



Noções básicas sobre biologia molecular e epigenética

Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

XIX Congresso Brasileiro de Histotecnologia - Novembro 2015



A.C. Camargo
Cancer Center

- ✓ Evolução da Patologia Molecular
- ✓ Conceitos Básicos
- ✓ Ferramentas utilizadas em Biologia Molecular
- ✓ Aplicações no Laboratório de Patologia

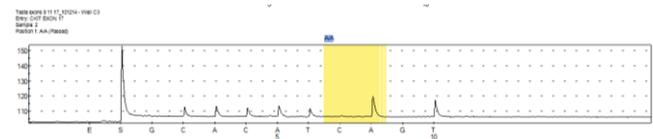
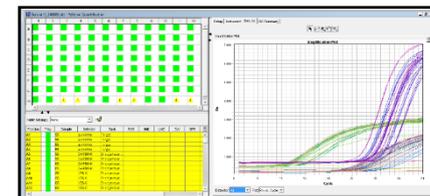
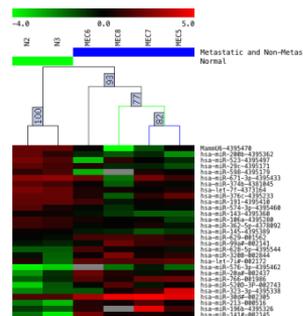
Patologia no século XIX
ANATÔMICA



Patologia no século XX
CELULAR

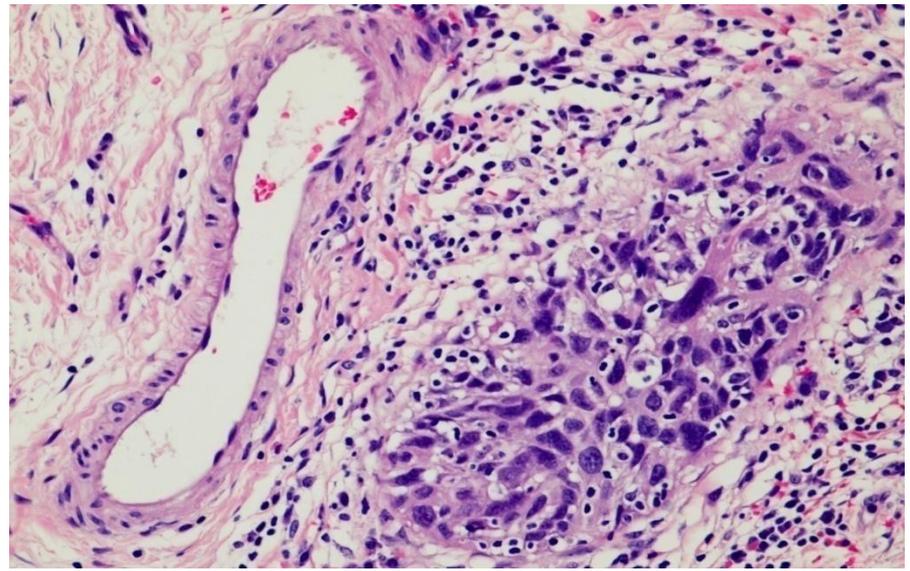
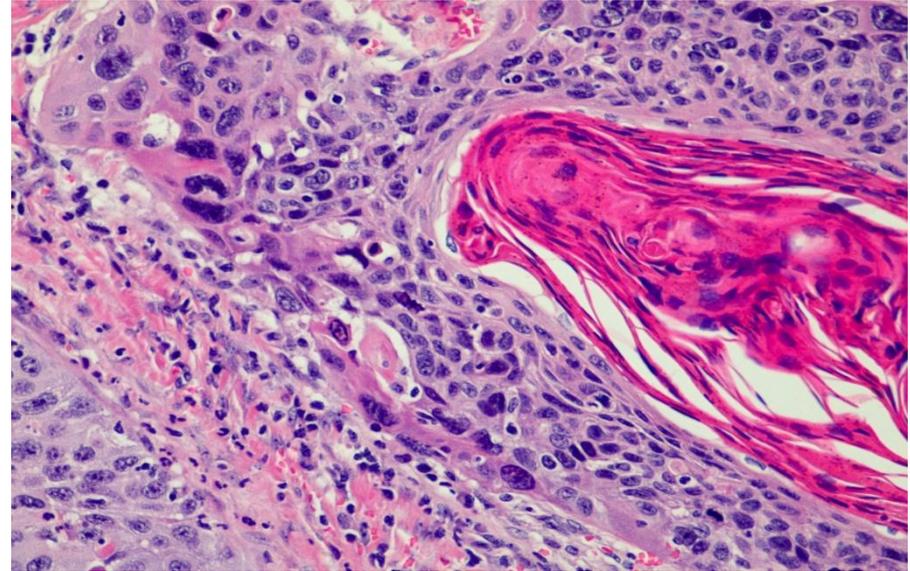
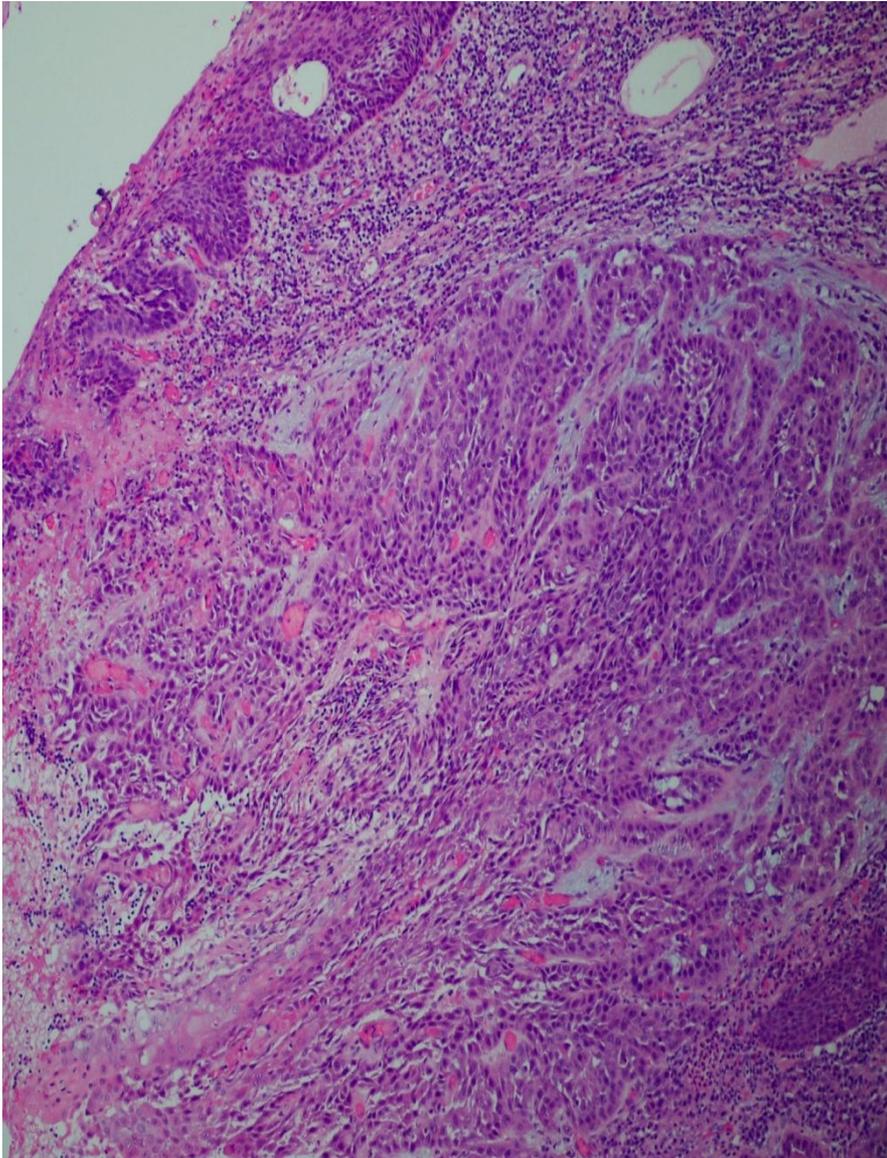


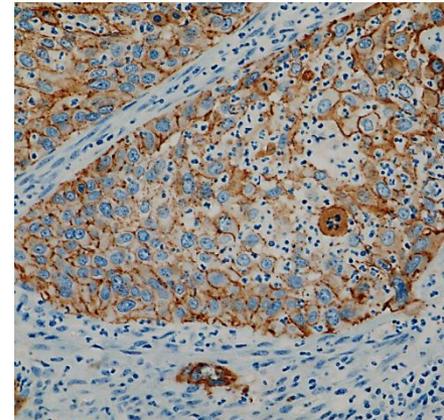
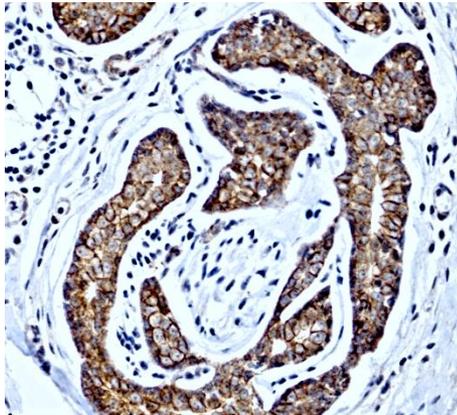
Patologia no século XXI
MOLECULAR





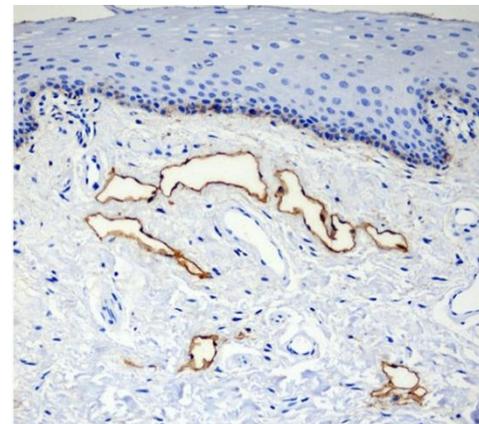
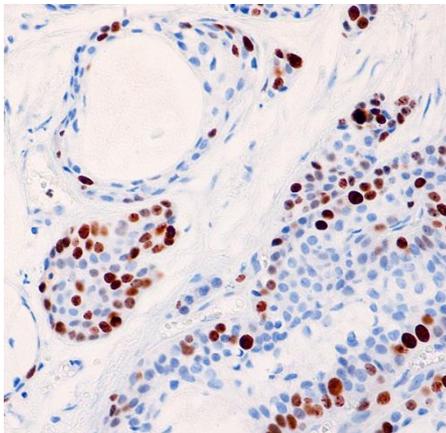
Patologia Tradicional - HE

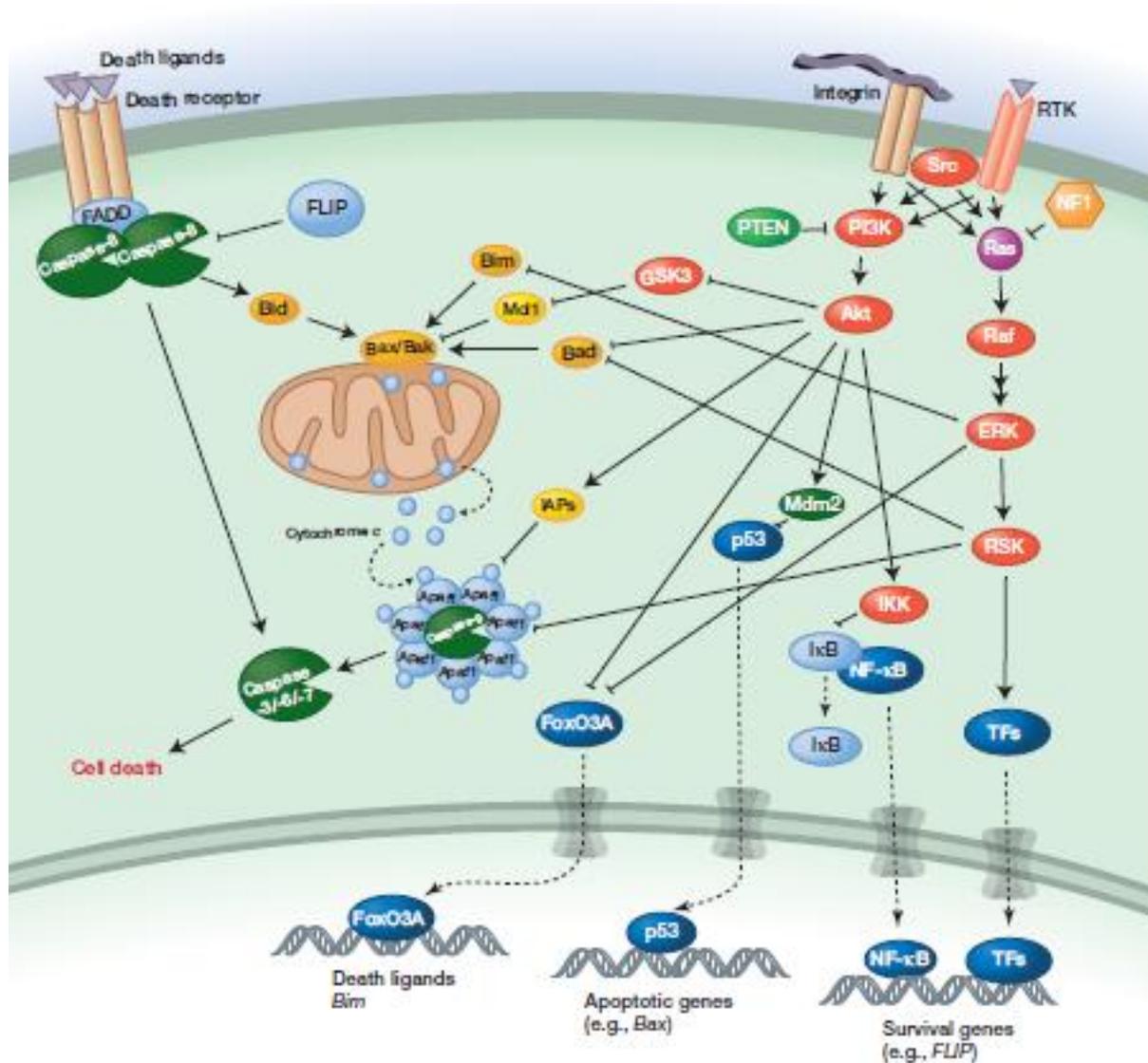




DIAGNÓSTICO E
PESQUISA

- MÉTODO UTILIZADO A PARTIR DOS ANOS 80





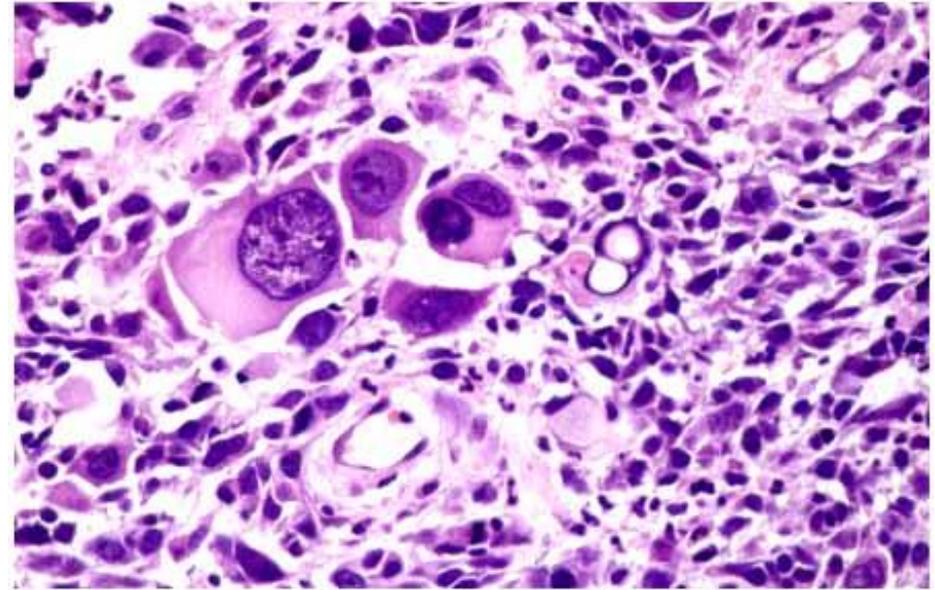
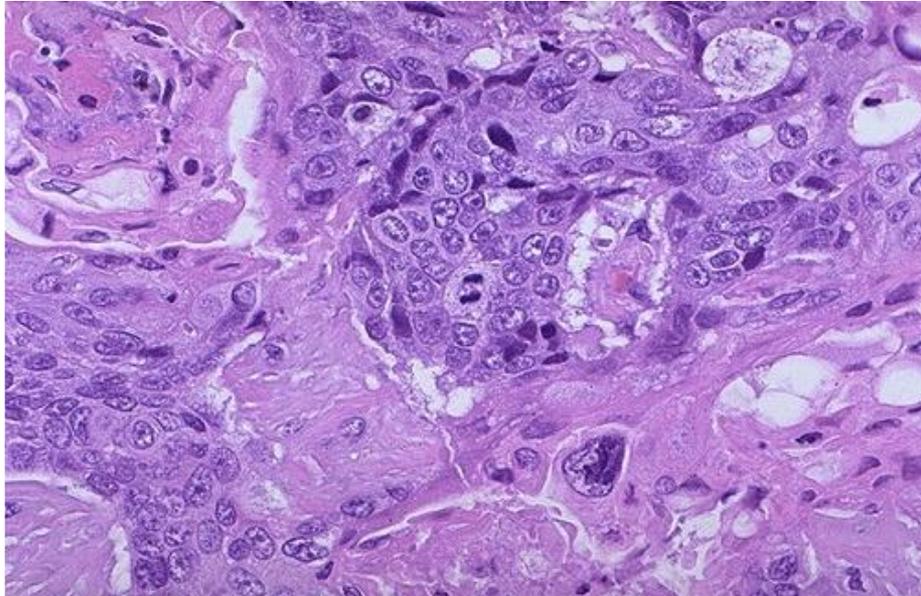


BUSCA DE MARCADORES

HISTOPATOLOGIA



BASES MOLECULARES



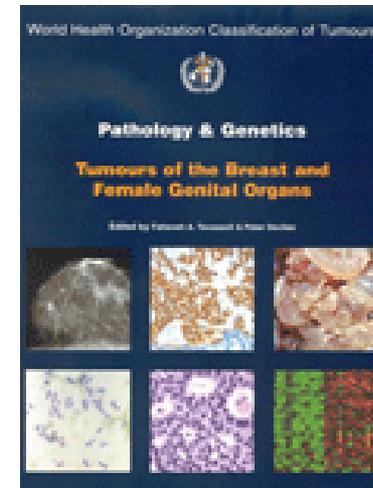


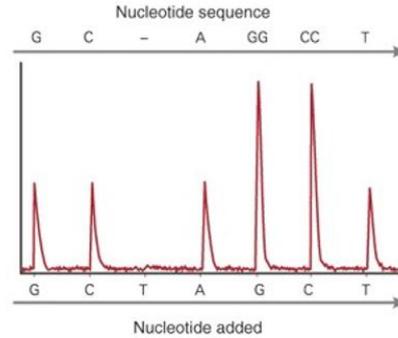
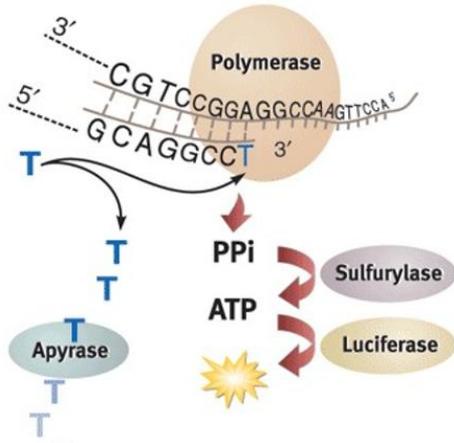
- ✓ Diagnóstico
- ✓ Prognóstico
- ✓ Detecção de Doença Residual
- ✓ Monitoramento de transplantes
- ✓ Predição de sensibilidade ao tratamento quimioterápico

- ✓ Uso de testes baseados em ácidos nucleicos
 - ✓ PCR
 - ✓ Sequenciamento
 - ✓ Hibridização

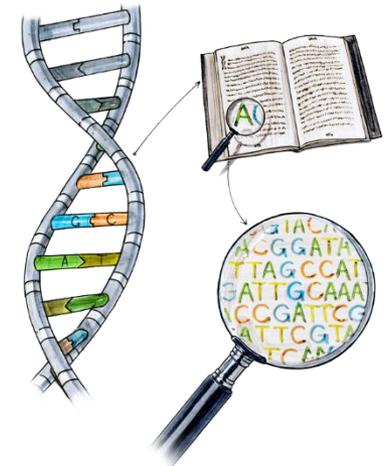
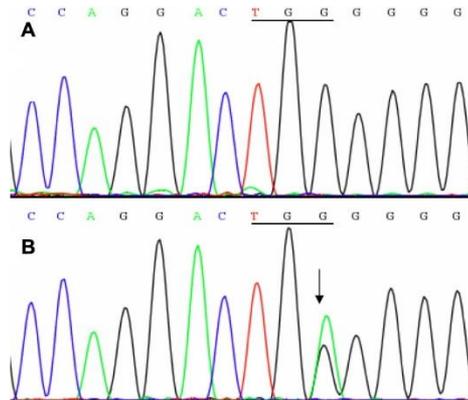
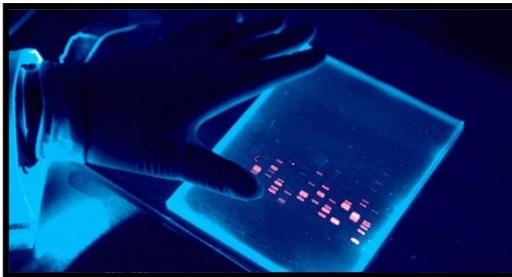
- ✓ Diagnóstico, além de morfológico deve conter:
 - ✓ Subtipos e fatores prognósticos
 - ✓ Biomarcadores prognósticos
 - ✓ Biomarcadores indicativos de resposta a tratamentos
 - ✓ Informação genética

Incorporação de
características
moleculares

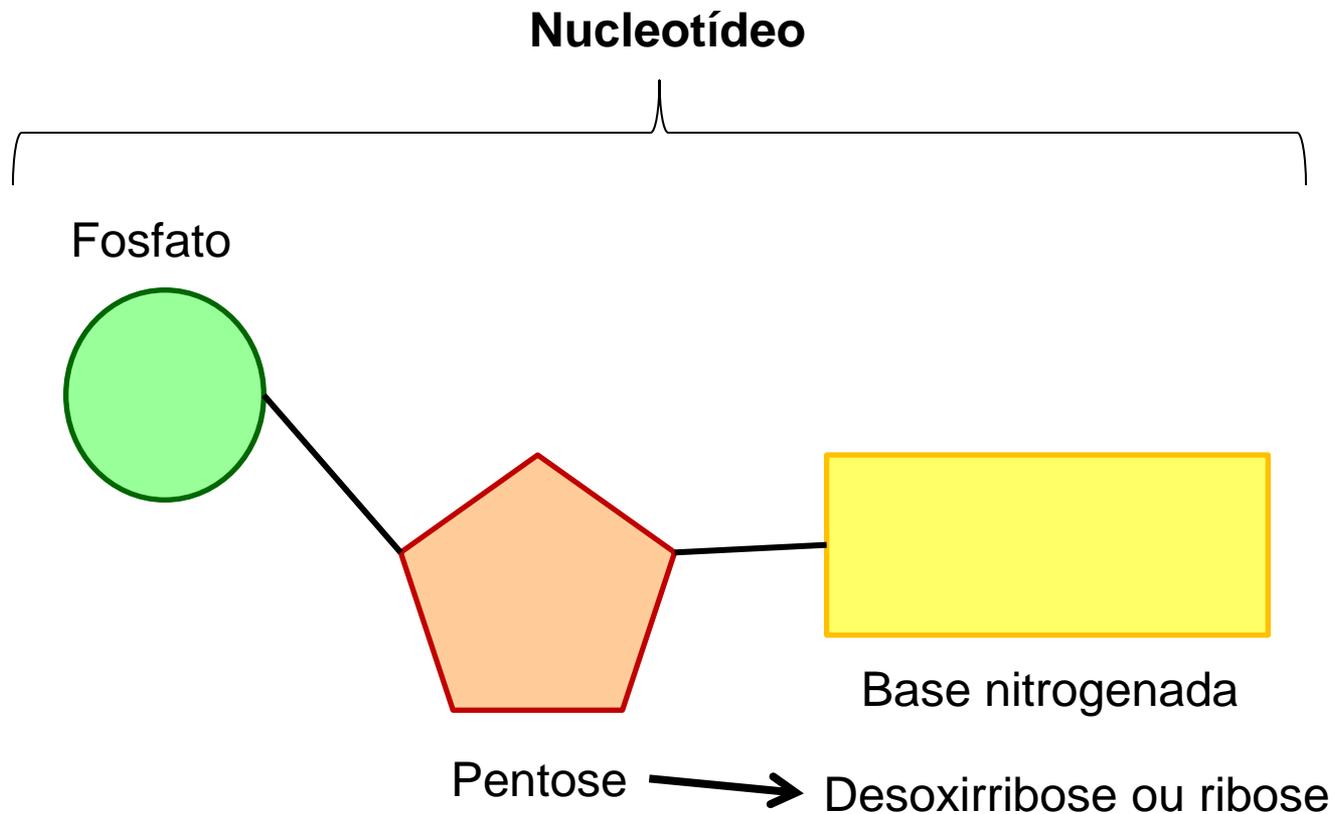




Conceitos Básicos



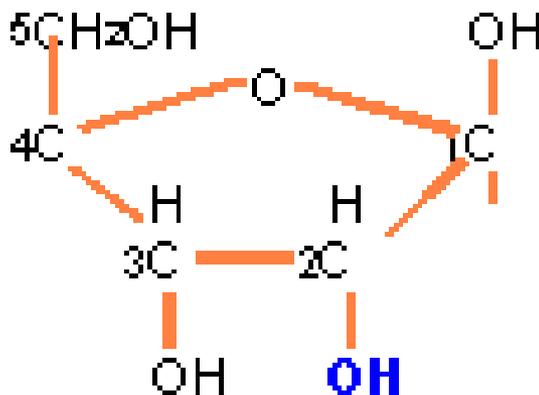
- ✓ Ácidos nucleicos: responsáveis pelas informações hereditárias e controle das atividades celulares



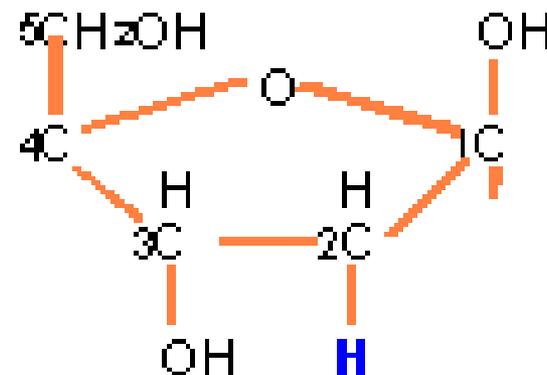


- ✓ Dois tipos de pentoses são encontrados nos ácidos nucleicos
 - ✓ **Ribose e desoxirribose**
 - ✓ Diferem uma da outra pela presença ou ausência do grupo hidroxila no C 2' da pentose. É baseado nesta característica que os ácidos nucleicos recebem o nome RNA (ribose) ou DNA (desoxirribose)

Ribose

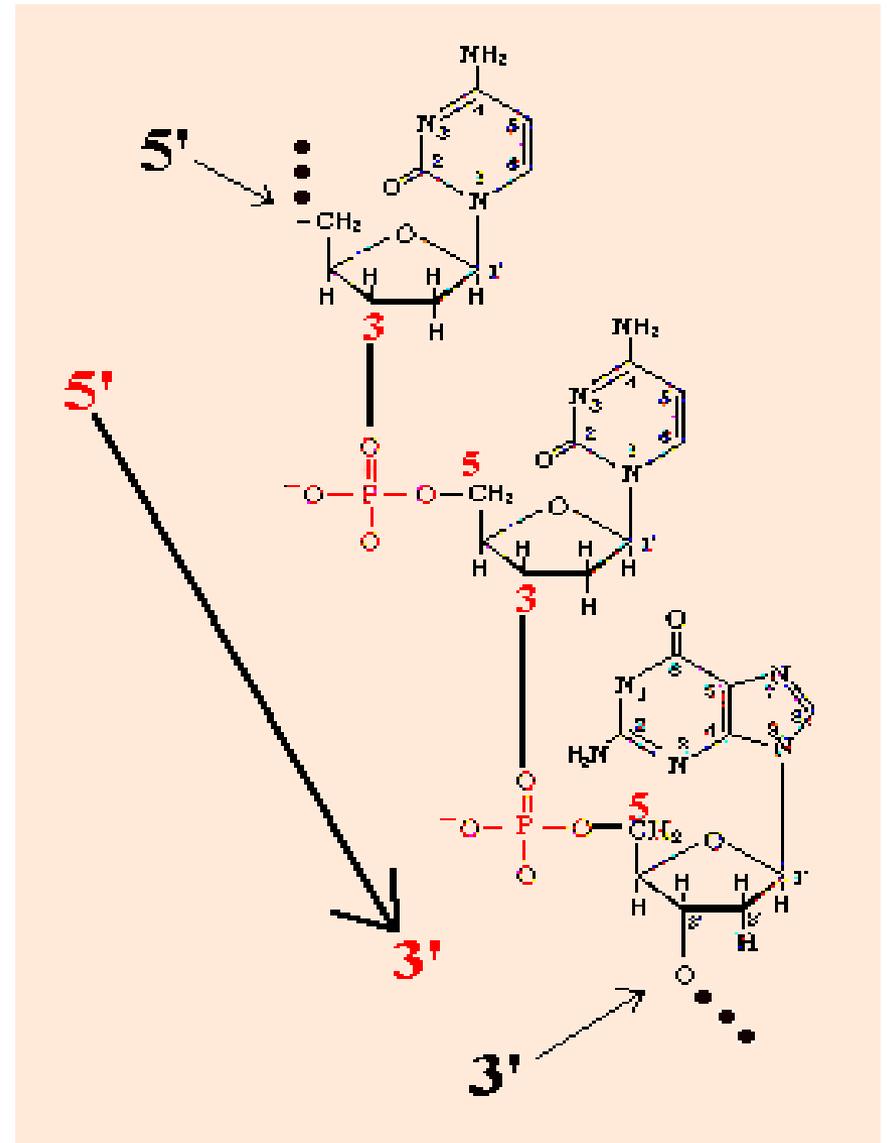


Desoxirribose





- ✓ Devido a esta formação a cadeia de DNA fica com uma direção determinada
- ✓ Em uma extremidade temos livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra temos livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose
- ✓ Isto determina que o crescimento do DNA se faça na **direção de 5' para 3'**



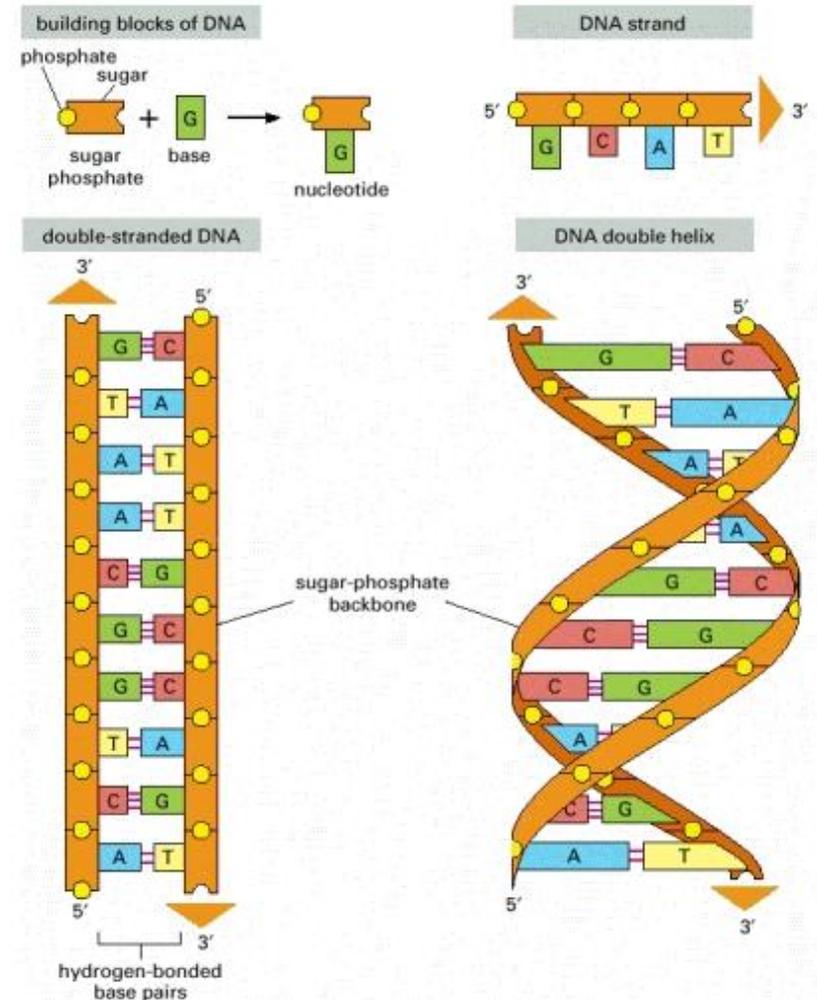


✓ Estrutura:

- ✓ Duas fitas compostas de 4 tipos de nucleotídeos (A, T, G, C)
- ✓ Desoxirribonucleotídeos
- ✓ Pontes de hidrogênio unem as duas fitas

✓ Função:

- ✓ Contém toda a informação genética responsável pela vida
- ✓ Cada gene carrega uma informação biológica que necessita ser copiada cada vez que a célula se divide
- ✓ O DNA codifica informação pela ordem ou sequência de nucleotídeos ao longo da fita

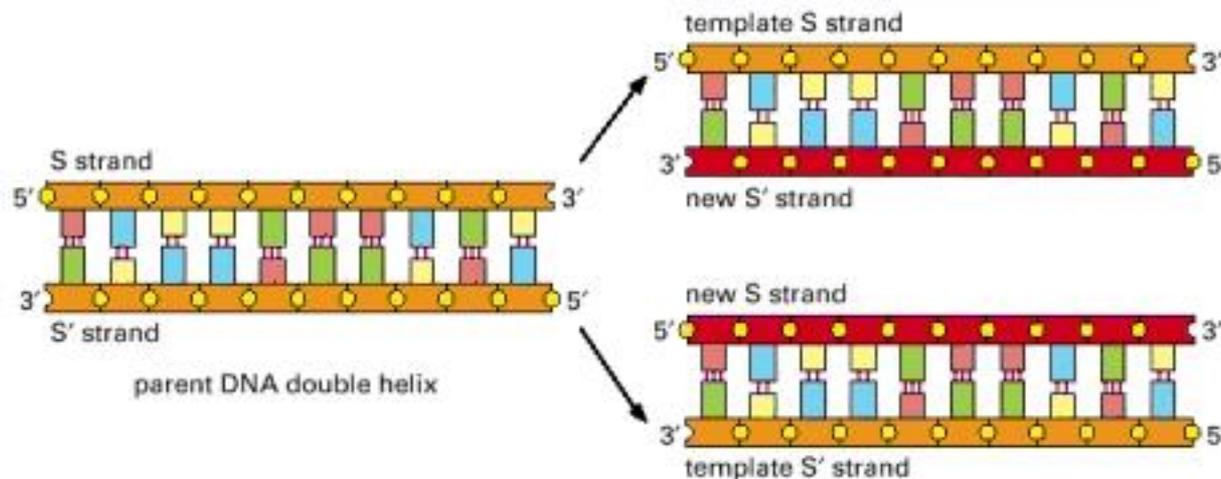




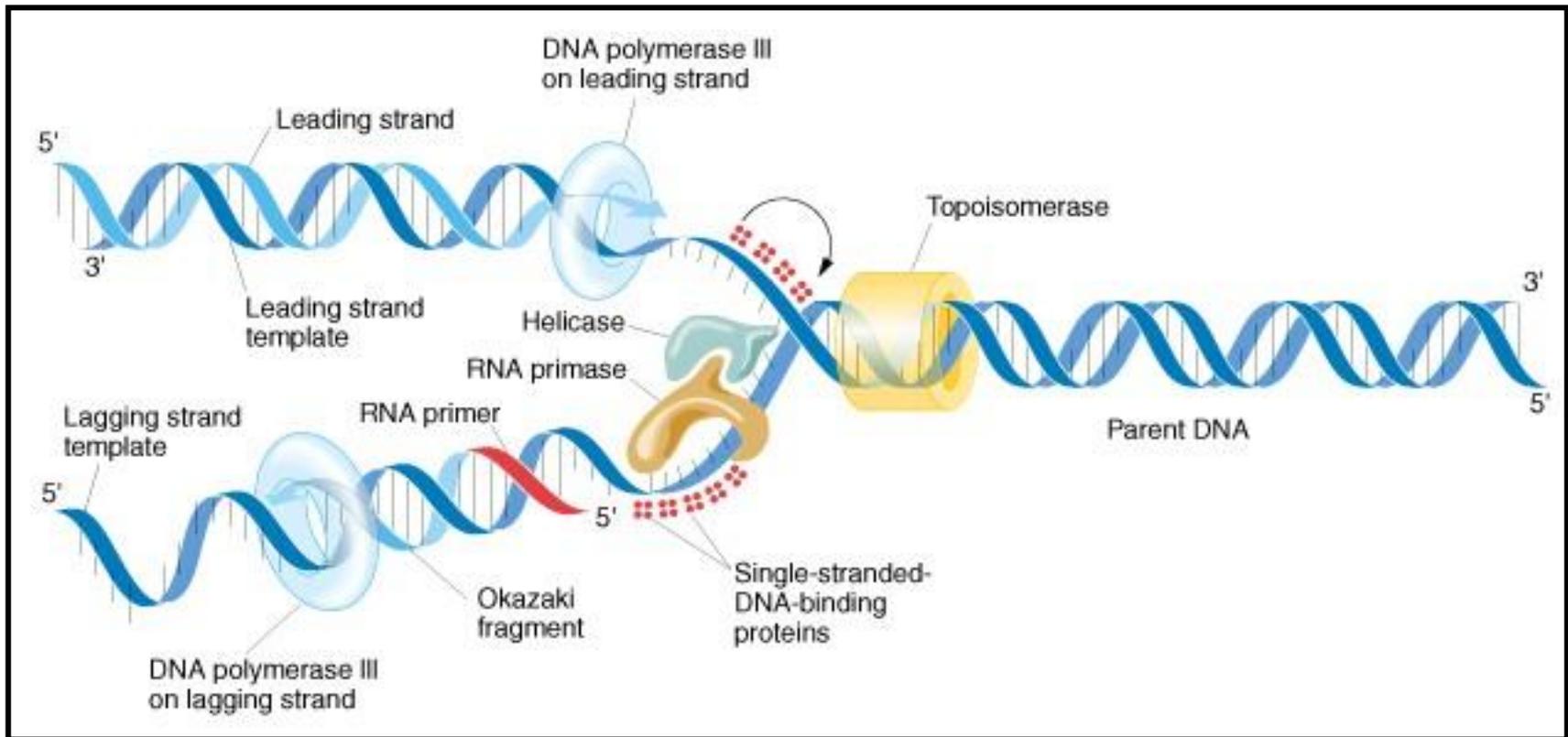
- ✓ As cadeias da dupla hélice estão unidas por **pontes de hidrogênio** estabelecidas entre as bases purinas e pirimidinas complementares:
- ✓ Adenina sempre pareia com Timina ($A = T$) e Guanina com Citosina ($G = C$)



- ✓ Todas as células necessitam duplicar o DNA antes da divisão celular
- ✓ É o processo no qual a sequência de uma fita do DNA é copiada com bases complementares (A-T e C-G) – forma a fita complementar
- ✓ Envolve reconhecimento de nucleotídeos
- ✓ Necessita que as fitas do DNA estejam separadas
- ✓ Processo necessita de enzima – **DNA Polimerase**

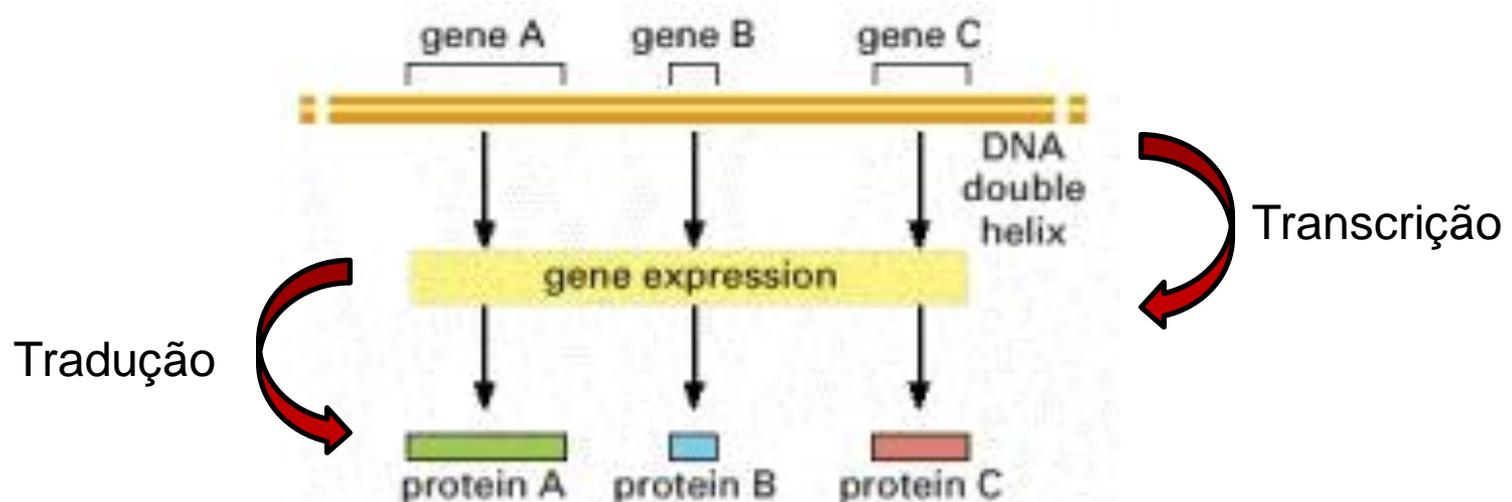


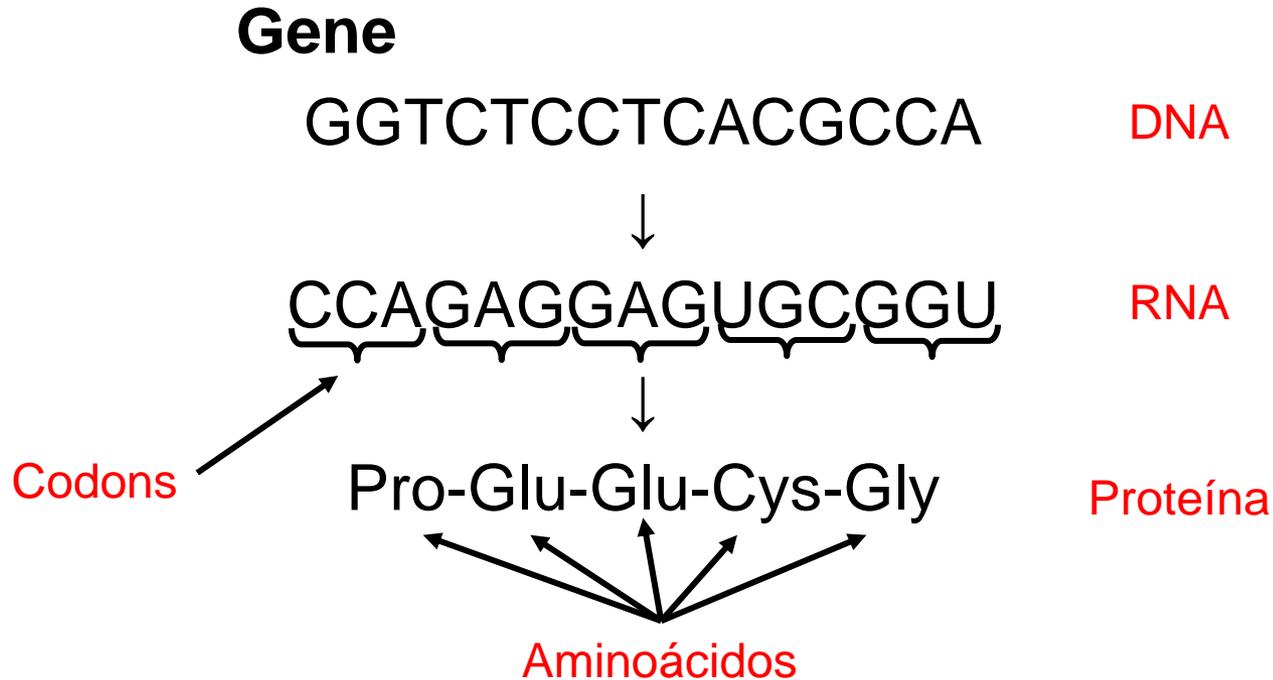
✓ **Replicação** do DNA é o processo de auto-duplicação do material genético mantendo assim o padrão de herança ao longo das gerações





- ✓ Gene – sequências específicas de DNA
 - ✓ Contém informação para a produção de proteínas
- ✓ A sequência de nucleotídeos em um gene deve informar a sequência de aminoácidos da proteína – Expressão gênica

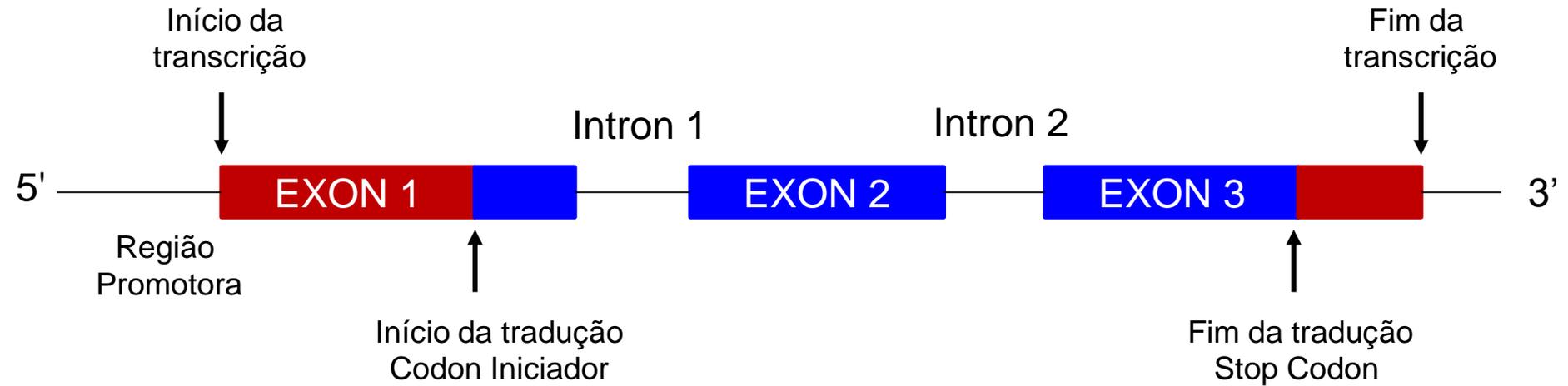






Código Genético Universal

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
U	U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U	
	U	UUC	UCC Ser	UAC	UGC Cys	C	
	U	UUA Leu	UCA	UAA STOP	UGA STOP	A	
	U	UUG	UCG	UAG STOP	UGG Trp	G	
C	C	CUU Leu	CCU	CAU His	CGU	U	
	C	CUC	CCC Pro	CAC	CGC Arg	C	
	C	CUA	CCA	CAA Gln	CGA	A	
	C	CUG	CCG	CAG	CGG	G	
A	A	AUU Ile	ACU	AAU Asn	AGU Ser	U	
	A	AUC	ACC Thr	AAC	AGC Ser	C	
	A	AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg	A	
	A	AUG Met	ACG	AAG	AGG Arg	G	
G	G	GUU	GCU	GAU Asp	GGU	U	
	G	GUC Val	GCC Ala	GAC	GGC Gly	C	
	G	GUA	GCA	GAA Glu	GGA	A	
	G	GUG	GCG	GAG	GGG	G	



✓ Mutações cromossômicas:

✓ Numéricas: variações no número de cromossomos

✓ Estruturais: alterações no número de genes ou arranjo dos cromossomos

✓ Inversão

✓ Deleção

✓ Translocação

✓ Amplificação





Alterações genéticas

✓ Mutações gênicas:

✓ Mutações pontuais

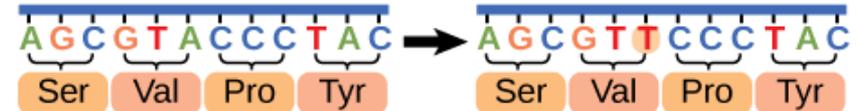
✓ Substituição

✓ Inserção

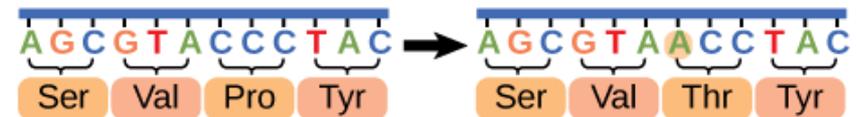
✓ Deleção

Point Mutations

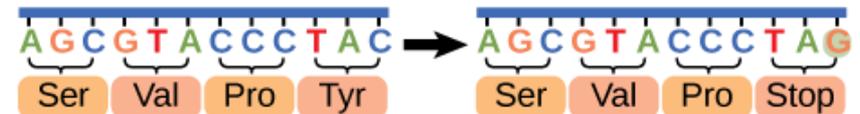
Silent: has no effect on the protein sequence



Missense: results in an amino acid substitution

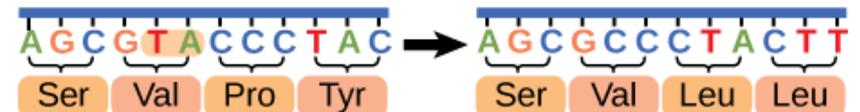


Nonsense: substitutes a stop codon for an amino acid



Frameshift Mutations

Insertions or deletions of nucleotides may result in a shift in the reading frame or insertion of a stop codon.



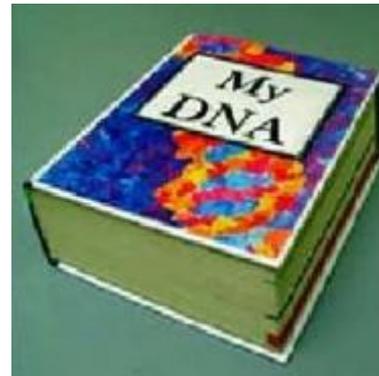


✓ Epigenética: alterações na função gênica que não podem ser explicadas por alterações na sequência do DNA

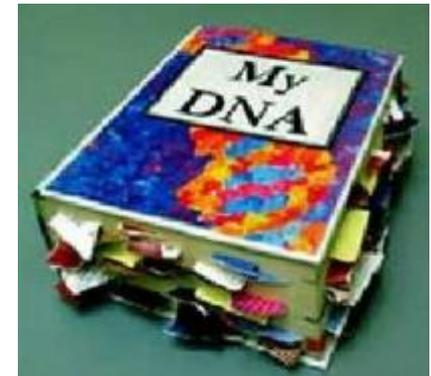
✓ Metilação do DNA

✓ Modificação de histonas

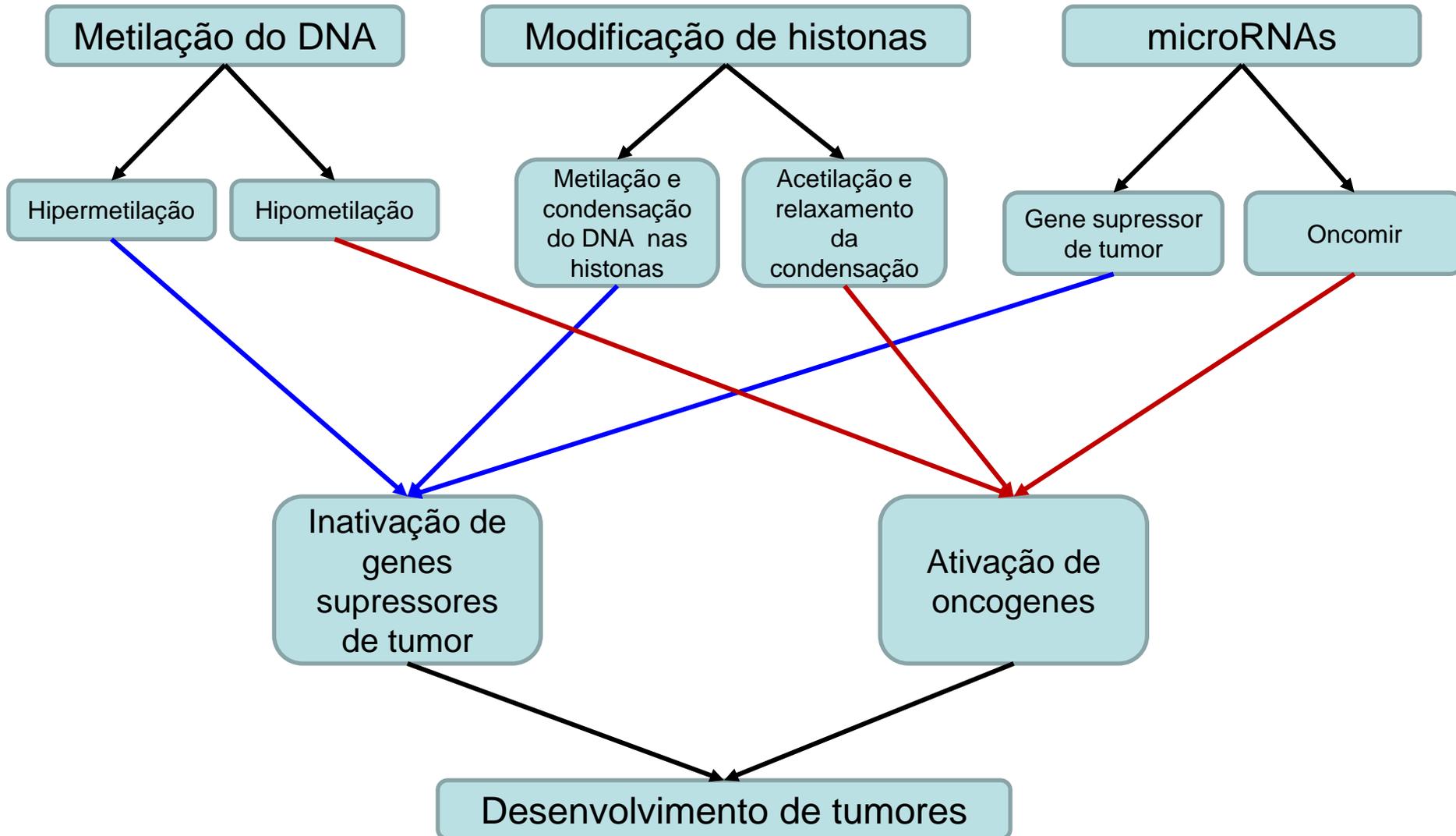
✓ Interferência por RNA



Genética



Epigenética





- ✓ Adição de um grupo metil na posição 5 do resíduo de citosina em dinucleotídeos CpG



- ✓ Regiões do genoma com alta concentração de resíduos CpG são denominadas ilhas CpG
 - ✓ Regiões com até 2Kb

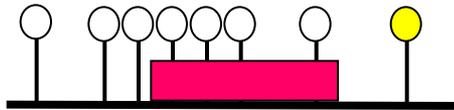


- ✓ Metilação do DNA associada a:
 - ✓ Regulação da expressão gênica
 - ✓ “Imprinting” genômico
 - ✓ Inativação do cromossomo X
 - ✓ Tumorigênese



Metilação do DNA

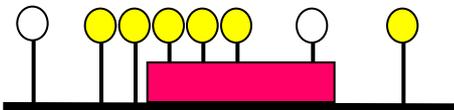
**Silenciamento de gene
supressor de tumor**



Gene Supressor de Tumor

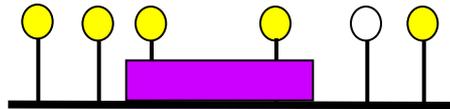


Hipermetilação

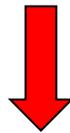


**Repressão
transcricional
do gene
supressor de
tumor**

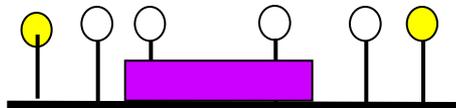
**Ativação de proto-
oncogene**



Proto-oncogene

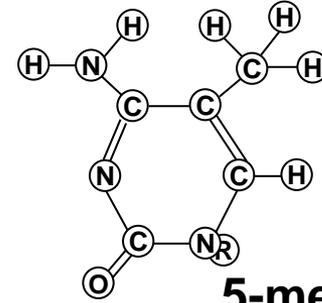


Hipometilação



**Aumento da
expressão do
oncogene**

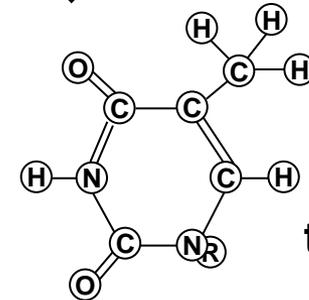
**Mutação de gene
supressor de tumor ou
proto-oncogene**



5-metil-citosina



Desaminação

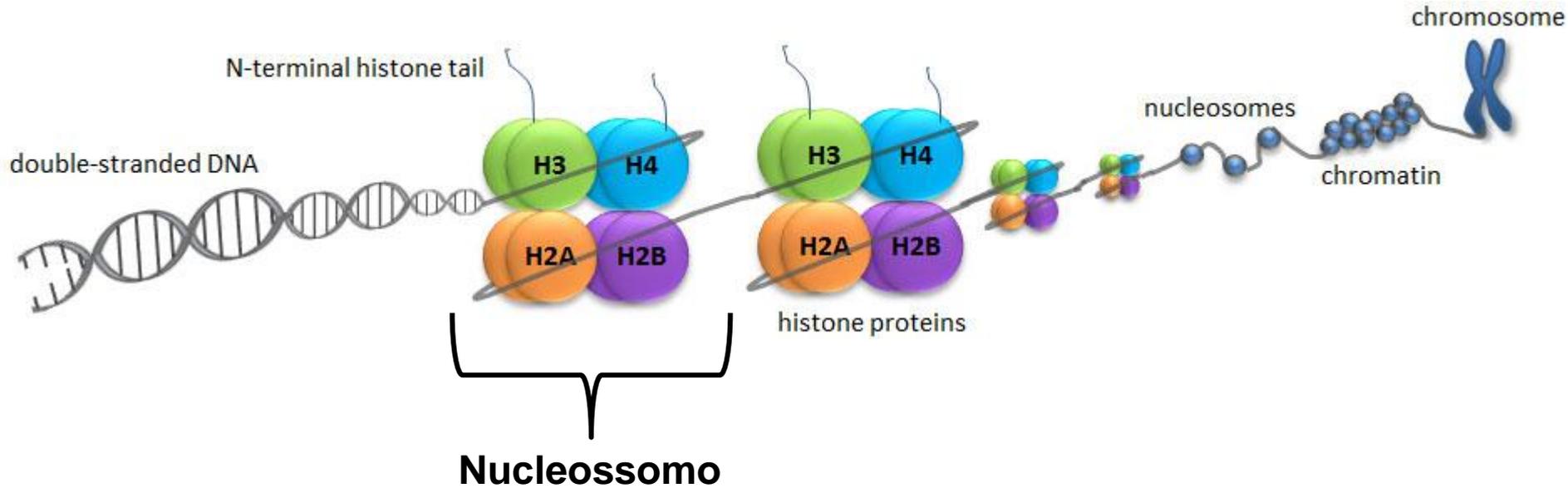


timina

**Mutações
puntiformes
oncogênicas**



Modificação de histonas



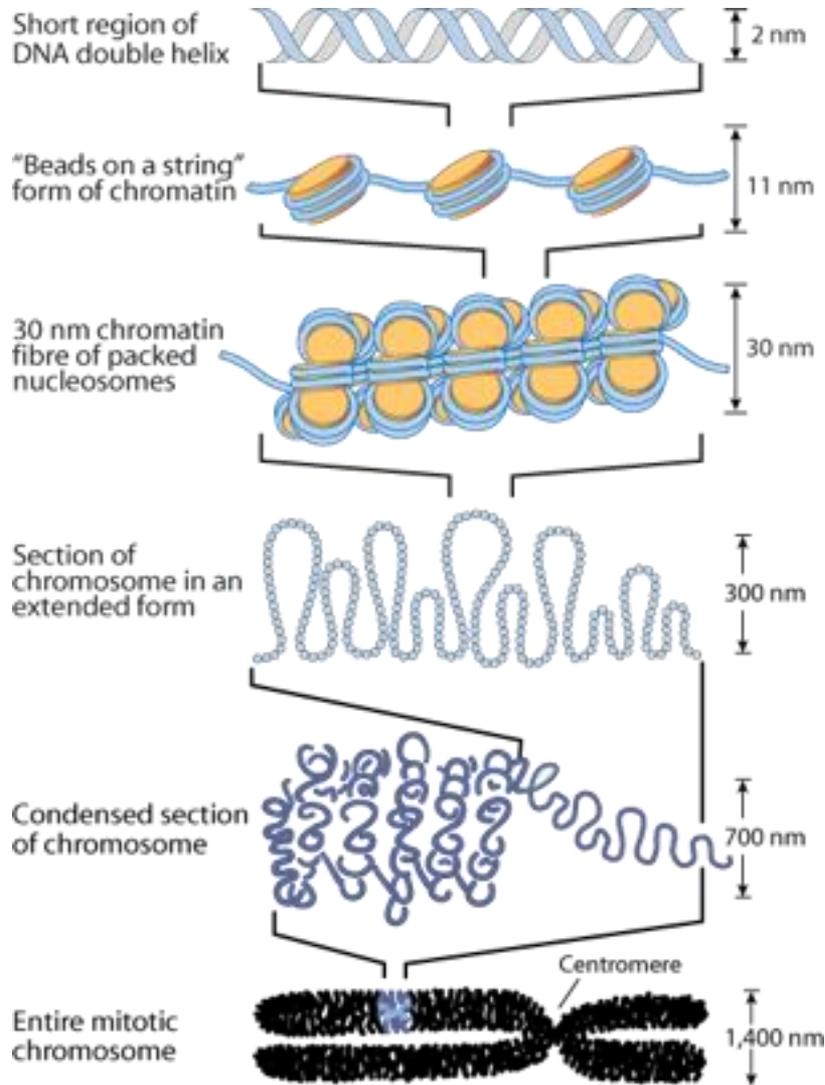
✓ Modificação de histonas

✓ Acetilação

✓ Metilação



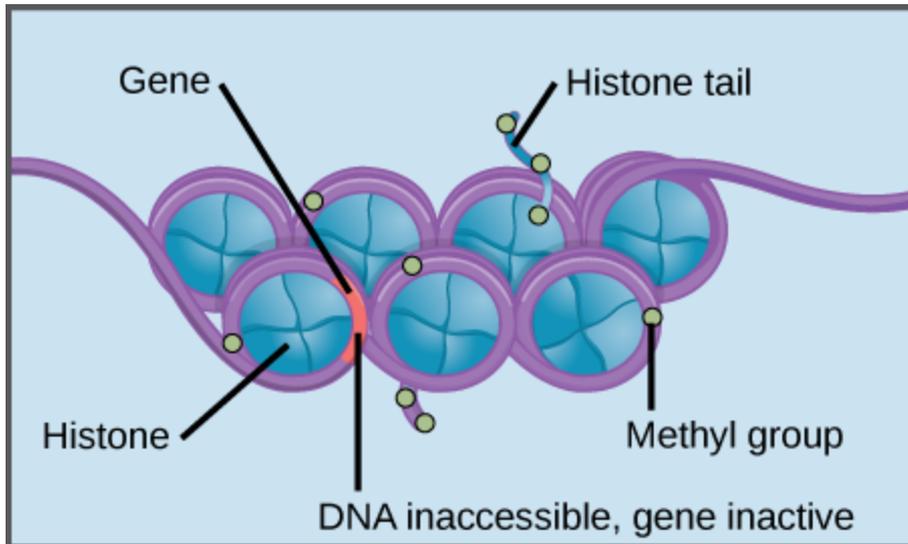
Modificação de histonas



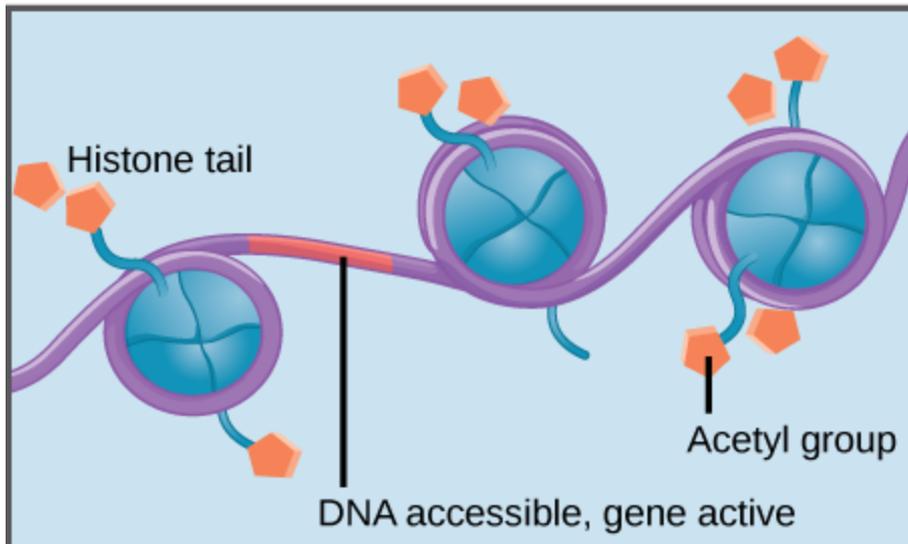
Diferentes graus de compactação do material genético



Modificação de histonas

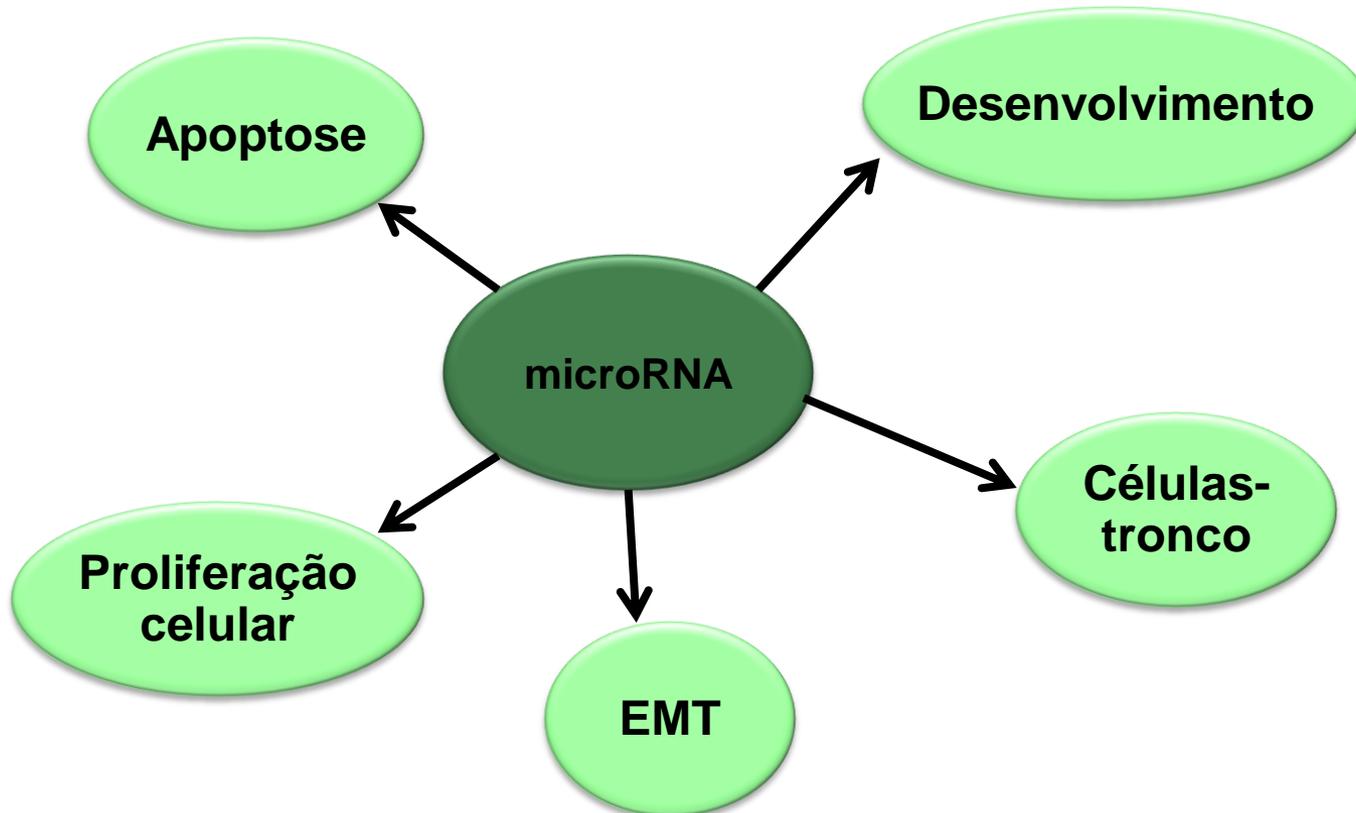


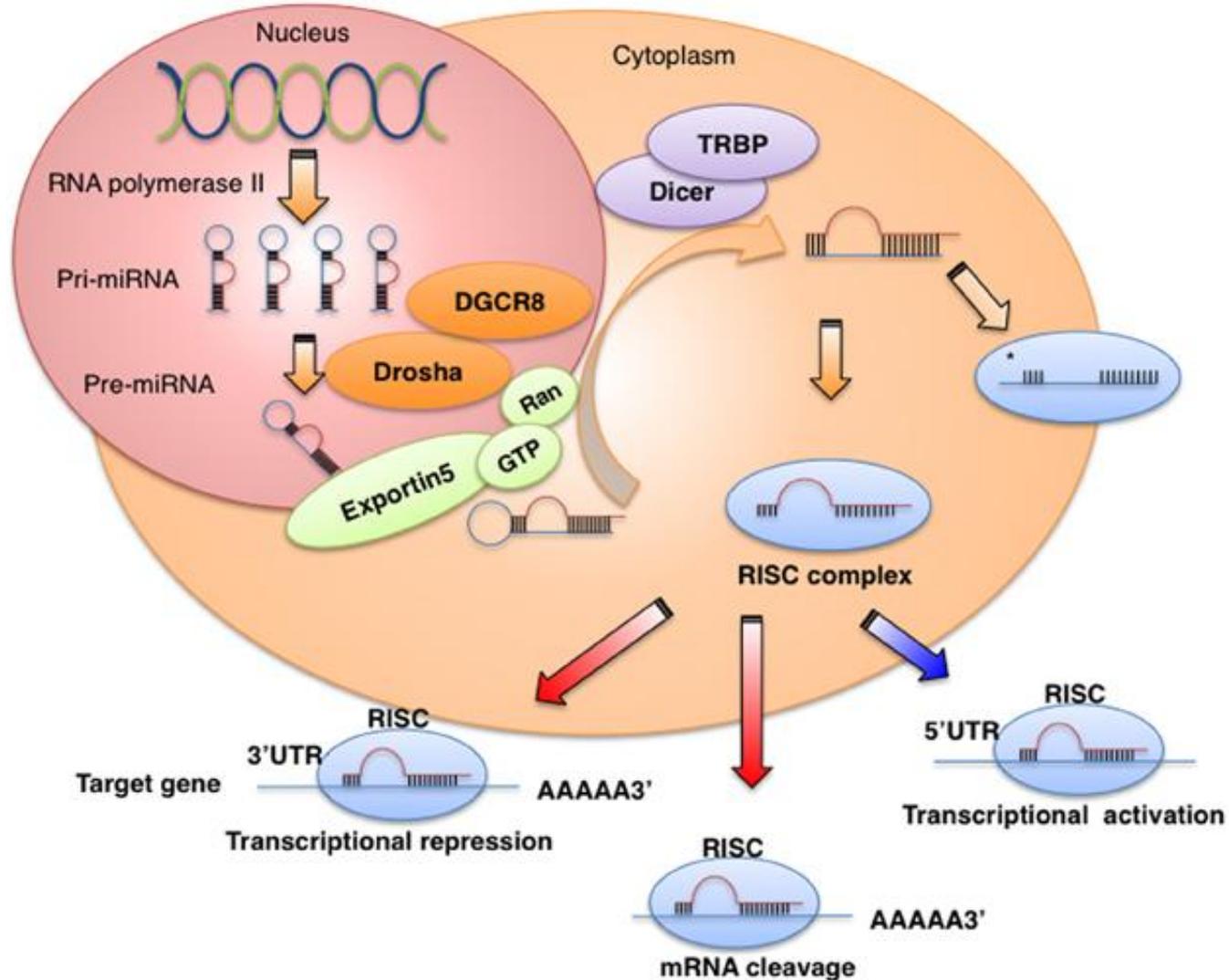
Methylation of DNA and histones causes nucleosomes to pack tightly together. Transcription factors cannot bind the DNA, and genes are not expressed.

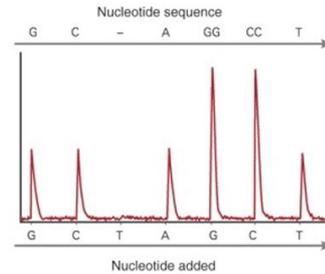
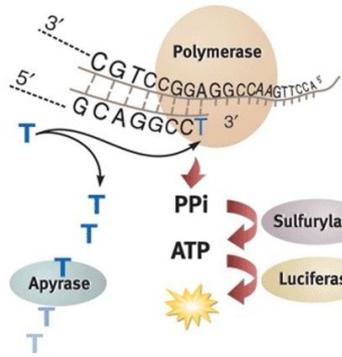


Histone acetylation results in loose packing of nucleosomes. Transcription factors can bind the DNA and genes are expressed.

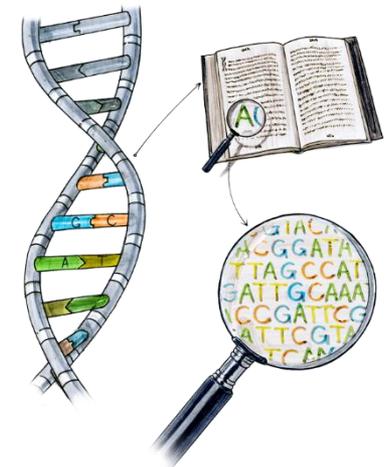
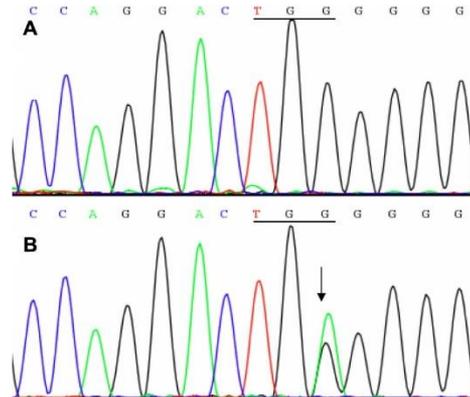
- ✓ Pequenos RNAs não codificadores (19-25 nucleotídeos)
- ✓ Controle pós-transcricional da expressão gênica
- ✓ Em humanos cerca de 2600 microRNAs foram identificados (<http://www.mirbase.org/>)





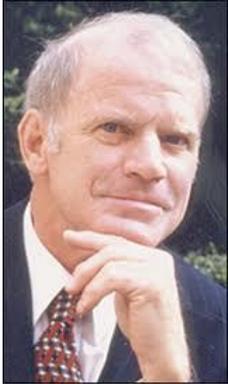


Ferramentas utilizadas em Biologia Molecular

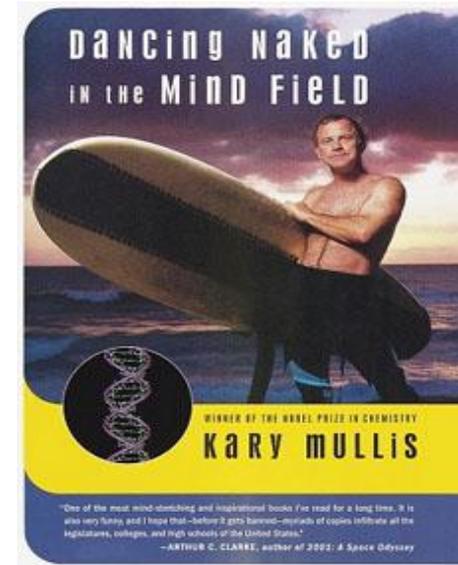




- ✓ PCR (Polymerase Chain Reaction): Reação em cadeia da polimerase
- ✓ Reação enzimática de polimerização de DNA *in vitro*
- ✓ Método para amplificação de sequências específicas do DNA/cDNA
- ✓ Reação cíclica na qual os produtos de um ciclo são substratos para o ciclo seguinte



- Kary Mullis – 1983



1985 → Saiki e cols. publicaram a primeira aplicação da PCR

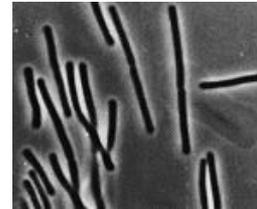
1989 → Hoffman LaRoche e Perkin-Elmer patentaram a PCR

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., **Mullis, K.**, Horn, G., and Erlich, H. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-54

Mullis, K. and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-35



- ✓ Limitação inicial da técnica: durante a etapa de **quebra das pontes de H** e separação das fitas (*DNA melting*) a 96°C, a enzima polimerase era desnaturada e precisava ser acrescentada ciclo a ciclo
- ✓ Não permitia automação
- ✓ Síntese de oligonucleotídeos



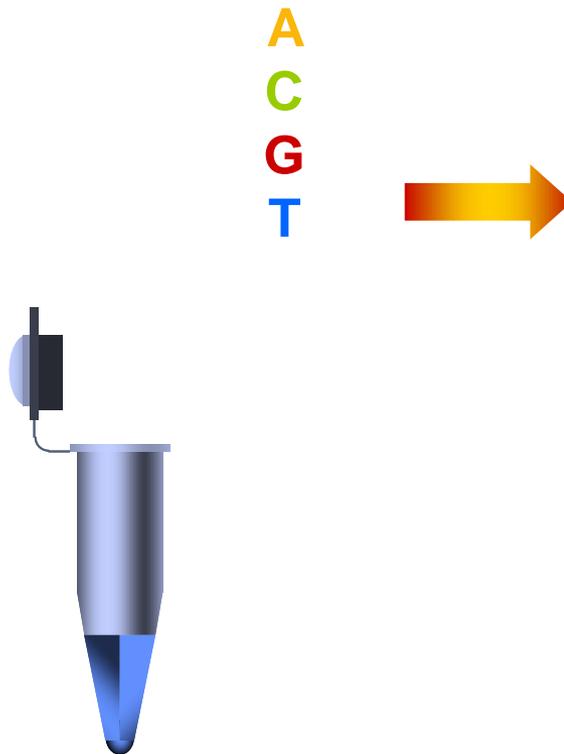
1986 → utilização da enzima polimerase de *Thermus aquaticus*

Permitiu finalmente a automação da técnica

O nome Taq vem de *Thermus aquaticus*, uma bactéria encontrada sobrevivendo a altas temperaturas em geisers no Yellow Stone National Park

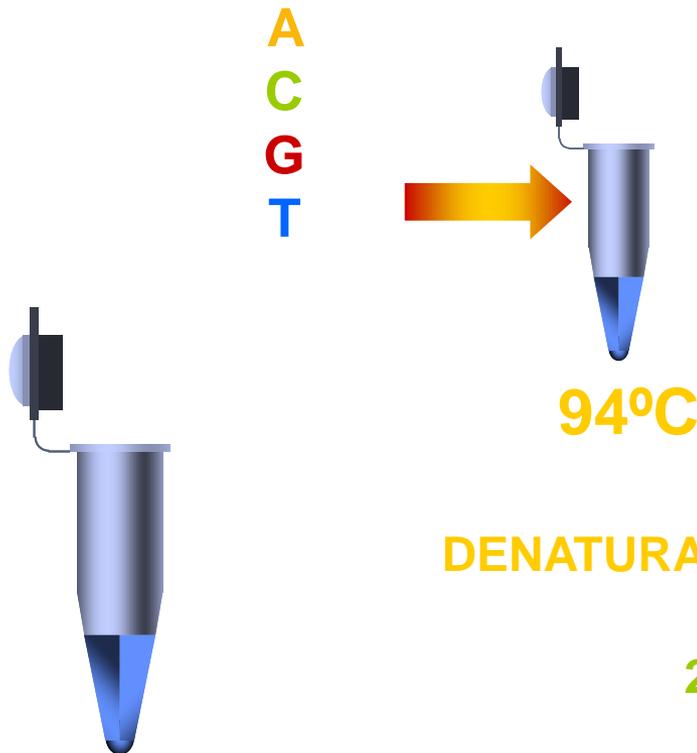
- ✓ DNA polimerase: enzima que catalisa a reação
- ✓ Molde – Molécula de DNA/cDNA: contém a sequência a ser amplificada
- ✓ Região iniciadora – Oligonucleotídeo/“Primer”: definem a sequência a ser amplificada
- ✓ Deoxinucleotídeos – dNTPs: para a “montagem” da sequência
- ✓ Tampão de reação: mantém o pH e a força iônica para a atividade da enzima
- ✓ Magnésio: cofator da enzima

1. Adição de reagentes





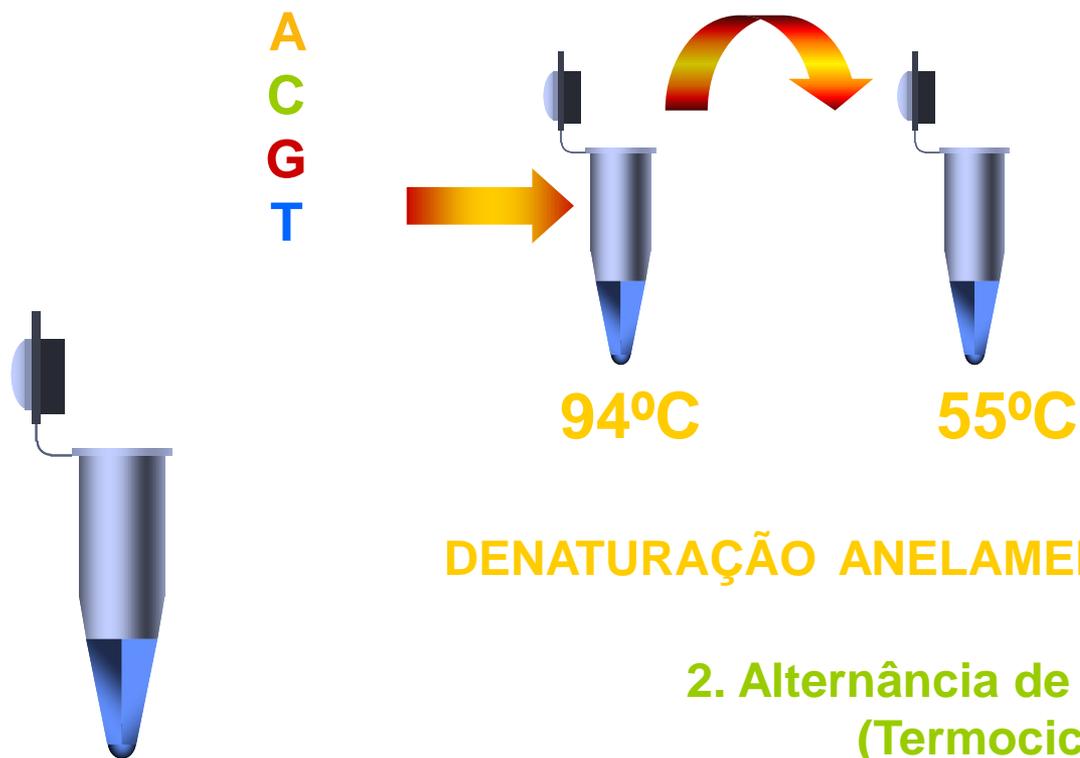
1. Adição de reagentes



DENATURAÇÃO

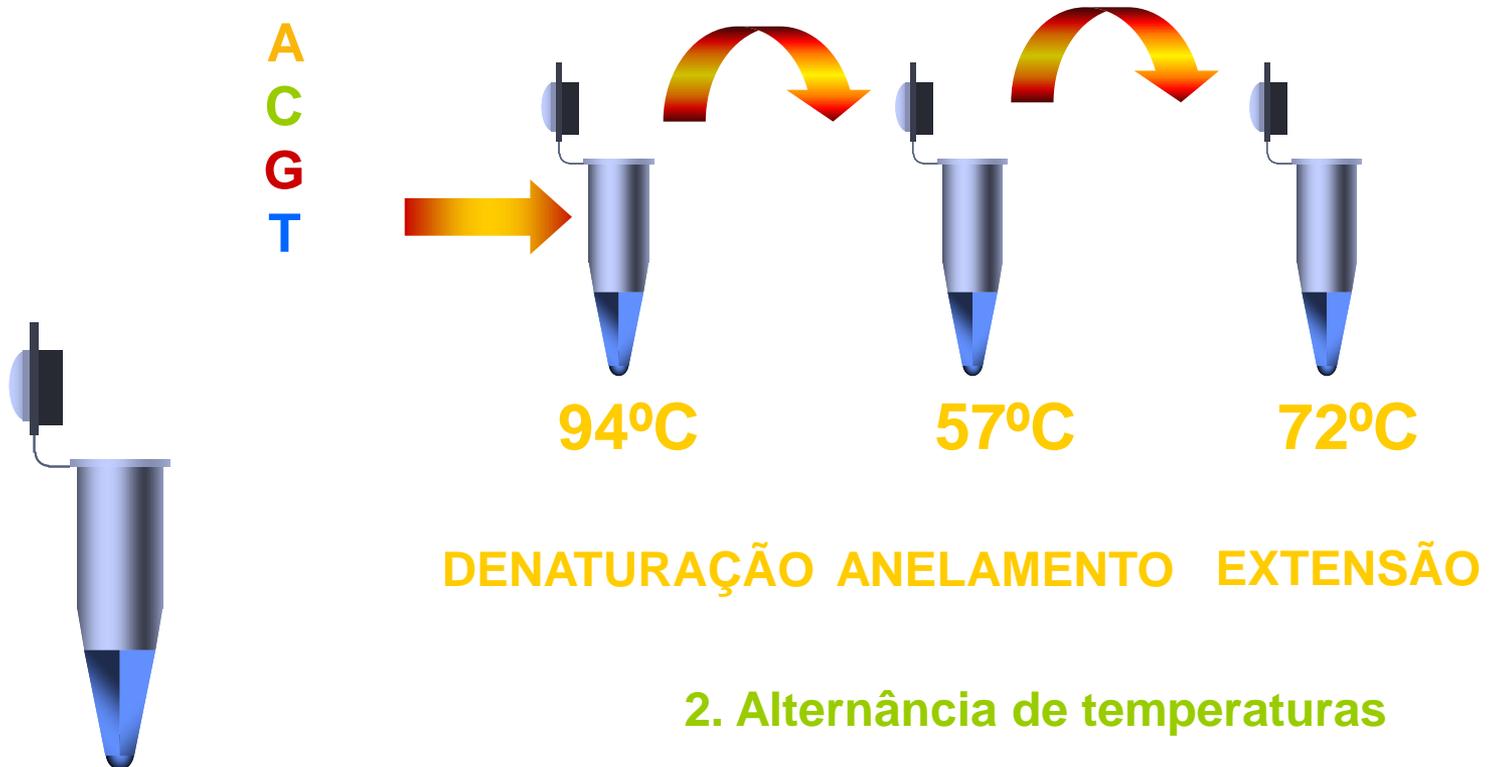
2. Alternância de temperaturas
(Termociclador)

1. Adição de reagentes





1. Adição de reagentes



2. Alternância de temperaturas

(Termociclador)

25-40 (35) CICLOS



Etapas da PCR



Região que se deseja amplificar



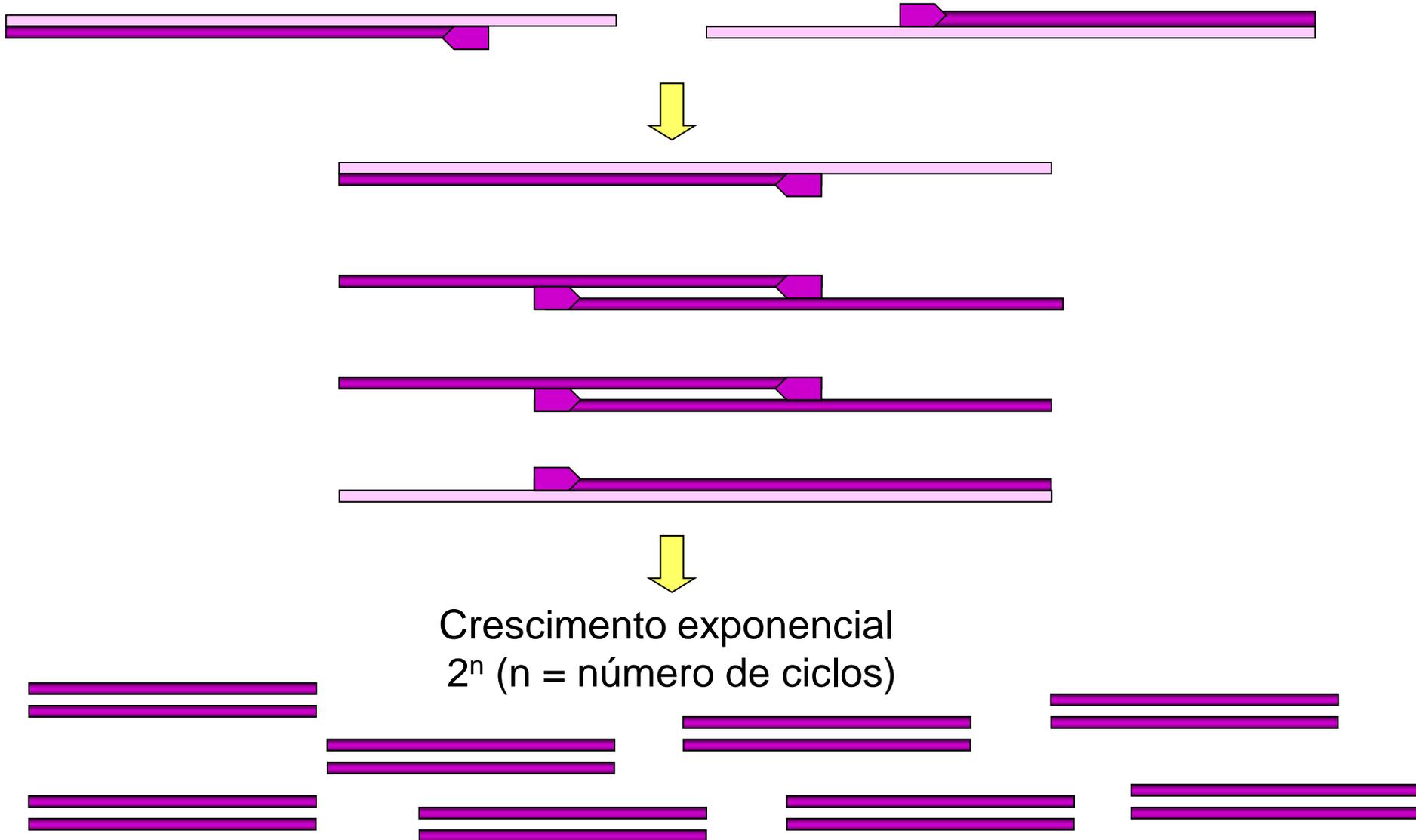
Desnaturação
pelo calor
(90 – 95°C)



Anelamento dos
oligonucleotídeos
("primers")
(45 – 70°C)



Extensão
(72°C)





Amplificação exponencial

Aumento = 2^n
n = número de ciclos

Eficiência 100% = duplicação do
material a cada ciclo



Número de cópias de 1 molécula
de DNA após 34 ciclos: **1.580.000.000**

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

- ✓ Qualidade e a concentração da amostra ($<1\mu\text{g}$)
- ✓ Desenho e a concentração dos primers ($0,1-0,5\mu\text{M}$)
- ✓ Concentração de magnésio ($0,5$ a $2,5\text{mM}$)
- ✓ Concentração dos 4 deoxinucleotídeos ($20-200\mu\text{M}$)
- ✓ Solução tampão ($\text{pH}=8,3-8,8$)
- ✓ Seleção e concentração da DNA polimerase ($1-2,5\text{U}$)
- ✓ Ciclagem da reação
- ✓ Adição e concentração de aditivos/co solventes



Visualização do produto

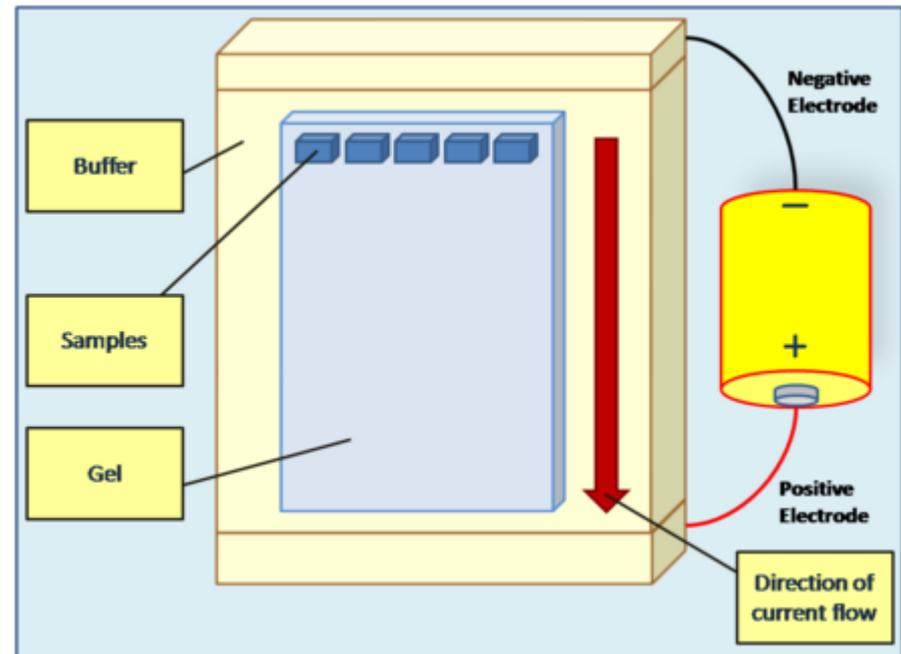
?



✓ Eletroforese: consiste na migração e separação de partículas em uma matriz submetida a uma diferença de potencial elétrico

✓ Migração depende:

- ✓ Tamanho
- ✓ Carga



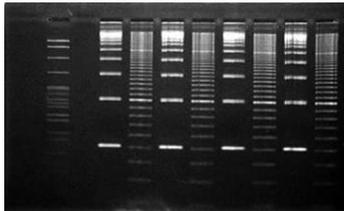


- ✓ Tipos de matriz
 - ✓ Agarose: até 200Kb
 - ✓ Poliacrilamida: separação de fragmentos menores que 2Kb

- ✓ Detecção
 - ✓ Brometo de etídeo (luz UV)
 - ✓ SYBR Safe (luz UV ou azul)
 - ✓ Gel Red (luz UV)
 - ✓ Nitrato de prata

Gel de Agarose

Sistema
horizontal



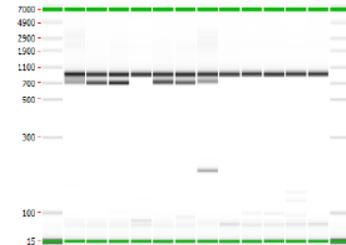
Gel de Poliacrilamida

Sistema
vertical



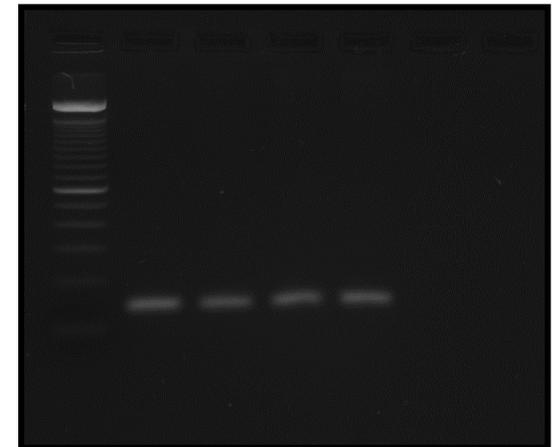
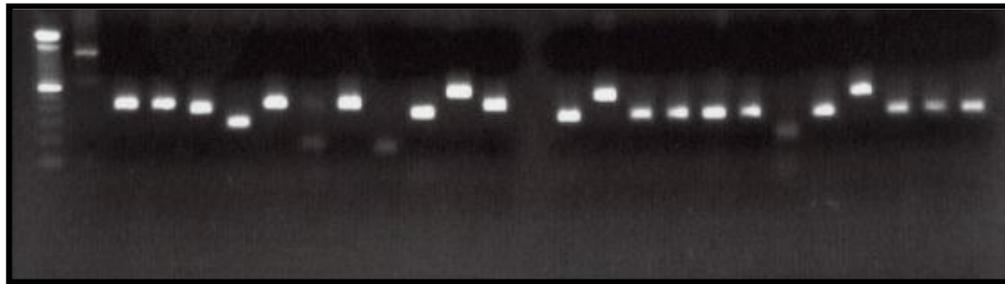
Eletroforese Capilar

Sistema
automático

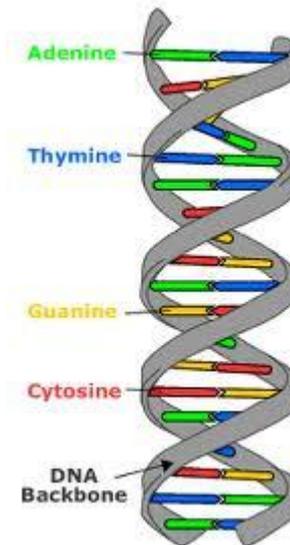




<http://www.biomedicinabrasil.com/>



- ✓ Coleta da amostra
- ✓ Estabilização da Amostra
- ✓ Extração dos ácidos nucleicos
- ✓ Quantificação dos ácidos nucleicos
 - ✓ Verificar a concentração de DNA na amostra
 - ✓ Verificar a presença impurezas
 - ✓ Restos de extração: fenol-clorofórmio, sais, etc.
 - ✓ Restos de proteínas



Inibidores da Polimerase:

- Fenol
- Proteinase K
- Agentes quelantes em excesso (EDTA)
- Hemoglobina e outras proteínas das hemácias
- SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)
- Elevadas concentrações de sal

Analytical Biochemistry 439 (2013) 152–160

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio



Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues



Stefan Paireder^a, Bettina Werner^a, Josef Bailer^a, Wolfgang Werther^a, Erich Schmid^a, Beatrix Patzak^b, Margit Cichna-Markl^{a,*}

Experimental and Molecular Pathology 92 (2012) 33–43

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp



Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: Defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques

Gulisa Turashvili^{a,b}, Winnie Yang^a, Steven McKinney^b, Steve Kalloger^c, Nadia Gale^a, Ying Ng^a, Katie Chow^a, Lynda Bell^a, Julie Lorette^a, Melinda Carrier^a, Margaret Luk^c, Samuel Aparicio^{a,b}, David Huntsman^a, Stephen Yip^{a,*}

Qualidade

Quantidade



Pré-fixação: tipo de tecido, autólise

Fixação: temperatura, pH, tipo de fixador, duração

Pós-fixação: temperatura, tempo de armazenamento do bloco

Methods 70 (2014) 12–19

Contents lists available at ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth



Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures



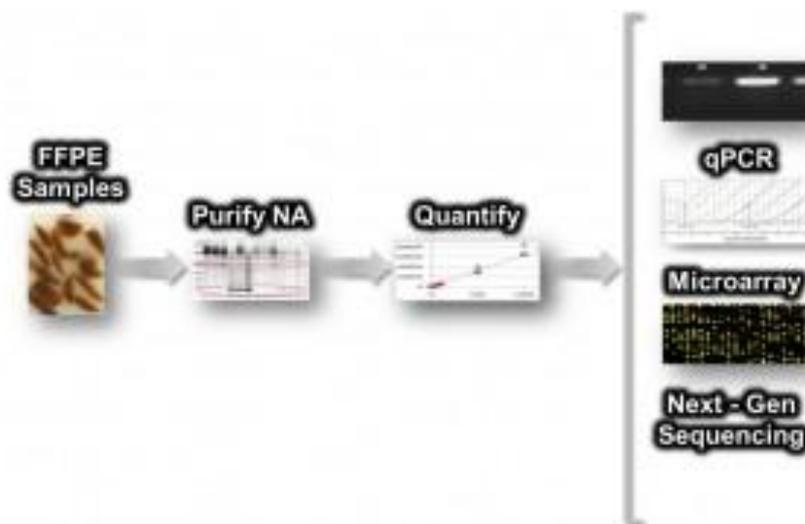
William J. Howat^{*}, Beverley A. Wilson

A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue

How Well Do You Know Your FFPE Specimen?

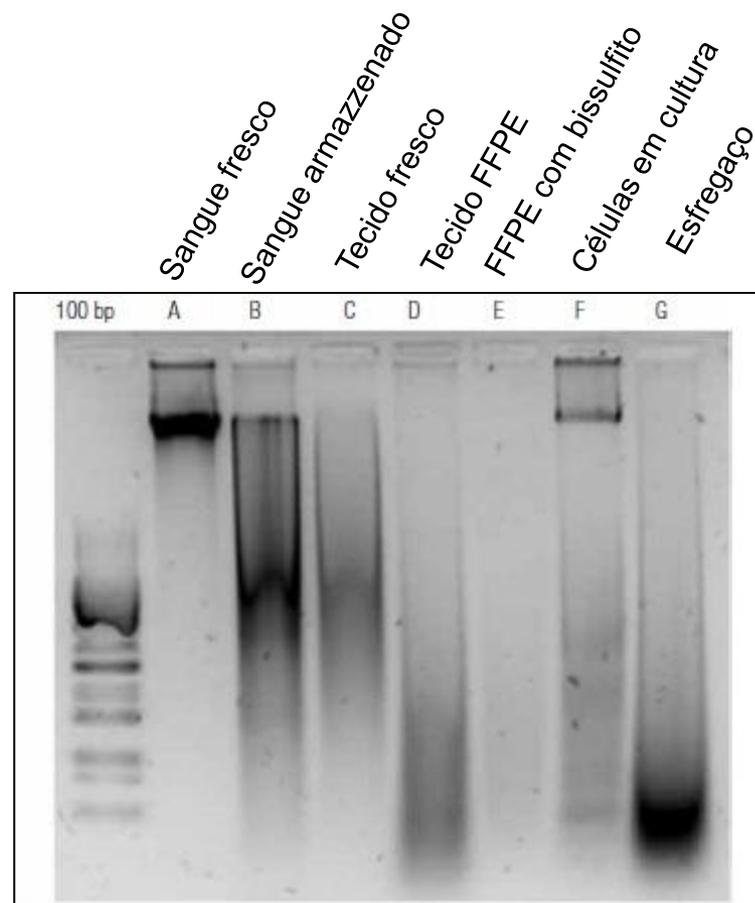
B. Paige Bass, PhD; Kelly B. Engel, PhD; Sarah R. Greytak, PhD; Helen M. Moore, PhD

- ✓ Fixação em formalina e embebição em parafina
- ✓ Preserva morfologia
- ✓ Longevidade
- ✓ Reação entre ácidos nucleicos e proteínas
- ✓ Fragmentação dos ácidos nucleicos

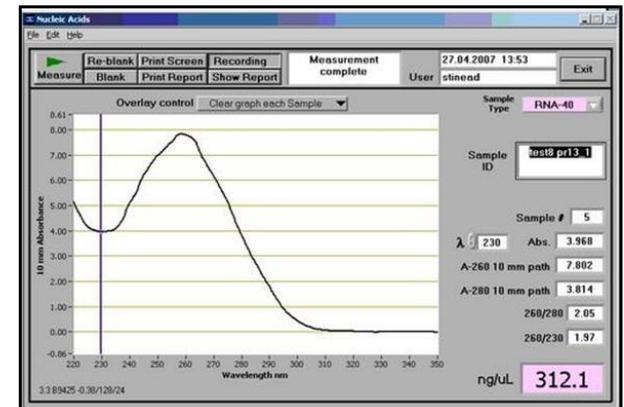
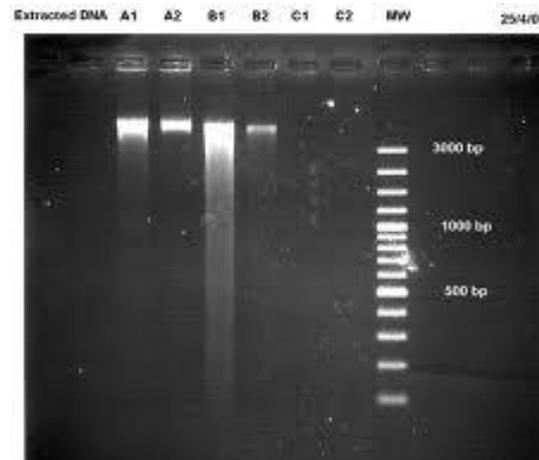
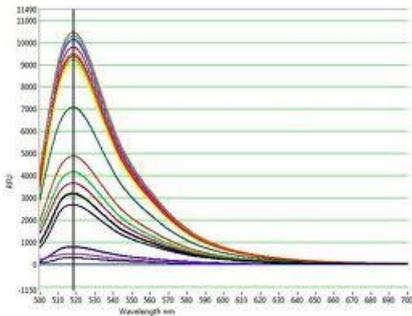


- ✓ Protocolo básico para extração de ácidos nucleicos
 - ✓ Desparafinização
 - ✓ Digestão com enzimas proteolíticas
 - ✓ Purificação
 - ✓ Precipitação com etanol

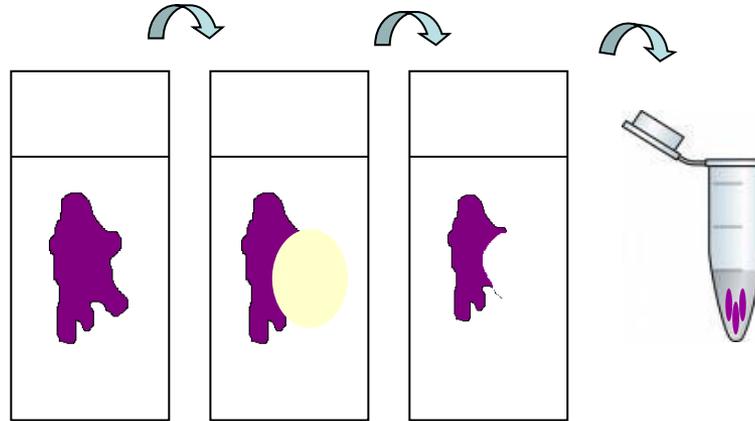
Optimizing nucleic acid extraction from thyroid fine-needle aspiration cells in stained slides, formalin-fixed/paraffin-embedded tissues, and long-term stored blood samples



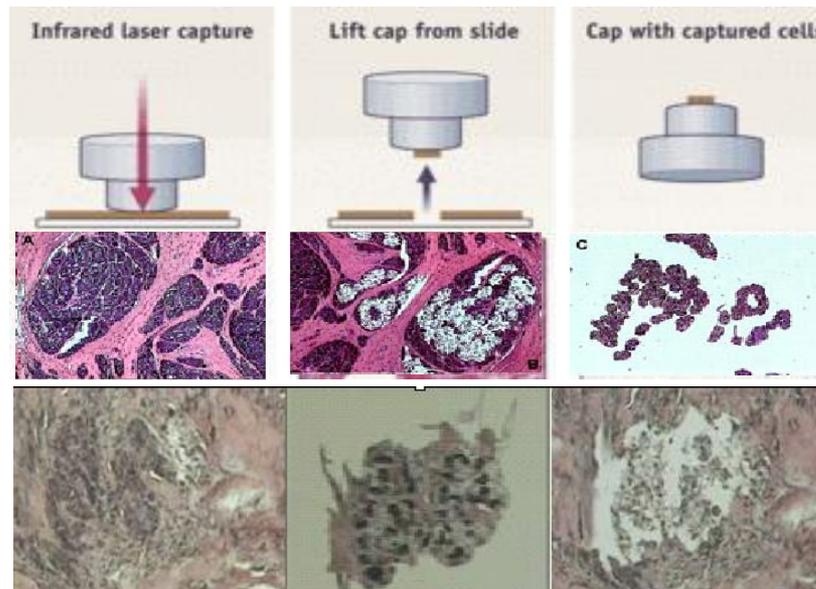
- ✓ A quantificação pode ser feita através de:
 - ✓ Espectrofotometria
 - ✓ Fluorimetria
 - ✓ Quantificação em gel de agarose



- **Microdissecção manual /scrape**



- **Microdissecção a laser**





- ✓ Monitora o progresso da reação em cadeia da polimerase enquanto ela ocorre
 - ✓ Usa sinal fluorescente emitido durante a reação
- ✓ O dado é coletado durante todo o processo e não apenas no final da reação
- ✓ Permite análise quantitativa dos dados
- ✓ Metodologia rápida



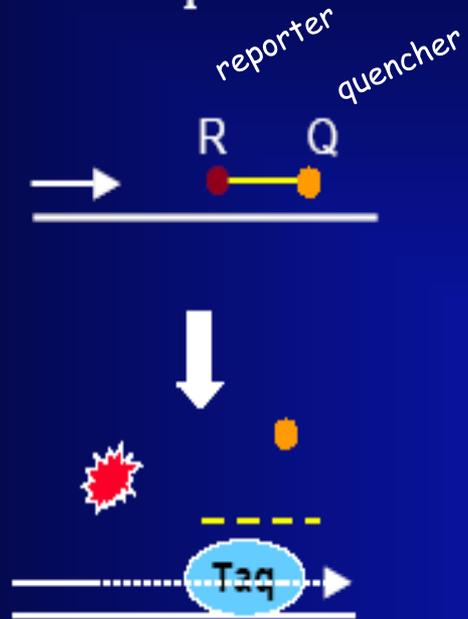
- ✓ Agentes que se ligam ao DNA (SYBR Green, EVA Green)
- ✓ Sondas de hidrólise (TaqMan, Beacons, Scorpions)
- ✓ Sondas de hibridização (Light Cycler)

Methods of fluorescence detection

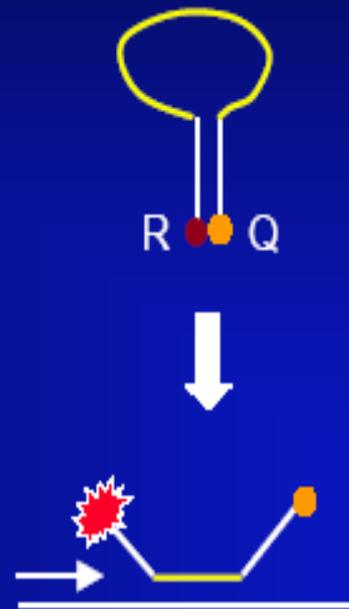
SYBR Green



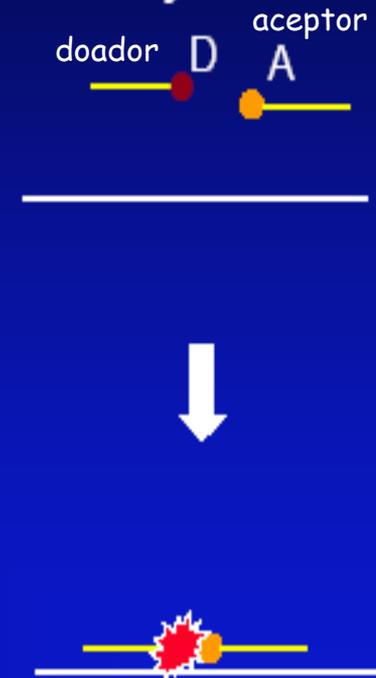
Taqman



Molecular
Beacons

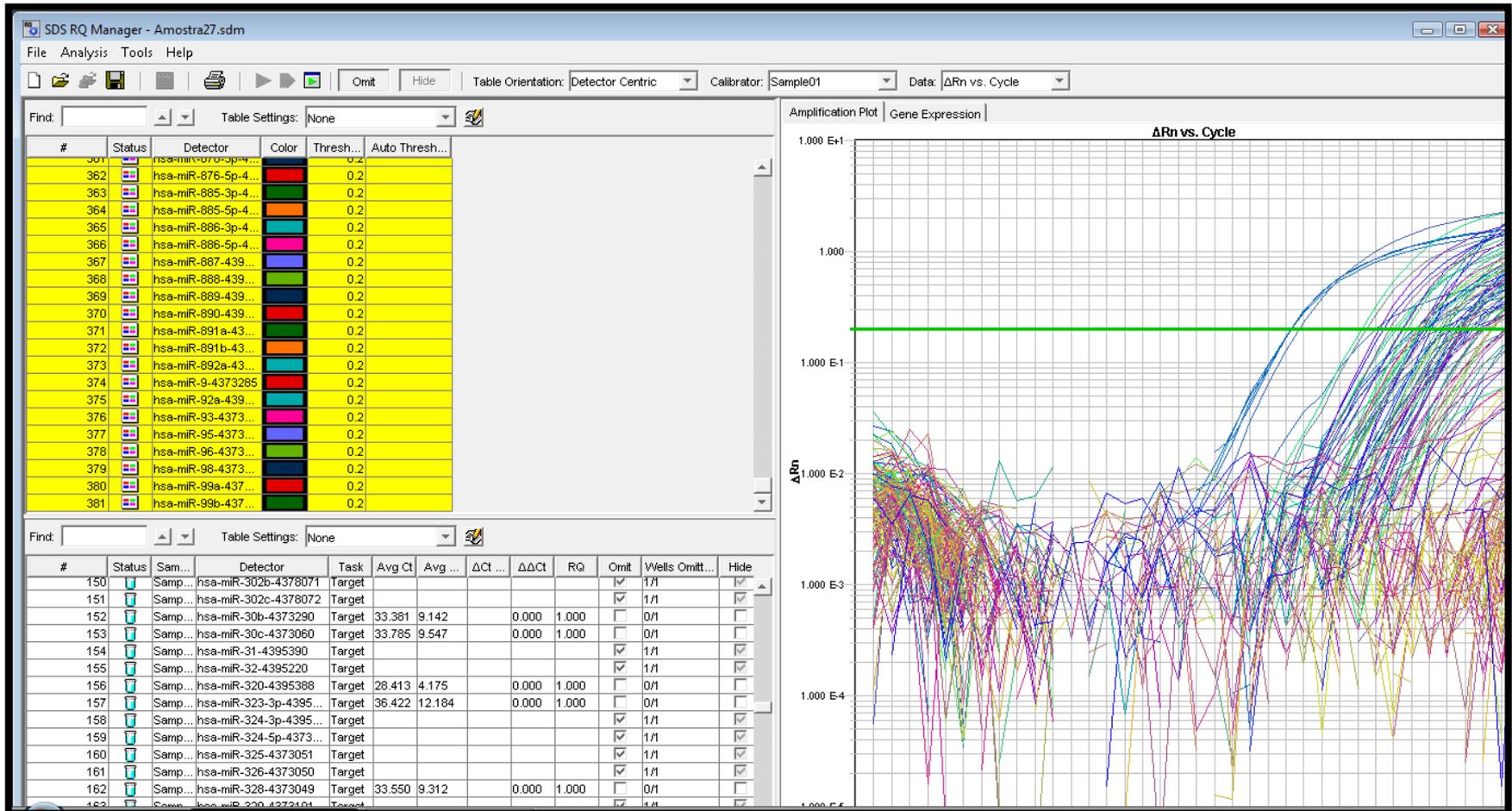


Light
Cycler





✓ Curva de amplificação



PCR convencional

- ✓ Baixa sensibilidade
- ✓ Baixa resolução
- ✓ Não quantitativo
- ✓ Necessidade de processamento do produto final

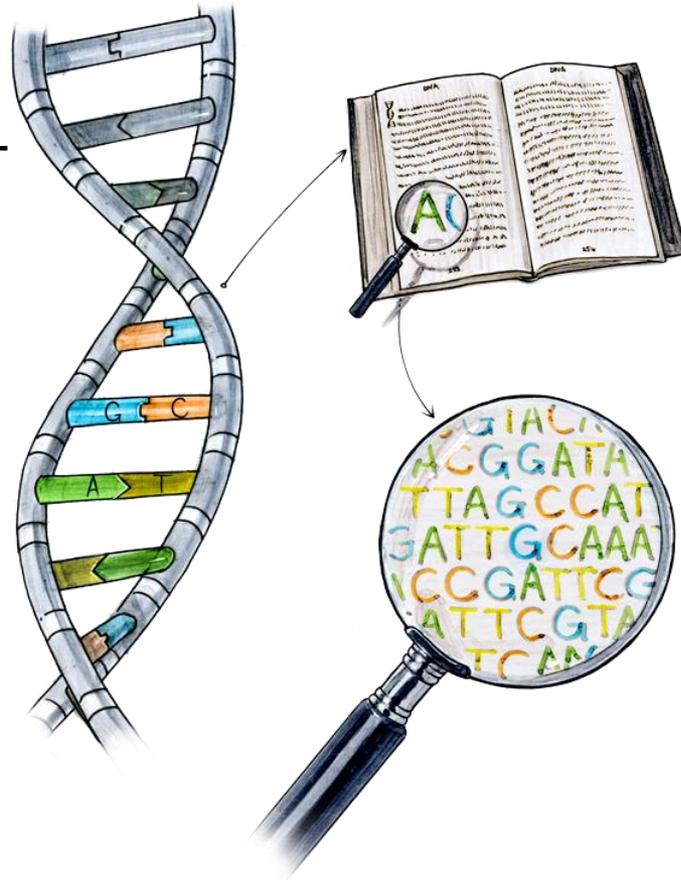


PCR em tempo real

- ✓ Alta sensibilidade
- ✓ Requer menor quantidade de amostra
- ✓ Requer equipamento específico: alto custo
- ✓ Quantitativo



- ✓ Sequenciamento: determinação da ordem dos nucleotídeos em um fragmento do DNA
- ✓ Sequencia de bases A, C, G, T





- ✓ Forense
 - ✓ Identificação
 - ✓ Paternidade
- ✓ Medicina
 - ✓ Mutações associadas à doenças
- ✓ Agricultura
 - ✓ Genoma de organismos



- ✓ Método da terminação da cadeia/didesoxi: Sanger
- ✓ Em 1975 Frederick Sanger descreveu a técnica para sequenciamento

J Mol Biol. 1975 May 25;94(3):441-8.

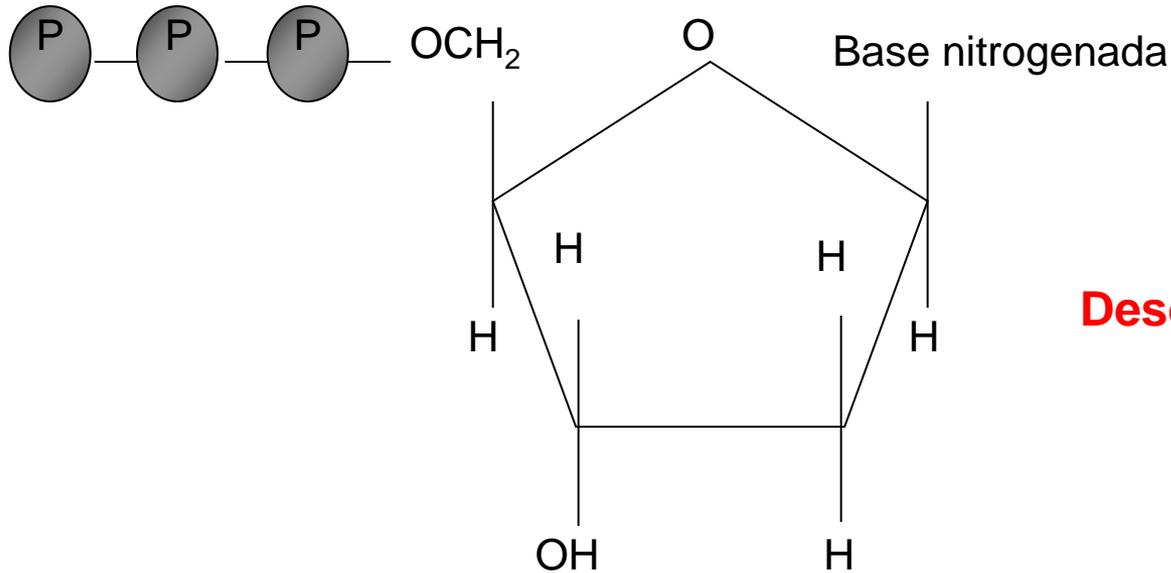
A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.

Sanger F, Coulson AR.

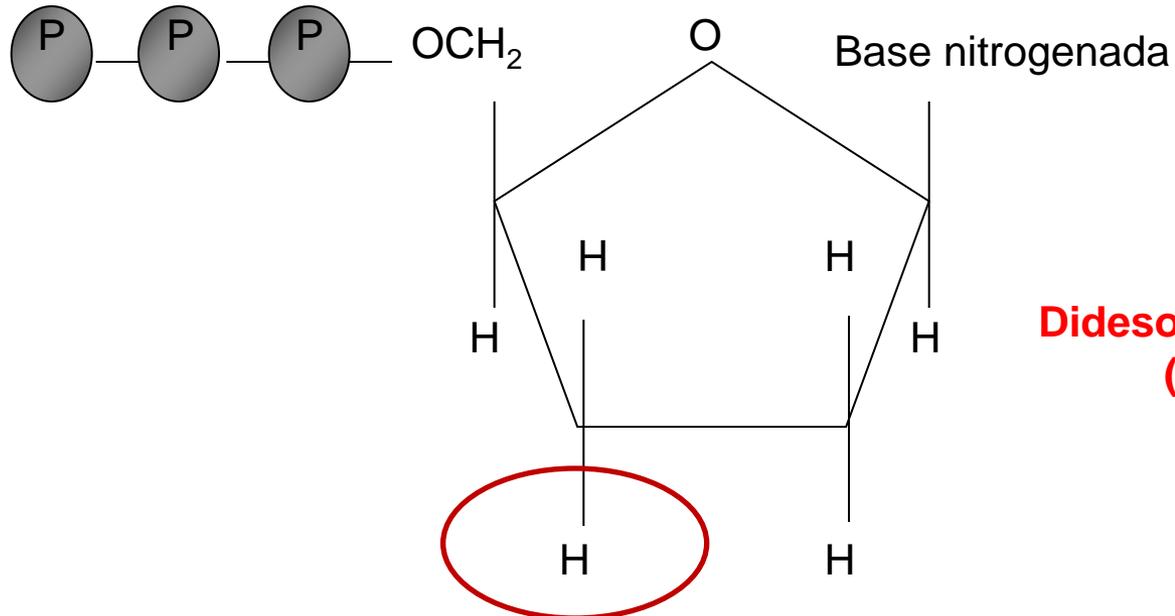
PMID: 1100841 [PubMed - indexed for MEDLINE]



Princípio - Sanger



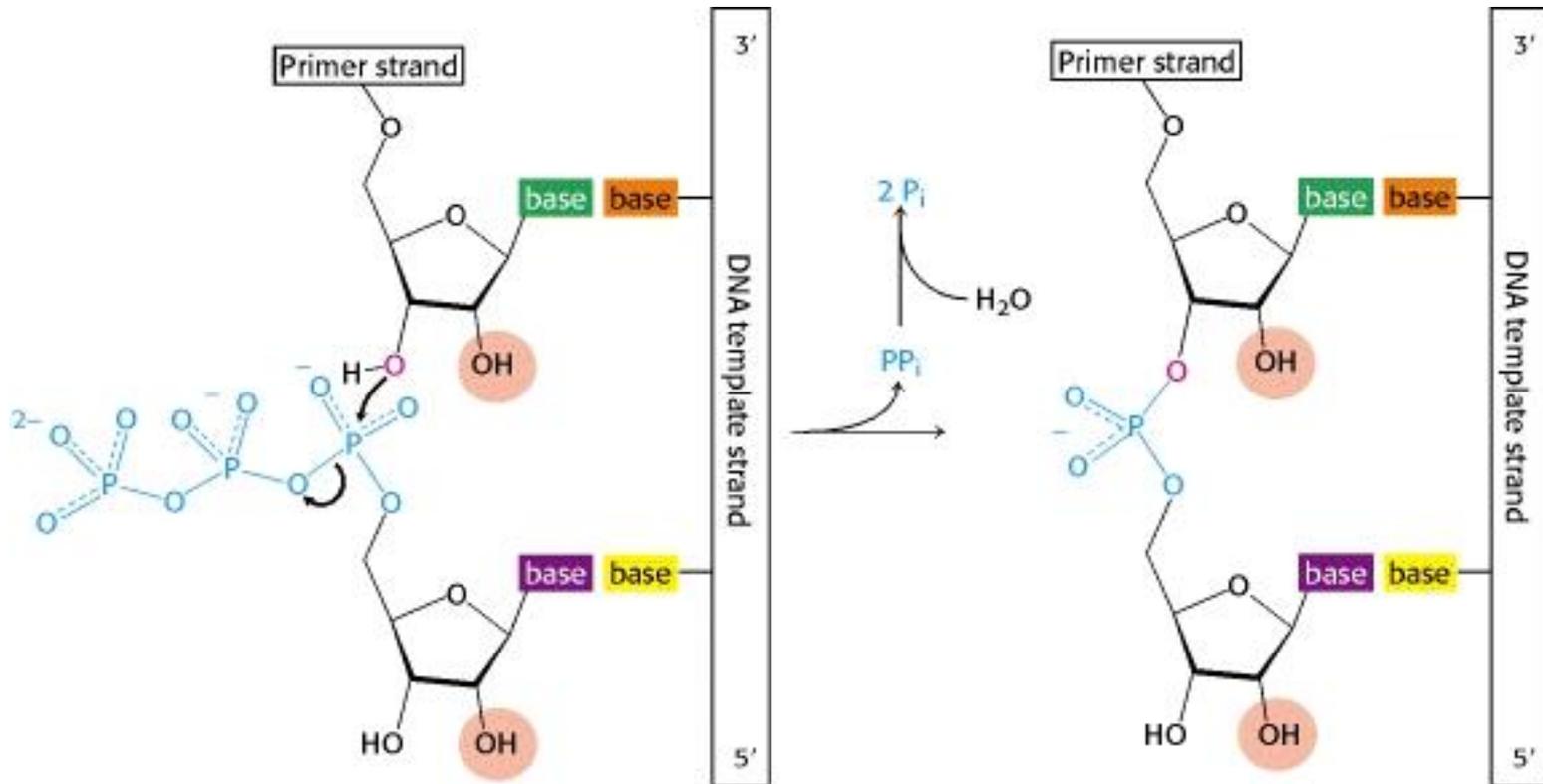
**Desoxinucleotídeo
(dNTP)**

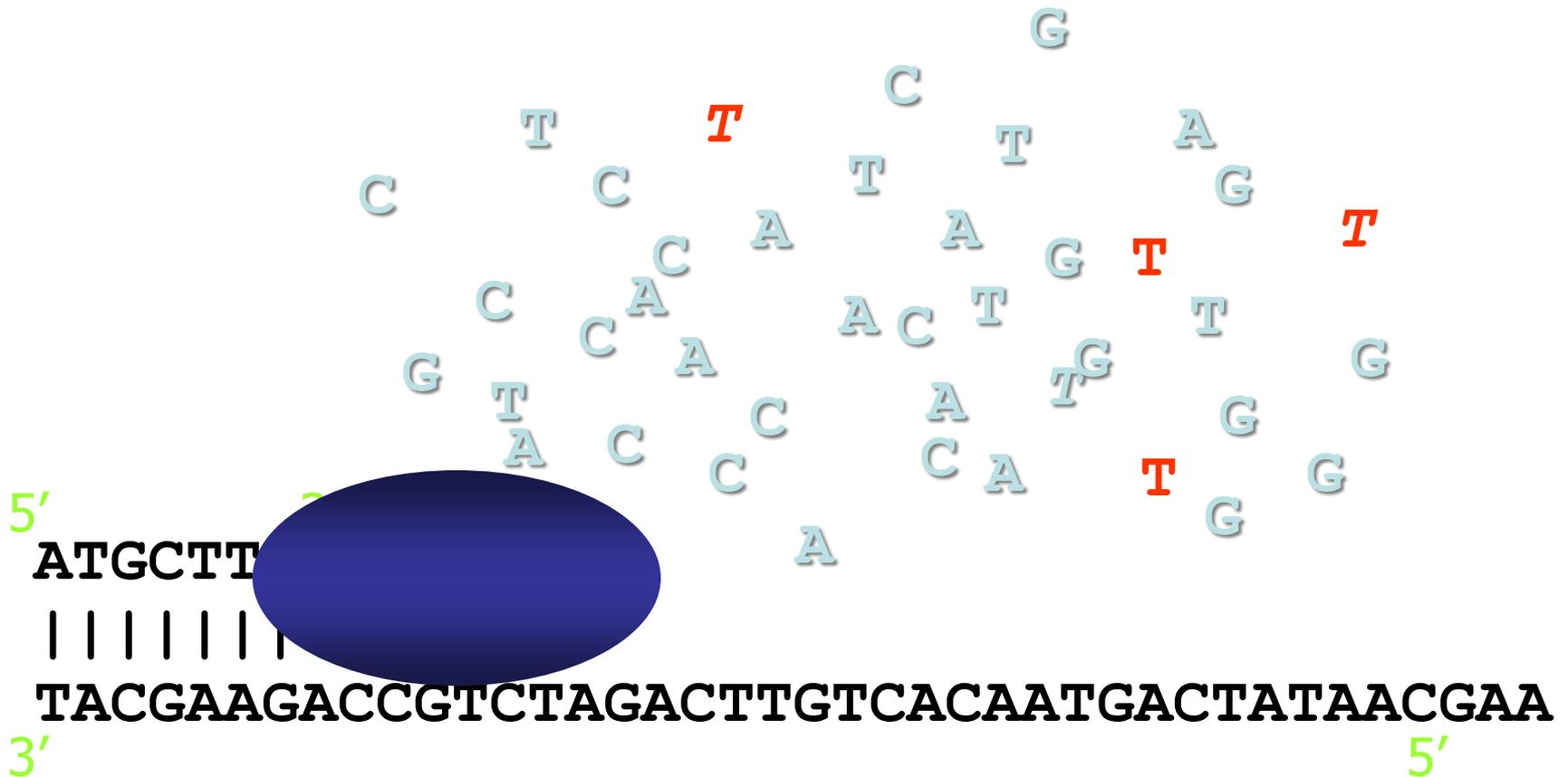


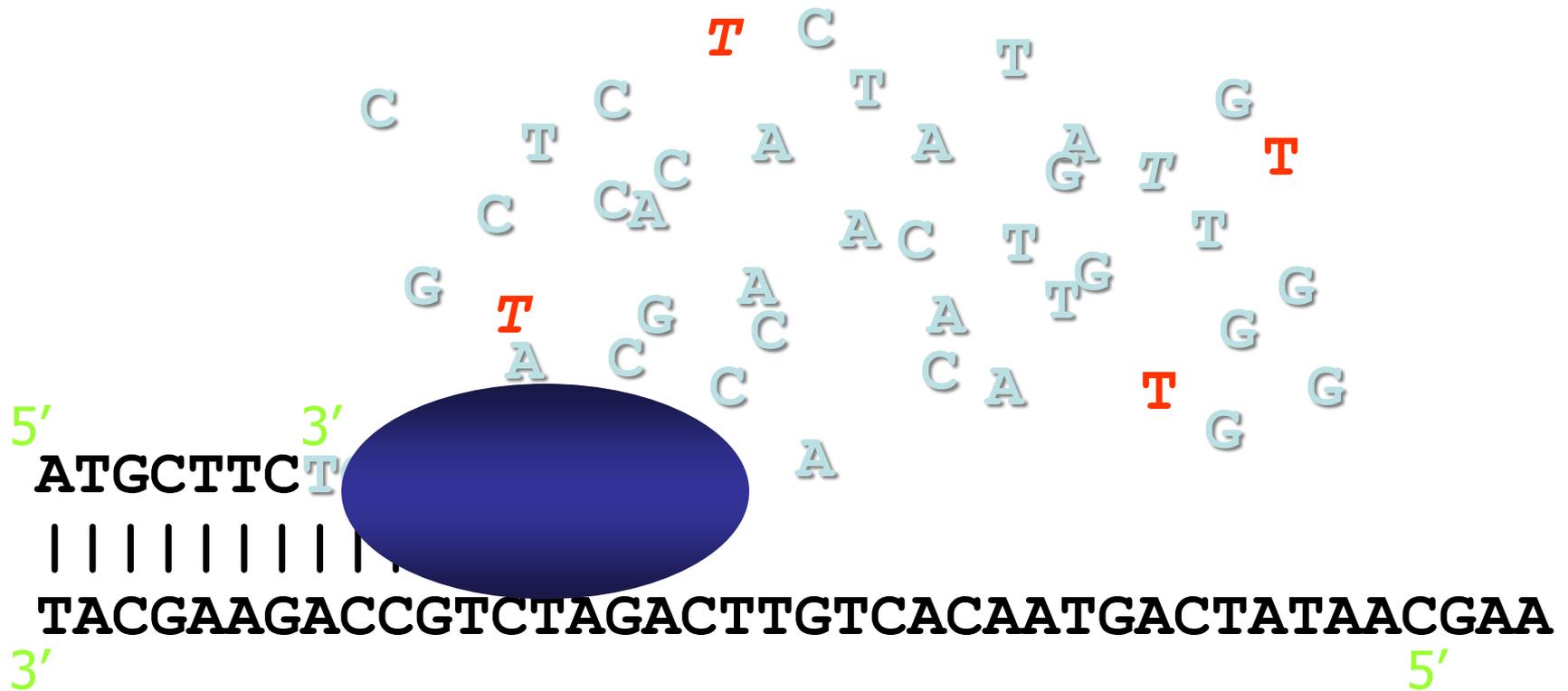
**Didesoxinucleotídeo
(ddNTP)**

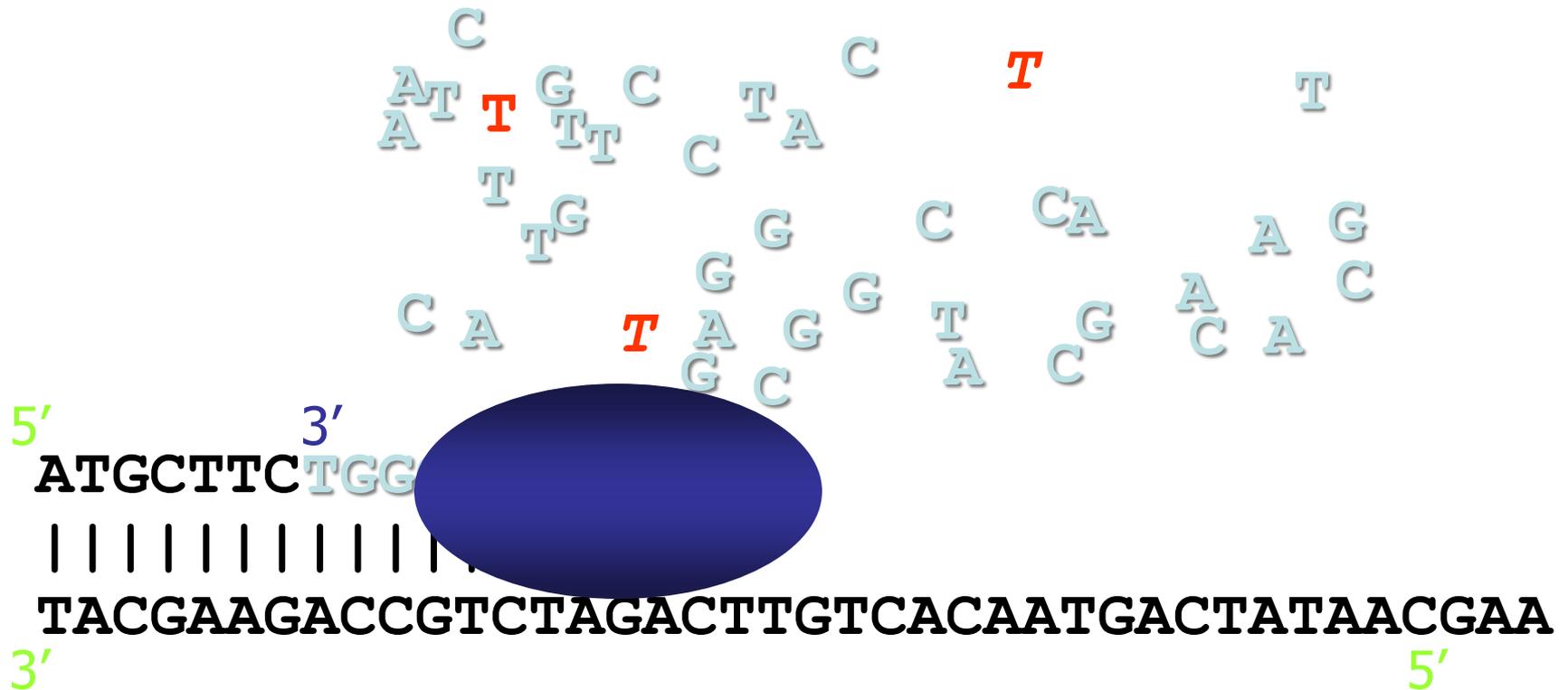


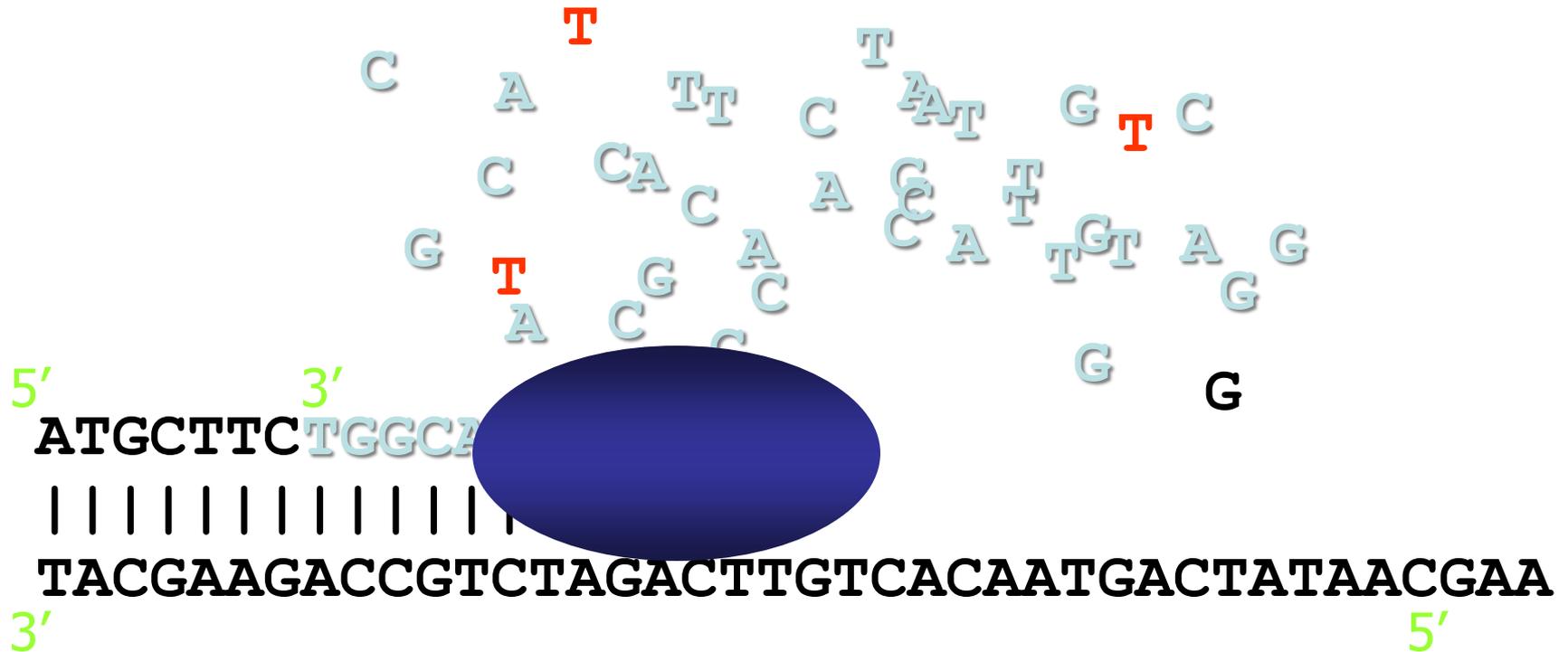
Princípio - Sanger

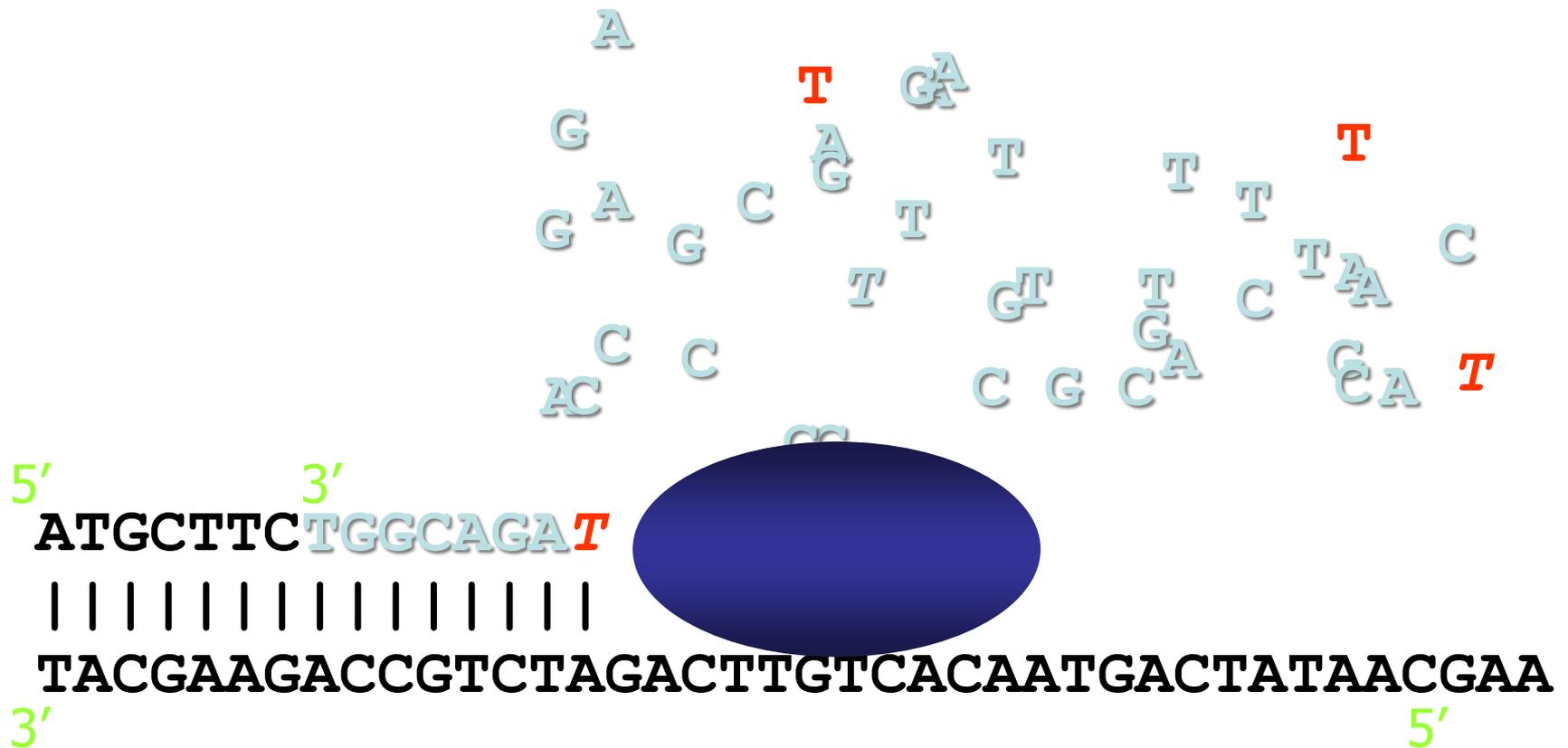






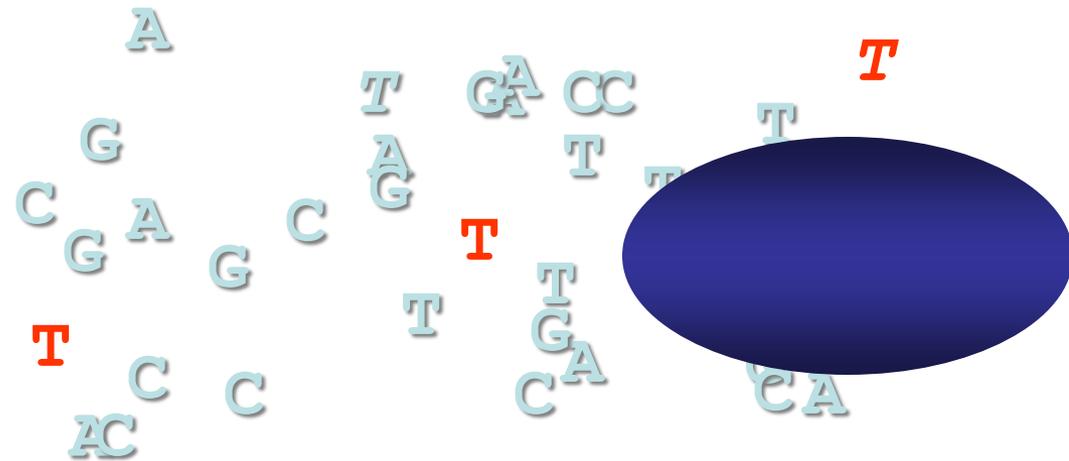








Princípio - Sanger



5' ATGCTTC **TGGCAGAT** 3'

|||||

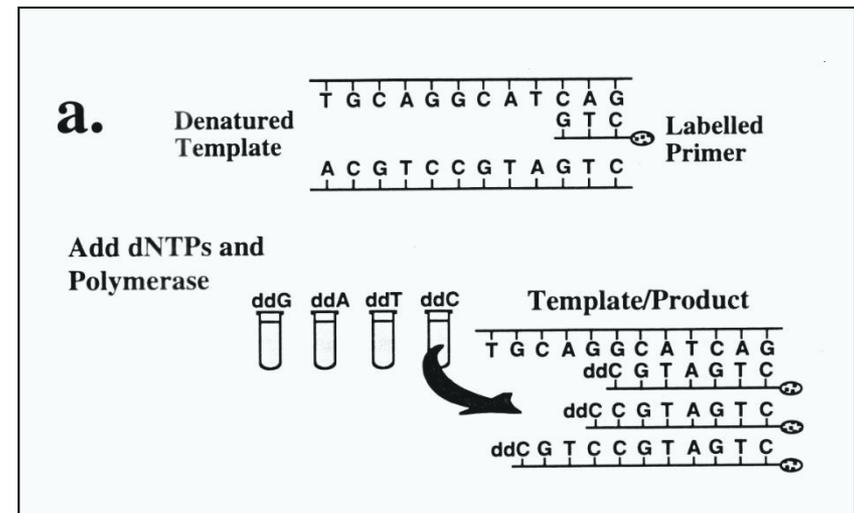
3' TACGAAGACCGTCTAGACTTGTCACAATGACTATAACGAA 5'



- ✓ DNA polimerase
- ✓ Primer
- ✓ Tampão
- ✓ dNTPs (desoxinucleotídeo)
- ✓ ddNTPs (didesoxinucleotídeo)

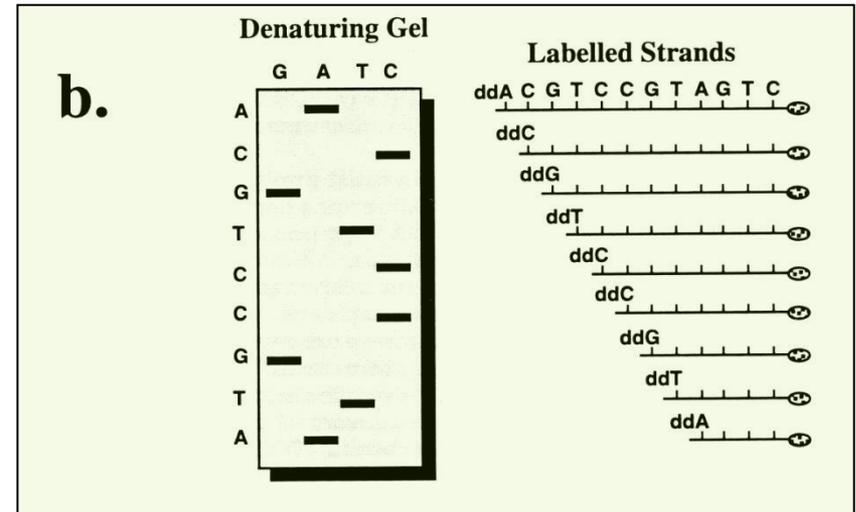


- ✓ Desnaturalização do DNA de dupla fita
- ✓ *Primers*: servem como iniciadores para a DNA polimerase
- ✓ Usam-se baixas concentrações de ddNTPs e altas concentrações de dNTPs
- ✓ Em cada reação, um ddNTP é incorporado aleatoriamente ao invés do dNTP correspondente, provocando a terminação da polimerização





- ✓ Inicialmente eram feitas 4 reações: uma para cada base ddNTP marcada com material radioativo
- ✓ Formados diversos fragmentos com tamanhos variados, de acordo com a posição e o ddNTP incorporado
- ✓ Eletroforese em gel de acrilamida
- ✓ Autorradiografia





Amostra

3' CCGGTAGCAACT 5'

Oligonucleotídeo

5' GG 3'

dNTPs
+ ddA TP

dNTPs
+ ddC TP

dNTPs
+ ddG TP

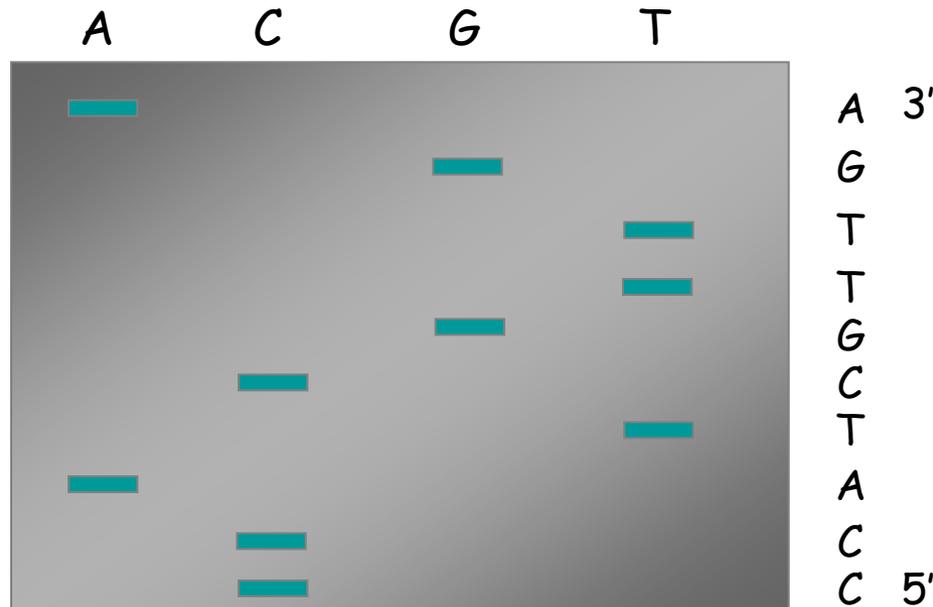
dNTPs
+ ddT TP

GGCCA
GGCCATCGTTGA

GGC
GGCC
GGCCATC

GGCCATCG
GGCCATCGTTG

GGCCAT
GGCCATCGT
GGCCATCGTT



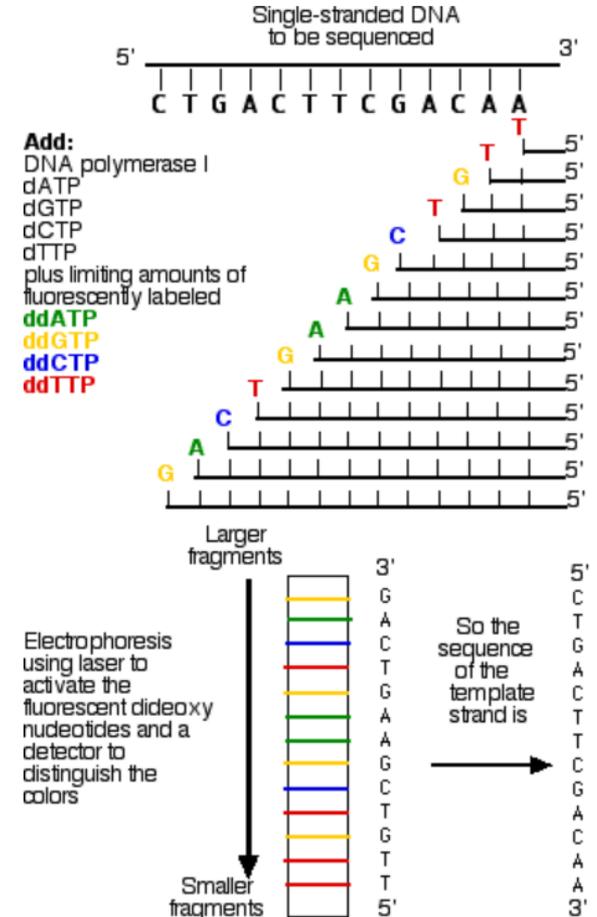


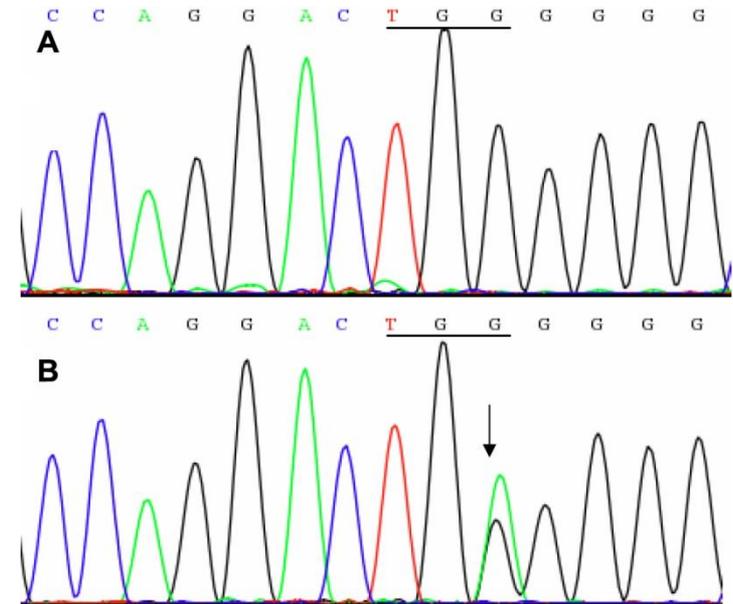
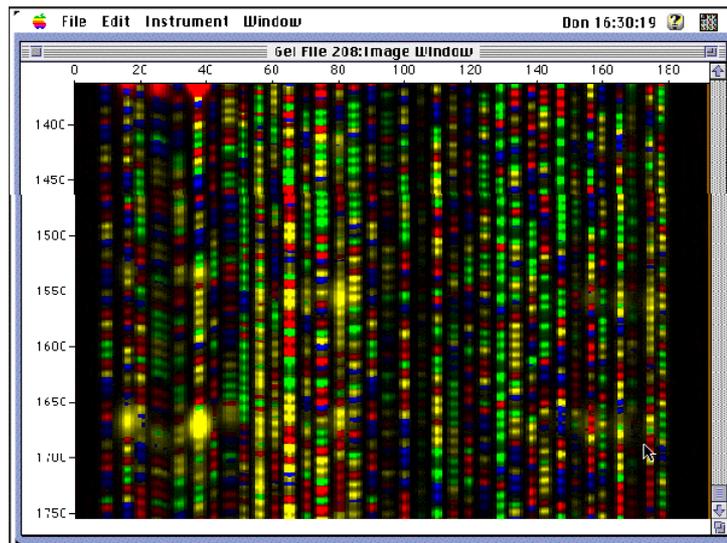
- ✓ Sequenciamento manual
- ✓ Marcação radioativa
- ✓ Para cada amostra são necessárias 4 reações (uma para cada ddNTP)
- ✓ Fragmentos de até 800pb podem ser sequenciados
- ✓ A leitura da sequencia é manual



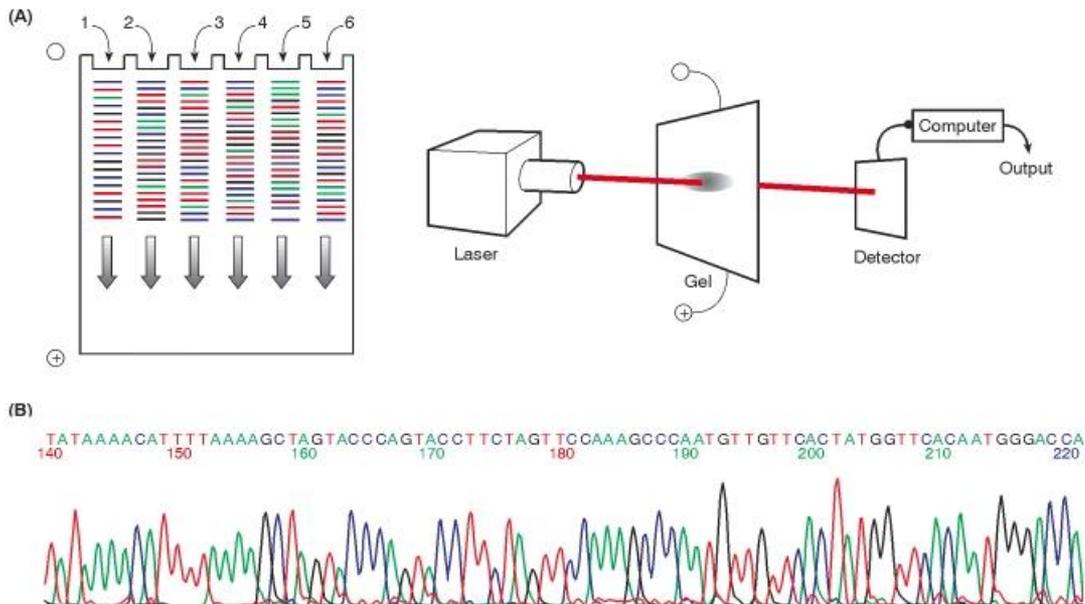
Evolução da técnica

- ✓ Sequenciamento semi-automatizado (década de 80):
 - ✓ Marcação fluorescente do ddNTP
 - ✓ 1 reação por amostra
 - ✓ Leitura automática da sequência
- ✓ Ainda há necessidade de se fazer o gel

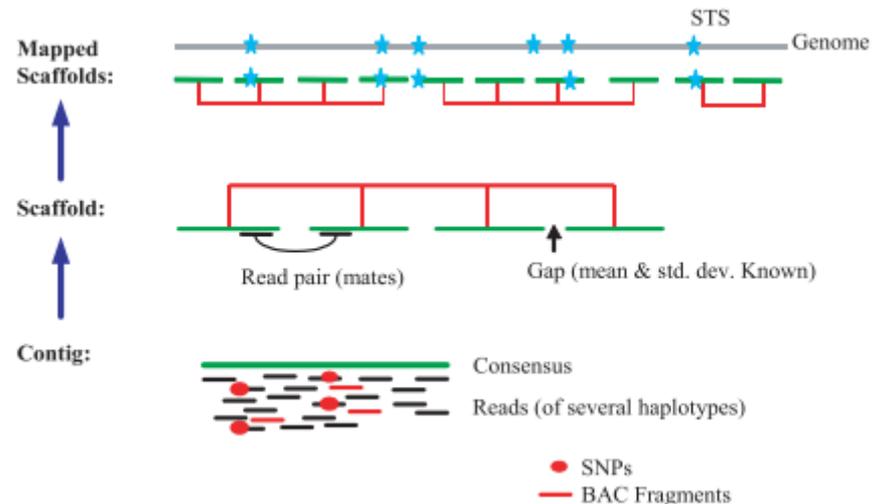




- ✓ Sequenciamento automatizado (década de 90)
 - ✓ O sequenciador executa a eletroforese em géis capilares ultra-finos
 - ✓ Um sensor é responsável por emitir um laser e verificar qual o comprimento de onda emitido pelo dideoxi
 - ✓ Máximo de 96 capilares



- ✓ A metodologia de Sanger foi utilizada no sequenciamento do genoma humano
- ✓ Projeto durou de 1990 a 2003
- ✓ Gasto: U\$ 3 bilhões
- ✓ Em 2001 foi publicado o “rascunho”
 - ✓ Venter et al., 2001 (Science)
 - ✓ Lander et al., 2001 (Nature)



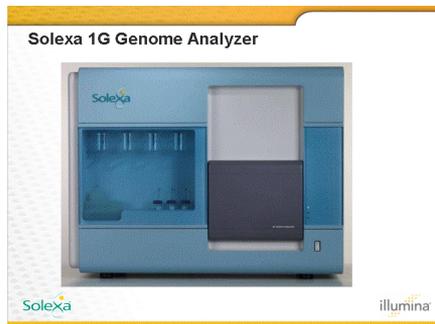
- ✓ O sequenciamento de Sanger predominou até 2005 quando surgiram as tecnologias chamadas “Next generation sequencing”
- ✓ Essas tecnologias são “Massively parallel”, ou seja o número de sequencias em um único experimento é bem maior que os 96 do sequenciamento Sanger

✓ Sequenciamento de Segunda Geração

✓ Sistema 454 GS da Roche



✓ Sistema Solexa (Illumina)



✓ Sequenciamento por ligação: SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)



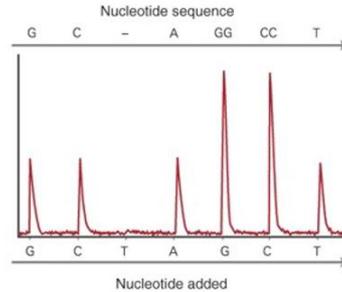
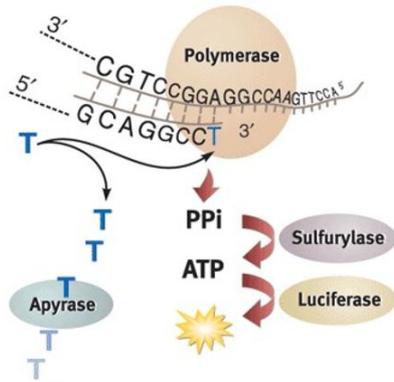
✓ Sequenciamento de Terceira Geração

✓ Sistema Ion Torrent

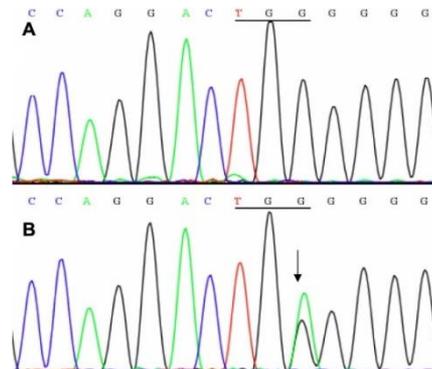


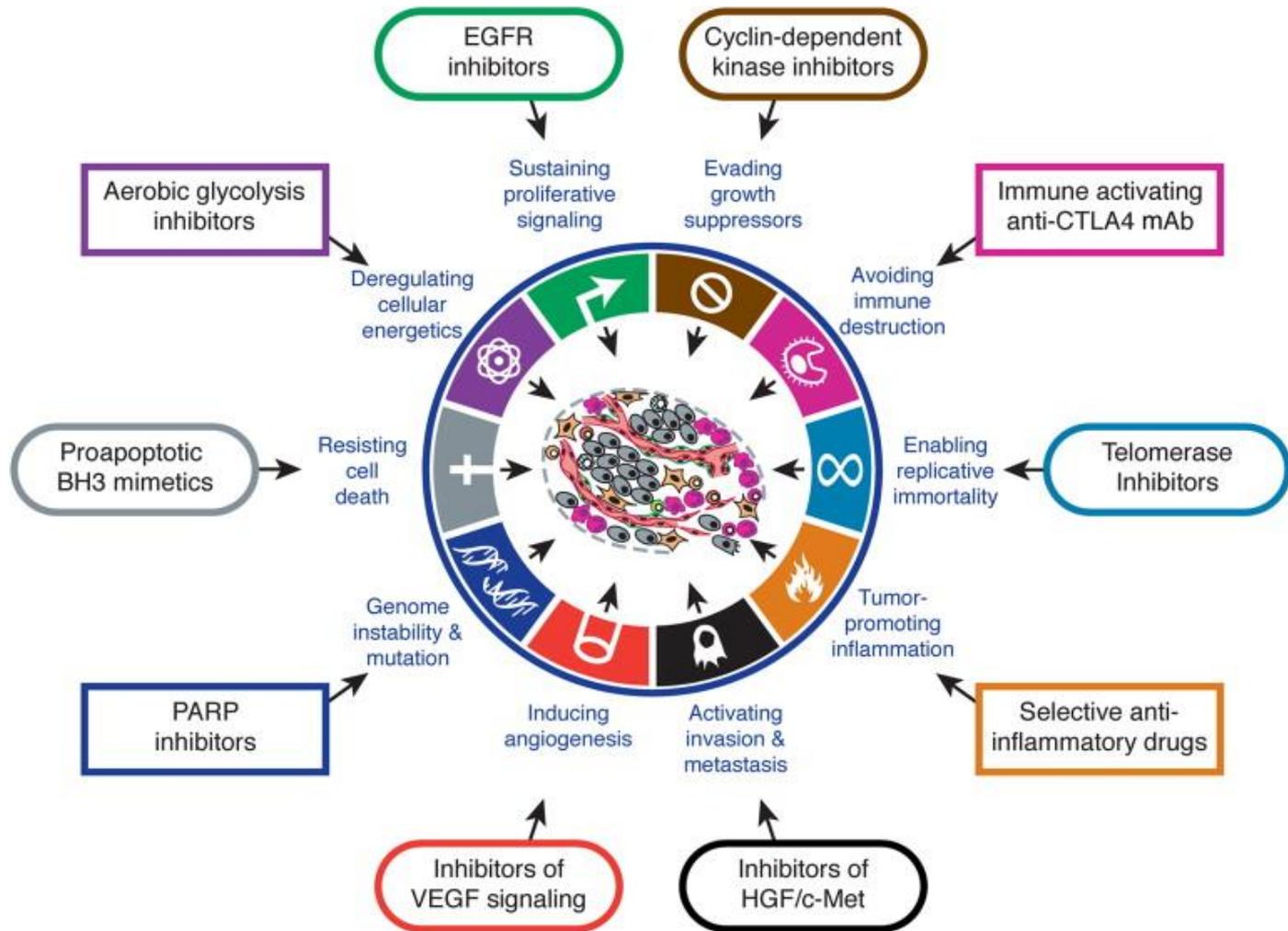
✓ Sistema Pac Bio: Molécula única em tempo real - *Single-Molecule, Real Time Technology Sequencing (SMRT®)*





Aplicações no Laboratório de Patologia

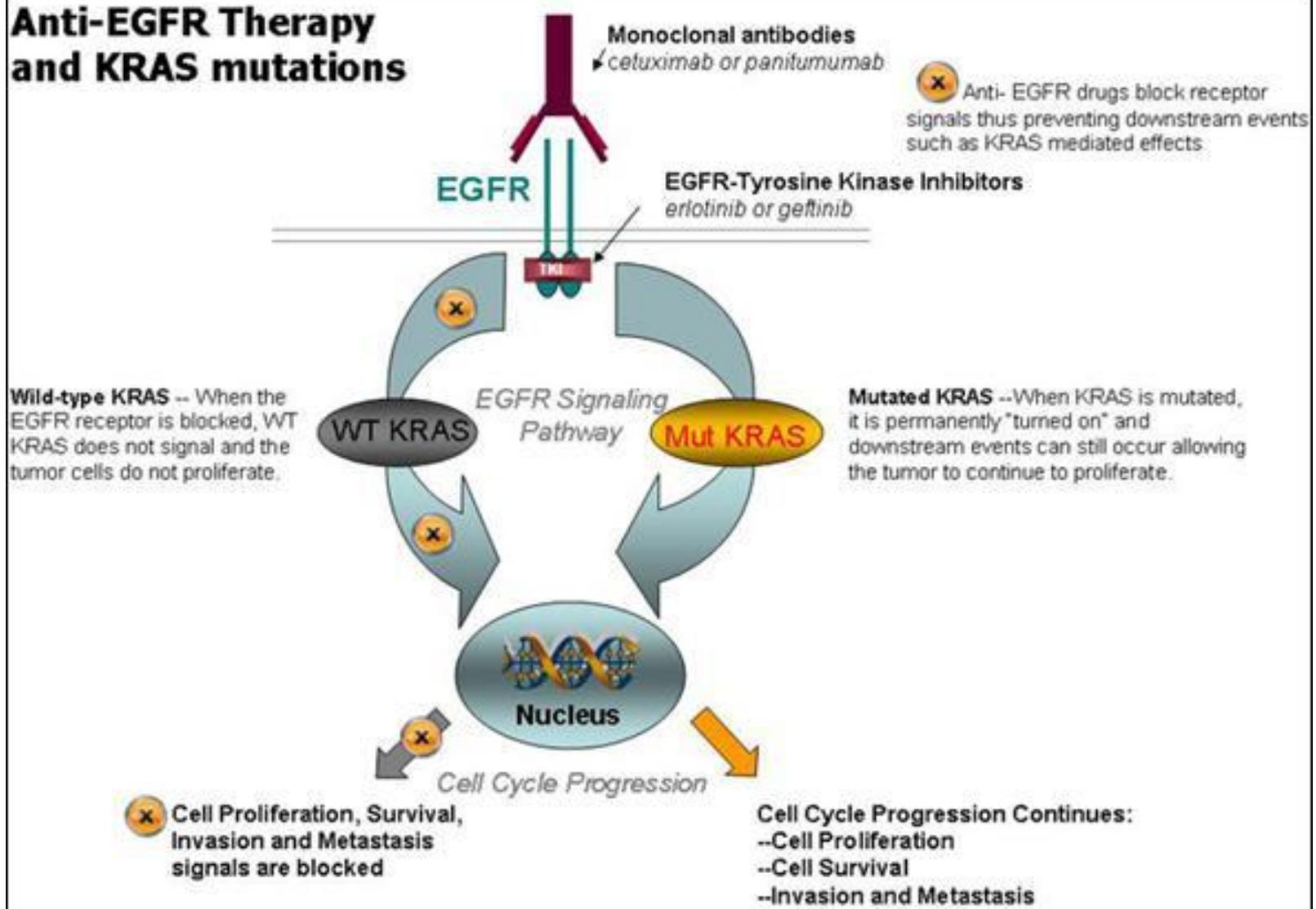


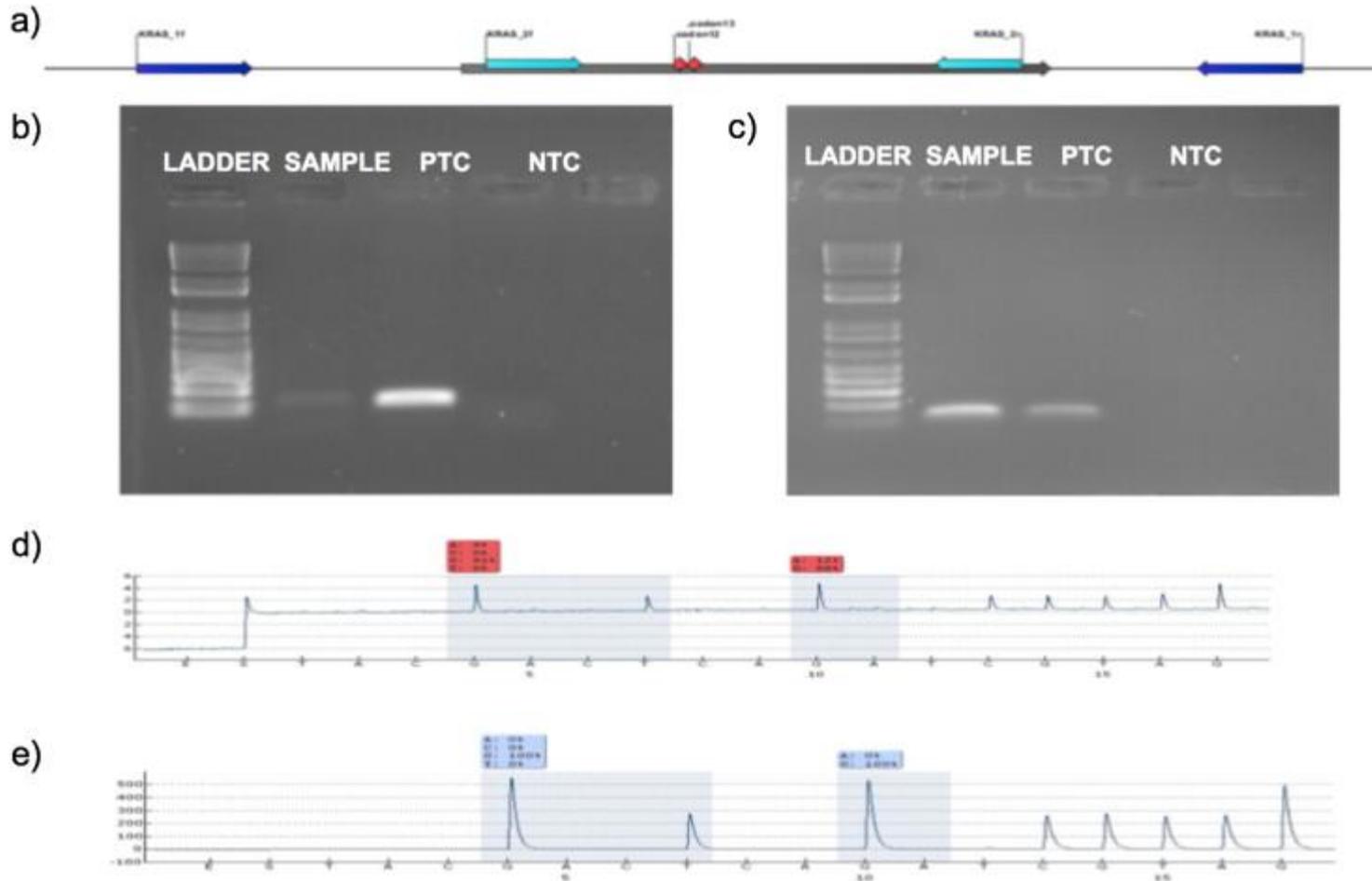


- ✓ Inibição de EGFR é uma estratégia para tratamento do carcinoma colorretal (CRC) metastático
- ✓ Mutação no gene KRAS é um preditor de resposta à terapia anti-EGFR
- ✓ Mutação em KRAS é observada em 35 – 40% dos CRCs
- ✓ Mutação em NRAS também tem sido associada à baixa resposta à terapia e é observada em 5% dos CRCs
- ✓ Mutação em EGFR não é comum (aproximadamente 1%) e não tem correlação efetiva com a resposta terapêutica



Anti-EGFR Therapy and KRAS mutations

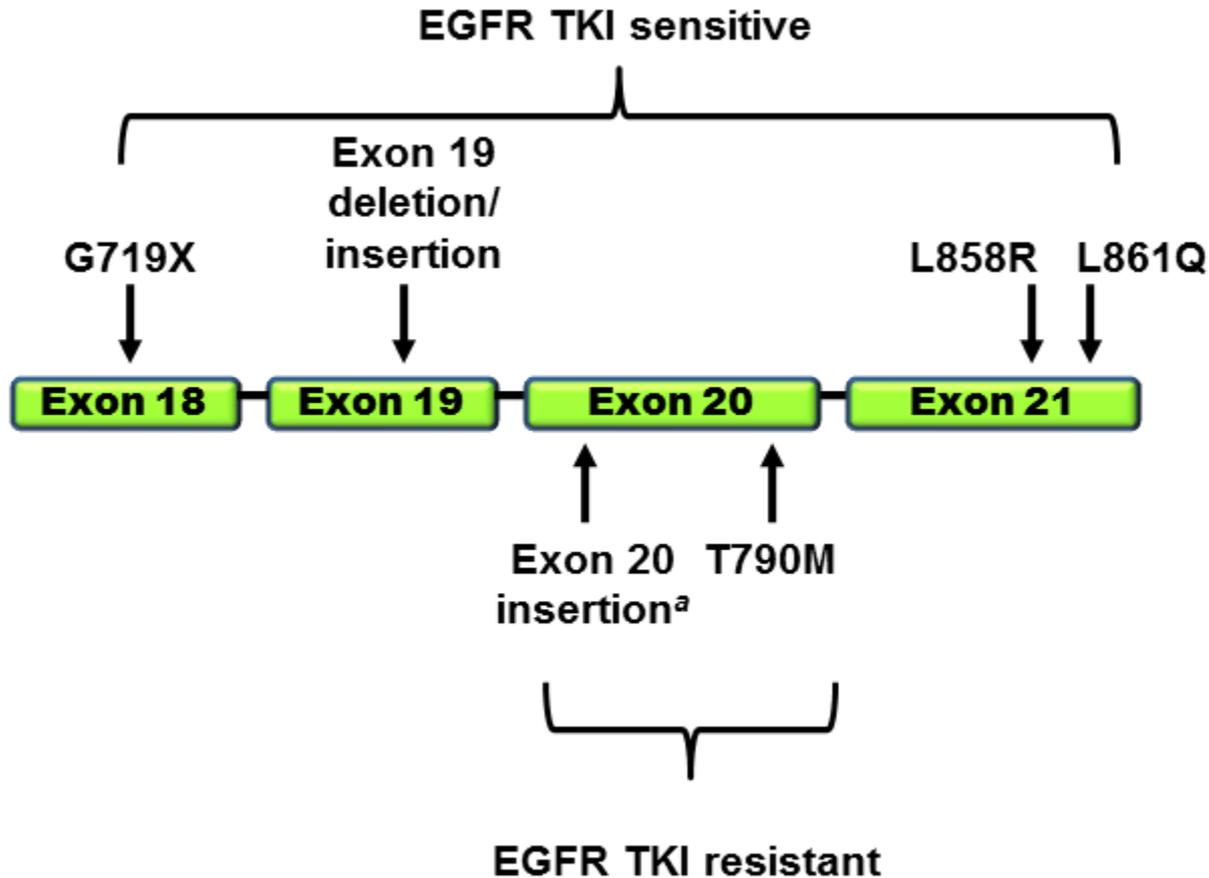




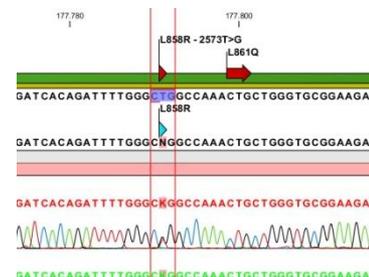
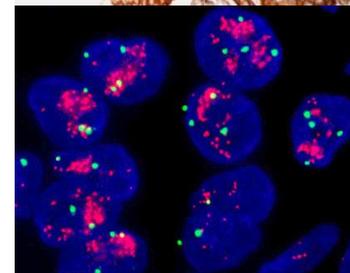
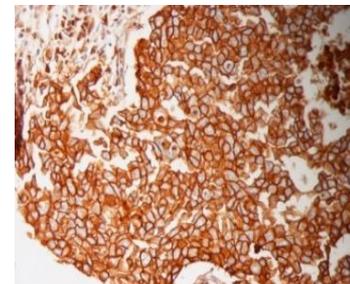
- ✓ Aproximadamente 10% dos pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células nos EUA e 35% na Ásia apresentam mutações em EGFR
- ✓ 90% das mutações são deleções no exon 19 e mutação de ponto no exon 21 (L858R)
- ✓ Terapias
 - ✓ Cetuximab (Erbix): domínio extracelular
 - ✓ Gefitinib (Iressa) ou Erlotinib (Tarceva): fosforilação
 - ✓ Erb Pan-inibit (CI-1033) e anti-ErbB-2 (Pertuzumab): heterodimerização



EGFR – tumores de pulmão

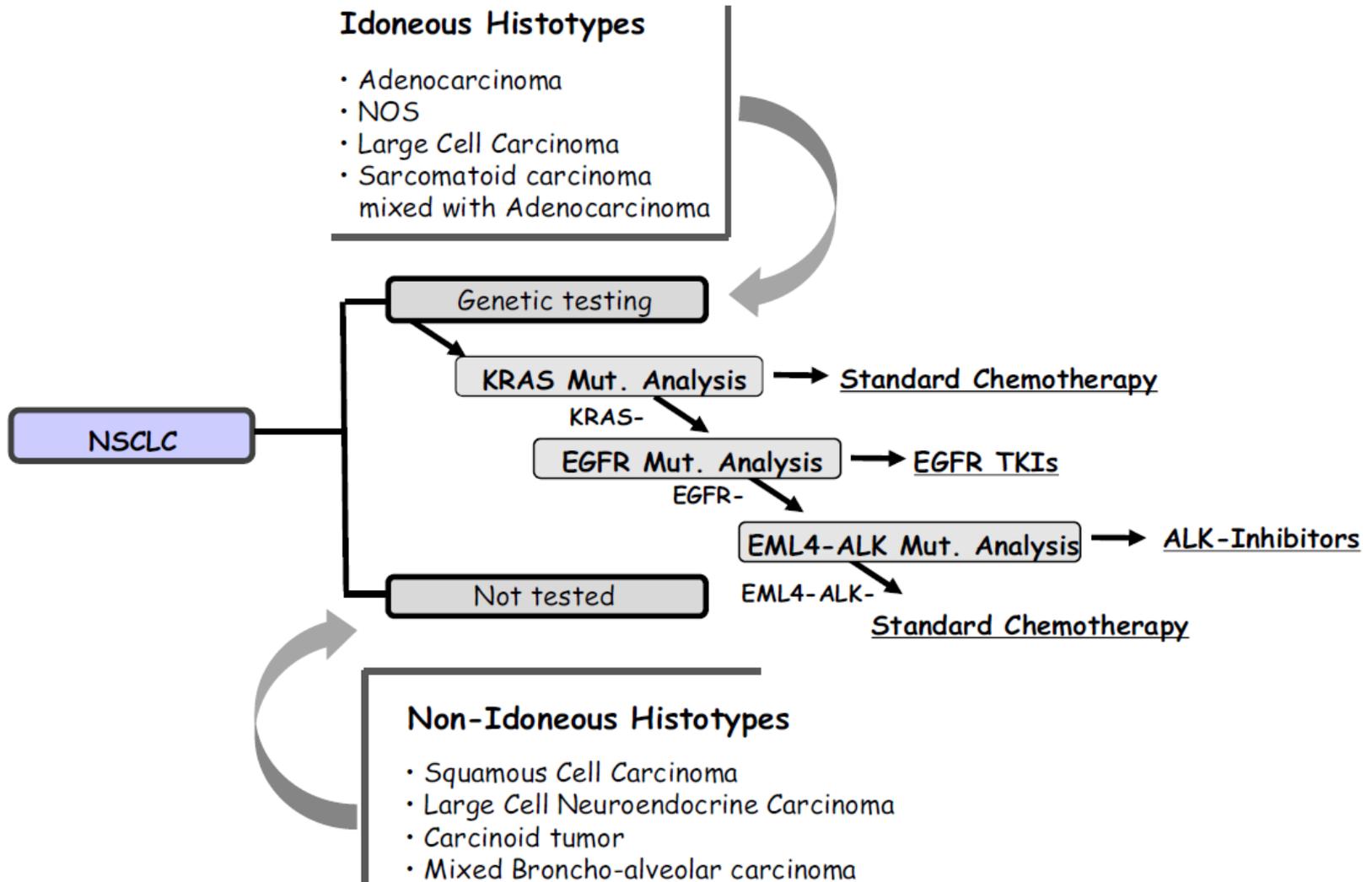


- ✓ Imunoistoquímica
 - ✓ Expressão protéica
- ✓ FISH/CISH
 - ✓ Amplificação/Polissomia
- ✓ Sequenciamento
 - ✓ Mutações

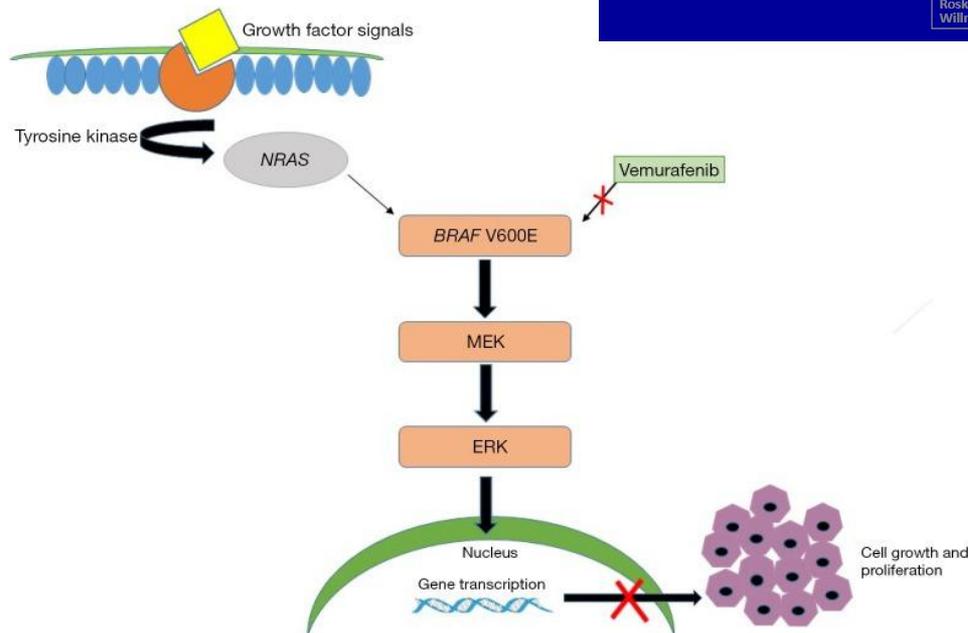
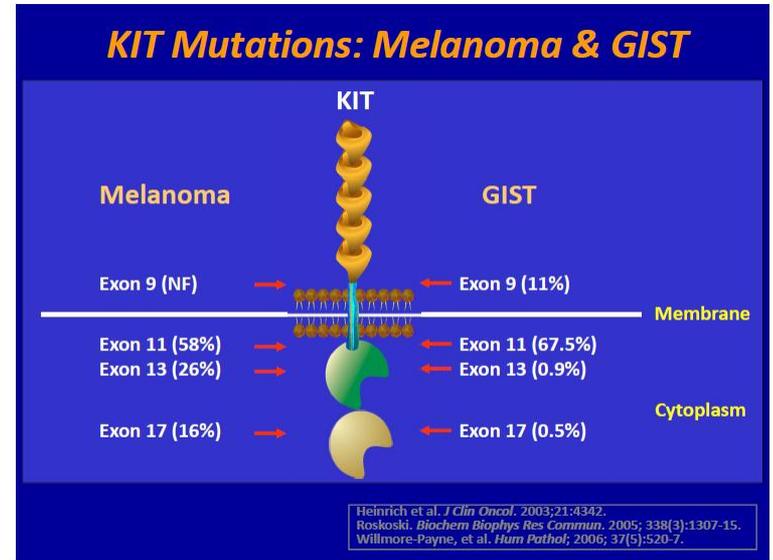




Genética – tumores de pulmão



- ✓ Mutações em Melanoma
 - ✓ BRAF (V600E): 66%
 - ✓ Uso do Vemurafenib (2011)
 - ✓ NRAS (13-25%)
 - ✓ KIT (20-28%)





Oncogenes e
genes
supressores

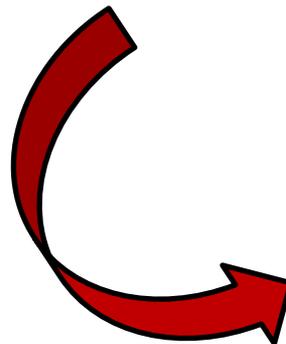
Vias de
sinalização

Painéis tumor-
específicos

Genes com
potencial para
desenvolvimento
de drogas

Sequenciamento
do exoma

Sequenciamento
do genoma



**Medicina
personalizada**



A.C. Camargo
Cancer Center

Obrigada!!!

ccamilo@cipe.accamargo.org.br