imuno-histoquímica tivemos uma positividade para o EGFR e a p-Akt em todos os pacientes incluídos; porém ao analisarmos a proteína do receptor (EGFR) e do p-Akt estas não apresentaram significado quando analisadas no grupo todo. Somente com a estratificação por sítio é que o EGFR teve significância relacionado ao Hipofaringe.

Porém como não foi previsto no estudo, um grupo controle para análise molecular comparativa, não podemos descartar que os resultados de p-Akt tenham sido sem significância. Outras formas de aquisição de material para análise no futuro poderão esclarecer alguns aspectos apresentados nesta amostragem.

6.0 CONCLUSÕES

O EGFR e a Akt estavam expressos na imuno-histoquímica, porém quando relacionados com a sobrevida não tiveram significância. Na análise por sítio anatômico o EGFR teve significância estatística com Hipofaringe. A análise molecular do EGFR e das proteínas Kras e Braf não tiveram expressão nesta amostra.

Dos trinta e dois pacientes incluídos no estudo, vinte estão vivos e sem evidência de doença, o estadiamento e o sítio anatômico apresentaram significância estatística na análise de sobrevida.

A expressão do EGFR parece ser um fator preditivo à reposta terapêutica, no entanto outros estudos com identificação de outros biomarcadores e amostras maiores são necessários para elucidar quais pacientes com CECCP podem ser beneficiados com este tratamento.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57:43-66, 2007.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2009: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
3. Brizel DM, Esclamado R. Concurrent chemoradiotherapy for locally advanced, nonmetastatic, squamous carcinoma of the head and neck: consensus, controversy, and conundrum. *J Clin Oncol*. 2006;24(17):2612-7.
4. A biologia do câncer, Robert A. Weinberg, Artmed, 2008.
5. Y. Yarden: The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 2001, 37: S3 – S8.
6. J. Boonstra: The Epidermal Growth Factor. *Cell Biology International* 1995, 19: 413 – 430.
7. C. Freitas: Extending Knowledge on Her-Family Receptors for Epidermal Growth Factor and their Ligands to Hematological Malignancies. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2008, 54: 79 – 86.
8. E.M. Bublil and Y. Yarden: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Cell Biology* 2007, 19: 124 – 134.
9. H. Ogiso: Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* 2002, 110: 775 – 787.
10. X. Zhang: An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* 2006, 125: 1137 – 1149.
11. K. Oda: A Comprehensive Pathway Map of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Molecular Systems Biology* 2005, 1: 2005.

12. R.S. Herbst: Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2004, 59: 21- 26.
13. Dent, P. e cols. Radiation-induced Release of Transforming Growth Factor α Activates the Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Carcinoma Cells, Leading to Increased Proliferation and Protection from Radiation-induced Cell Death. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 10, 2493-2506, August 1999.
14. I. Amit: Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Molecular Systems Biology* 2007, 3:
15. Cohen M.H. e cols. FDA Drug Approval Summary: Erlotinib (Tarceva®) Tablets. *The Oncologist* 2005, 10: 461-466.
16. Huang S. e cols. Dual-Agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Combining Anti-EGFR Antibody with Tyrosine Kinase Inhibitor. *Cancer Research* 64, 5355-5362, August 2004.
17. N. Normanno and W.J. Gulik: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and bone metastases: different mechanisms of action for a novel therapeutic application? *Endocrine Related Cancer* 2006, 13: 3 – 6.
18. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*. 2000;355(9208):949-55.
19. Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, Swann RS, Ang KK. Pre-treatment and treatment related risk factors for severe late toxicity after chemo-RT for head and neck cancer: An RTOG analysis. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 24: 5500.
20. Maurizi M, Scambia G, Benedetti Panici P, et al: EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological features and prognostic significance. *Int J Cancer* 52:862-6, 1992.
21. Magne N, Pivot X, Bensadoun RJ, et al: The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemo-radiotherapy. *Eur J Cancer* 37:2169-77, 2001.

22. Schmidt-Ullrich RK, Valerie KC, Chan W, et al: Altered expression of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29:813-9, 1994.
23. Liang K, Ang KK, Milas L, et al: The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:246-54, 2003.
24. Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A: Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 96:408-16, 2007.
25. I. Amit: Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Molecular Systems Biology* 2007, 3: 151.
26. A. Adjei: Novel Combinations Based on Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Clinical Cancer Research* 2006, 12: 4446 – 4450.
27. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, et al: Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* 22:77-85, 2004.
28. Bourhis J, Rivera F, Mesia R, et al: Phase I/II study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and fluorouracil in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2866-72.
29. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-78, 2006.
30. Pfister DG, Su YB, Kraus DH, et al: Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. *J Clin Oncol* 24:1072-8, 2006.
31. Cohen M.H. e cols. FDA Drug Approval Summary: Erlotinib (Tarceva®) Tablets. *The Oncologist* 2005, 10: 461-466.
32. Huang S. e cols. Dual-Agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Combining Anti-EGFR Antibody with Tyrosine Kinase Inhibitor. *Cancer Research* 64, 5355-5362, August 2004Zhang Q. e cols. Src Family Kinases Mediate Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Cleavage, Proliferation,

and Invasion of Head and Neck Cancer Cells. *Cancer Research* 64, 6166-6173, September 1, 2004.

33. E. S. Kim, M. S. Kies, B. S. Glisson, et al. Phase II study of erlotinib, docetaxel and cisplatin for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology*, ASCO Annual Meeting Proceedings. 2007, Vol 25, No 18S: 6013c.

34. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts PJ. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 2009, 45:228–247.

35. Budach W, Bolke E, Homey B: Severe cutaneous reaction during radiation therapy with concurrent cetuximab. *N Engl J Med* 357:514-5, 2007.

36. E. Van Cutsem, I. Lang, G. D'haens, V. Moiseyenko, et al. *Journal of Clinical Oncology*, ASCO Annual Meeting Proceedings. 26, (May 20 suppl; abstr 2), 2008.

37. Mark Agulnik, Gilda da Cunha Santos, David Hedley, et al. Predictive and Pharmacodynamic Biomarker Studies in Tumor and Skin Tissue Samples of Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Erlotinib. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 25, No 16 (June 1): pp. 2184-2190, 2007.