



Farmacodiagnósticos: ferramenta para indicação a terapias direcionadas e imunoterapias

Rudinei Cella
Especialista de Aplicação
Agilent Technologies

AGENDA

DNA e Câncer

Terapia alvo:

- O que é
- Como funciona
- Tipos de terapia-alvo
- Limitações

Farmacodiagnósticos:

- Importância
- Tipos de farmacodiagnósticos
- Farmacodiagnóstico e o histotecnólogo
- Perspectivas para o futuro



DNA

O nosso DNA é dividido em cromossomos – ao total são 46

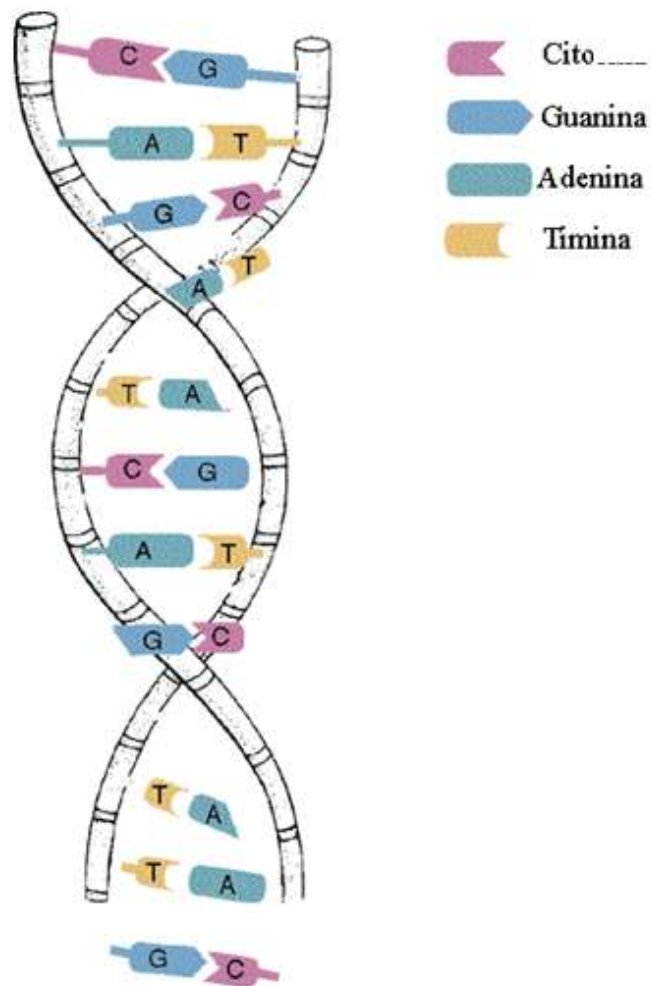
Aqui estão posando para foto



Mas normalmente o DNA pode ser encontrado como cadeias longas dentro do núcleo da célula.



DNA



O DNA é composto por dois esqueletos que são mantidos juntos por quatro bases diferentes:

A, T, G e C.

O comprimento acumulado de todo o DNA em nosso corpo pode chegar até o sol e voltar outra vez600 vezes!

O DNA influencia o nosso desenvolvimento ...

O DNA é o código da vida.

Cada uma das nossas células contém um conjunto completo de DNA.

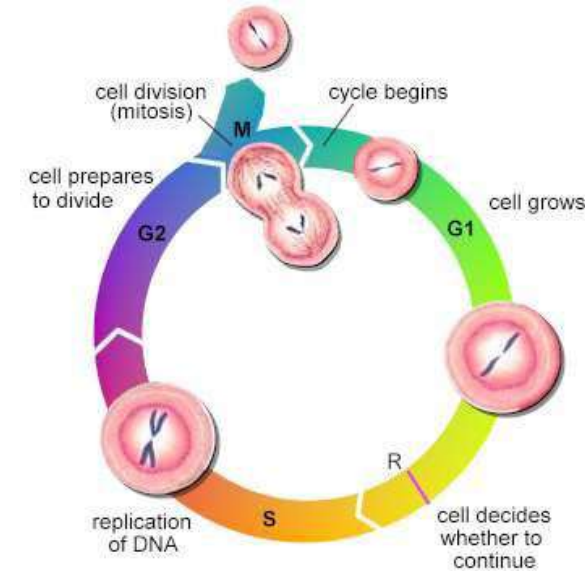
Este conjunto de DNA influencia o nosso desenvolvimento.



O câncer é uma doença genética

O câncer é uma divisão descontrolada das células

- Tornar-se imortal (continua dividindo) - benigno
- Invade tecidos circundantes - benigno / maligno
- Espalha para locais distantes (metástases) – malignos

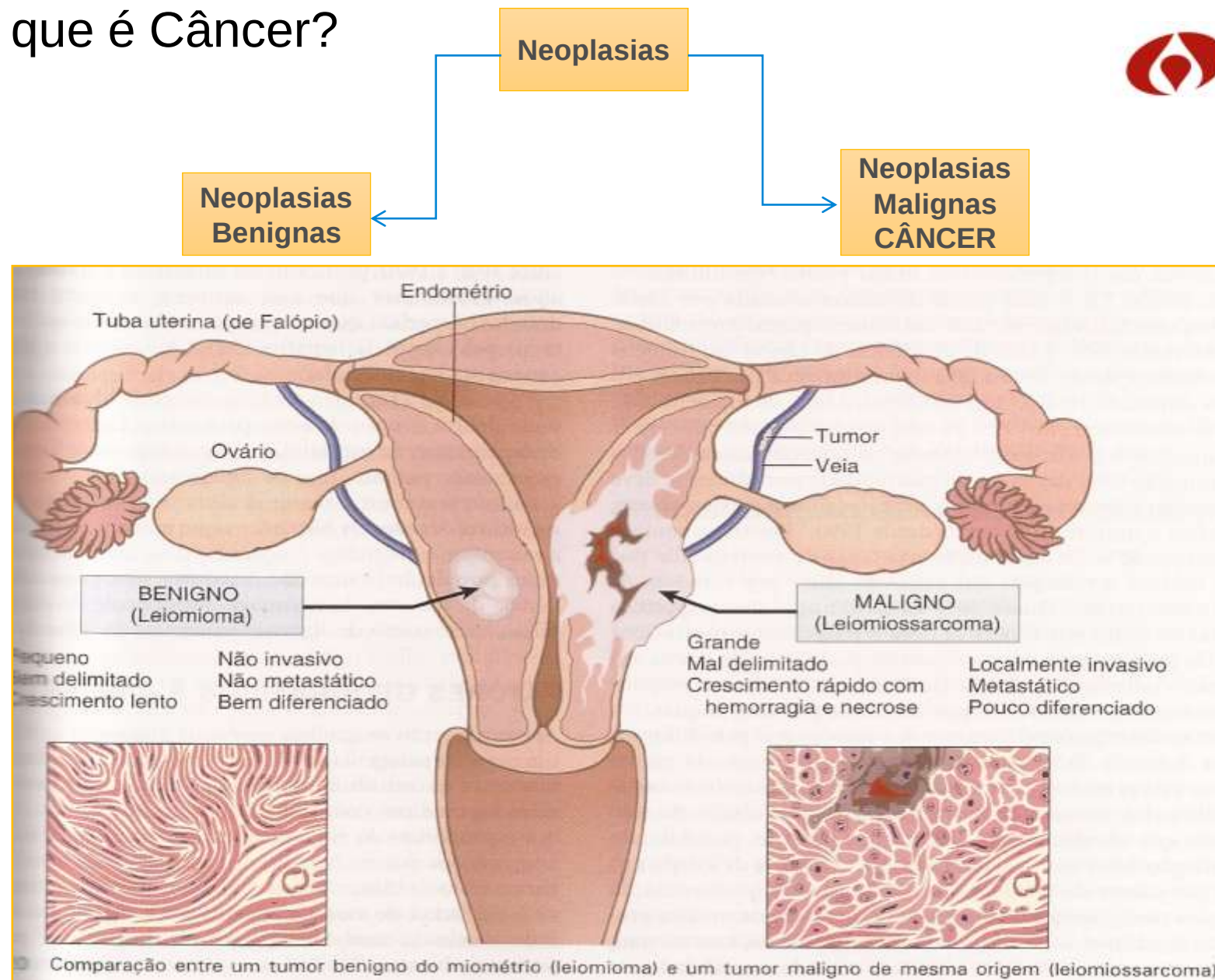


A célula cancerosa é descontrolada devido a erros no DNA

(Erros podem ser hereditários ou induzidos por fatores ambientais)

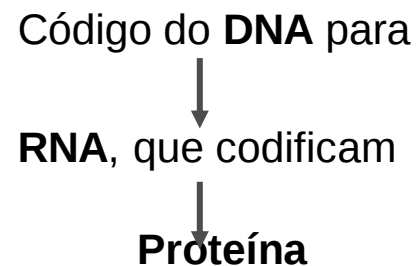
Tecnologias moleculares são projetados para detectar erros de DNA

O que é Câncer?



Fluxo de trabalho da célula

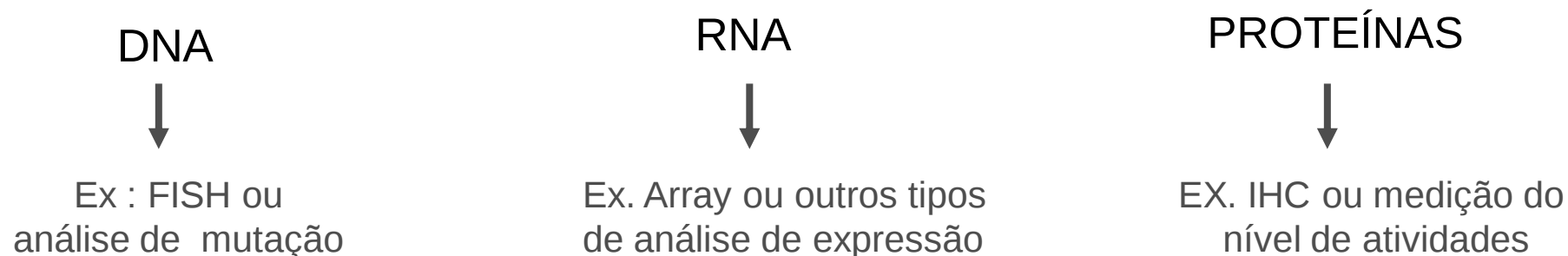
A construção do fluxo de trabalho em nossas células significa:



Alterações no DNA são transmitidas para o RNA e transcritas em proteínas:

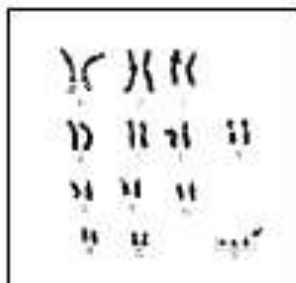
- Quer por alterações na quantidade de RNA ou proteína
- Ou por alterações no código de RNA ou proteína de estrutura

Consequentemente, o diagnóstico de câncer pode ocorrer em todos os três níveis

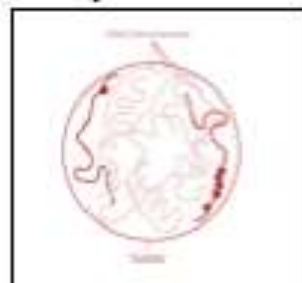


Tipos de erros genéticos

Anormalidade cromossômica



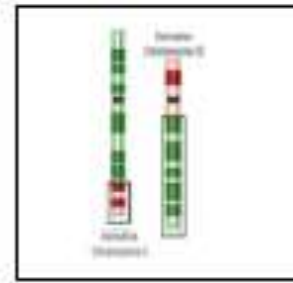
Amplificação



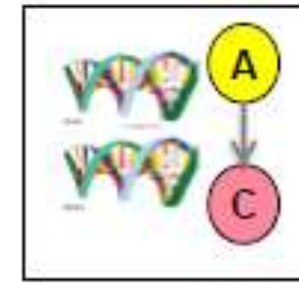
Eliminação



Translocação



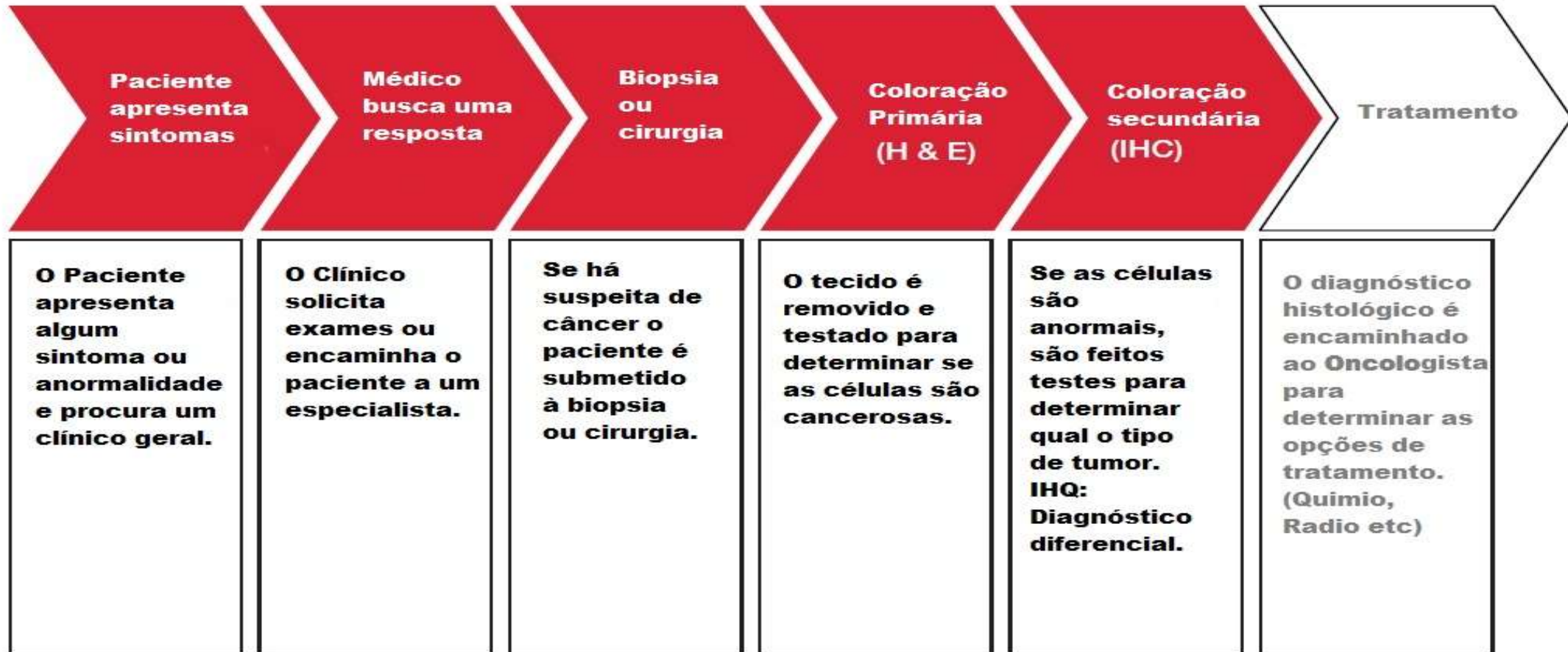
Ponto de mutação



Muitos tipos de erros genéticos

Tecnologias diferentes, dependendo do tipo de erro

Investigação e Tratamento



Entendendo o Tratamento de Câncer



Quimioterápicos tradicionais:

- Agem em todas as células de divisão rápida
- Citotóxicas
- Maioria endovenosas
- Mesma droga para todos

Terapia-alvo

- Agem em alvos moleculares específicos associados com o câncer
- Normalmente citostáticos
- Biomarcadores preditivos para eleição de pacientes
- Uma droga, um alvo

Terapia alvo

- É um tipo de tratamento que surgiu através do melhor entendimento da ação dos genes, das proteínas e de outras moléculas presentes nas células tumorais, criando o conceito da terapia personalizada.
- Esses medicamentos são compostos de substâncias que foram desenvolvidas para identificar e atacar características específicas das células cancerígenas, bloqueando assim o crescimento e a disseminação do câncer.

Terapia alvo

- A grande vantagem da Terapia Alvo é proporcionar uma forma melhor de individualizar o tratamento, em especial quando o alvo é presente em alguns, mas não em todos os tumores de um tipo particular.
- Esta modalidade de terapia proporciona seletividade para células cancerosas, prejudicando menos as células normais, reduzindo possíveis efeitos colaterais e melhorando a vida do paciente.

Um exemplo recente

O PD-1 (programmed death 1) é um receptor expresso em células T citotóxicas que detectam o ligante PD-L1, quando a célula T não encontra esse ligante presente em células normais entende como uma célula anormal e ataca essa célula.

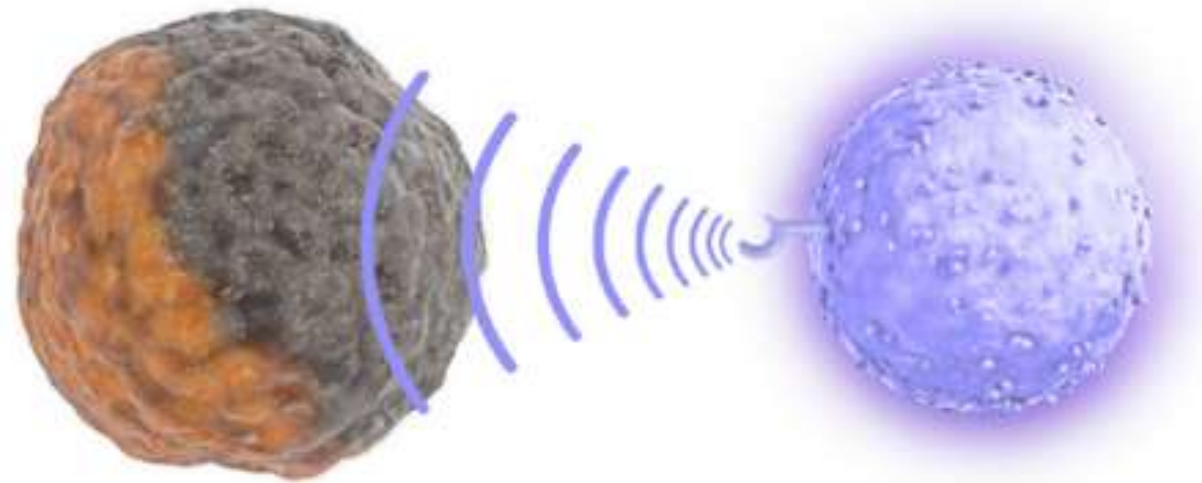


Fig 01: Célula T ativa eliminando uma célula anormal.

PD-L1 é um ligante transmembrânico expresso em células normais.

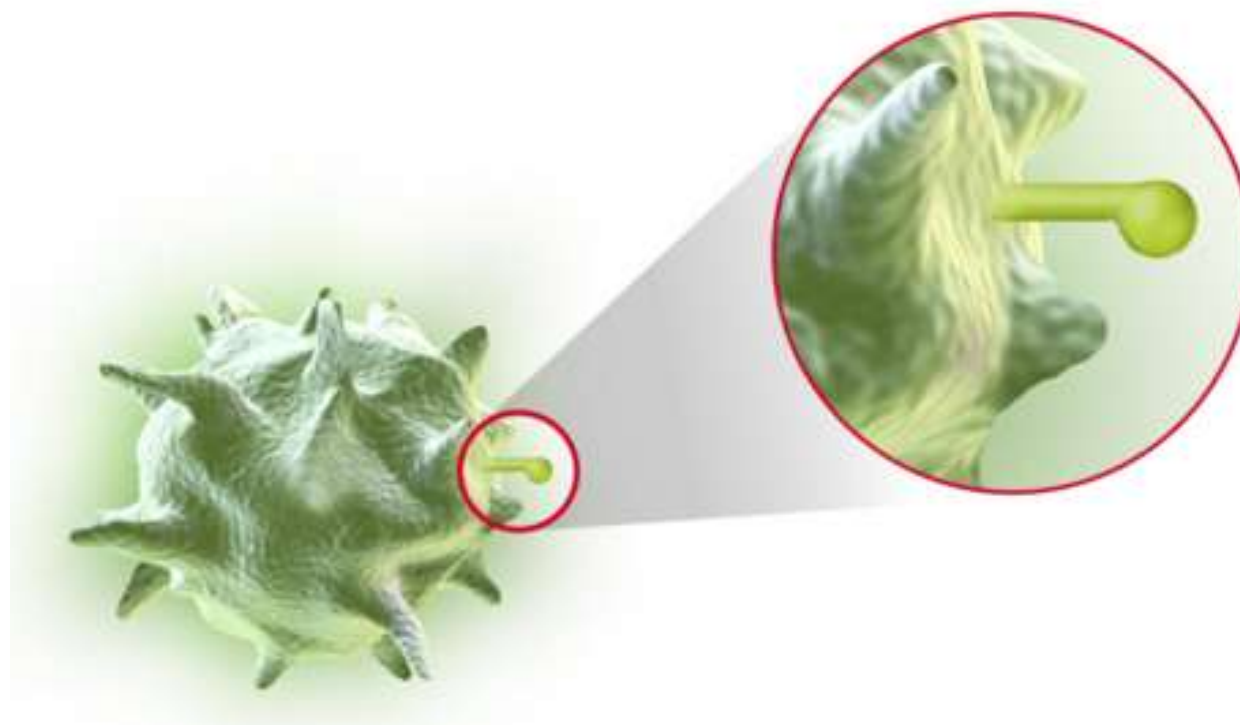


Fig 02: Célula normal expressa o ligante PD-L1

PD-L1 em Células Anormais

Algumas células tumorais também expressam o ligante PD-L1 dessa forma inativando a célula T e escapando do sistema imune.

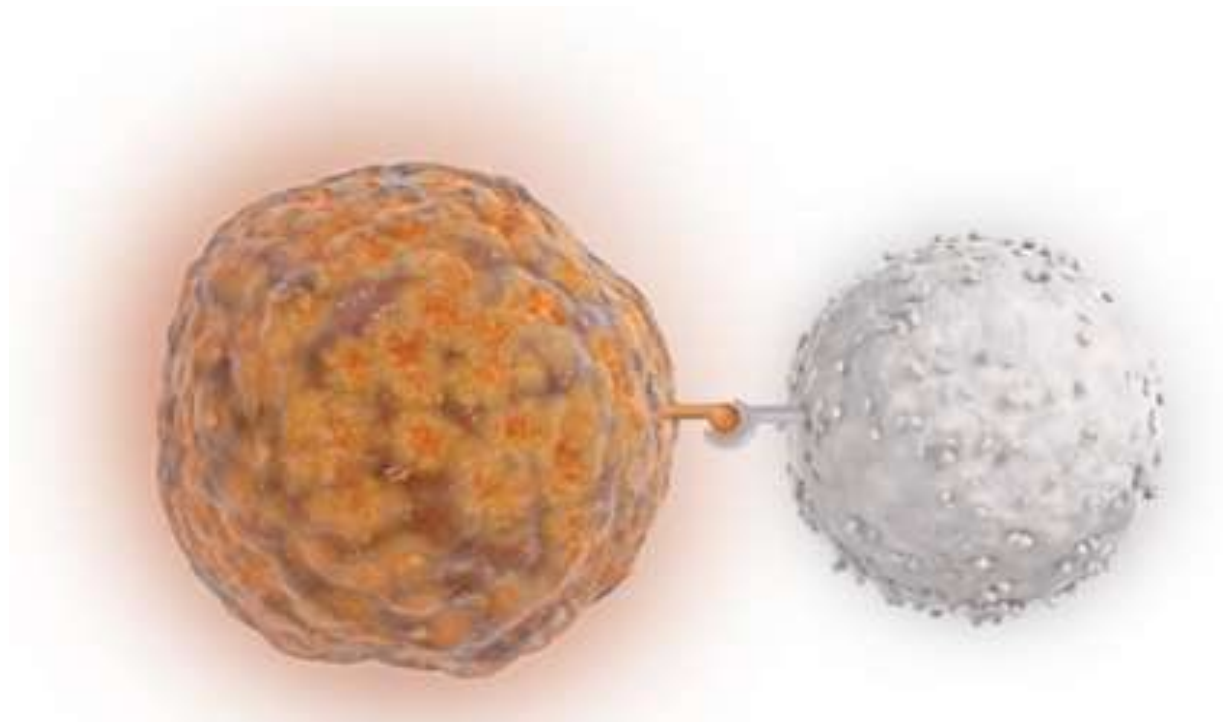


Fig 03: Interação entre ligante/receptor levando a inativação da célula T

Expressão tumoral de PD-L1

Melanoma (MEL)

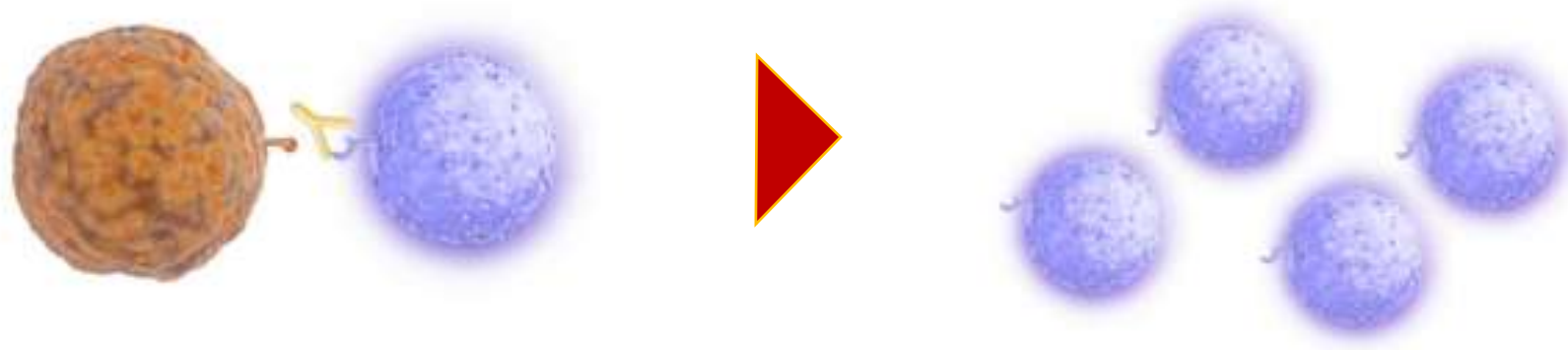
Renal Cell Carcinoma (RCC)

Non-small-cell Lung Cancer (NSCLC)



Como a terapia anti-PD-1 funciona?

Ao identificar pacientes com expressão de PD-L1 tumoral a terapia anti-PD-1 bloqueia a interação PD-L1/PD-1.



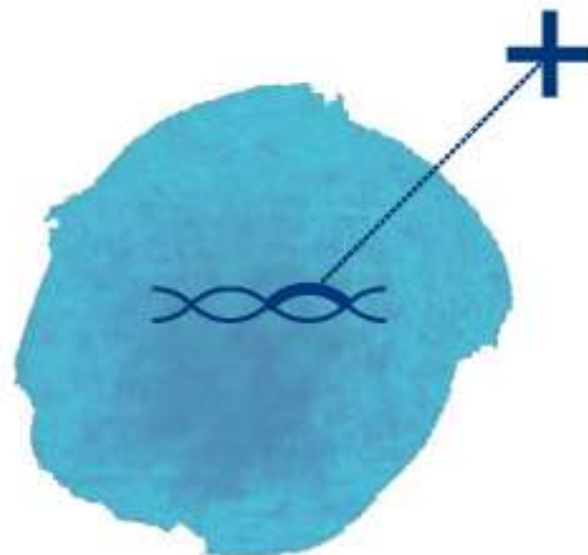
- As células T do sistema imune permanecem ativas ajudando no combate ao câncer.
- A utilização de biomarcadores como o anti-PD-L1 (farmacodiagnóstico) nos ajuda a selecionar os pacientes que melhor se enquadram nas terapias anti-PD-1, que consequentemente terão uma melhor resposta a essas drogas.

Tipos de terapia alvo

Moduladores da expressão gênica:

Os tumores resultam da expressão de um gene alterado por mutação.

O crescimento desses tumores pode ser controlado ao bloquear a expressão dessas proteínas.

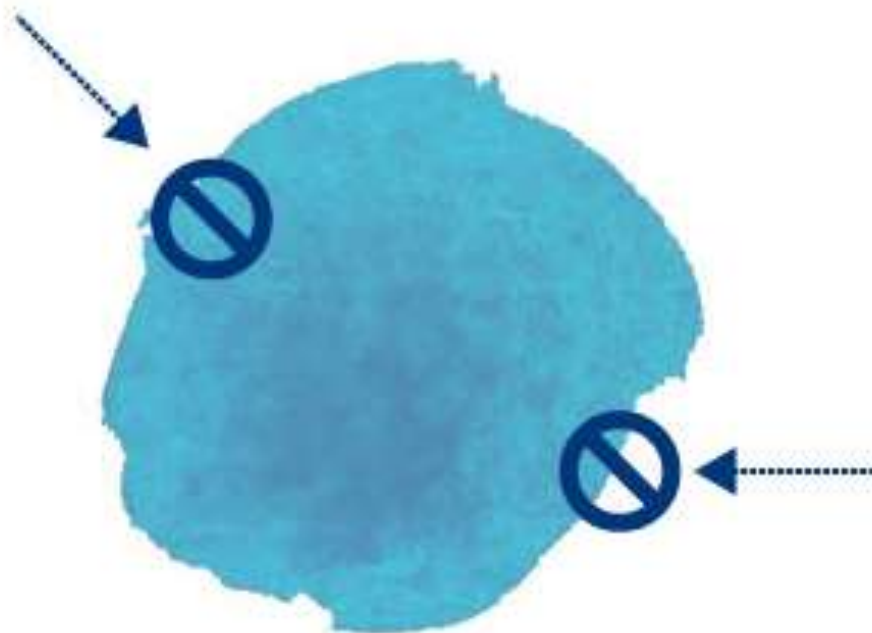


Tipos de terapia alvo

Hormonioterapia:

Alguns tumores crescem a partir do estímulo de hormônios.

A hormonioterapia impede a produção ou atuação desses hormônios e é usada no tratamento de alguns tumores.



Tipos de terapia alvo

Inibidores de sinais celulares:

Algumas células tumorais possuem receptor para fatores de crescimento.

Drogas que interferem nesse processo bloqueiam o aumento do câncer.

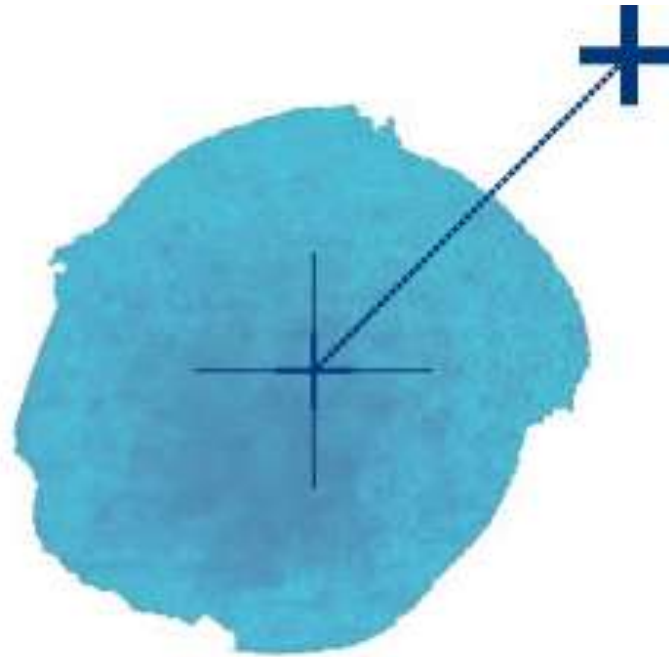


Tipos de terapia alvo

Indutores de morte celular:

Células cancerosas possuem estratégias para evitar os processos do corpo para se livrar de células defeituosas. (terapia anti-PD-1)

Algumas drogas contornam essas estratégias e matam as células cancerosas.

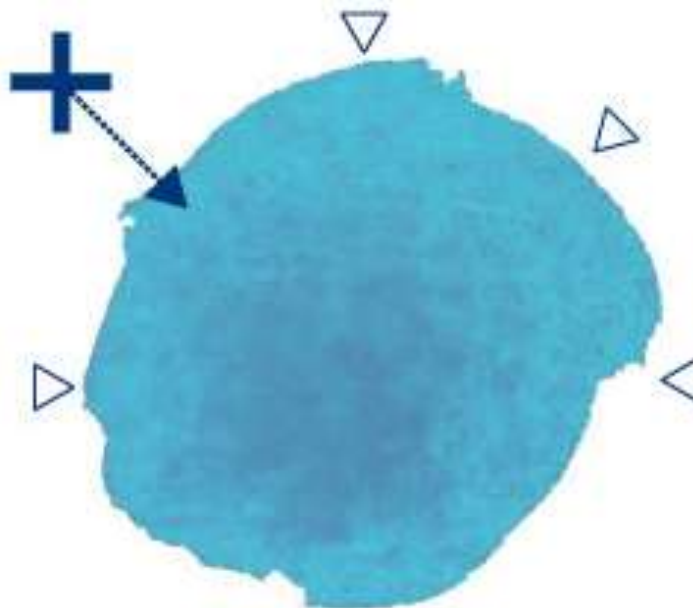


Tipos de terapia alvo

Imunoterapias:

Por meio da imunoterapia, o sistema de defesa do corpo é estimulado a destruir células do câncer.

Ela pode ser feita pela introdução de anticorpos que reconhecem células cancerosas.

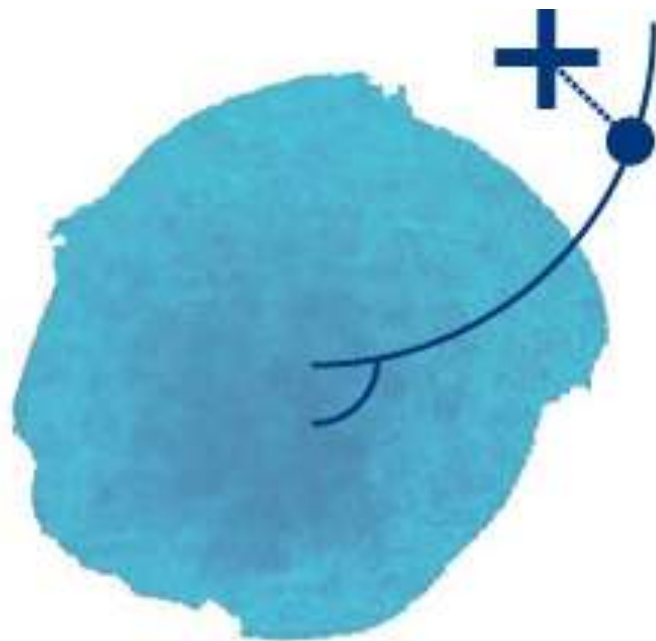


Tipos de terapia alvo

Inibidores da angiogênese:

O surgimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) na região do tumor garante o seu crescimento.

Inibidores de angiogênese interferem, assim, no crescimento do tumor.



Existem dois grupos principais de drogas usadas em terapia alvo:

Anticorpos Monoclonais:

- Substâncias produzidas em laboratório para bloquear um alvo específico das células cancerígenas ou no tecido adjacente ao tumor.
- Os anticorpos monoclonais também podem fornecer substâncias tóxicas, como quimioterapia e substâncias radioativas, diretamente nas células cancerosas.
- Essas drogas são geralmente administradas por via intravenosa, porque são compostos grandes que não são bem absorvidos pelo corpo.



Existem dois grupos principais de drogas usadas em terapia alvo:

Medicamentos Orais:

- Como o nome indica normalmente são administrados por via oral. Eles contêm componentes químicos menores do que os anticorpos monoclonais, o corpo consegue absorve-los melhor.
- Estes medicamentos geralmente bloqueiam processos dentro das células cancerosas que as estimulam a se multiplicar e se espalhar.



Limitações da terapia alvo

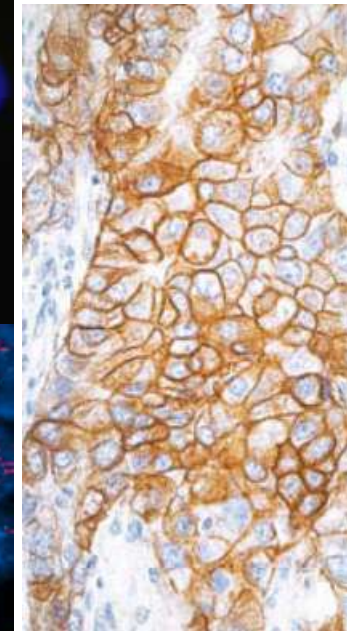
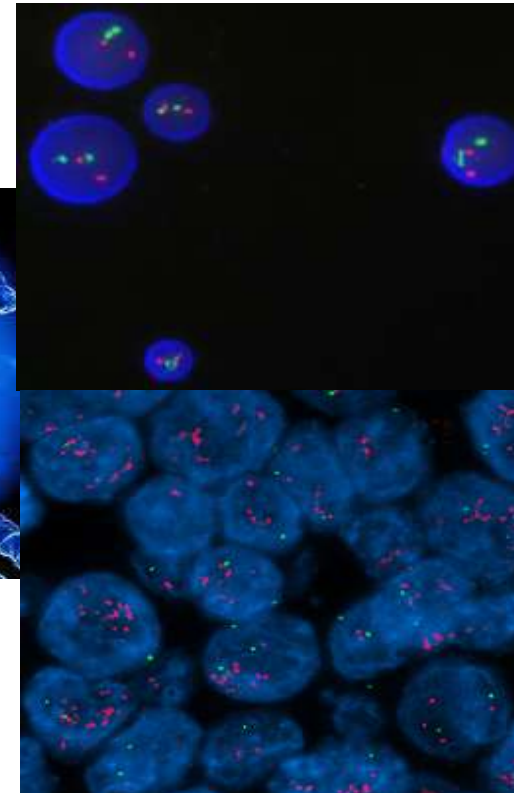
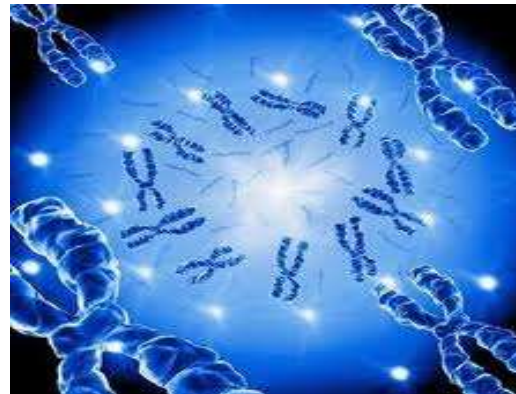
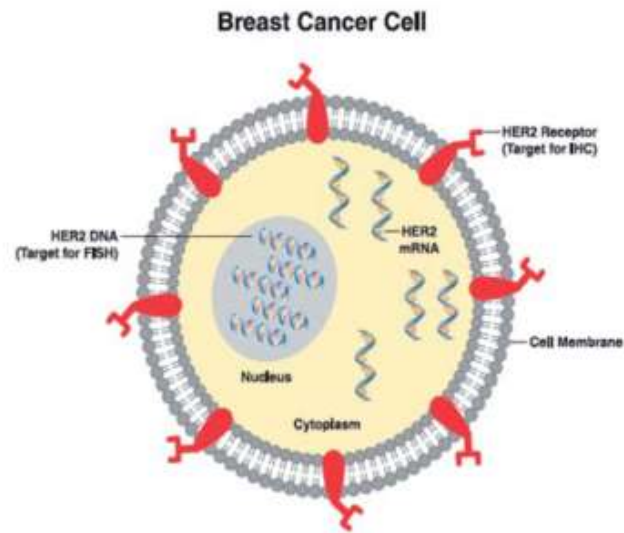
- Embora a ideia de um medicamento alvo para um tumor pareça simples, esta abordagem é complexa e nem sempre eficaz.
- O alvo na célula cancerígena pode não ser tão importante quanto se acreditava, e o medicamento não fornecerá muitos benefícios..
- O câncer pode se tornar resistente ao tratamento, o que significa que não responde mais.
- Estes medicamentos podem causar efeitos colaterais importantes, embora esses efeitos sejam geralmente diferentes do que os observados com a quimioterapia convencional.
- Apenas alguns tipos de câncer podem ser tratados com estas drogas.
- Com poucas exceções, os pacientes com câncer geralmente recebem uma combinação de terapia alvo e cirurgia, quimioterapia, radioterapia de radiação e/ou terapia hormonal.

Quando e para quem é indicada?

- O princípio básico da utilização da terapia alvo consiste na identificação de um bom alvo molecular.
- Os tumores precisam ter a presença do alvo molecular no tecido tumoral para existir benefício do uso do medicamento
- Esses alvos podem ser genes mutados, proteínas expressas exclusivamente no tumor, proteínas alteradas devido mutações ou mesmo quando essas estão presentes em maior quantidade na célula doente quando comparada a célula normal, sugerindo ação dessa via no desenvolvimento do tumor.
- Para tudo isso é essencial a realizações de exames específicos que identificam a presença desses alvos que podem estar presentes ou não, dependendo de cada paciente.

Farmacodiagnósticos

- São ensaios completos de diagnóstico que permitem a identificação de pacientes que são susceptíveis em se beneficiar de uma terapia específica dirigida.
- Fazem parte do grupo de exames chamado de Patologia Molecular.



Farmacodiagnósticos ajudam o médico a escolher corretamente os pacientes para tratamento.



Dako

Agilent Pathology Solutions

O problema

Tratamento personalizado do câncer é o presente e o futuro da medicina. Quanto mais rápido nós podemos desenvolver tratamentos contra o câncer, que são adaptados às características individuais de cada paciente, o melhor que podemos concentrar as intervenções sobre aqueles que vai beneficiar a maioria deles e evitar a despesa, efeitos colaterais.

A solução

Prevenção, detecção e tratamento do câncer vai se tornar ainda mais precisa como identificar alterações genéticas através do conhecimento acumulado e tecnologias cada vez mais sofisticadas.

O tratamento certo para o paciente certo, na hora certa.

Os produtos

Diagnóstico torna possível selecionar os pacientes elegíveis para um tratamento específico de forma confiável.



Agilent Technologies

Eles podem identificar:

- A expressão do gene – proteína de interesse, geralmente possuem marcação cromogênica semelhante a IHQ.
- Alterações no DNA que podem ser amplificação ou supressão de genes translocações e mutações
- Essas alterações podem ser detectadas por métodos diferentes:
 - ✓ FISH (Hibridização In Situ Fluorescência)
 - ✓ PCR (Reação em cadeia de Polimerase)
 - ✓ Sequenciamento de DNA

Principais farmacodiagnósticos

C-Kit pharmDx Kit (cód:K1906/K1907)

- Sistema de kit imuno-histoquímico qualitativo para a identificação da expressão da proteína c-kit (CD117) em tecidos normais e neoplásicos indicado como um auxiliar no diagnóstico diferencial de tumores estromais gastrointestinais (GIST).
- A avaliação exata da expressão da proteína c-kit é agora um fator crítico no diagnóstico de GIST e está se tornando cada vez mais importante para influenciar as decisões sobre o manejo clínico, incluindo o uso de Gleevec® / Glivec® (mesilato de imatinib)

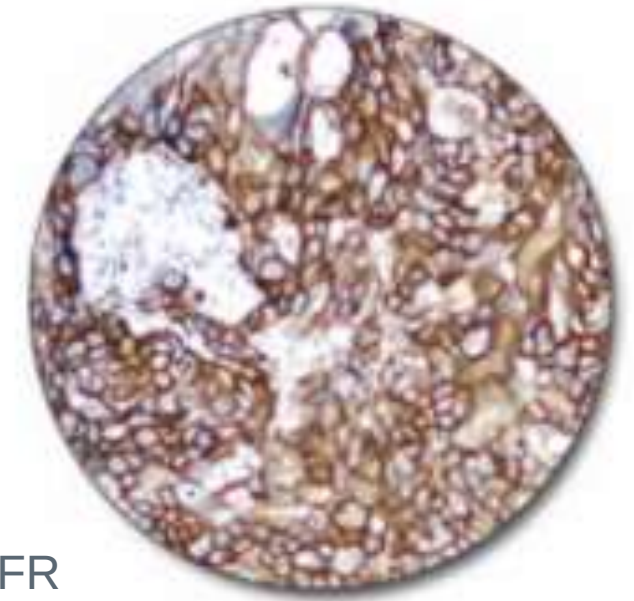


Gastrointestinal tumor stained with c-Kit

Principais farmacodiagnósticos

EGFR pharmDx Kit (cód:K1492 or K1494)

- Sistema imuno-histoquímico qualitativo para identificar a expressão da proteína do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) na superfície de células normais e neoplásicas.
- A proteína EGFR também é chamada de proteína HER1 está indicado como um auxiliar na identificação de doentes com câncer colorrectal elegíveis para tratamento com Erbitux® (cetuximab) ou Vectibix™ (panitumumab).



Colorectal cancer (FFPE) stained with EGFR

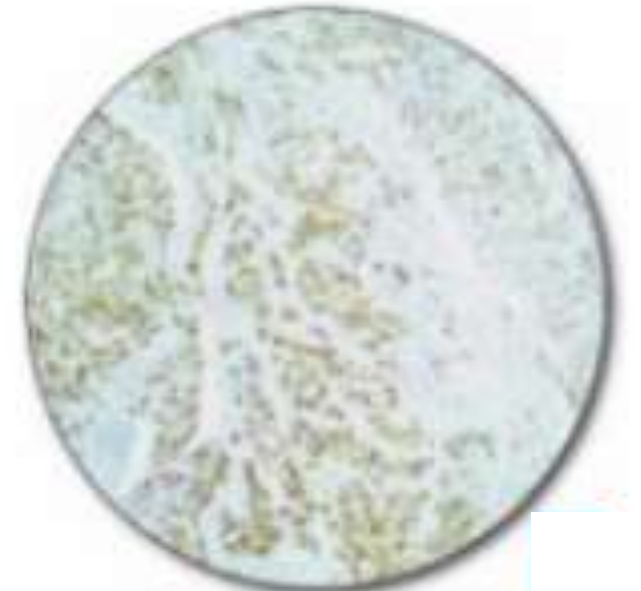
Principais farmacodiagnósticos

ER / PR pharmDx Kit (cód:K4071)

- Sistemas imuno-histoquímicos semi-quantitativos para identificar a expressão da proteína α do receptor de estrogênio (ER) e proteína do receptor de progesterona (PR) em tecidos normais e neoplásicos.
- Indicado como um auxílio na identificação de pacientes elegíveis para tratamento com terapias anti-hormonais ou inibidores de aromatase, bem como um auxílio no prognóstico e no manejo do câncer de mama.



Estrogen receptor staining

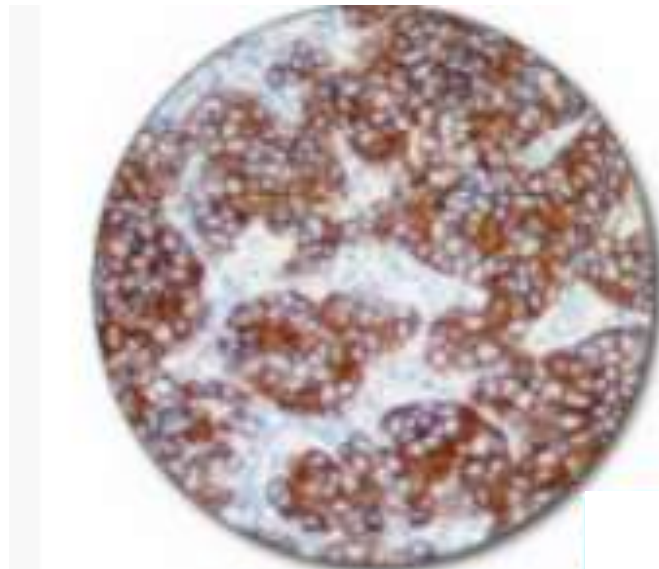


Progesterone receptor staining

Principais farmacodiagnósticos

HercepTest pharmDx Kit (cód:K5204)

- Ensaio imuno-histoquímico semi-quantitativo para a determinação da sobreexpressão da proteína HER2 (oncoproteína c-erbB-2) em tecidos de câncer da mama e adenocarcinoma do estômago
- HercepTest está indicado como um auxiliar na avaliação de doentes para os quais está a ser considerado o tratamento com Herceptin TM (trastuzumab).



Breast carcinoma (FFPE)
stained with HercepTest



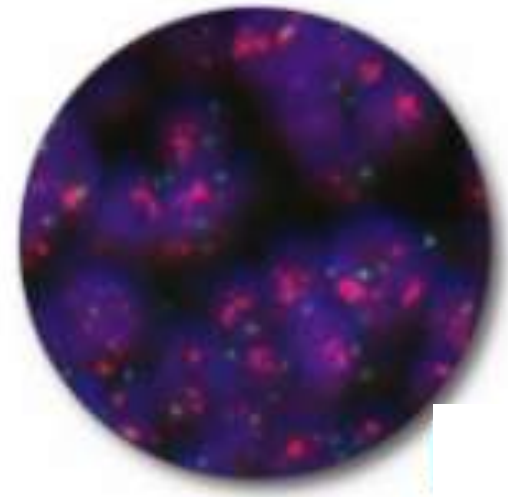
Gastric adenocarcinoma (FFPE)
stained with HercepTest

Principais farmacodiagnósticos

HER2 IQFISH pharmDx (cód: K5731)

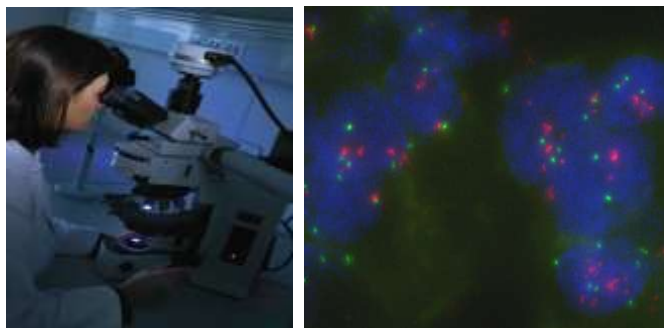
- Projetado para determinar quantitativamente a amplificação do gene HER2 em espécimes de tecido de câncer de mama e adenocarcinoma do estômago. A amplificação do gene é determinada a partir da relação entre o número de sinais da hibridação da sonda do gene HER2 (sinais vermelhos) e o número de sinais da hibridação da sonda de referência do cromossomo CEN-17 (sinais verdes).
- HER2 IQFISH pharmDx está indicado como um auxiliar na avaliação de doentes para os quais está ser considerado o tratamento com HerceptinTM

Breast carcinoma (FFPE) stained with *HER2* IQFISH pharmDx, Code K5731. Tumor cells show *HER2* gene amplification (*HER2*/CEN-17 ratio ≥ 2).

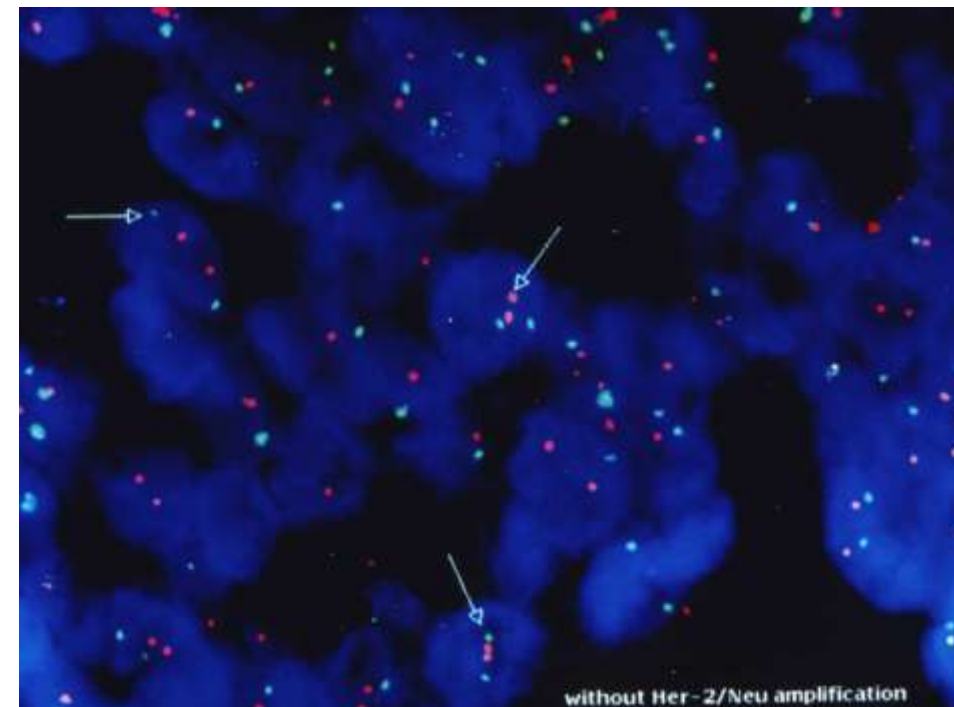


Principais farmacodiagnósticos

- HER2 IQFISH pharmDx é um sistema completo que fornece todos os reagentes necessários para realizar 20 ensaios FISH. Isto inclui reagentes de pré-tratamento, mistura de sondas HER2 e CEN-17 em tampão de hibridização IQISH, tampões e meio de montagem. Um procedimento padrão validado e diretrizes de interpretação validadas também são fornecidos.



Avaliação por microscópio de fluorescência



HER2 IQFISH PharmDx

Resultados de FISH em 3h30

- Tempo de hibridização reduzido de 12-18 horas a 1½ horas (1-2 horas)

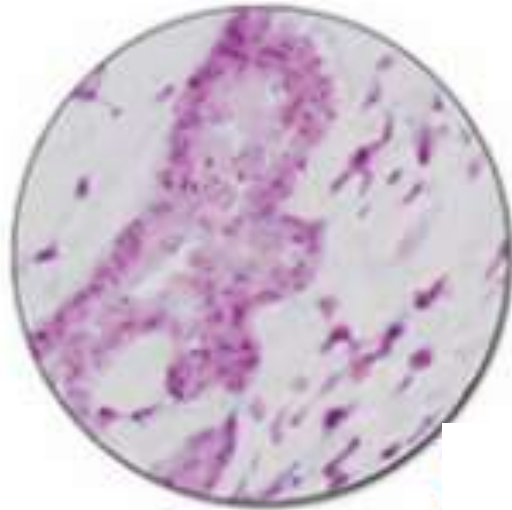


Principais farmacodiagnósticos

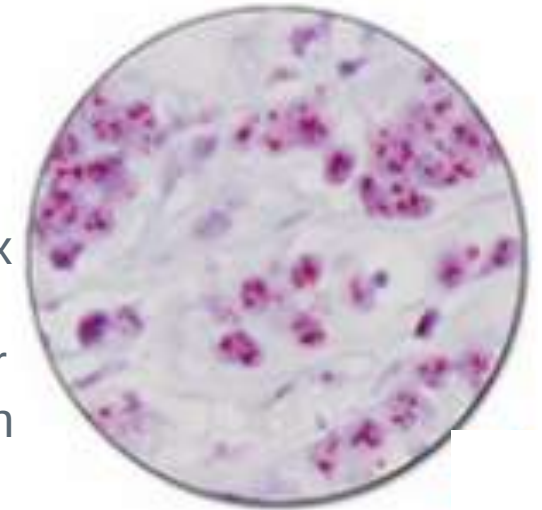
HER2 CISH pharmDx Kit (cód:SK109)

- Ensaio cromogénico de dupla cor desenhado para determinar quantitativamente as amplificações do gene HER2 em amostras FFPE de câncer de mama utilizando microscopia de campo claro. A amplificação do gene é determinada a partir da relação entre o número de sinais da visualização da sonda do gene HER2 (sinais vermelhos) e o número de sinais da sonda de referência do cromossomo 17 (sinais azuis).
- HER2 CISH pharmDx Kit é indicado como um auxiliar na avaliação de pacientes para os quais está sendo considerado o tratamento com Herceptin TM

HER2 CISH pharmDx Kit, Code SK109, stained breast cancer tissue specimens with Non-amplified.



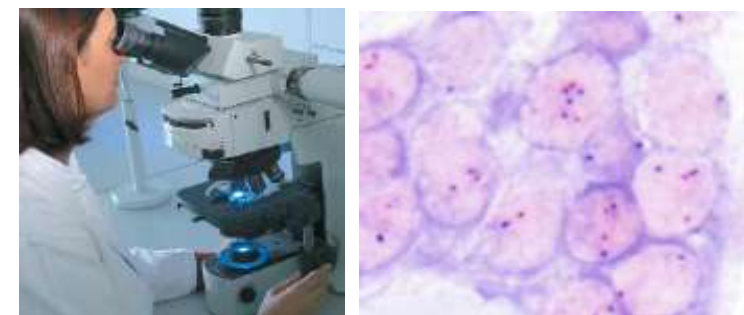
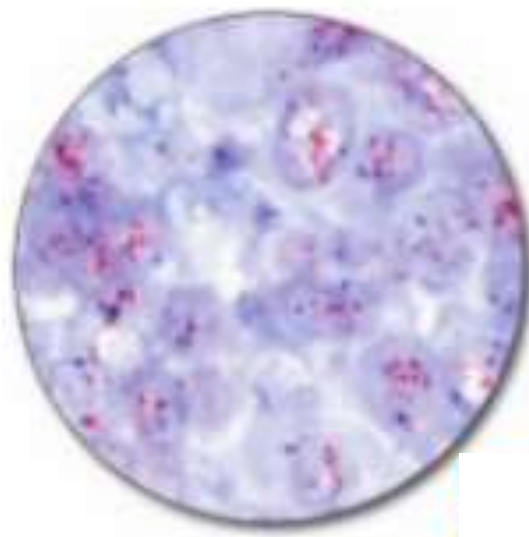
HER2 CISH pharmDx Kit, Code SK109, stained breast cancer tissue specimens with Amplified



Principais farmacodiagnósticos

- HER2 CISH pharmDx Kit é um sistema completo que fornece todos os reagentes necessários para realizar 20 ensaios CISH. Isto inclui reagentes de pré-tratamento, mistura de sonda HER2 e CEN-17, mistura de peroxidase, mistura de anticorpos CISH, cromogénios vermelho e azul, tampões de substrato e meios de montagem. Também é fornecido um procedimento padrão validado e um manual de interpretação validado.
- Lâminas permanentes.

HER2 CISH pharmDx Kit, Code SK109, stained breast cancer tissue specimens with Amplified.

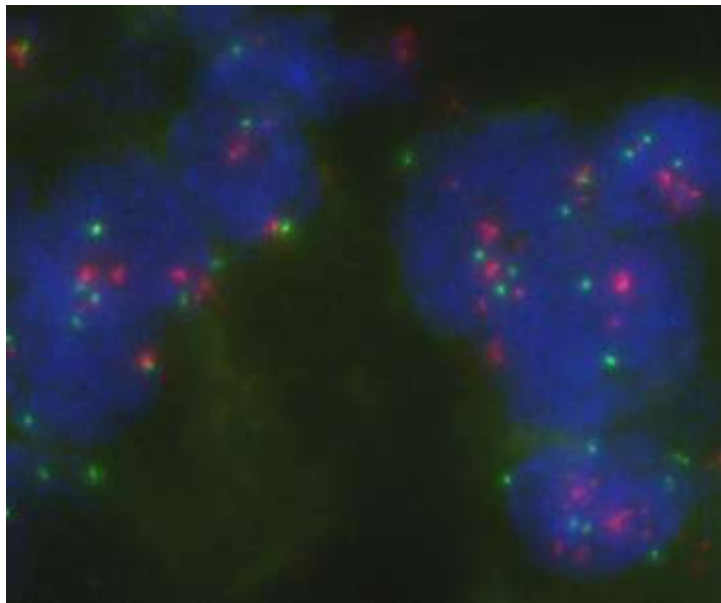


Avaliação por **microscópio de campo claro**

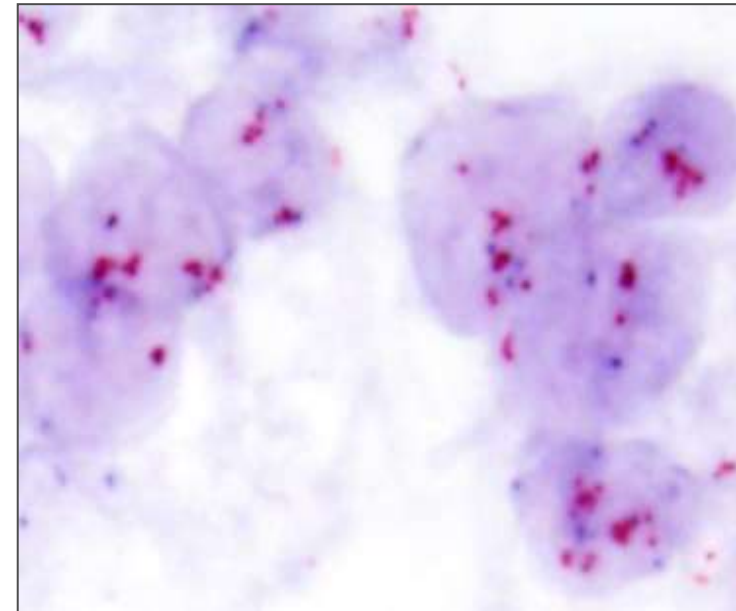
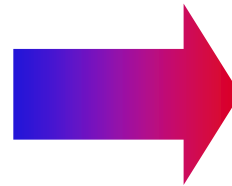
Dot-to-dot - conversão

Sinais do FISH **verdes** se convertem CISH **azuis**

Sinais FISH **vermelhas** se convertem CISH **vermelhas**



FISH



CISH

Alto nível de concordância entre FISH e CISH

Farmacodiagnóstico e o histotecnólogo



- Kits completos, validados e com lâminas controle inclusas – facilitam e padronizam os exames gerando resultados confiáveis e facilitando o trabalho do técnico;
- Possibilidade de automação para a hibridização e visualização – conforto e segurança para o uso;
- Rapidez nos resultados – IQFISH
- A participação do técnico é extremamente importante para o resultado final ser preciso e com qualidade beneficiando o paciente.

Perspectivas para o futuro



- O tratamento do câncer tem avançado muito graças ao robusto volume de pesquisas na área.
- Mais de 90% dos medicamentos oncológicos em desenvolvimento pela indústria farmacêutica se referem às chamadas terapias-alvo.
- Pesquisas científicas têm permitido que os médicos conheçam cada vez melhor os diferentes tipos de tumores. Quanto mais se estuda sobre eles mais se avança na obtenção de drogas com bons resultados.
- O diagnóstico evolui na mesma velocidade que o tratamento e com as drogas individualizadas se torna cada vez mais importante exames que identifiquem pacientes que podem se beneficiar dessas terapias.

Perspectives para o futuro

Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist

Keith M. Kerr, BSc, MB, ChB, FRCPath, FRCPE; Marianne C. Nicolson, MD, FRCP

• **Context.**—Although most primary cancers of the lung carry a heavy mutational load and will potentially present many “nonsell” antigens to the immune system, there are a wide range of possible mechanisms for tumors to avoid so-called immune surveillance. One such mechanism is the adoption of immune checkpoints to inhibit the host immune response. Immun great promise in the treatm lung cancer.

Objective.—To discuss selection of patients for th a much debated issue, a detection of Programmed ligand for the inhibitory I (PD-1) checkpoint, is one available show some co immunohistochemistry loo clinical use for selecting p

PD-1 or anti-PD-L1 therapies. Given that there are 4 such drugs rapidly approaching regulatory approval, each with its own independent PD-L1 immunohistochemistry bio-marker test, both oncologists and pathologists face some significant challenges.

Key Words: Biomarkers, Immunotherapy, and medicine

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Cancer Treatment Reviews

journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/ctrv

Anti-Tumour Treatment

Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy

Xiangjiao Meng^a, Zhaoqin Huang^b, Feifei Teng^a, Ligang Xing^{a,*}, Jinming Yu^{a,*}

^aDepartment of Radiation Oncology and Shandong Key Laboratory of Radiation Oncology, Shandong Cancer Hospital and Institute, Jinan, China

^bDepartment of Radiology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong, China

ARTICLE INFO

Article history:

ABSTRACT

Checkpoint blockades turn on a new paradigm shift in immunother

Traditionally the treatme lung cancer (NSCLC) chemotherapy, or a combi tumor stage and patient fitn targeted therapies have pres approach for patients whos alterations.³ Early attempts lung cancers were disappo BCG; cytokines, such as int tions.⁴⁻⁶

Now, recognition of the Death receptor 1 (PD-1) an Ligand 1 (PD-L1), and th



PHARMACODIAGNOSTICS Sintesi della relazione

Project ID: [36591](#)

Finanziato nell'ambito di: [FP6-MOBILITY](#)

Paese: Denmark

Final Activity Report Summary - PHARMACODIAGNOSTICS (PharmacodiagnosTICS for prediction of breast cancer treatment)

 **Research article**

CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells

Sergio A. Quezada, Karl S. Peggs, Michael A. Curran, and James P. Allison

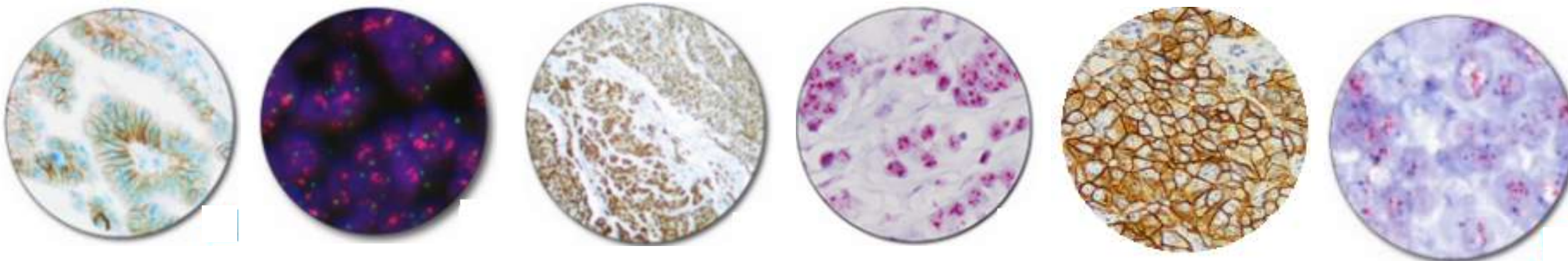
Howard Hughes Medical Institute, Department of Immunology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York, USA.

CTL-associated antigen 4 (CTLA4) blockade releases inhibitory controls on T cell activation and proliferation, inducing antitumor immunity in both preclinical and early clinical trials. We examined the mechanisms of action of anti-CTLA4 and a GM-CSF-transduced tumor cell vaccine (Gvax) and their impact on the balance of effector T cells (Teffs) and Tregs in an in vivo model of B16/BL6 melanoma. Tumor challenge increased the frequency of Tregs in lymph nodes, and untreated tumors became infiltrated by CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺Foxp3⁺

PharmacodiagnosTICS and Targeted Therapies--A Rational Approach for Individualizing Medical Anticancer Therapy in Breast Cancer

Jan Trøst Jørgensen, Kirsten Vang Nielsen and Bent Ejlersen

ologist 2007, 12:397-405.
34/theoncologist.12-4-397



A qualidade de vida do paciente com câncer é o alvo principal de todos esses esforços em pesquisa de novas drogas e diagnósticos.

Prova disso é a ascensão da Medicina Personalizada cujos testes diagnósticos são específicos para identificação de tratamentos individualizados e, conseqüentemente, aumente a sobrevida do paciente.



Agilent Technologies