

# **Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**

## **Desenvolvimento de métodos eficientes para análise de biomarcadores preditivos em biópsias líquidas para aplicação em pacientes com carcinoma do pulmão de não pequenas células**

**Dissertação de Mestrado em:  
Biotecnologia para as Ciências da Saúde**

**Juliana Carvalho Miranda**

**Orientação: Professora Doutora Raquel Chaves  
Co-orientação: Doutora Daniela Ferreira**



**Vila Real, 2021**



**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO**

**Desenvolvimento de métodos eficientes para análise de biomarcadores  
preditivos em biópsias líquidas para aplicação em pacientes com carcinoma  
do pulmão de não pequenas células**

**Dissertação de Mestrado em:  
BIOTECNOLOGIA PARA AS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Juliana Carvalho Miranda**

**Orientadora: Professora Doutora Raquel Chaves**

**Co-orientadora: Doutora Daniela Ferreira**

**Composição do Júri:**

**Professora Doutora Isabel O'Neill de Mascarenhas Gaivão**

**Professora Doutora Paula Filomena Martins Lopes**

**Doutora Daniela Pernetta Ferreira**

**Vila Real, 2021**



Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia para as Ciências da Saúde. As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor. Todas as contribuições não originais foram devidamente identificadas com a indicação da fonte.



Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito projeto PulmaGENE (NORTE-01-0247-FEDER-033533).





**“Independentemente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”**

**Dalai Lama**



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do magnífico reitor PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO FONTAÍNHAS FERNANDES, instituição que eu escolhi e me acolheu nesta etapa tão importante da minha vida académica.

À Escola de Ciências da Vida e do Ambiente (ECVA), na pessoa do presidente PROFESSOR DOUTOR ARTUR AGOSTINHO DE ABREU E SÁ, agradeço a disponibilização dos meios académicos para realizar esta dissertação.

À COORDENAÇÃO DO 2º CICLO EM BIOTECNOLOGIA PARA AS CIÊNCIAS DA SAÚDE, na pessoa da PROFESSORA DOUTORA ISABEL GAIVÃO, por terem aceite o plano de trabalho aqui apresentado e por terem disponibilizado toda a logística necessária para a realização desta dissertação.

A TODOS OS DOCENTES do 2º Ciclo em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, pelos conhecimentos transmitidos e competências adquiridas durante o mestrado!

À PROFESSORA DOUTORA RAQUEL CHAVES, minha orientadora, obrigada por ter acreditado em mim, pela grande oportunidade que me deu em poder aprender consigo e pelo tempo que generosamente sempre me dispensou. Quando a conheci, cativou-me pela forma como se empenha em dar sempre o seu melhor, como é a MELHOR naquilo que faz! É o meu EXEMPLO! Por isso, AGRADEÇO-LHE do fundo do meu coração pela oportunidade de ter feito parte da sua equipa e por me ter deixado conhece-la melhor. Foi muito importante para mim! Foi uma experiência extremamente enriquecedora! OBRIGADA!

À DOUTORA DANIELA FERREIRA, minha co-orientadora, nem sei por onde começar! OBRIGADA POR TUDO! Obrigada por teres sido UMA AMIGA! OBRIGADA pela paciência que tiveste comigo, pelo tempo que me dispensaste! ESTAVAS SEMPRE PRESENTE PARA MIM quando eu precisava! OBRIGADA! Tenho mesmo muita SORTE por te teres cruzado na minha vida, por ter trabalhado contigo, por poder aprender contigo! Obrigada pelos momentos divertidos que passei contigo! E tenho a noção que sem ti e sem a tua ajuda, não teria conseguido completar esta etapa! ESTAREI PARA SEMPRE EXTREMAMENTE AGRADECIDA!

À PROFESSORA DOUTORA FILOMENA ADEGA, OBRIGADA por se preocupar comigo! Ao longo deste ano, sempre foi muito atenciosa, prestável e sempre teve uma palavra amiga para me dar! Foi um GOSTO muito grande tê-la conhecido!

À DOUTORA ANA ESCUDEIRO, um grande OBRIGADA! Foi muito bom ter-te conhecido um bocadinho melhor! Obrigada por me ajudares no laboratório e por me teres deixado à vontade para responder “Não sei, não é?!” a quase todas as perguntas que me fazias!

À Mariana Lopes, OBRIGADA por me teres acolhido tão bem e por me ajudares sempre que precisei!

Ao Diogo Lucas, um sincero OBRIGADO por tudo que fizeste por mim! Foste um companheiro de laboratório maravilhoso! Obrigado por ficares comigo a fazer tempo para irmos embora, obrigado por esperares por mim para ires almoçar, obrigado por me fazeres rir! OBRIGADO POR TUDO!

À Catarina Cunha e ao Albano Pinto, OBRIGADO pela amizade! Pela disponibilidade, pela ajuda, pela companhia!

Aos meus amigos e as minhas meninas de Refóios do Lima! Que sem eles a minha vida não era a mesma! OBRIGADO pelo apoio que me deram, pelo incentivo! E por todas as alegrias que me proporcionam! Sou definitivamente uma melhor pessoa depois de vos ter conhecido!

E por último, À MINHA FAMÍLIA! Um GRANDE OBRIGADO por fazerem de tudo para que eu pudesse seguir os meus SONHOS! Obrigada pelo apoio, pelo incentivo, pela ajuda e por nunca duvidarem de mim!

**OBRIGADA DE CORAÇÃO, SEM VOCÊS EU NÃO CONSEGUIRIA!**

## Resumo

O cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC) é o tipo mais comum de cancro do pulmão, sendo responsável pela maioria dos casos de cancro. Este encontra-se, geralmente, num estadio avançado quando diagnosticado, diminuindo a taxa de sobrevivência. A aplicação de terapias dirigidas (como afatinib, crizotinib) depende da deteção de alterações em genes específicos (como *EGFR* e *ALK*), sendo estes considerados biomarcadores preditivos. Atualmente, são utilizadas técnicas de PCR e/ou sequenciação de Sanger para determinar alterações moleculares em biópsias tumorais (que normalmente estão fixadas em formalina e embebidas em parafina – FFPE). Porém, as limitações na dificuldade de obtenção de amostra com qualidade têm levado à necessidade de encontrar alternativas viáveis para determinar a evolução da doença ou até a detetar precocemente. Uma alternativa viável são as biópsias líquidas, consideradas um método confiável e minimamente invasivo para a deteção de mutações genéticas específicas.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um teste simples, certificado e com maior sensibilidade analítica para a deteção de mutações associadas a diferentes respostas terapêuticas em biópsias líquidas de doentes com CPNPC. Para tal, foi necessário: definir o método de acondicionamento e extração de cfDNA e desenhar e otimizar ensaios para deteção de mutações no gene *EGFR*.

Relativamente ao acondicionamento e extração de cfDNA a partir de biópsias líquidas, o uso de esferas magnéticas para extração de cfDNA (especificamente o kit GenElute UltraMag Cell-DNA) e os tubos para colheita Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) (Roche) mostraram ser adequados e eficientes para obtenção de cfDNA até 6 dias após a colheita de sangue.

Para o desenho dos ensaios de diagnóstico foi feito um estudo das mutações do gene *EGFR* relacionadas com resposta terapêutica e os “primers” foram desenhados de forma a englobarem todas as alterações relevantes. Após otimização do multiplex PCR foi possível amplificar os exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* a partir de amostras de cfDNA e sequenciar por NGS. Este método mostrou-se eficiente para a deteção de mutações no gene *EGFR*, tendo sido detetada uma deleção específica no exão 19 –p.E746\_A750delELREA.

Desenvolvemos também ensaios de HRM (“High Resolution Melting Temperature”) como uma alternativa de deteção mais rápida e sensível. Os resultados foram promissores, uma vez que conseguimos uma sensibilidade de 0.25% (fração de alelo mutante) para detetar alterações

no exão 19 e foi possível também identificar a mutação previamente analisada por NGS (Exão 19- p.E746\_A750delELREA) na mesma amostra de cfDNA.

O desenho dos ensaios para detecção de alterações no gene *ALK* encontra-se em desenvolvimento, tendo sido feita a análise “in silico” das mutações/fusões no gene *ALK* relacionadas com diferentes respostas terapêuticas e o desenho dos “primers” para detecção das mutações em amostras de cfDNA de doentes com CPNPC.

Com este trabalho verificamos o potencial que a utilização das biopsias líquidas tem como uma alternativa válida e confiável para a detecção de mutações no *EGFR*. Esta abordagem permitirá o seguimento (não invasivo) dos doentes com CPNPC durante a terapia, representando uma grande vantagem, pois frequentemente adquirem mutações específicas que provocam resistência aos tratamentos.

**Palavras-Chave:** Cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC); cfDNA; *EGFR*; NGS; HRM.

## Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer. This is usually in an advanced stage when diagnosed, decreasing the survival rate. The application of targeted therapies (such as afitinib, crizotinib) depends on the detection of alterations in specific genes (such as *EGFR* and *ALK*), which are considered predictive biomarkers. Currently, PCR and / or Sanger sequencing techniques are used to determine molecular changes in tumor biopsies (which are normally formalin fixed and paraffin embedded - FFPE). However, the limitations in obtaining a quality sample have led to the need to find viable alternatives to determine the evolution of the disease or even to its earlier detection. A viable alternative are liquid biopsies, considered a reliable and minimally invasive method for detecting specific genetic mutations.

This work aims to develop a simple, certified test with greater analytical sensitivity for detecting mutations associated with different therapeutic responses in liquid biopsies of patients with NSCLC. For that, it was necessary to: define the method of conditioning and extraction of cfDNA and design and optimize assays for detecting mutations in the *EGFR* gene.

Regarding the conditioning and extraction of cfDNA from liquid biopsies, the use of magnetic spheres for extraction of cfDNA (specifically the GenElute UltraMag Cell-DNA kit) and the Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) collection tubes (Roche) showed to be adequate and efficient to obtain cfDNA up to 6 days after blood collection.

For the design of the diagnostic tests, a study of the *EGFR* gene mutations related to the therapeutic response was made and the primers were designed to encompass all relevant changes. After optimizing the multiplex PCR, it was possible to amplify exons 18, 19, 20 and 21 of the *EGFR* gene from cfDNA samples and sequence by NGS. This method proved to be efficient for detecting mutations in the *EGFR* gene, with a specific deletion being detected in exon 19 –p.E746\_A750delELREA.

We also developed HRM (High Resolution Melting) tests as a faster and more sensitive detection alternative. The results were promising, since we achieved a sensitivity of 0.25% (fraction of mutant allele) to detect changes in exon 19 and it was also possible to identify the mutation previously analyzed by NGS (Exon 19, p.E746\_A750delELREA) in the same sample of cfDNA .

The design of assays for detecting alterations in the *ALK* gene is under development, with an in silico analysis of mutations / fusions in the *ALK* gene related to different therapeutic

responses, and the design of primers to detect mutations in samples of cfDNA of patients with NSCLC.

With this work we verify the potential that the use of liquid biopsies has as a valid and reliable alternative for the detection of mutations in *EGFR*. This approach will allow (non-invasive) follow-up of patients with NSCLC during therapy, representing a great advantage, as they often acquire specific mutations that cause resistance to treatments.

**Keywords:** Non-small cell lung cancer (NSCLC); cfDNA; *EGFR*; NGS; HRM.

# Índice

Agradecimentos .....	xi
Resumo .....	xiii
Abstract.....	xv
Índice de Figuras .....	xxi
Índice de Tabelas .....	xxiii
Abreviaturas e Símbolos.....	xxv
Capítulo I- Introdução .....	1
I.1- Cancro do pulmão .....	3
I.2- Biomarcadores em Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células – <i>EGFR</i> e <i>ALK</i> .....	4
I.2.1. <i>EGFR</i> como biomarcador em Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células.....	4
I.2.1.1 <i>EGFR</i> - Função e Estrutura .....	5
I.2.2.1 Mutações no gene <i>EGFR</i> como biomarcadores preditivos .....	7
I.2.2 <i>ALK</i> como biomarcador em Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células.....	12
I.2.2.1 <i>ALK</i> - Função e estrutura.....	12
I.2.2.2 Fusões e mutações no gene <i>ALK</i> como biomarcadores preditivos.....	14
I.2.3 Inibidores de Tirosina Cinase.....	16
I.2.3.1 Inibidores Tirosina Cinase do <i>EGFR</i> .....	17
I.2.3.2 Inibidores Tirosina Cinase do <i>ALK</i> .....	19
I.2.4 Métodos de deteção de alterações em genes preditivos de terapia - <i>EGFR</i> e <i>ALK</i> .....	21
I.3 Biópsias Líquidas .....	22
Capítulo II- Objetivos .....	27
Capítulo III- Material e Métodos.....	31
III.1 Material biológico.....	33
III.2 Extração de DNA Genómico a partir de células em cultura.....	33
III.3 Preparação das amostras e extração de cfDNA .....	33

III.4	Quantificação do cfDNA .....	34
III.5	Análise “in silico” de mutações no gene <i>EGFR</i> e <i>ALK</i> e mapeamento fusões <i>EMLA-ALK</i> .....	35
III.6	Desenho de “primers” para multiplex PCR para amplificação do gene <i>EGFR</i> .....	35
III.7	Amplificação dos exões do gene <i>EGFR</i> em amostras de cfDNA pela técnica “Multiplex Polymerase Chain Reaction” .....	35
III.7.1	Otimização do PCR para amplificação dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene <i>EGFR</i> .....	35
III.7.2	Otimização do multiplex PCR para amplificação dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene <i>EGFR</i> em amostras de cfDNA .....	36
III.7.3	Eletroforese em gel de agarose .....	37
III.7.4	Purificação do produto PCR Multiplex Illumina e quantificação dos produtos PCR purificados .....	37
III.7.5	Sequenciação pelo método de NGS das amostras amplificadas por PCR multiplex.....	38
III.8	Clonagem dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene <i>EGFR</i> .....	38
III.9	HRM como forma de detecção de variantes.....	39
III.10	Análise Estatística.....	39
Capítulo IV-	Resultados .....	41
IV.1	Otimização da extração de cfDNA a partir de amostras de sangue .....	43
IV.2	Análise das mutações do <i>EGFR</i> preditivas de resposta terapêutica .....	44
IV.3	Desenvolvimento do método para análise de mutações no <i>EGFR</i> em cfDNA-Multiplex PCR e NGS .....	51
IV.4	Desenvolvimento do método para análise de mutações no <i>EGFR</i> em cfDNA- HRM .....	55
IV.5	Análise das alterações do <i>ALK</i> preditivas de resposta terapêutica .....	58
Capítulo V-	Discussão .....	63

V.1 Biópsias Líquidas- Otimização de procedimentos de acondicionamento e extração de cfDNA .....	65
V.2 Desenvolvimento do método para análise de mutações no <i>EGFR</i> em cfDNA- NGS e HRM.....	68
Capítulo VI- Conclusão e Perspetivas Futuras .....	71
Capítulo VII- Referências Bibliográficas .....	75
Anexos .....	87



## Índice de Figuras

Figura I. 1- Estrutura do gene e da proteína EGFR..	5
Figura I. 2- Representação esquemática da proteína <i>EGFR</i> com os domínios intracelular, transmembranar, extracelular e domínio cinase.	6
Figura I. 3- Frequência das mutações no <i>EGFR</i> no CPNPC..	7
Figura I. 4- Frequência das mutações do exão 18 do <i>EGFR</i> no CPNPC.....	8
Figura I. 5- Frequência das mutações do exão 19 do <i>EGFR</i> .....	9
Figura I. 6- Frequência das mutações do exão 20 do <i>EGFR</i> em pacientes com CPNPC..	10
Figura I. 7- Frequência das mutações do exão 21 do <i>EGFR</i> ..	11
Figura I. 8- Mutações mais comuns do domínio de cinase do <i>EGFR</i> e a sua influência na resposta aos inibidores de <i>EGFR</i> das mutações. ....	12
Figura I. 9- Localização genómica e expressão do <i>ALK</i> . ....	13
Figura I. 10- Formação do gene de fusão <i>EML4-ALK</i> . ....	13
Figura I. 11- Frequência das variantes <i>ALK</i> . ....	14
Figura I. 12- Representação esquemática da composição estrutural das proteínas de fusão <i>EML4-ALK</i> . ....	15
Figura I. 13- Mutações do domínio cinase do <i>ALK</i> . ....	16
Figura I. 14- Mecanismo de ação de diferentes gerações de inibidores de tirosina cinase do <i>EGFR</i> e resistência aos TKIs conduzida pela mutação T790M.....	18
Figura I. 15- Componentes derivados dos tumores que podem ser utilizados através das biópsias líquidas para testes genéticos..	23
Figura IV. 1- Otimização da extração de cfDNA e da colheita de sangue para aplicação em pacientes com CPNPC. ....	44
Figura IV. 2- Distribuição da frequência das mutações do EGFR ao longo da proteína..	45
Figura IV. 3- Mapeamento das mutações do gene <i>EGFR</i> descritas como preditivas em pacientes com CPNPC..	51
Figura IV. 4- Otimização da reação de PCR..	52
Figura IV. 5- Alinhamento dos clones isolados por PCR dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene <i>EGFR</i> .....	53
Figura IV. 6- Quantificação dos produtos do multiplex PCR purificados. ....	54
Figura IV. 7- Alinhamento dos clones isolados por PCR do exão 19 do gene <i>EGFR</i> em cfDNA contendo a mutação p.E746_A750delELREA e DNA genómico da PC9. ....	55

Figura IV. 8- Resultado do HRM demonstrando a detecção da mutação pela análise das variantes. ....	56
Figura IV. 9- Resultado do HRM demonstrando a detecção da mutação p.E746_A750delELREA (cfDNA_mut) e das diferentes variantes.....	57
Figura IV. 10- Resultado do HRM demonstrando a presença das diferenças entre os cfDNA e os controles pelas diferentes variantes. ....	57
Figura IV. 11- Distribuição da frequência das alterações do ALK ao longo da proteína..	58
Figura IV. 12- Mapeamento das mutações do gene <i>ALK</i> , nos respectivos, descritas como preditivas em pacientes com CPNCP com base em dados COSMIC. ....	60
Figura IV. 13- Mapeamento dos genes <i>EML4</i> e <i>ALK</i> nas sequências das variantes das fusões <i>EML4-ALK</i> descritas com preditivas em pacientes com CPNCP com base em dados <i>COSMIC</i> . ....	62
Figura A. 1- Resultado do HRM demonstrando a presença da mutação (Pdel) nas diferentes percentagens. ....	89
Figura A. 2 - Resultado do HRM demonstrando a presença das diferenças entre os cfDNA e os controles.....	89

## Índice de Tabelas

Tabela I. 1- Descrição dos inibidores de TKIs de 1 <sup>a</sup> à 4 <sup>a</sup> geração.....	17
Tabela I. 2- TKIs do <i>ALK</i> aprovados pela FDA. ....	21
Tabela I. 3- Exemplos tecnologias efetuadas para a detecção de mutações no <i>EGFR</i> . ....	22
Tabela I. 4- Resumo das características/vantagens das biopsias líquidas em comparação com as características das biopsias sólidas (tumores embebidos em parafina e fixados em formalina- FFPE).....	25
Tabela III. 1- Descrição das diferentes etapas dos kit GenElute™ UltraMag Cell-Free DNA, cfKapture™ e MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation. ....	34
Tabela III. 2- Quantidades e concentrações dos reagentes de PCR utilizados para o Multiplex PCR e para a reamplificação com “primers” com adaptadores.....	37
Tabela IV. 1 - Análise das mutações preditivas do <i>EGFR</i> em pacientes com CPNPC descritas no COSMIC cancer database. ....	46
Tabela IV. 2- Resultados de “Next Generation Sequencing” – NGS- do produto de Multiplex PCR de cfDNA com “primers” <i>EGFR</i> . ....	54
Tabela IV. 3- Análise “in silico” das mutações do <i>ALK</i> em pacientes com CPNPC, descritas no COSMIC cancer database. ....	59



## **Abreviaturas e Símbolos**

**ALK** - Linfoma Cinase Anaplásico

**A-loop**- alça de ativação

**ATP**- Adenosina 5 'trifosfato

**BRFA**- “Oncogene homolog B”

**CD246**- “Cluster of differentiation 246”

**cfDNA**- DNA circulante

**cfRNA**- RNA circulante

**C-lobe**- lóbulo C-terminal

**c-MET** – “Mesenchymal-epithelial transition factor or hepatocyte growth factor recetor”

**CPNPC**- Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células

**CPPC**- Cancro do Pulmão de Pequenas Células

**CTCs**- Células tumorais circulantes

**DNAg**- DNA genómico

**EGF**- Fator de crescimento epidérmico

**EGFR** - Recetor do fator de crescimento epidérmico

**EMA**- “European Medicines Agency”

**EML4**- “Echinoderm microtubule-associated protein-like 4”

**ERBB2**- “Epidermal growth factor recetor 2”

**FDA**- “Food and Drug Administration”

**FFPE**- Tecido fixado em formalina e embebido em parafina

**FISH**- Hibridação “in situ” fluorescente

**HRM** – “High Resolution Melting”

**HS**- “High Sensitivity”

**HSP90**- “Heat Shock Protein 90”

**IHC**- método de imunohistoquímica

**K-RAS**- “Kirsten Rat Sarcoma”

**mTOR**- “Mechanistic target of rapamycin”

**NGS**- Sequenciação de última geração

**N-lobe**- lóbulo N-terminal

**PCR**- reação em cadeia da polimerase

**PD-L1**- “Protein dead ligand 1 ”  
**PI3K**- “Phosphatidylinositol 3-kinase”  
**ROS**- ROS Proto-Oncogene 1  
**RT-qPCR**- PCR quantitativo em tempo real  
**SNC**- Sistema nervoso central  
**TGF- $\alpha$** - Fator de crescimento transformador alfa  
**TK** - Domínio Tirosina cinase  
**TKIs**- Inibidores da tirosina cinase  
**Tm** - Temperatura de melting  
**VEGFR**- “Vascular epidermal growth factor recetor”  
**VEs**- Vesículas extracelulares  
**v-RAF**- “Murine sarcoma viral”

# **Capítulo I- Introdução**



## **I.1- Cancro do pulmão**

O cancro do pulmão é a principal causa de morte por doença oncológica mundialmente, registando cerca de 2 milhões de novos casos e aproximadamente 1.7 milhões de mortes em 2018 (19% dos casos de cancro) (Bray *et al.* 2018). Em geral, o cancro do pulmão causa mais mortes que os cancros de mama, próstata, colorretal em conjunto (Siegel *et al.* 2020).

Embora a principal causa de cancro do pulmão seja o tabagismo, outros fatores internos e externos também podem estar associados ao risco de cancro do pulmão, nomeadamente radiação, poluição atmosférica e predisposição genética (Barta *et al.* 2019). A incidência do cancro do pulmão têm vindo a diminuir ao longo dos anos devido, em parte, à alteração dos hábitos de tabagismo (Siegel *et al.* 2020).

O cancro do pulmão é dividido em dois grandes grupos citológicos, tendo como base a classificação histológica: Cancro do Pulmão de Pequenas Células (CPPC) e Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células (CPNPC) (Travis 2004, Sher *et al.* 2008), representando este último cerca de 85% dos casos (Herbst *et al.* 2018). Esta classificação é importante para a escolha do tratamento, uma vez que CPNPC possui uma vasta gama de alternativas terapêuticas comparativamente ao CPPC, e para definir o prognóstico, tendo o CPPC um prognóstico mais reservado. O CPNPC pode ainda ser classificado em três tipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes, com percentagens de incidência de 40%, 25-30% e 10-15%, respetivamente (Zappa e Mousa 2016).

Devido à ausência de sintomas clínicos nas fases iniciais da doença e à falta de eficácia programas de rastreamento, o cancro do pulmão é comumente diagnosticado em estadios avançados, o que contribui para as baixas taxas de sobrevivência (Schmidt-Hansen *et al.* 2017). Quando os pacientes apresentam doença avançada inoperável, a quimioterapia e/ou radioterapia são as opções de tratamento mais comuns (Hofman *et al.* 2016). A escolha da terapia tem por base a caracterização fenotípica e molecular de uma única biópsia tumoral, o que pode subestimar a heterogeneidade do tumor e menosprezar a evolução do tumor que poderá levar à resistência à terapia (de Bruin *et al.* 2014). Para a maioria dos pacientes que apresentam CPNPC em estadio inicial, a cirurgia com intenção curativa é a opção terapêutica mais comum, no entanto, a recidiva do tumor ocorre em aproximadamente 20-40% dos casos e para pacientes com tumores metastizados a taxa de sobrevida é de 1% (Lee *et al.* 2013, Schuchert *et al.* 2019).

## **I.2- Biomarcadores em Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células – *EGFR* e *ALK***

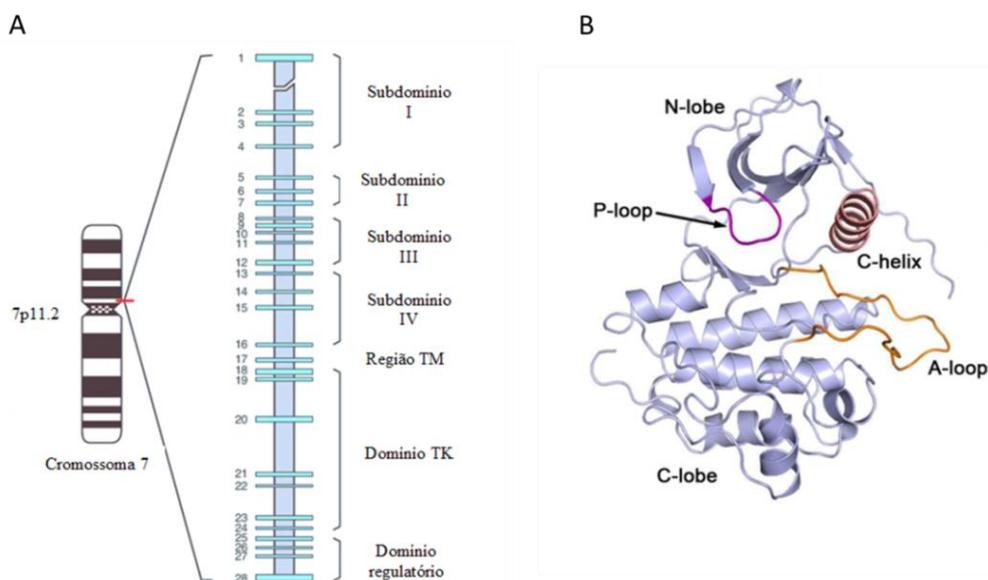
Os biomarcadores utilizados para prever a eficácia da terapia direcionada no CPNPC são alterações somáticas do genoma conhecidas como "driver mutations". Essas mutações ocorrem em células cancerosas em genes que codificam proteínas críticas para o crescimento e a sobrevivência celular. Muitas outras alterações moleculares foram identificadas no CPNPC que são menos essenciais para manter o fenótipo oncogénico e são frequentemente chamadas de "passenger mutations". As mutações "driver" geralmente não são encontradas no genoma da linha germinativa (sem cancro) do hospedeiro e geralmente são mutuamente exclusivas (ou seja, é improvável que um cancro tenha mais de uma mutação de "driver" (Sequist *et al.* 2016). Relativamente ao CPNPC, os biomarcadores atualmente mais utilizados são as alterações nos genes *EGFR* ("epidermal growth factor recetor"), *ALK* ("Anaplastic Lymphoma Kinase"), *ROS* ("ROS Proto-Oncogene 1, Recetor Tyrosine Kinase"), *PD-L1* ("protein dead ligand 1"), *K-RAS* ("Kirsten Rat Sarcoma"), *PI3K* ("phosphatidylinositol 3-kinase"), *mTOR* ("mechanistic Target Of Rapamycin"), *ERBB2* ("epidermal growth factor recetor 2"), *VEGFR* ("vascular epidermal growth factor recetor"), *c-MET* ("mesenchymal-epithelial transition factor or hepatocyte growth factor recetor"), *v-RAF* ("murine sarcoma viral") e *BRFA* ("oncogene homolog B") (Alamgeer *et al.* 2013, Garon *et al.* 2015). Estes biomarcadores estão envolvidos em vias de proliferação celular, que frequentemente estão alteradas nas células tumorais. Desta forma, a identificação destas características no genoma tumoral determinam resultados mais favoráveis se forem utilizados tratamentos direcionados (Rosell *et al.* 2012). Assim, a descoberta e identificação de mutações "driver" nos CPNPC, são utilizadas com sucesso para direcionar terapias (Alamgeer *et al.* 2013).

### **I.2.1. *EGFR* como biomarcador em Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células**

A influência do gene *EGFR* (recetor do fator de crescimento epidérmico) na patogénese de vários tipos de cancro tem sido alvo de vários estudos, sendo usado com biomarcador na caracterização de diferentes tipos de tumores (Leal *et al.* 2019). No que diz respeito ao CPNPC, o *EGFR* é sobreexpresso em 50%-60% dos tumores, estando esta característica correlacionada com um mau prognóstico. Este gene é um biomarcador preditivo de resposta ao tratamento, sendo alvo de diferentes inibidores da tirosina cinase (TKIs) (Sharma *et al.* 2007, Mok *et al.* 2015).

### I.2.1.1 EGFR - Função e Estrutura

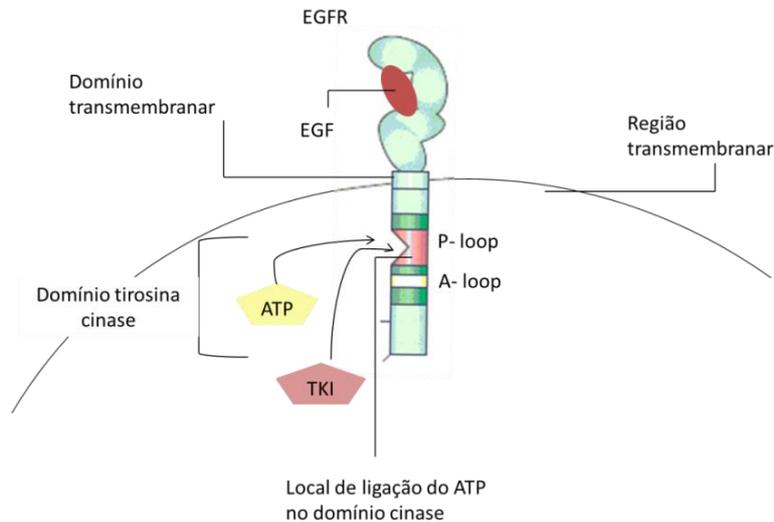
O gene *EGFR* localiza-se no braço curto do cromossoma 7 e é constituído por 28 exões. Este codifica uma glicoproteína de 170 kDa transmembranar do tipo I (Martin *et al.* 2006) e desempenha uma função fundamental na transdução do sinal celular (Bethune *et al.* 2010). Esta proteína compreende três domínios: um domínio extracelular (exões 1 a 16), um domínio intracelular (exões 18 a 28), e a região transmembranar (exão 17). O domínio extracelular possui quatro subdomínios (I-IV) e o domínio intracelular possui o domínio tirosina cinase (exões 18-24), como representado na Figura I.1A (Martin *et al.* 2006). O domínio cinase do EGFR compreende dois lóbulos: um lóbulo C-terminal (“*C-lobe*”) e um lóbulo N-terminal (“*N-lobe*”). O sítio catalítico está localizado entre esses dois “lobes” como representado na Figura I.1B. O local catalítico contém a alça de ativação (“*A-loop*”) (contida no “*C-lobe*”), a C-hélice reguladora e a “*binding loop*” de fosfato (“*P-loop*”) (Eck e Yun 2010).



**Figura I. 1-** Estrutura do gene e da proteína EGFR. A- Localização cromossômica e organização do gene *EGFR* e os correspondentes domínios da proteína que codifica. Adaptado de (Martin *et al.* 2006). B- Representação da estrutura cristalina do domínio da cinase do *EGFR*, destacando os “*lobe*” terminal *N-* e *C-*, bem como o *P-loop* de coordenação de fosfato (azul) e o “*loop*” de ativação (*A-loop*). O sítio ativo encontra-se *loop A* (vermelha) e o lóbulo *C*. A *C-hélice* de regulação encontra-se a verde. Adaptado de (Eck e Yun 2010).

O EGFR é ativado através da ligação de um ligando como EGF (fator de crescimento epidérmico) ou TGF- $\alpha$  (fator de crescimento transformador alfa). Quando ativado, o EGFR liga-se a outro EGFR ou a outro membro do fator de crescimento da família de recetores HER que formam um homodímero ou heterodímero, respetivamente. A formação do dímero ativa o domínio tirosina cinase intracelular (TK) e isso desencadeia autofosforilação de vários resíduos

de tirosina no domínio C-terminal catalítico da TK, como representado na figura I.2 (Choi *et al.* 2013).



**Figura I. 2-** Representação esquemática da proteína *EGFR* com os domínios intracelular, transmembranar, extracelular e domínio cinase. Adaptado de (Imai e Takaoka 2006).

Estes ligam o recetor para várias vias de sinalização a jusante como a via RAS/RAF/MAPK, que está relacionada com a proliferação celular, a via PI3K/AKT associada à regulação do ciclo celular ou a via JAK/STAT que está envolvida no crescimento e diferenciação celular (Martin *et al.* 2006).

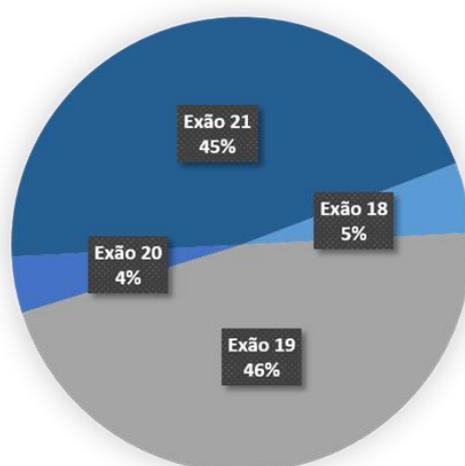
As mutações nos exões do gene *EGFR* que codificam o TK são geralmente referidas como ativadoras, pois parecem resultar numa atividade cinase aumentada do recetor (Sharma *et al.* 2006, Huang e Fu 2015). As mais recorrentes ocorrem nos exões 18 a 21 que são agrupados à volta do “binding pocket” da adenosina 5 'trifosfato (ATP) do *EGFR*. O local ativo de ligação ao ATP encontra-se na fenda entre os lóbulos N-terminal e C-terminal, dentro de seu domínio de cinase (Sharma *et al.* 2007). Essas mutações ativam preferencialmente as vias sinalizadoras PI3K/AKT e JAK/STAT nas células tumorais, que levam à proliferação celular, ao desenvolvimento da capacidade de invasão e metastização, além do estímulo à neovascularização e a uma diminuição da apoptose (Mosesson e Yarden 2004). Estas vias de sinalização intracelulares são cruciais no normal crescimento e desenvolvimento celulares (Huang e Fu 2015).

### I.2.2.1 Mutações no gene *EGFR* como biomarcadores preditivos

As mutações mais importantes do gene *EGFR* estão localizadas espacialmente no local de ligação de ATP da cinase. A maioria das mutações detetáveis no gene *EGFR* compreendem deleções “in-frame” no exões 19, substituições no exão 21, substituições no exão 18, inserções e/ou substituições no exão 20 (Sharma *et al.* 2007).

De acordo com as alterações nucleotídicas, as mutações podem ser classificadas em três classes: classe I, que incluem deleções curtas nas estruturas que resultam na perda de quatro a seis aminoácidos codificados pelo exão 19; classe II, que consistem em substituições de um único nucleótido que podem ocorrer nos exões de 18 a 21; classe III, que são duplicações e/ou inserções “in-frame” que ocorrem principalmente no exão 20 (Gazdar 2009) .

As mutações mais frequentes do *EGFR* são denominadas como mutações ativadoras clássicas ou de sensibilidade aos inibidores da tirosina cinase (TKIs) como gefitinib e erlotinib (Paez *et al.* 2004, Shigematsu *et al.* 2005). A maioria das mutações designadas clássicas são deleções no exão 19 e substituições no exão 21 representam em conjunto 85% de todas as mutações no *EGFR* e são mutações que conferem sensibilidade aos TKIs. Outras mutações do *EGFR* são denominadas mutações não-comuns, que correspondem a 15%, como as inserções ou duplicações no exão 20 e mutações pontuais no exão 18, cuja maioria das mutações estão relacionadas com a resistência à terapia com TKIs de primeira e segunda geração (Figura I.3) (Russo *et al.* 2017, Harrison *et al.* 2019).

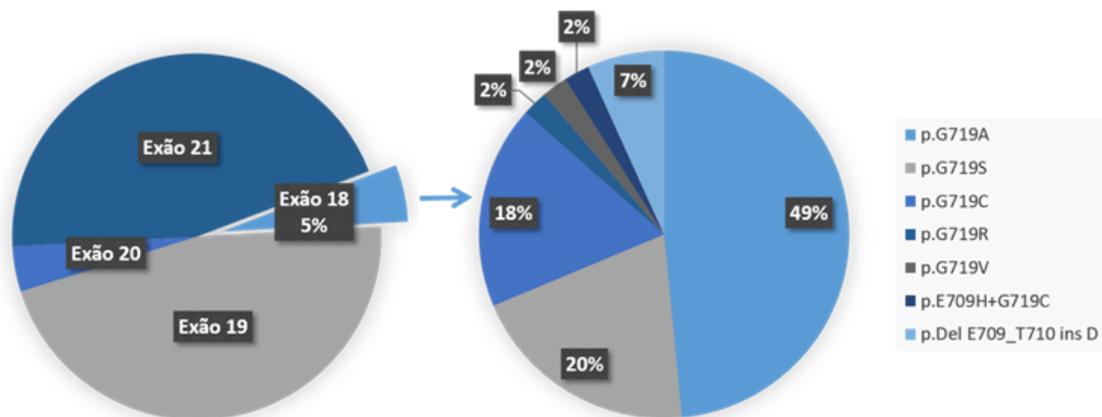


**Figura I. 3-** Frequência das mutações no *EGFR* no CPNPC. Adaptado de (Haghgoo *et al.* 2015).

## **Exão 18**

As mutações pontuais no exão 18 são relativamente pouco frequentes, representando apenas 5% das mutações do *EGFR* em CPNPC, sendo as mais comuns a E709X e G719X (Haghgoo *et al.* 2015, Harrison *et al.* 2019). A principal mutação descrita no exão 18 é a mutação pontual G719X (onde X indica a possibilidade de substituição por A, S, C e D), ou seja, nesta mutação, o resíduo de glicina na posição 719 pode ser substituído pelo resíduo de alanina (G719A), serina (G719S), cisteína (G719C) ou ácido aspártico (G719D) representado na figura I.4 (Chiu *et al.* 2015). A G719 está localizada no “P-loop” de ligação ao fosfato dentro do “N-lobe” que participa da coordenação do ATP arqueando a porção trifosfato. O “P-loop” também contribui para um conjunto de interações hidrofóbicas que mantêm a hélice  $\alpha$ -C na conformação inativa. Nesta conformação, uma glicina na posição 719 é favorecida. A substituição da glicina por serina no 719 reduz a flexibilidade do “P-loop” e enfraquece as interações hidrofóbicas que mantêm a hélice  $\alpha$ -C na conformação inativa, levando a um aumento de 10 vezes na atividade de cinase em comparação com o EFGR “wild-type”. Assim, as alterações estruturais induzidas pela mutação G719S aumentam a propensão à dimerização e subsequente ativação do *EGFR* de maneira semelhante à mutação clássica L858R (exão 21) (Harrison *et al.* 2019).

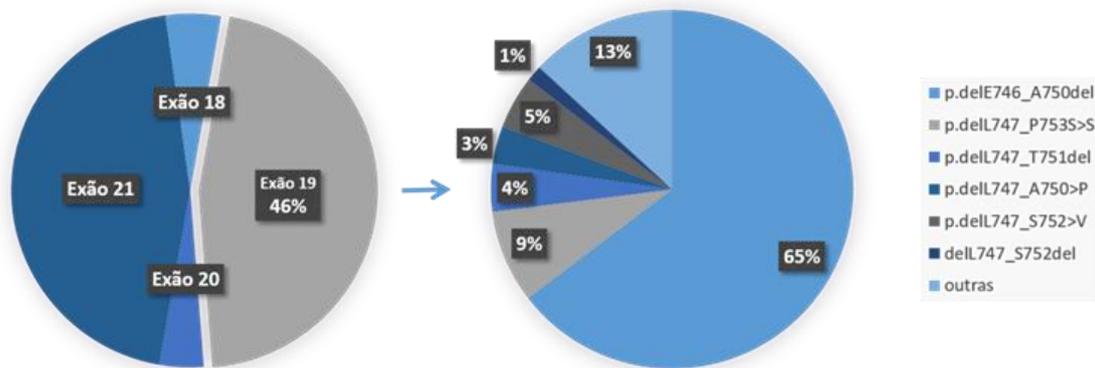
Esta mutação também pode estar presente em combinação com mutações pontuais adicionais, como S768I (exão 20) ou L819Q (exão 21). Estas mutações conferem maior sensibilidade aos TKIs de segunda geração, especialmente afatinib e neratinib, do que aos TKIs de primeira e terceira geração (Kobayashi *et al.* 2015).



**Figura I. 4-** Frequência das mutações do exão 18 do *EGFR* no CPNPC Adaptado de (Haghgoo *et al.* 2015, Kobayashi *et al.* 2015).

### Exão 19

Cerca de 46% das mutações no *EGFR* consistem em deleções “in-frame” (Del 19), dividindo-se em diferentes subtipos (Su *et al.* 2017), e em algumas inserções que compreendem apenas 1% de todas as mutações do exão 19 (Harrison *et al.* 2019). A maioria das mutações abrange os aminoácidos dos codões L747 e E749 (designado fragmento LRE) mas podem ocorrer em todos os aminoácidos do exão 19 de E746 a D761. Esta cadeia envolve um total de 16 aminoácidos e 39 subtipos de deleções. As mutações mais frequentes são: delE746-A750 seguidas por delL747-P753insS, delL747-T751 e a delL747-A750insP representado na figura I.5 (Su *et al.* 2017).



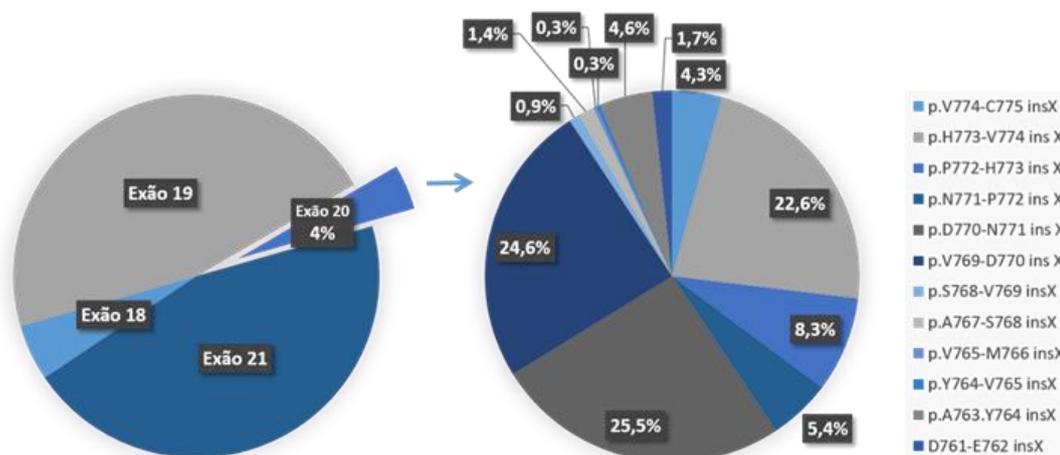
**Figura I. 5-** Frequência das mutações do exão 19 do *EGFR*, adaptado de (Haghighi *et al.* 2015, Su *et al.* 2017).

Os diferentes tipos de mutações do exão 19 estão associados a diferentes respostas terapêuticas aos TKI de primeira linha, onde se verifica uma maior eficácia para delE746 que para delL747, o que indica que os locais de deleção podem afetar a eficácia dos TKI (Su *et al.* 2017). As deleções do exão 19 “pull” e restringem a rotação da hélice C, impedindo-o de adotar a conformação externa inativa e favorecendo a conformação interna ativa, promovendo a ativação constitutiva do recetor (Yasuda *et al.* 2013). Essa mudança permite a dimerização e ativação do recetor, independente do ligante, resultando na ativação constitutiva das vias de sinalização a jusante (Landau e Ben-Tal 2008).

### Exão 20

As inserções no exão 20 (Ins20) ou a mutação T790M representam 4% das mutações do *EGFR* e estão associadas à resistência aos TKIs e ao mau prognóstico em pacientes com CPNPC (Vyse e Huang 2019). As mutações do exão 20 do *EGFR* podem ser caracterizadas

como inserções ou duplicações entre 3 e 21 pb (correspondentes a 1 a 7 aminoácidos) entre as posições de aminoácidos 762 e 774 da proteína *EGFR* (Yasuda *et al.* 2013). As mutações mais comuns do exão 20 no CPNPC do *EGFR* estão demonstradas na figura I.6 (Vyse e Huang 2019).



**Figura I. 6-** Frequência das mutações do exão 20 do *EGFR* em pacientes com CPNPC. Adaptado de (Haghgoo *et al.* 2015, Vyse e Huang 2019).

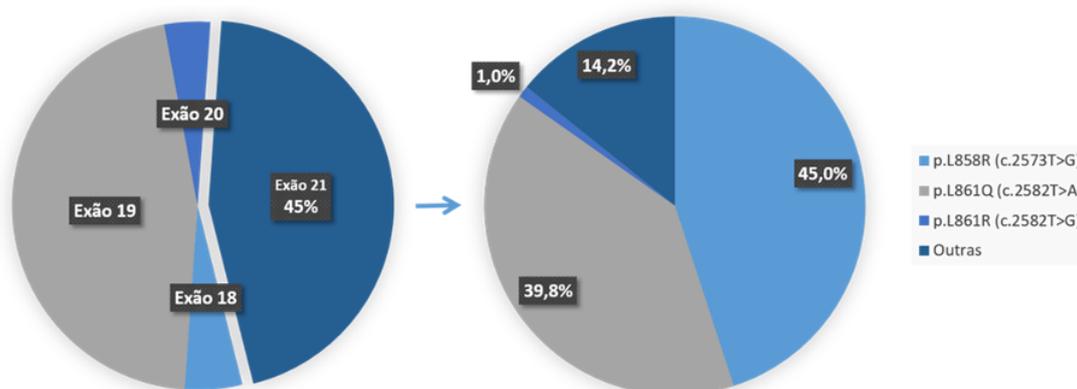
O mecanismo de ativação do *EGFR* induzido pelas inserções do exão 20 está subjacente à resistência relativa dessas mutações aos inibidores do *EGFR* clinicamente aprovados. As inserções do exão 20 são posicionadas em direção à extremidade C-terminal de um componente estrutural específico do *EGFR*, a hélice C (Harrison *et al.* 2019). Este é um elemento regulador chave que determina o “status” de ativação do *EGFR* girando de uma posição externa para uma interna, permitindo interações específicas com o local ativo que estabiliza o *EGFR* competente para a dimerização (Eck e Yun 2010, Yasuda *et al.* 2013).

Frequentemente ocorre um segundo evento mutacional no exão 20 do *EGFR*, a mutação T790M (substituição do aminoácido metionina por treonina na posição 790), que é responsável por mais de 50-70% de todos os casos de resistência adquirida aos inibidores de *EGFR* de primeira e segunda geração no CPNPC (Kosaka *et al.* 2006, Li *et al.* 2018). Inicialmente pensava-se que a mutação secundária do T790M causasse alterações estruturais que dificultavam estereotipicamente a ligação dos TKIs, mas estudos posteriores demonstraram que a mutação T790M afeta a afinidade do recetor *EGFR*. Esta mutação gera uma cadeia lateral mais robusta que reduz a ligação do gefitinib/erlotinib e aumenta a afinidade “binding pocket” da tirosina cinase ao ATP (Yun *et al.* 2008, Kobayashi *et al.* 2015). Com o aumento da afinidade com ATP, a mutação T790M diminui a eficácia dos inibidores reversíveis competitivos do

ATP, gefitinib e erlotinib, e remove a seletividade desses fármacos (Yun *et al.* 2008). Em 20-40% dos casos há o desenvolvimento de uma mutação terciária, a C797S (mudança da cisteína nucleofílica para a serina na posição 797), que é responsável pela resistência aos inibidores de *EGFR* direcionados a T790M e o principal mecanismo de resistência a toda a geração de TKIs de terceira geração (Kohsaka *et al.* 2019). Essa mutação impede a formação de ligação covalente entre os inibidores e o resíduo de cisteína na posição 797 no “binding pocket” do ATP (Ayati *et al.* 2020).

### **Exão 21**

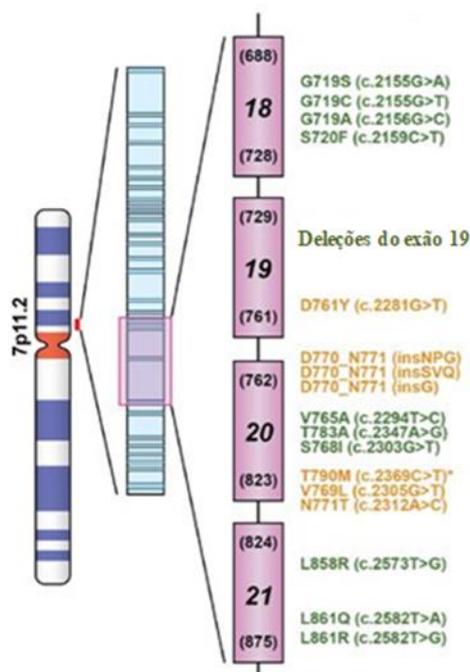
A mutação pontual no exão 21 L858R (substituição de uma leucina por uma arginina no codão 858) corresponde a 45% das mutações (do exão 21), sendo a segunda mais comum do *EGFR* (figura I.7) (Dogan *et al.* 2012). A segunda mutação mais frequente no exão 21 é a L861Q (substituição de uma leucina na posição 861 por uma glutamina) está localizada dentro do “loop” de ativação (A-loop) do *EGFR* e representa cerca de 3% das mutações do *EGFR* no CPNPC. Essas mutações provocam alterações estruturais no sítio de ligação à ATP do domínio intracelular do *EGFR*.



**Figura I. 7-** Frequência das mutações do exão 21 do *EGFR*. Adaptado de (Haghgoo *et al.* 2015, Kobayashi e Mitsudomi 2016).

Estas mutações no *EGFR* são muito importantes uma vez que conferem sensibilidade ou resistência ao tratamento com inibidores da tirosina cinase (TKIs) específicos para esta proteína (Figura I.8). Entre todas as mutações no *EGFR*, existem 3 tipos que estão fortemente correlacionados com a sensibilidade aos TKI. Essas são mutações pontuais nos exões 18 (G719S, G719A, G719C, S720F) e 21 (L858R e L861Q) e as deleções “in-frame” no exão 19

(Chou *et al.* 2005, da Cunha Santos *et al.* 2011). No que diz respeito à resistência aos TKIs, a exposição prolongada a esses agentes resulta na aquisição da mutação T790M (em cerca de 50% dos pacientes) (Akula *et al.* 2018), sendo este um fator determinante para o insucesso da terapia. Além disso, outras mutações associadas à resistência podem surgir com o uso de novos medicamentos (Yasuda *et al.* 2013).



**Figura I. 8-** Mutações mais comuns do domínio de cinase do *EGFR* e a sua influência na resposta aos inibidores de *EGFR* das mutações. A verde estão representadas mutações que conferem sensibilidade aos TKIs e a amarelo as que estão associadas à resistência. Adaptado de (Cheng *et al.* 2012).

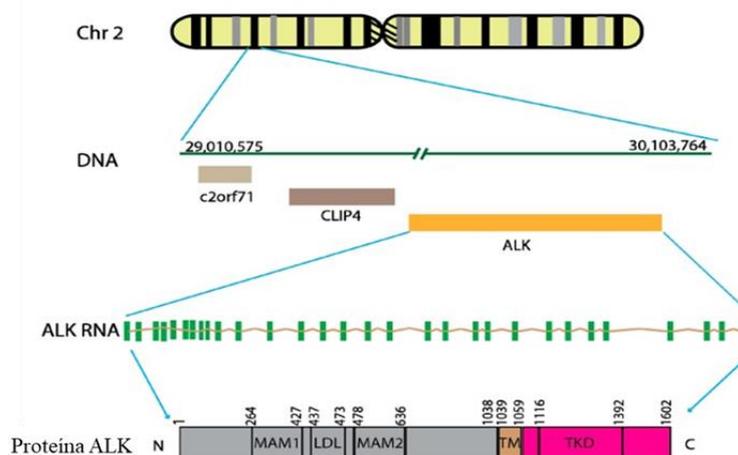
## I.2.2 *ALK* como biomarcador em Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células

### I.2.2.1 *ALK* - Função e estrutura

O gene Linfoma Cinase Anaplásico (*ALK*) é constituído por 29 exões que se localizam no braço curto do cromossoma 2 (2p23) e codifica uma proteína tirosina cinase transmembranar, também conhecida como recetor de tirosina cinase *ALK* ou CD246 (“cluster of differentiation 246”). A proteína *ALK* é composta por 1620 aminoácidos com um peso molecular de 220 kDa (Hallberg e Palmer, 2013).

O recetor tirosina cinase *ALK* pertence à superfamília dos recetores de insulina, sendo normalmente expresso apenas no sistema nervoso central e também em tecido pulmonar tumoral. Esta proteína compreende um domínio extracelular, múltiplas regiões de proteína-

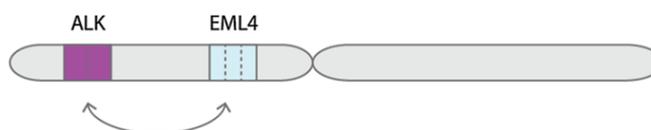
tirosina fosfatase de recetor (MAM) e um domínio de recetor de lipoproteína de baixa densidade de classe A (LDL<sub>A</sub>), um intervalo hidrofóbico correspondente a uma região transmembranar (TM) de passagem única e um domínio tirosina cinase (TKD) intracelular (Figura I.9) (Wu et al., 2017).



**Figura I. 9-** Localização genómica e expressão do *ALK*. Adaptado de (Wu *et al.* 2017).

A sinalização do *ALK* nas células cancerosas ocorre através de três mecanismos principais: fusão de genes (sendo a principal com o gene *EML4*), amplificação do gene do *ALK* e ativação de mutações pontuais (Bayliss *et al.* 2016).

A fusão *EML4-ALK* foi a primeira fusão oncogénica a ser detetada no cancro do pulmão. Soda et al. (2007) identificaram uma pequena inversão no braço curto do cromossoma 2, que promove a fusão da porção N-terminal da *EML4* com o *ALK* onde se encontram ambos os genes em direções opostas, e que ficarão fundidos após ocorrer a inversão que envolve os dois loci - *inv(2)(p21p23)* (Figura I.10) (Soda *et al.* 2007).



**Figura I. 10-** Formação do gene de fusão *EML4-ALK* que ocorre por uma inversão paracêntrica no braço curto do cromossoma 2. Adaptado de (Bayliss *et al.* 2016).

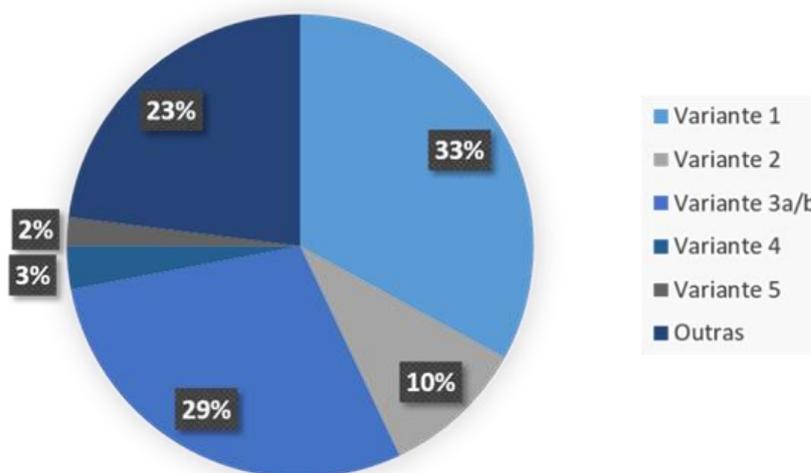
O gene *EML4* (“echinoderm microtubule-associated protein-like 4”) é codificador de uma proteína estabilizadora de microtúbulos. Esta proteína interage funcionalmente com os

microtúbulos e a tubulina solúvel, sendo essencial na formação e manutenção dos microtúbulos (Bayliss *et al.* 2016).

Apesar dos rearranjos do gene *ALK* representarem apenas cerca de 3-7% de casos em CPNPC, este gene é provavelmente, em termos de rearranjos cromossômicos, o mais importante subconjunto de alterações genéticas que conduzem a oncogênese nesta doença (Wu *et al.* 2017). Os rearranjos cromossômicos são as alterações mais comuns neste gene, tendo já sido descritos mais de 30 parceiros de fusão do *ALK* (como o *EML4*) (Childress *et al.* 2018).

### I.2.2.2 Fusões e mutações no gene *ALK* como biomarcadores preditivos

O “breakpoint” do gene *ALK* ocorre no exão 20, enquanto o do *EML4* difere no exão onde surge (2, 6,13, 14, 15, 18 e 20) originando assim, variantes da proteína de fusão. Estão descritas mais de 15 variantes de fusão *EML4-ALK*, sendo as mais comuns a Variante 1 (33%), Variante 2 (10%) e Variante 3a/b (29%) (Soda *et al.* 2007, Lin *et al.* 2018) (Figura I.11).

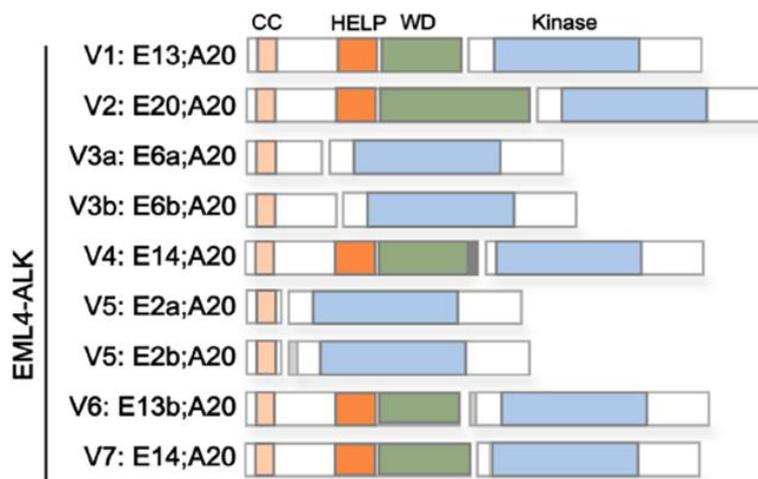


**Figura I. 11-** Frequência das variantes *ALK*. Adaptado de (Sabir *et al.* 2017).

Assim, mais detalhadamente (Figura I.12):

- a variante 1 (E13; A20) contém os exões de 1 a 13 de *EML4* juntos ao exão 20 do *ALK*;
- a variante 2 (E20; A20) contém os exões de 1 a 20 de *EML4* juntos ao exão 20 do *ALK*;
- as variantes 3a / b (E6a / b; A20) abrangem os exões 1 a 6 de *EML4*, com o exão 6b sendo 188pb a jusante do exão 6a, juntos com o exão 20 do *ALK*;

- a variante 4 (E14; A20) contém os exões 1 a 14 de *EML4*, com a inserção de quatro aminoácidos de origem desconhecida e fusão com o exão 20 de *ALK*;
- a variante 5 (E2a / b; A20) apresentam uma fusão do exão 2 de *EML4* com o exão 20 do *ALK* (E2a; A20) ou 117bp a montante do exão 20 do *ALK* (E2b; A20);
- a variante 6 (E13b; A20) contém os exões 1 a 13 de *EML4* fundidos ao exão 20 de *ALK* com uma inserção de 19 aminoácidos;
- a variante 7 (E14; A20) representa uma fusão genética de *EML4* no exão 14 com *ALK* no exão 20 (Wu *et al.* 2017).



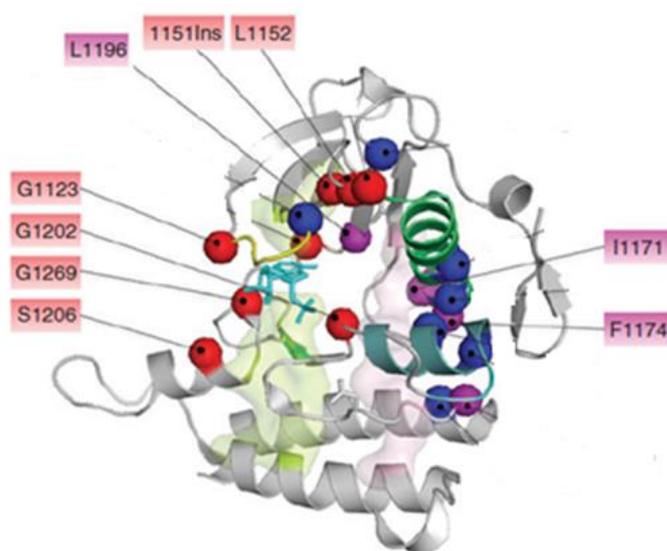
**Figura I. 12-** Representação esquemática da composição estrutural das proteínas de fusão *EML4-ALK*. Os domínios da proteína estão indicados por cores e incluem: bobina em espiral –CC- (laranja claro), HELP (laranja escuro), WD – repetições- (verde escuro), domínio da cinase ALK (azul) que é conservado em todas as diferentes variantes de proteínas de fusão. Adaptado de (Wu *et al.* 2017).

Os rearranjos que envolvem o *EML4-ALK* têm um claro potencial oncogénico e sua atividade anómala da tirosina cinase promove a dimerização/oligomerização das proteínas que se originam e conduz a uma ativação constitutiva do domínio cinase do *ALK* conduzindo à proliferação celular e sobrevida, além de alterações no rearranjo do citoesqueleto e estrutura da célula. A transformação oncogénica do *ALK* é mediada por interação com moléculas “downstream” que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular (Tuononen *et al.* 2013). A expressão das diferentes variantes *EML4-ALK* podem influenciar a resposta aos inibidores de *ALK* afetando assim, a propensão para o desenvolvimento de mutações secundárias no *ALK* específicas de resistência ao tratamento (Yoshida *et al.* 2016).

As mutações pontuais correspondem a quase um terço dos mecanismos de resistência, e incluem a mutação L1196M, que é a mutação análoga à T790M do *EGFR*, sendo a que mais

comumente identificada. Outras mutações identificadas incluem: 1151Tins, L1152R, C1156Y, I1171T, F1174L, V1180L, G1202R, D1203N, S1206Y e G1269A (Figura I.13) (Cameron e Solomon 2015). Estas mutações aumentam a afinidade do recetor de tirosina cinase para o ATP, diminuindo, portanto, a afinidade da ligação dos TKI's (Sullivan e Planchard 2016).

Mutações como a 1151Tins e G1202R conferem resistência a todos os TKIs de segunda geração (Bayliss *et al.* 2016); L1196M, L1152R conferem resistência ao lorlatinib, e sensibilidade ao crizotinib; F1174L, G1269A, I1171T/N/S estão relacionadas com resistência ao ceritinib; G1202R confere resistência ao crizotinib, alectinib e ceritinib (Bayliss *et al.* 2016).



**Figura I. 13-** Mutações do domínio cinase do *ALK*. Adaptado de (Hallberg e Palmer 2016).

### **I.2.3 Inibidores de Tirosina Cinase**

O tratamento de pacientes com cancro de pulmão depende do tipo de classificação histológica, estadió do tumor, características moleculares e avaliação da condição médica geral do paciente. Atualmente, as linhas de tratamento do cancro do pulmão incluem quimioterapia, radioterapia e cirurgia. O tratamento de primeira linha é a cirurgia, no entanto, este processo só é adequado na fase inicial da doença. O tratamento do CPNPC para estadios I e II devem ser indicados para cirurgia que pode ser complementada com quimioterapia adjuvante (é limitado à quimioterapia à base de cisplatina em ajuste completamente ressecado pacientes em estadió II – III) ou neoadjuvante (quimioterapia pré-operatória, representando uma melhoria absoluta de sobrevivência de 5% em 5 anos). Em estadios III, o tratamento depende da classificação do tumor, sendo normalmente administrados 4 ciclos de quimioterapia adjuvante à base de platina

(pacientes com CPNPC ressecável ou parcialmente ressecável) e quimio e radioterapia concomitante com combinações baseadas em cisplatina (pacientes com CPNPC irressecável) (Majem *et al.* 2019). A quimioterapia é sempre parte integral do tratamento em tumores no estadio III, independentemente de terem sido submetidos a cirurgia e/ou radioterapia prévias (Vansteenkiste *et al.* 2013). No estadio IV, o tratamento está diretamente dependente do paciente ter ou não mutações “driver”. Se o paciente não apresentar mutações “driver”, a quimioterapia deve ser considerada optando pela combinação de fármacos com menor perfil de efeitos adversos, mas que inclui normalmente compostos derivados da platina em combinação com outro agente. Caso o paciente apresente mutações “driver”, este é conduzido para tratamentos direcionados com TKIs (Majem *et al.* 2019).

### I.2.3.1 Inibidores Tirosina Cinase do *EGFR*

Com o avanço das técnicas de diagnóstico molecular, foi possível desenvolver terapias-alvo (TKIs) mais efetivas e menos tóxicas do que a quimioterapia para pacientes com mutações ativadoras do *EGFR* (Gridelli *et al.* 2014).

As duas principais classes de inibidores dos TKIs do *EGFR* são moléculas pequenas e anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais atuam como competidores, são capazes de inibir a atividade do *EGFR*, bloqueando competitivamente a ligação do ATP ao local catalítico no domínio de tirosina cinase do *EGFR*, inibindo subsequentemente a sua autofosforilação. As moléculas pequenas funcionam competindo reversivelmente com ATP pela ligação ao domínio intracelular da tirosina-cinase do *EGFR* e, assim, inibe a autofosforilação do *EGFR* e a sinalização a jusante (Sharma *et al.* 2007, Boolell *et al.* 2015).

Até o momento, existem pequenos inibidores de 1ª geração, 2ª geração, 3ª geração e 4ª geração do *EGFR* que são utilizados no tratamento do CPNPC (Tabela I.1) (Ayati *et al.* 2020).

**Tabela I. 1-** Descrição dos inibidores de TKIs de 1ª à 4ª geração, adaptado de (Ayati *et al.* 2020).

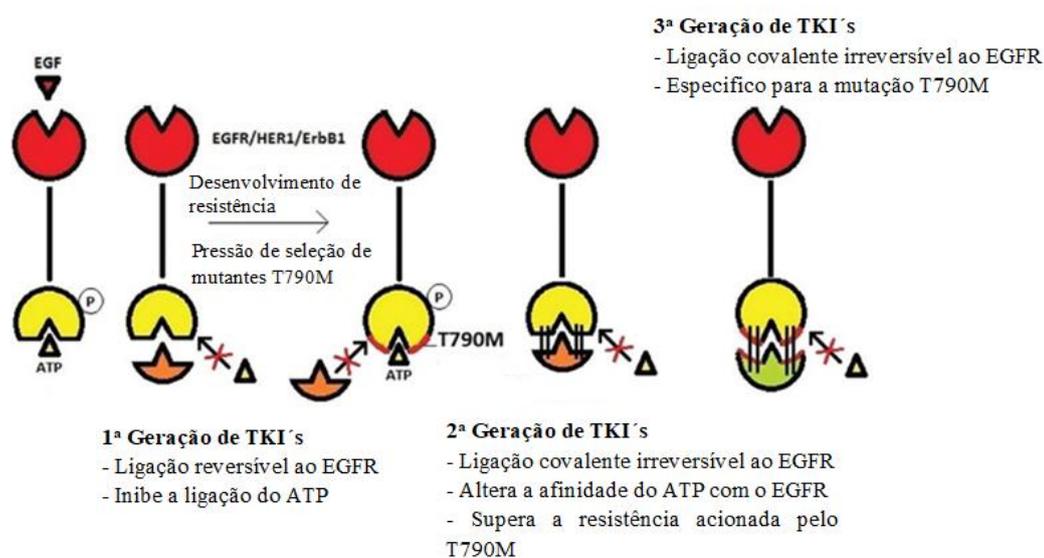
TKI 1ª geração	TKI 2ª geração	TKI 3ª geração	TKI 4ª geração
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gefitinib</li> <li>• Erlotinib</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afatinib</li> <li>• Dacomitinib</li> <li>• Neratinib*</li> <li>• Canertinib*</li> <li>• Pelitinib*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Osimertinib</li> <li>• Olmutinib*</li> <li>• Rociletinib*</li> <li>• Naquotinib*</li> <li>• Avitinib*</li> <li>• Nazartinib*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EAI001*</li> <li>• EAI045*</li> </ul>

\* TKIs não aprovados pela FDA (“Food and Drug Administration”).

Os TKIs de 1ª geração disponíveis são o gefitinib e erlotinib. Por este mecanismo, reduzem a autofosforilação e a ativação do recetor levando à regressão tumoral através da indução da apoptose, da inibição da proliferação celular e da angiogénese, inibindo assim sua atividade (Sharma *et al.* 2007).

As resistências adquiridas após o tratamento com os inibidores de 1ª geração levaram ao desenvolvimento de inibidores de 2ª geração. Os TKIs de segunda geração são: afatinib, dacomitinib, anertinib, pelitinib e neratinib, que são inibidores irreversíveis da família das tirosinas cinases *HER* (*HER 2* e *HER 4*), que inibe seletivamente o *EGFR* assim como os recetores de *EGFR* portadores da mutação T790M (Aran e Omerovic 2019).

Os TKIs de terceira geração inibem irreversivelmente o *EGFR* mutado, com particular especificidade para a mutação T790M (figura I.14). Os dois compostos mais estudados são o Rociletinib (CO-1686; Clovis Oncology) e o Osimertinib (AZD9291, mereletinib, AstraZeneca) (Boolell *et al.* 2015). A Rociletinib é uma pequena molécula, disponível por via oral, inibidora das formas mutadas mais comuns do *EGFR*, incluindo as deleções do exão 19, L858R e T790M mas, não as inserções do exão 20 (Sequist *et al.* 2015). O Osimertinib é um potente inibidor irreversível das mutações do *EGFR*, incluindo a mutação T790M. Dados pré-clínicos sugerem que o Osimertinib é 200 vezes mais eficaz contra as mutações L858R e T790M do que contra o *EGFR* “wild-type” (Tan *et al.* 2015).



**Figura I. 14-** Mecanismo de ação de diferentes gerações de inibidores de tirosina cinase do *EGFR* e resistência aos TKIs conduzida pela mutação T790M. Adaptado de (Chen 2012).

Apesar da alta eficácia dos TKIs do *EGFR* de terceira geração, a progressão das mutações epigenéticas e resistências que adquirem, restringem o uso desses inibidores. A mutação terciária C797S representa a principal mutação que compromete a eficácia dos TKIs de 3ª geração. Por esse motivo, uma 4ª geração de inibidores tirosina cinase de *EGFR* foram introduzidos na avaliação clínica para combater a mutação terciária do *EGFR* (C797S) (Song *et al.* 2016, Ayati *et al.* 2020).

EAI001 é um novo inibidor alostérico da atividade do *EGFR* derivado de “Thiazole amide”, que se liga ao local de ligação do ATP, tornando a hélice C numa conformação inativa. O EAI045 é combinado com cetuximab, um anticorpo monoclonal que bloqueia a dimerização *EGFR*. Esta terapia de combinação provocou respostas anti-proliferativos em estudos “in vitro” e “in vivo”. O EAI045 é o primeiro inibidor descrito como eficiente no tratamento de CPNPC com as mutações T790M e C797S (Wang *et al.* 2017, Ayati *et al.* 2020).

Existem outros TKIs de quarta geração em desenvolvimento, capazes de inibir irreversivelmente as mutações T790M e C797S. As estruturas destes TKIs são inspiradas na estrutura do EAI045 e podem ser derivados à base: “Quinazoline-4-one”, “Aryl-4-aminoquinazoline”, “Tri-substituted imidazole”, “Amino pyrazolopyrimidine”, “Pyrimido-pyrimidinone”, “Pyrido[3,4-d]pyrimidine” (Ayati *et al.* 2020).

### **I.2.3.2 Inibidores Tirosina Cinase do *ALK***

Os TKIs do *ALK* apresentam respostas excelentes em termos de remissão da doença no início do tratamento, mas a resistência acaba por ocorrer num período que varia entre os 7-11 meses, de forma semelhante ao que ocorre com os TKIs do *EGFR* (Sullivan e Planchard 2016). Além do problema associado as resistências do TKIs, o desenvolvimento de metástases durante o tratamento que surgem em 20-30% dos doentes *ALK* positivos (Cameron e Solomon 2015). Esta situação pode advir de uma falha na produção do medicamento, promovendo a fraca penetração do crizotinib no sistema nervoso central (SNC). De forma a ultrapassar este problema, tem sido desenvolvidos TKIs de segunda geração (ceritinib, alectinib, brigatinib) e de terceira geração (lorlatinib) para pacientes com CPNPC *ALK*-positivo com maior potência e maior penetração no SNC do que o crizotinib (Lin *et al.* 2018).

O crizotinib é um TKIs de primeira geração e antagoniza a atividade da tirosina cinase do *ALK* competindo com ATP. Foi o primeiro inibidor de *ALK* a ser aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com CPNPC com *ALK* positivo em estado avançado. Embora o crizotinib tenha um distinto efeito terapêutico inicial, a resistência adquirida a esse

medicamento sistematicamente desenvolve-se no primeiro ano de tratamento (Zou *et al.* 2007, Malik *et al.* 2014, El-Osta e Shackelford 2015).

O ceritinib e alectinib são dois TKIs de segunda geração com perfis de segurança aceitáveis que provaram serem eficazes contra muitas das principais formas de CPNPC *ALK*-positivo resistente ao crizotinib, incluindo tumores que abrigam a mutação “gatekeeper” - L1196M. O ceritinib atua competindo com o ATP, sendo vinte vezes mais potente que o crizotinib (Friboulet *et al.* 2014, Golding *et al.* 2018). O ceritinib demonstrou inibir eficazmente algumas das mutações adquiridas, especialmente a L1196M, G1269A, I1171T e S1206Y mas não demonstrou efeito em pacientes com as mutações G1202R e F1174C (Sullivan e Planchard 2016).

O alectinib possui vantagens quando comparado com o crizotinib e o ceritinib, em parte devido ao fato de conseguir ultrapassar e atravessar a barreira hematoencefálica. Esta vantagem torna-se importante pelo facto da capacidade de metastização cerebral ser elevada (Gadgeel *et al.* 2014).

O brigatinib foi desenvolvido para ser um inibidor potente e seletivo do *ALK*, capaz de ultrapassar os mecanismos de resistência associados ao crizotinib, demonstrando ter uma maior inibição e uma melhor seletividade “in vitro” para quase todas as variantes de *ALK* (Cameron e Solomon 2015).

Lorlatinib é um TKIs macrocíclico de *ALK* e *ROSI* de terceira geração, oral, reversível, competitivo com ATP (Johnson *et al.* 2014). Comparado com os inibidores de segunda geração, o lorlatinib foi projetado especificamente para penetrar no SNC e ultrapassar mutações de resistência secundária conhecidas no domínio *ALK* da tirosina cinase (Shaw *et al.* 2019).

Tem vindo a ser utilizados para tratamento de pacientes com CPNPC com fusão do *ALK* inibidores da HSP90 (“Heat Shock Protein 90”). Esta proteína é um “chaperone” que confere estabilidade às proteínas que resultam da fusão com o *ALK*. Como acontece com alguns dos TKIs do *ALK*, nem todos os pacientes respondem positivamente aos inibidores de HSP90, sendo importante identificar o subconjunto de pacientes *EML4-ALK* que pode se beneficiar desta terapia (Tabela I.2). Existem variantes que conferem maior sensibilidade do que outras, como a variante 1. Por outro lado, as variantes mais estáveis como a 3a / b, que não possuem o domínio TAPE conferem resistência (Sequist *et al.* 2010, Sabir *et al.* 2017).

**Tabela I. 2-** TKIs do *ALK*. Adaptado (Golding *et al.* 2018).

TKIs de 1ª geração	TKIs de 2ª geração	TKIs de 3ª geração	Inibidores Hsp90
• Crizotinib	• Ceritinib • Alectinib • Brigatinib	• Lorlatinib*	• Ganetespib*

\*Não aprovados pela FDA.

#### **I.2.4 Métodos de detecção de alterações em genes preditivos de terapia - *EGFR* e *ALK***

Diferentes métodos podem ser usados para detetar alterações em genes como o *EGFR* e o *ALK* que permitem a triagem de pacientes com CPNPC para terapia direcionada com TKIs, apresentando cada um deles vantagens e desvantagens. O método de imunohistoquímica (*IHC*) é uma ferramenta potencialmente útil, tanto para detecção de alterações no gene *EGFR* como *ALK*, para guiar os médicos no tratamento personalizado de pacientes com CPNPC. No entanto, só pode ser realizado em secções de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) (Gaur *et al.* 2018), sendo utilizados anticorpos específicos para as mutações no *EGFR* ou fusões do *ALK*, o que torna esta técnica altamente sensível e específica (Gaur *et al.* 2018, Lin *et al.* 2019). A técnica de hibridação “in situ” fluorescente (FISH) é o frequentemente utilizado para a detecção de fusões no gene *ALK* em CPNPC. No entanto, esta técnica também só pode ser usada em amostras de tecido FFPE. Especificamente no caso de fusões do *ALK*, esta técnica torna-se útil pela utilização de sondas do gene *EML4* e *ALK* de cores diferentes, que quando sobrepostas originam uma outra cor, indicando a presença de uma fusão (Lin *et al.* 2019). Diferentes técnicas baseadas em PCR (“Polimerase Chain Reaction”) são muito utilizadas tanto para detecção de mutações no *EGFR* como fusões ou mutações do *ALK*. Estas apresentam a vantagem da sua sensibilidade e versatilidade em diferentes aspetos, sendo um deles a amostra de origem. A amplificação por PCR seguida pela sequenciação de última geração (NGS) permite sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA em paralelo, permitindo a detecção de uma pequena fração de uma sequência mutada (Ohira *et al.* 2016). O RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real) tem sido uma estratégia de triagem comumente usada para detetar rearranjos de genes *ALK* em doentes com CPNPC. Vários ensaios multiplex foram desenvolvidos para identificar simultaneamente todas as fusões possíveis dentro do quadro entre *EML4* e *ALK*, nas quais o domínio cinase de *ALK* seria preservado (Wu *et al.* 2013,

Lin *et al.* 2019), sendo recomendada como teste de diagnóstico para o tratamento com inibidores da *ALK* (Wu *et al.* 2013).

Desta forma, tem vindo a ser desenvolvidos diferentes ensaios (alguns vendidos comercialmente e aprovados para uso clínico) para a deteção de alterações nos genes *EGFR* (Tabela I.3) e *ALK* em CPNPC. Esses testes podem ser de “screening” ou específicos de alelos, permitindo alguns deles a identificação de mutações presentes não só em tecido tumoral, mas também em DNA tumoral circulante (presente em biopsias líquidas). Aqui destacam-se as técnicas: multiplex PCR seguida de NGS e HRM (“High Resolution Melting”). O HRM é um processo de amplificação em tempo real, onde há uma exposição a aumento de temperatura gradual após a amplificação dos fragmentos, sendo possível detetar a presença de mutações pela diferença de temperatura na qual a cadeia dupla de DNA se separa. A análise por HRM é uma técnica barata e relativamente rápida para triagem de mutações nos exões 18 a 21 do *EGFR* com uma sensibilidade de aproximadamente 10% (Kim *et al.* 2018).

**Tabela I. 3-** Exemplos tecnologias efetuadas para a deteção de mutações no *EGFR* (Kim *et al.* 2018).

Ensaio	Amostra tumor	cfDNA
“Screening”	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sequenciação por Sanger;</li> <li>▪ Análise por HRM;</li> <li>▪ Pirosequenciação;</li> <li>▪ NGS.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Análise por HRM;</li> <li>▪ NGS;</li> <li>▪ Teste cobas de mutação <i>EGFR</i>, v2;</li> <li>▪ Kit Therascreen <i>EGFR</i> RGQ PCR.</li> </ul>
Alelo-específico	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Teste cobas de mutação <i>EGFR</i>, v2;</li> <li>▪ Kit Therascreen <i>EGFR</i> RGQ PCR;</li> <li>▪ MassARRAY (MS) com painel LungCarta SNaShot.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ dHPLC;</li> <li>▪ Genotipagem por espectrometria de massa;</li> <li>▪ BEAMing;</li> <li>▪ PNA-PCR;</li> <li>▪ ddPCR;</li> <li>▪ EFIRM.</li> </ul>

BEAMing beads, emulsion, amplification and magnetic; ddPCR digital droplet polymerase chain reaction; dHPLC denaturing high-performance liquid chromatography; EFIRM electric field-induced release and measurement; PNA-PCR peptide nucleic acid polymerase chain reaction.

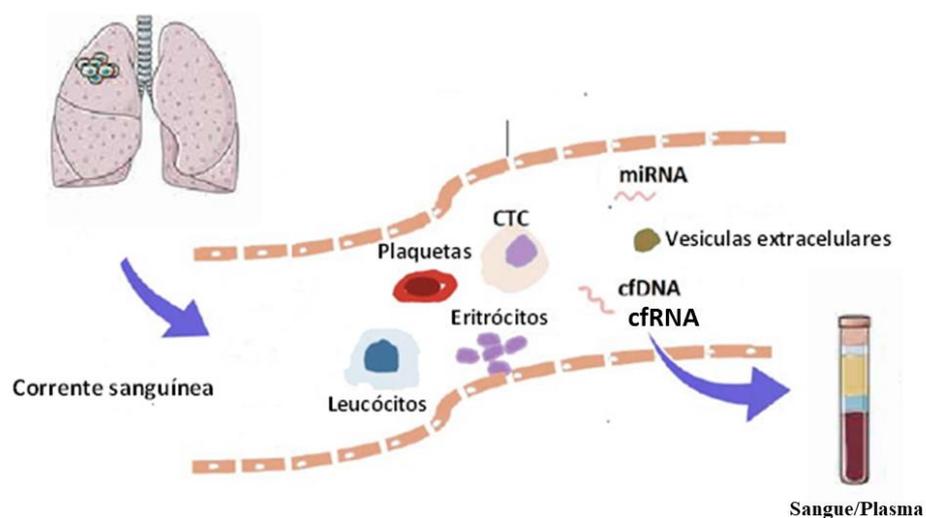
### I.3 Biópsias Líquidas

As biópsias líquidas baseiam-se na utilização de fluídos corporais (sangue, urina, saliva) do paciente para análise de alterações específicas de um tumor (Mattox *et al.* 2019). Nestas amostras é possível proceder à extração e ao estudo de anomalias no DNA circulante (cfDNA), RNA circulante (cfRNA), nas células tumorais circulantes (CTCs), em miRNAs circulantes e vesículas extracelulares (VEs) (figura I.15) (Santarpia *et al.* 2018). (Alix-Panabières e Pantel 2016). As biópsias líquidas têm como premissas o facto da maioria das células exportarem o

seu DNA para a corrente sanguínea e da libertação do conteúdo das células tumorais à medida que morrem, sendo parte de seu DNA encaminhado para o fluxo sanguíneo. A análise de cfDNA permite a deteção de mutações como mutações pontuais, pequenas inserções e deleções, alterações no número de cópias, translocações e alterações epigenéticas frequentemente detetadas em cancro (Mattox *et al.* 2019).

Do ponto de vista biológico, o cfDNA é considerado um DNA fragmentado de cerca de 170bp – 200bp (Alcaide *et al.* 2020), podendo ter origem em células tumorais primárias lisadas, apoptóticas ou necróticas, células metastáticas, células estromais normais e células sanguíneas nucleadas (Jahr *et al.* 2001).

A quantidade absoluta de cfDNA no plasma varia muito entre os pacientes - 0,01% e 90% (Grunt *et al.* 2017). Isto pode dever-se a vários fatores como o peso corporal (em particular obesidade), prática de exercício físico, que é conhecido por resultar em níveis mais elevados de cfDNA, o estado de desenvolvimento/volume do tumor, a utilização de tratamentos como a quimioterapia (os compostos citotóxicos que eliminam preferencialmente células tumorais levam à apoptose) (Vora *et al.* 2012, Nishimoto *et al.* 2016). Essas variações são ainda mais acentuadas entre pacientes com cancro, alguns dos quais são conhecidos por exibir aumentos de 20 vezes na quantidade de cfDNA (presumivelmente devido a grande quantidade de cfDNA de origem tumoral) (Kustanovich *et al.* 2019).



**Figura I. 15-** Componentes derivados dos tumores que podem ser utilizados através das biópsias líquidas para testes genéticos. Adaptado de (Santarpia *et al.* 2018, Banini e Sanyal 2019).

A análise destes componentes é muito promissora para pacientes com cancro em estadios iniciais e avançados. Até ao momento, existem 4 aplicações clínicas para as quais as biópsias

líquidas estão a ser avaliadas: 1) Diagnóstico inicial- a análise de alguns dos biomarcadores em biópsias líquidas permite identificar as diferentes mutações que existem num momento inicial e a identificação dessas mutações primárias permite a indicação de terapias adjuvantes como quimioterapia ou radioterapia, para impedir a recorrência do cancro; 2) Monitorização da resposta do doente à terapêutica médica e/ou cirúrgica- a análise de biomarcadores preditivo de resposta terapêutica em biópsias líquidas permite a definição de grupos de suscetibilidade terapêutica. Além disso, devido ao curto tempo médio de vida do cfDNA espera-se que um ou dois dias após a cirurgia, todos os traços de mutações desapareçam do cfDNA. A sua presença é indicativa de uma ressecção cirúrgica incompleta ou à presença de metástases não detetadas, permitindo desta forma monitorizar o sucesso da terapia/cirurgia; 3) Monitorização das terapias adicionais- a utilização das biópsias líquidas permite a deteção precoce de recidivas (antes de se tornarem radiograficamente ou clinicamente visíveis), permitindo a alteração antecipada dos regimes de tratamento. Se houver uma recidiva do paciente, as biópsias líquidas podem ainda revelar novas mutações (não presentes no tumor primário) que podem orientar as escolhas para a terapia de segunda linha; 4) Rastreio para o cancro: o uso das biópsias líquidas antes que o tumor seja clinicamente detetado é de extrema importância, pois tem potencial para reduzir a morbidade e mortalidade por cancro. No entanto, existem vários problemas associados à utilização das biópsias líquidas para uma deteção muito precoce do cancro: os testes de triagem atuais são baseados num valor preditivo positivo relativamente baixo (alta taxa de falsos positivos para verdadeiros positivos); e o sobrediagnóstico, permitindo a deteção de cancros indolentes e que nunca causariam mortalidade (Tie *et al.* 2016, Mattox *et al.* 2019).

Posto isto, a realização de rastreio, diagnóstico e monitorização com recurso a biópsias líquidas revela-se indubitavelmente vantajosa na prática futura da oncologia. Existem várias vantagens postuladas das biópsias líquidas em comparação às biópsias tradicionais que indicam, que poderá constituir uma alternativa às biópsias tradicionais (tabela I.4) (Malapelle *et al.* 2016).

**Tabela I. 4-** Resumo das características/vantagens das biopsias líquidas em comparação com as características das biopsias sólidas (tumores embebidos em parafina e fixados em formalina- FFPE). Adaptado de (Malapelle *et al.* 2016, Mamdani *et al.* 2017).

Biopsias Líquidas	Biopsias Sólidas
Processo não invasivo; Baixo custo; Permite a avaliação da biologia do tumor em diferentes momentos no decorrer do tratamento; Útil para prever prognóstico; É capaz de examinar a evolução longitudinal do tumor e refletem melhor a heterogeneidade tumoral; Monitorização da resposta à terapêutica; Elevada especificidade;	Processo invasivo; A colheita do material tecidual pode ser inviável, inapropriada ou difícil de obter; Dificuldade de seguir a evolução do tumor; Limitado o acesso à heterogeneidade tumoral intra e intertumoral; A preservação do material colhido (fixação com formalina) pode formar artefactos e levar a falsos positivos; As biópsias seriadas, quando necessárias, são pouco toleradas pelos doentes;

As biopsias líquidas têm um elevado potencial para alterar a estratégia terapêutica, identificando biomarcadores preditivos e fornecendo uma ferramenta clínica não invasiva e fiável para traçar o perfil molecular dos pacientes em tempo real permitindo, assim, aplicar terapias personalizadas e direcionadas para cada paciente (Alix-Panabières e Pantel 2016, Lianidou e Hoon 2017).



## **Capítulo II- Objetivos**



## II Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo analisar biomarcadores preditivos (mutações no *EGFR* e *ALK*) em biopsias líquidas para futura aplicação em pacientes com carcinoma do pulmão de não pequenas células.

Para atingir este objetivo, diferentes abordagens serão implementadas, especificamente:

- Definir o melhor método de extração de cfDNA e de conservação do mesmo;
- Analisar as mutações no gene *EGFR* relacionadas com diferentes respostas terapêuticas e desenhar os “primers” para detecção das mutações em amostras de cfDNA de doentes com CPNPC, procedendo ao seu teste e análise dos resultados de sequenciação Sanger e NGS;
- Validação do método em biópsias líquidas de dadores saudáveis;
- Desenvolvimento do método HRM para análise de mutações no gene *EGFR* em amostras cfDNA;
- Análise das mutações/fusões do gene *ALK* relacionadas com diferentes respostas terapêuticas e desenhar os “primers” para detecção das mutações em amostras de cfDNA de doentes com CPNPC.



## **Capítulo III- Material e Métodos**



### **III.1 Material biológico**

Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares humanas: GM12878 (B-Linfócitos B, Coriell Institute) como linha celular controlo normal e a PC-9 (formalmente conhecida como PC-14, adenocarcinoma Pulmão, ECACC, Merck) que possui a mutação no exão 19 *EGFR* p.E746\_A750del. Ambas as linhas foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de FBS (soro bovino fetal), 1% L-Glutamina e 1% Penicilina/Estreptomicina (sendo todos os reagentes da Gibco™, Invitrogen), à temperatura de 37°C e na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Estas linhas celulares foram utilizadas para extração de DNA genómico.

Foi feita a colheita de sangue de 17 doadores saudáveis em diferentes tubos cfDNA (Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) – Roche and Blood STASIS 21-ccfDNA – MAGBIO) para extração de cfDNA, seguindo os requisitos éticos aprovados pela comissão ética da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

### **III.2 Extração de DNA Genómico a partir de células em cultura**

O DNA genómico (DNAg) foi extraído recorrendo ao kit “Genomic DNA Isolation from Human Cultured Cell Lines” (Quickgene DNA Tissue Kit S, Fujifilm Life Science), conforme as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA foi analisada pelo espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### **III.3 Preparação das amostras e extração de cfDNA**

O sangue periférico foi colhido em diferentes tubos (cfDNA Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) – Roche and Blood STASIS 21-ccfDNA – MAGBIO), para a avaliação do método de colheita, tendo sido também testado o tempo de preservação do cfDNA desses mesmos tubos.

Para a extração de cfDNA, foi necessário separar o plasma dos restantes constituintes das amostras de sangue periférico. Para isso, os tubos com as amostras foram centrifugados a 2000 ×g durante 10 minutos. Posteriormente, foi retirado o plasma (sobrenadante- parte superior amarelada) e foi realizada uma nova centrifugação a 13000 ×g durante 10 minutos.

Foram testados 3 kits diferentes, baseados em purificação com esferas magnéticas, para a extração de cfDNA: GenElute™ UltraMag Cell-Free DNA Kit (Millipore), cfKapture™ Kit (MAGBIO) e MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems).

Todos os kits foram usados segundo as recomendações dos fabricantes. Apesar de serem compostos por diferentes reagentes, estes kits seguem os mesmos passos gerais para a extração de cfDNA (descritos na tabela III.1).

**Tabela III. 1-** Descrição das diferentes etapas dos kit GenElute™ UltraMag Cell-Free DNA, cfKapture™ e MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation.

	MagMAX	GenElute	cfKapture
Separação do plasma da amostra de sangue periférico		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 2000 ×g, 10 min.</li> <li>✓ 13000 ×g, 10 min.</li> </ul>	
Tratamento com proteinase K	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ proteinase k</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ proteinase k</li> <li>✓ SDS 20%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ proteinase k</li> <li>✓ SE buffer</li> </ul>
Lise e ligação as esferas magnéticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de lise/ligação</li> <li>✓ esferas magnéticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de lise/ligação</li> <li>✓ esferas magnéticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de lise/ligação</li> <li>✓ esferas magnéticas</li> <li>100% etanol</li> <li>Solução DF</li> </ul>
Primeira lavagem	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de lavagem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 2 lavagem com tampão de lavagem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de lavagem 1</li> </ul>
Segunda lavagem	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ duas lavagens com etanol 80%</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de lavagem 2</li> </ul>
Eluição		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ tampão de eluição</li> </ul>	
Concentração e lavagem do cfDNA (repetição do protocolo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ segunda adição de tampão de lise/ligação</li> <li>✓ adicionar esferas magnéticas</li> <li>✓ Repetição das lavagens com tampão de lavagem e com etanol 80%</li> <li>✓ tampão de eluição</li> </ul>		

### III.4 Quantificação do cfDNA

Após a extração, todas as amostras de cfDNA, estas foram quantificadas no Qubit 4 Fluorometer com o kit de quantificação dsDNA HS (“High Sensitivity”) Assay Kit (Invitrogen). Foram utilizados 2 µL de cfDNA para a quantificação (em ng/mL), que foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

### **III.5 Análise “in silico” de mutações no gene *EGFR* e *ALK* e mapeamento fusões *EML4-ALK***

A análise das mutações do gene *EGFR* e *ALK* e das fusões *EML4-ALK* foi feita com base nas anotações (localização no cromossoma e nome das mutações) para CPNPC presentes na base de dados COSMIC (Cancer Browser, GRCh38, COSMIC v92). O mapeamento das mutações nos cromossomas 2 e 7 (GRCh38.p13) para o *ALK* e *EGFR*, respetivamente, foi feito tendo em conta a localização dos intrões e exões dos genes nos cromossomas (*EGFR*-201e *ALK*-201, Ensembl) e utilizando o programa Geneious (R9 version 9.1.2, Biomatters). No que diz respeito às fusões *EML4-ALK*, as sequências presentes na base de dados Nucleotide do NCBI foram importadas para o Geneious e foi feito o mapeamento dos exões do *ALK* e *EML4* nas diferentes variantes.

### **III.6 Desenho de “primers” para multiplex PCR para amplificação do gene *EGFR***

Para o desenho de “primers” para amplificação dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* foi utilizada a ferramenta de desenho de “primers” do Geneious. Estes foram desenhados tendo em conta: que incluem todas as mutações de interesse em CPNPC (descritas no COSMIC), não resultarem num fragmento maior do que 170 pb, terem amplicões de tamanho semelhante, quantidade GC%, temperatura de “melting” ( $T_m$ ), tamanho dos “primers” e não formarem dímeros quando usados em multiplex PCR. Os “primers” foram testados quanto à sua qualidade e formação de dímeros pelo programa “Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific)”. Cada “primer” foi também produzido com adaptadores para “Next Generation Sequencing” (NGS).

### **III.7 Amplificação dos exões do gene *EGFR* em amostras de cfDNA pela técnica “Multiplex Polymerase Chain Reaction”**

#### **III.7.1 Otimização do PCR para amplificação dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR***

Antes de proceder à técnica de multiplex PCR (“Polymerase Chain Reaction”), foi necessário otimizar a amplificação de cada exão separadamente com os respetivos “primers” (tanto os “primers” normais como os com adaptadores para NGS) em amostras de DNA genómico e de cfDNA, uma vez que este último é mais difícil de amplificar devido à sua baixa

concentração, mas é a amostra em foco neste trabalho. Foram testadas: concentração de “primers”, temperatura de “melting”, enzimas Taq polimerase e concentração de cfDNA. Verificamos que a melhor combinação é: “primers” a 20 µM, Tm 61°C, MyTaq Mix (Bioline) e 2ng de cfDNA (mínimo). O programa PCR consistiu numa desnaturação inicial de 1 minuto a 95°C, 25 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, 15 segundos a 61°C (“annealing”), e extensão a 72°C durante 10 minutos. A análise dos produtos de PCR obtidos foi efetuada por eletroforese em gel de agarose (descrito em III.7.3).

### **III.7.2 Otimização do multiplex PCR para amplificação dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* em amostras de cfDNA**

A técnica de multiplex PCR foi otimizada para a amplificação dos exões 18 a 21 do gene *EGFR* em simultâneo com o objetivo de conseguir numa só amostra obter milhares de cópias destes exões para a sua posterior análise por NGS. Após otimização da técnica, verificou-se ser necessária a realização de um multiplex PCR com os “primers” normais (sem adaptadores para NGS) e a posterior reamplificação do produto deste multiplex PCR com “primers” específicos para NGS (com adaptadores, aqui designados de ILU) para obtenção de um produto PCR com milhares de cópias dos exões em estudo com uma região adaptada para a sua sequenciação por NGS. Na tabela III.2 estão representadas as misturas de reação. O programa de multiplex PCR (tanto na amplificação como na reamplificação) foi igual ao da amplificação do cfDNA pelo PCR convencional. Os produtos PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (descrito em III.7.3) e o produto final do multiplex PCR foi purificado (descrito em III.7.3) e analisado por NGS.

**Tabela III. 2-** Quantidades e concentrações dos reagentes de PCR utilizados para o Multiplex PCR e para a reamplificação com “primers” com adaptadores.

Multiplex PCR convencional		Reamplificação- Multiplex PCR com “primers” com adaptadores	
Reagentes	Volume $\mu\text{L}$	Reagentes	Volume $\mu\text{L}$
MyTaq Mix (Bioline)	25 $\mu\text{L}$		25 $\mu\text{L}$
cfDNA	2 ng	Produto do multiplex PCR normal	10 $\mu\text{L}$
“primers” 20 $\mu\text{M}$ :		“primers” Illumina 20 $\mu\text{M}$ :	
<i>EGFR_ex18</i> FW	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex18</i> FW_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex18</i> RV	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex18</i> RV_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex19</i> FW	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex19</i> FW_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex19</i> RV	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex19</i> RV_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex20</i> FW	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex20</i> FW_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex20</i> RV	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex20</i> RV_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex21</i> FW	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex21</i> FW_ILU	1 $\mu\text{L}$
<i>EGFR_ex21</i> RV	1 $\mu\text{L}$	<i>EGFR_ex21</i> RV_ILU	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	Até 50 $\mu\text{L}$		7 $\mu\text{L}$

### III.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Os resultados das reações de PCR foram avaliados quanto à sua intensidade e tamanho em gel de agarose a 1,2% (massa/volume) em SGTB 1x (Grisp), com brometo de etídio (0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) incorporado para visualização das bandas no gel. O marcador padrão de DNA GeneRuler™ DNA Ladder Mix foi utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos obtidos. A separação das bandas em gel de agarose foi realizada durante 30 minutos com uma potência 100V e visualizados com um transiluminador de luz UV.

### III.7.4 Purificação do produto PCR Multiplex Illumina e quantificação dos produtos PCR purificados

A purificação do produto de reamplificação do PCR Multiplex foi realizada usando dois kits diferentes para avaliar o melhor método: kit “Ready to Surf PCR Kits- Magnetic NanoBeads” for PCR (STAB VIDA), baseado em esferas magnéticas e kit ExoSAP GO (Grisp) baseado na utilização de enzimas. Ambos os kits foram usados segundo as recomendações do fabricante. A quantificação dos produtos de PCR purificados foi realizada no Qubit 4 Fluorometer com Qubit- dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit (Invitrogen). Foram utilizados

2  $\mu$ L de DNA para a quantificação (em ng/ $\mu$ L), que foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

### **III.7.5 Sequenciação pelo método de NGS das amostras amplificadas por PCR multiplex**

Depois de purificadas as amostras foram enviadas para a STABVIDA para serem sequenciadas por NGS, sendo tratadas bioinformaticamente e emitido um relatório de análise. Para a construção da biblioteca de amplicões foi utilizado a Nextera, utilizando a plataforma de sequenciação Illumina MiSeq, com um limite de detecção de 1%. Os dados genômicos são processados com Trim Galore! (Versão 0.4.3.1) e PRINSEQ (Versão 0.20.4), alinhados à referência com BWA-MEM (versão 0.7.17.1) e as variantes são detetadas com VarDict (versão de 03.07.2018).

### **III.8 Clonagem dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR***

De forma a verificar a especificidade dos “primers” desenhados e obter as sequências dos exões 18, 19, 20 e 21 sem alterações isoladas (linha celular GM12878), assim como sequências com a mutação p.E746\_A750delELREA (linha celular PC9 e amostra de cfDNA sequenciada por NGS), isolaram-se estas sequências por clonagem. As bandas de interesse (resultantes da reação PCR descrita em III.7.2) foram coradas do gel de agarose e purificadas com Cut & Spin (Grisp) e com o kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Confirmou-se a purificação pela migração do produto em gel de agarose (1,2%).

Para aumentar a eficiência da clonagem, procedeu-se à fosforilação dos produtos PCR com o kit “Fast and Repair” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. De seguida, estes fragmentos foram inseridos no vetor Puc19/SmaI (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) por uma reação de ligação com o kit T4 DNA ligase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A transformação foi feita em bactérias ultracompetentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen) por choque térmico. O método de seleção utilizado foi o meio LB (meio Luria Broth) agar contendo ampicilina (50  $\mu$ g/mL), IPTG (0,5 mM) e X-GAL (80  $\mu$ g/mL em DMSO (dimetilsulfóxido)). Após a incubação “overnight” a 37 °C, os clones positivos (colónias brancas) foram selecionados e procedeu-se à confirmação por PCR com “primers” M13 (STAB VIDA), sendo o resultado analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Após a confirmação dos clones positivos, o DNA plasmídico foi extraído

com o Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante e enviado para sequenciação Sanger.

O alinhamento múltiplo para análise das sequências dos vários clones foi obtido através do CLUSTALW no Geneious R9 (versão 9.1.2, Biomatters) com os parâmetros do programa.

### **III.9 HRM como forma de detecção de variantes**

A técnica HRM (“High Resolution Melting”) foi otimizada neste trabalho de forma a permitir a detecção de mutações no exão 19 do gene *EGFR*, uma vez que possuímos uma mutação neste exão (p.E746\_A750delELREA) isolada em clones, e amostras que possuem a mesma (DNA genómico de uma linha celular e uma amostra de cfDNA). Assim, estas amostras, assim como outras amostras de cfDNA foram analisadas por ensaios de “High Resolution Melt” (HRM) com MeltDoctor HRM Master Mix que usa fluorocromo SYTO9 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Científico), e com “primers” específicos para o exão 19 do gene *EGFR*, de acordo com as recomendações do fabricante. Estas experiências foram realizadas no sistema de PCR em tempo real StepOne (Applied Biosystems, Thermo Fisher Científico) com o programa PCR: desnaturação inicial em 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, seguido por 61 °C por 1 min. Posteriormente, foi feita uma curva de “melt” com um passo de desnaturação a 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 seg, 61 °C 1 min seguindo-se 95 °C 15 seg, e fazendo uma rampa de aumento de temperatura de 0.3% desde 61 °C 1 min, até aos 95 °C 15 seg. Todas as reações foram realizadas em triplicado, e controlos negativos. O software StepOne (versão 2.2.2, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) foi usado para criar a curva de melting e o software “High Resolution Melt” (version 3.0.1, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) para análise de dados (os parâmetros utilizados foram os standards do software).

### **III.10 Análise Estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística foi determinada usando o teste t de Student para a comparação entre duas amostras independentes e a análise de variância (ANOVA) quando mais de dois grupos estavam sob análise. ns (não significativo) para  $p > 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

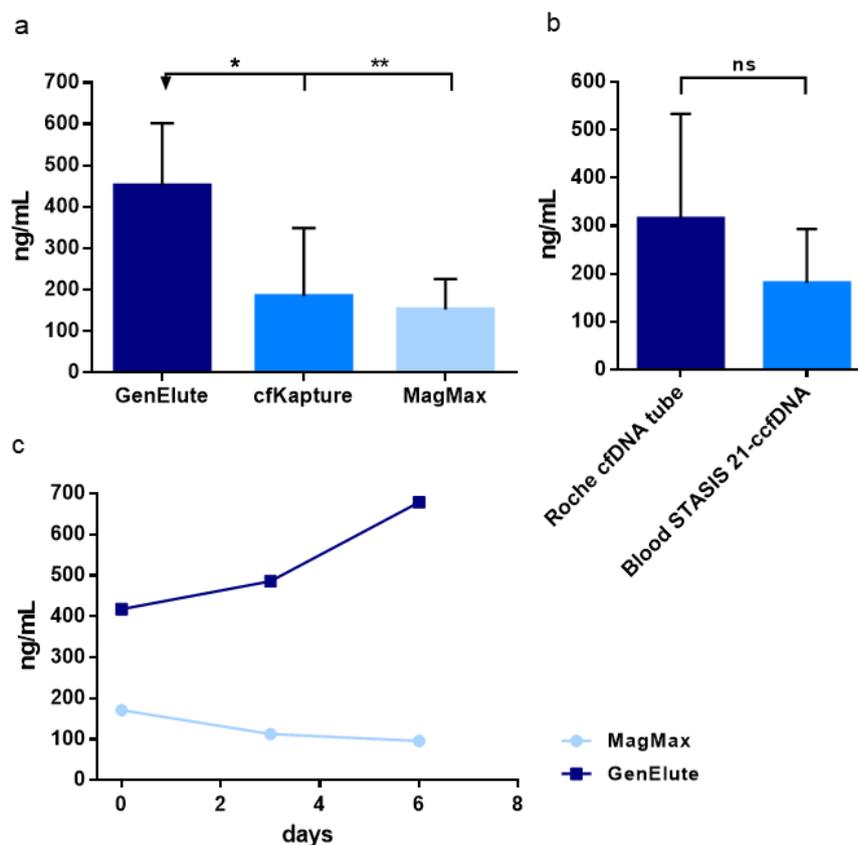


## **Capítulo IV- Resultados**



## IV.1 Otimização da extração de cfDNA a partir de amostras de sangue

Numa primeira abordagem para a análise de mutações de *EGFR* no cfDNA (DNA livre circulante) de pacientes com CPNPC, iniciaram-se experiências de otimização de sistemas de acondicionamento (colheita de sangue) e manuseamento (extração de cfDNA) de amostras de ácidos nucleicos. Foram testados três kits diferentes de extração de cfDNA baseados na utilização de esferas magnéticas (GenElute UltraMag Cell-Free DNA – Millipore, cfKapture – MAGBIO and MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation – Applied Biosystems) (Figura IV.1a). Todos os kits testados têm por base uma fase inicial de digestão com proteínase K e isolamento do cfDNA em esferas magnéticas, com subsequentes lavagens, sendo por último eluído o cfDNA. O kit GenElute UltraMag Cell-Free DNA mostrou ser mais eficiente comparado com os outros dois kits testados, sendo possível obter uma concentração de 451 ng/mL ( $\pm 150,4$ ). O menos eficiente foi o kit MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation – Applied Biosystems com uma concentração de 152,5 ng/mL ( $\pm 73,0$ ) de cfDNA. De seguida procedeu-se à avaliação dos tubos para a colheita e armazenamento do sangue, tendo sido testados dois tubos comerciais diferentes, específicos para preservação de cfDNA – cfDNA Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) (Roche) e Blood STASIS 21- cfDNA (MAGBIO) (Figura IV.1b). Embora tenha sido observado um alto desvio padrão, consequência da variação da concentração de cfDNA entre os diferentes kits e dadores testados, os tubos de colheita de sangue cfDNA cfDNA Cell-Free DNA Collection Tube (Roche) revelaram uma concentração mais alta de cfDNA (315,0 ng/mL  $\pm 218,8$ ) em comparação aos tubos da Blood STASIS 21- cfDNA Collection Tubes (MAGBIO) (180,6 ng/mL  $\pm 112,9$ ). Por esse motivo, os tubos da cfDNA Cell-Free DNA Collection Tube (Roche) foram os escolhidos para as colheitas das amostras, sendo estes tubos adequados para utilização em diagnóstico. No entanto, foi necessário avaliar a sua capacidade para preservação do cfDNA, realizando a extração às 0h, 3 dias e 6 dias após a colheita de sangue com os kits GenElute UltraMag Cell-DNA e MagMAX Total Total Free Cellule Isolation Acid (Figura IV.1c). Desta forma, foi possível verificar que estes tubos apresentaram elevada capacidade de preservação do cfDNA pelo menos até 6 dias e, mais uma vez, o kit GenElute UltraMag Cell-Free DNA foi o que apresentou os melhores resultados.



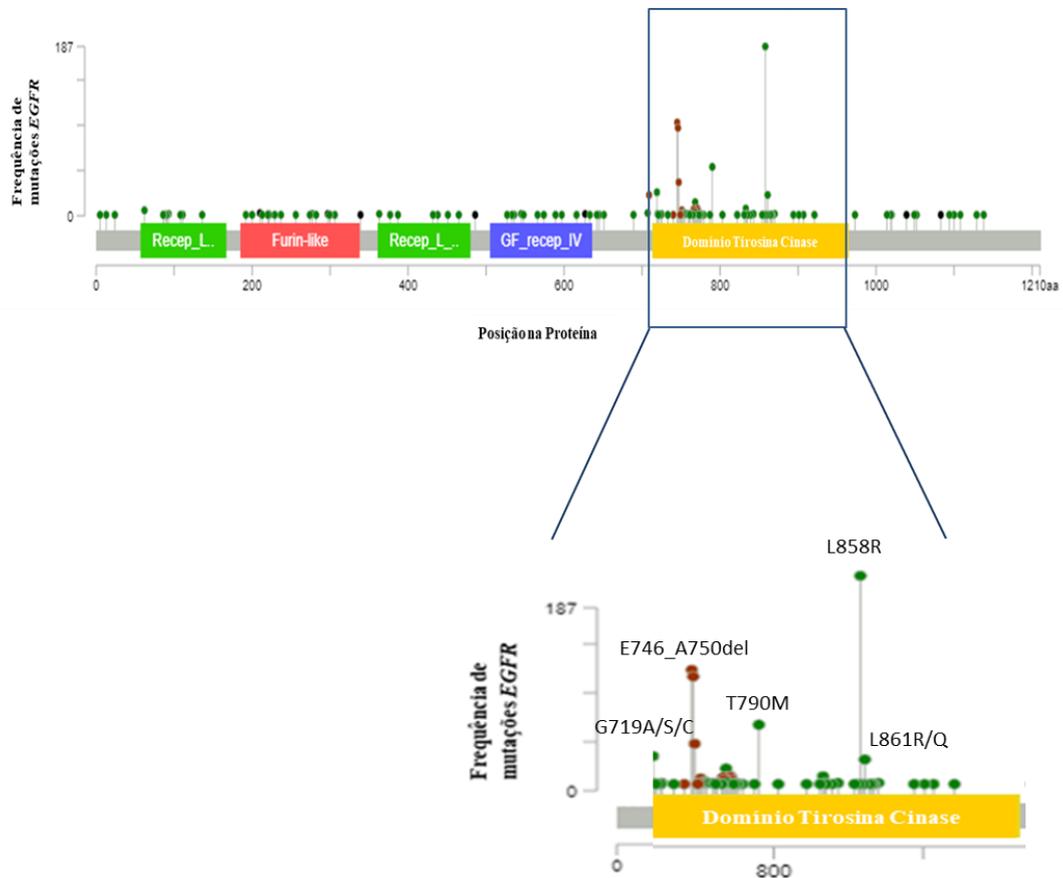
**Figura IV. 1-** Otimização da extração de cfDNA e da colheita de sangue para aplicação em pacientes com CPNPC. (a) Quantificação de cfDNA extraído com três kits diferentes de extração de cfDNA baseados em esferas magnéticas. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  conforme determinado pela One Way ANOVA. (b) Quantificação do cfDNA extraído do sangue coletado com dois tipos de tubos comerciais diferentes específicos para a preservação do cfDNA. ns - não é significativo, conforme determinado pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três ou mais experiências independentes. (c) Quantificação do cfDNA extraído com dois kits diferentes baseados em esferas magnéticas após diferentes tempos entre a colheita de sangue e a extração de cfDNA.

## IV.2 Análise das mutações do *EGFR* preditivas de resposta terapêutica

Para desenvolver um teste que permita fazer a detecção de mutações no gene *EGFR* preditivas de resposta terapêutica em doentes com CPNPC foi necessária proceder à análise “in silico” das mutações somáticas nos exões 18, 19, 20 e 21 do *EGFR* com relevância clínica, ou seja, mutações preditivas de resposta ao tratamento em CPNPC.

Numa primeira abordagem, procedeu-se à análise de dados das mutações no *EGFR* em outras bases de dados como o The cBioPortal for Cancer Genomics para determinar a frequência das mutações no *EGFR*. Os dados apresentados nesta base de dados resultam do estudo combinado de 6122 amostras, de 5718 pacientes em 17 estudos sobre o *EGFR*. Assim, foi possível verificar que a grande maioria das mutações detetadas no *EGFR* estão presentes no

domínio tirosina cinase, sendo a que tem maior frequência a L858R, seguindo-se a mutação p.E746\_A750del e T750M (Figura IV.2).



**Figura IV. 2-** Distribuição da frequência das mutações do EGFR ao longo da proteína. Na proteína está discriminado a verde a localização do Recetor L domain, a vermelho “Furin-like cysteine rich region”, a azul “Growth factor recetor domain IV” e amarelo Domínio Tirosina Cinase. Verde- Mutações missense; Preto- Mutações truncadas (“Nonsense”, “Nonstop”, “Frameshift deletion”, “Frameshift insertion”, “splice site”); Vermelho- Deleções e inserções “Inframe”.

A análise das mutações no *EGFR* englobou também a pesquisa na base de dados COSMIC cancer database, onde estão descritas 12154 mutações relativas a CPNCP, juntamente com pesquisa bibliográfica. Foi, portanto, necessário fazer uma triagem das mesmas. Apenas as mutações no gene *EGFR* localizadas nos exões que codificam o domínio tirosina cinase desta proteína (18, 19, 20 e 21) e que possuíam indicação relativamente à sua implicação na resposta terapêutica (em artigos ou bases de dados) foram consideradas (Tabela IV.1).

**Tabela IV. 1** - Análise das mutações preditivas do *EGFR* em pacientes com CPNPC descritas no COSMIC cancer database.

Exão	AA Mutação	CDS mutação	ID Mut	Resistência	Sensibilidade
18	p.K708M (Substitution - Missense, position 708, K→M)	c.2123A>T (Substitution, position 2123, A→T)	COSM28509	Gefitinib Erlotinib	-
18	p.E709K (Substitution - Missense, position 709, E→K)	c.2125G>A (Substitution, position 2125, G→A)	COSM12988	-	Gefitinib Erlotinib Afatinib Osimertinib
18	p.E709H (Substitution- Missense, position 709, E→H)	c.2125_2127delinsCAT (Complex- compound substitution)	COSM12428	Erlotinib Gefitinib Afatinib Osimertinib	-
18	p.E709_T710delinsD (Deletion - In frame)	c.2127_2129del (Deletion)	COSM51525	Erlotinib Gefitinib	Afatinib Osimertinib
18	p.F712S (Substitution - Missense, position 712, F→S)	c.2135T>C (Substitution, position 2135, T→C)	COSM28601	-	Gefitinib Erlotinib Dacomitinib afatinib Vandetinib
18	p.L718* (Substitution - Nonsense)	c.2152_2153delinsTA (Complex - compound substitution)	COSM417021 8	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib	-
18	p.G719C (Substitution - Missense, position 719, G→C)	c.2154_2155delinsTT (Complex - compound substitution)	COSM18441	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
18	p.G719C (Substitution - Missense, position 719, G→C)	c.2155G>T (Substitution, position 2155, G→T)	COSM6253	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
18	p.G719S (Substitution - Missense, position 719, G→S)	c.2155G>A (Substitution, position 2155, G→A)	COSM6252	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
18	p.G719A (Substitution - Missense, position 719, G→A)	c.2156G>C (Substitution, position 2156, G→C)	COSM6239	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.V742A (Substitution - Missense, position 742, V→A)	c.2225T>C (Substitution, position 2225, T→C)	COSM13183	Gefitinib Erlotinib	-
19	p.I740_K745dup (Insertion - In frame)	c.2217_2234dup (Insertion)	COSM26443	-	Gefitinib Erlotinib
19	p.E746_A750delELREA (Deletion - In frame)	c.2235_2249del15 (Deletion)	COSM6223	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib Osimertinib

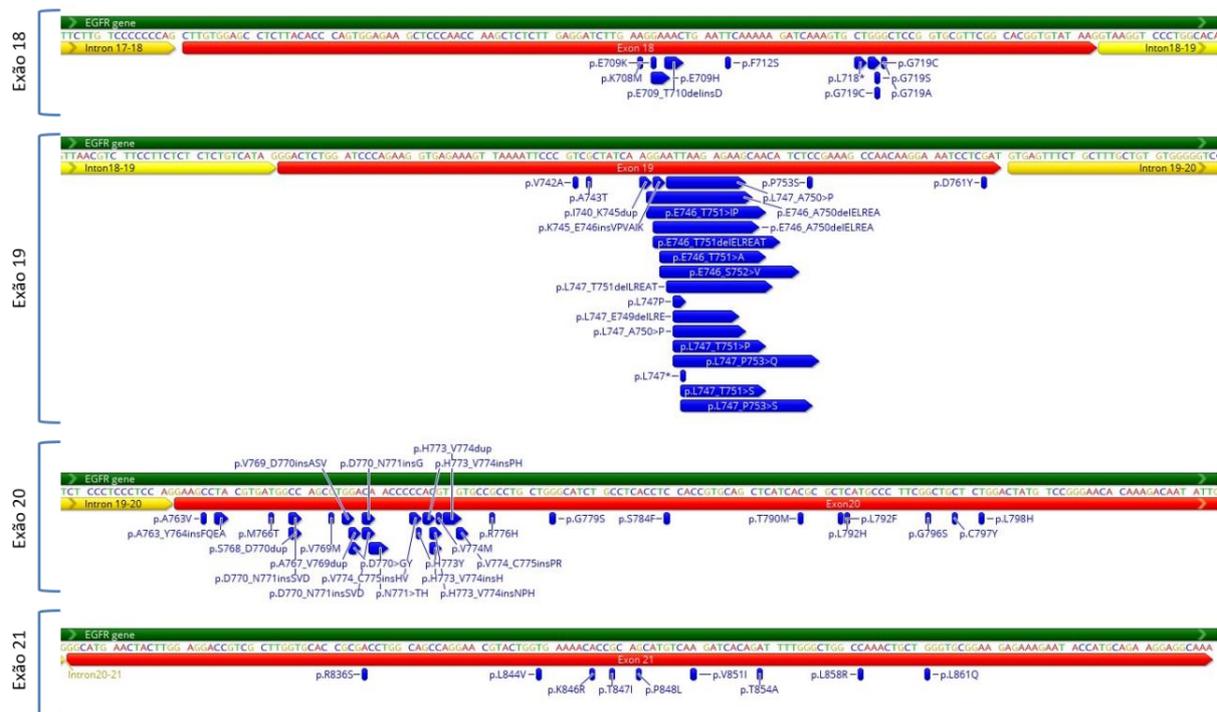
19	p.E746_T751>IP (Complex - deletion inframe)	c.2235_2251>AATTC	COSM13552	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.K745_E746insVPVAIK (Insertion - In frame)	c.2219_2236dup (Insertion)	COSM26444	-	Afatinib Osimertinib
19	p.E746_A750delELREA (Deletion - In frame)	c.2236_2250del15 (Deletion)	COSM6225	-	Gefitinib Erlotinib Afatinib
19	p.E746_T751delELREAT (Deletion - In frame)	c.2236_2253del18 (Deletion)	COSM12728	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.E746_A750del (Complex - deletion inframe)	c.2232_2249delinsAAA (Complex)	COSM373466 8	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib Osimertinib
19	p.E746_T751>A (Complex - deletion inframe)	c.2237_2251del15 (Deletion)	COSM12678	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.E746_S752>V (Complex - deletion inframe)	c.2237_2255>T (Complex)	COSM12384	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.L747_A750>P (Complex - deletion inframe)	c.2238_2248>GC (Complex)	COSM12422	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.L747_E749delLRE (Deletion - In frame)	c.2239_2247delTTAAGA GAA (Deletion)	COSM6218	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.L747_T751delLREAT (Deletion - In frame)	c.2238_2252del15 (Deletion)	COSM23571	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.L747_T751delLREAT (Deletion - In frame)	c.2240_2254del15 (Deletion)	COSM12369	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.L747P (Substitution - Missense, position 747, L→P)	c.2239_2240delinsCC (Complex - compound substitution)	COSM24267	Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Dacomitinib, Afatinib	-

19	p.L747_E749delLRE (Deletion - In frame)	c.2239_2247delTTAAGA GAA (Deletion)	COSM6218	-	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib, Osimertinib
19	p.L747_A750>P (Complex - deletion inframe)	c.2239_2248TTAAGAG AAG>C (Complex)	COSM12382	-	Erlotinib, Afatinib, Osimertinib, Gefitinib
19	p.L747_T751>P (Complex - deletion inframe)	c.2239_2251>C (Complex)	COSM12383	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.L747_P753>Q (Complex - deletion inframe)	c.2239_2258>CA (Complex)	COSM12387	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.L747* (Insertion - Frameshift)	c.2240delinsAAGAGAA GCAAC (Complex)	COSM741053 7	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.L747_T751>S (Complex - deletion inframe)	c.2240_2251del12 (Deletion)	COSM6210	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
19	p.L747_P753>S (Complex - deletion inframe)	c.2240_2257del18 (Deletion)	COSM12370	-	Erlotinib, Afatinib, Osimertinib, Gefitinib
19	p.P753S (Substitution - Missense, position 753, P→S)	c.2257C>T (Substitution, position 2257, C→T)	COSM6268	-	Afatinib, Osimertinib
19	p.D761Y (Substitution – Missense, position 761, D→Y)	c.2281G>T (Substitution, position 2281, G→T)	COSM21984	Erlotinib, Afatinib, Osimertinib, Gefitinib	-
20	p.A763_Y764insFQEA (Insertion - In frame)	c.2284-5_2290dup (Insertion)	COSM26720	-	Erlotinib, Afatinib, Osimertinib,
20	p.M766T (Substitution - Missense, position 766, M→T)	c.2297T>C (Substitution, position 2297, T→C)	COSM28943	Gefitinib Erlotinib	
20	p.D770_N771insSVD (Insertion - In frame)	c.2300_2301insCAGCGT GGA (Insertion)	COSM372843 3	Erlotinib, Afatinib, Gefitinib,	Osimertinib
20	p.S768I (Substitution - Missense, position 768, S→I)	c.2303G>T (Substitution, position 2303, G→T)	COSM6241	Gefitinib	Erlotinib, Afatinib, Osimertinib
20	p.V769M (Substitution - Missense, position 769, V→M)	c.2305G>A (Substitution, position 2305, G→A)	COSM13425	-	Afatinib, Osimertinib
20	p.V769_D770insASV (Insertion - In frame)	c.2307_2308insGCCAGC GTG (Insertion)	COSM12376	Erlotinib, Afatinib, Gefitinib,	Osimertinib
20	p.D770delinsGY	c.2308_2309insGTT (Insertion)	COSM12427		Dacomitinib
20	p.A767_V769dup (Insertion - In frame)	c.2300_2308dup (Insertion)	COSM12376	Erlotinib	

20	p.D770_N771insSVD (Insertion - In frame)	c.2300_2301insCAGCGT GGA (Insertion)	COSM372843 3	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Dacomitinib	-
20	p.D770_N771insG (Insertion - In frame)	c.2310_2311insGGC (Insertion)	COSM13004	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib,	-
20	p.N771>TH (Complex - insertion inframe)	c.2311_2312insCAC (Insertion)	COSM22946	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib,	-
20	p.V774_C775insHV (Insertion - In frame)	c.2316_2317insCACGTG (Insertion)	COSM133201	Erlotinib Afatinib Gefitinib	Osimertinib
20	p.H773Y (Substitution - Missense, position 773, H→Y)	c.2317C>T (Substitution, position 2317, C→T)	COSM460160 0	-	Afatinib Osimertinib Erlotinib Gefitinib
20	p.H773_V774insPH (Insertion - In frame)	c.2318_2319insCCCCCA (Insertion)	COSM22947	Erlotinib Afatinib Gefitinib	Osimertinib
20	p.H773_V774insH (Insertion - In frame)	c.2319_2320insCAC (Insertion)	COSM12377	Erlotinib Afatinib Gefitinib	Osimertinib
20	p.H773_V774insNPH	c.2319_2320insAACCCC CAC (Insertion)	COSM12381	Erlotinib Afatinib Gefitinib	Osimertinib
20	p.V774M (Substitution - Missense, position 774, V→M)	c.2320G>A (Substitution, position 2320, G→A)	COSM13006	Erlotinib Gefitinib	Afatinib Osimertinib
20	p.V774_C775insPR (Insertion - In frame)	c.2322_2323insCCACGT (Insertion)	COSM417022 3	Afatinib Erlotinib Gefitinib Dacomitinib	-
20	p.H773_V774dup (Insertion - In frame)	c.2316_2321dup (Insertion)	COSM18432	Osimertinib	Erlotinib Gefitinib Dacomitinib
20	p.R776H (Substitution - Missense, position 776, R→H)	c.2327G>A (Substitution, position 2327, G→A)	COSM22940	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
20	p.G779S (Substitution - Missense, position 779, G→S)	c.2335G>A (Substitution, position 2335, G→A)	COSM25016	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
20	p.S784F (Substitution - Missense, position 784, S→F)	c.2351C>T (Substitution, position 2351, C→T)	COSM13189	Erlotinib	
20	p.T790M (Substitution - Missense, position 790, T→M)	c.2369C>T (Substitution, position 2369, C→T)	COSM6240	Erlotinib Afatinib Gefitinib	Osimertinib
20	p.L792F (Substitution - Missense, position 792, L→F)	c.2374C>T (Substitution, position 2374, C→T)	COSM649393 3	Afatinib Osimertinib	Dacomitinib
20	p.L792H (Substitution - Missense, position 792, L→H)	c.2375T>A (Substitution, position 2375, T→A)	COSM649393 4	Osimertinib	

20	p.G796S (Substitution - Missense, position 796, G→S)	c.2386G>A (Substitution, position 2386, G→A)	COSM20891	Erlotinib Afatinib	-
20	p.C797Y (Substitution - Missense, position 797, C→Y)	c.2390G>A (Substitution, position 2390, G→A)	COSM53104	Osimertinib	-
21	p.K846R (Substitution - Missense, position 846, K→R)	c.2537A>G (Substitution, position 2537, A→G)	COSM13431	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
21	p.P848L (Substitution - Missense, position 848, P→L)	c.2543C>T (Substitution, position 2543, C→T)	COSM22943	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
21	p.V851I (Substitution - Missense, position 851, V→I)	c.2551G>A (Substitution, position 2551, G→A)	COSM12727	Erlotinib Gefitinib	Afatinib Osimertinib
21	p.T854A (Substitution - Missense, position 854, T→A)	c.2560A>G (Substitution, position 2560, A→G)	COSM28537	Gefitinib Erlotinib	Osimertinib
21	p.L858R (Substitution - Missense, position 858, L→R)	c.2573T>G (Substitution, position 2573, T→G)	COSM6224	-	Erlotinib Afatinib Osimertinib Gefitinib
21	p.L861Q (Substitution. Missense, position 861 L → Q)	c.2582T>A (Substitution, position 2582, T→A)	COSM6213	-	Afatinib Osimertinib

Após a análise das mutações no gene *EGFR* relacionadas à resistência/sensibilidade à terapia em pacientes com CPNCP descritas na base de dados *COSMIC*, procedeu-se ao mapeamento das mesmas nos exões do gene *EGFR* utilizando o programa Geneious (Figura IV.3). Esta análise “in silico” (bases de dados e mapeamento das mutações) foi fundamental para: o desenho dos “primers” (descrito no capítulo material e métodos) de forma a ser possível detetar (por multiplex PCR e HRM) as mutações descritas até ao momento com o sendo preditivas de resposta terapêutica e analisar os resultados de NGS de forma a poder relacionar as mutações detetadas com a sua influência no tratamento. As mutações no gene *EGFR* preditivas estão localizadas no domínio tirosina cinase (exões 18, 19, 20 e 21) e são maioritariamente deleções, inserções ou mutações pontuais.

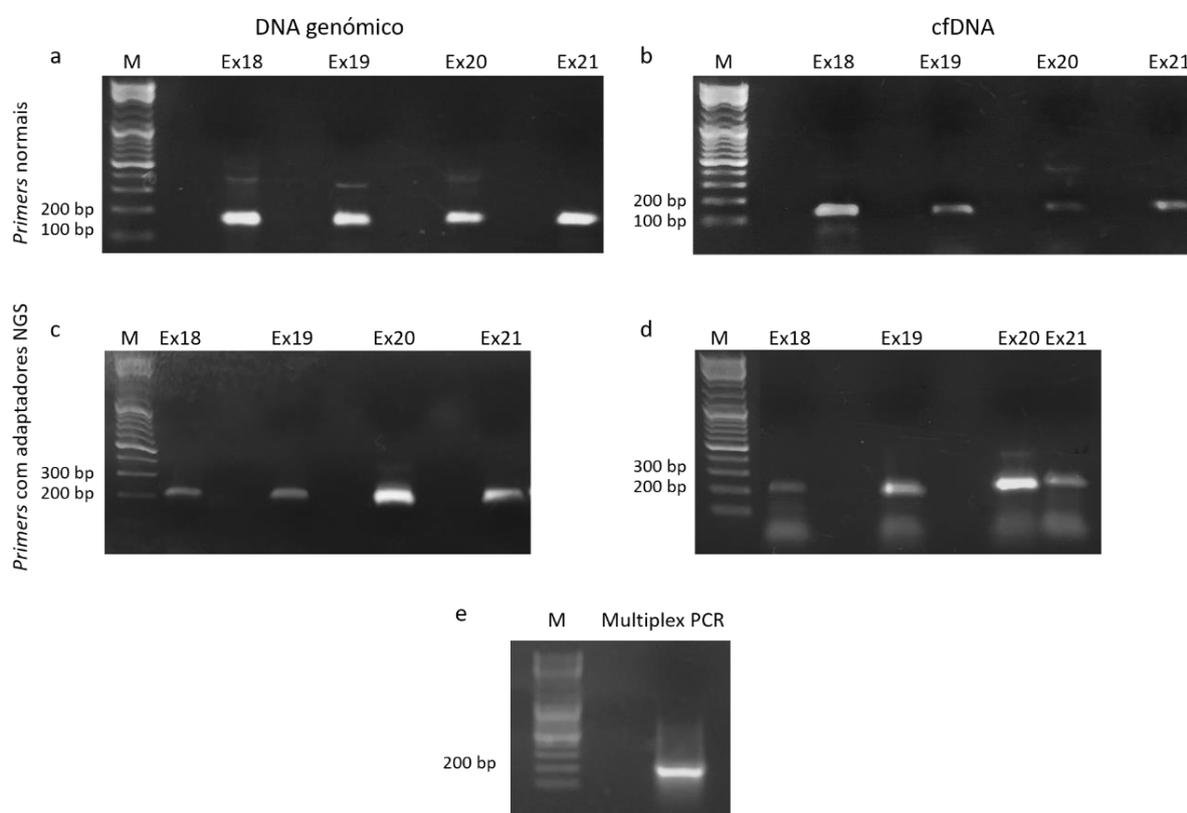


**Figura IV. 3-** Mapeamento das mutações do gene *EGFR* descritas como preditivas em pacientes com CPNPC. Os “primers” foram desenhados para cada exão com os amplicões contendo as mutações descritas.

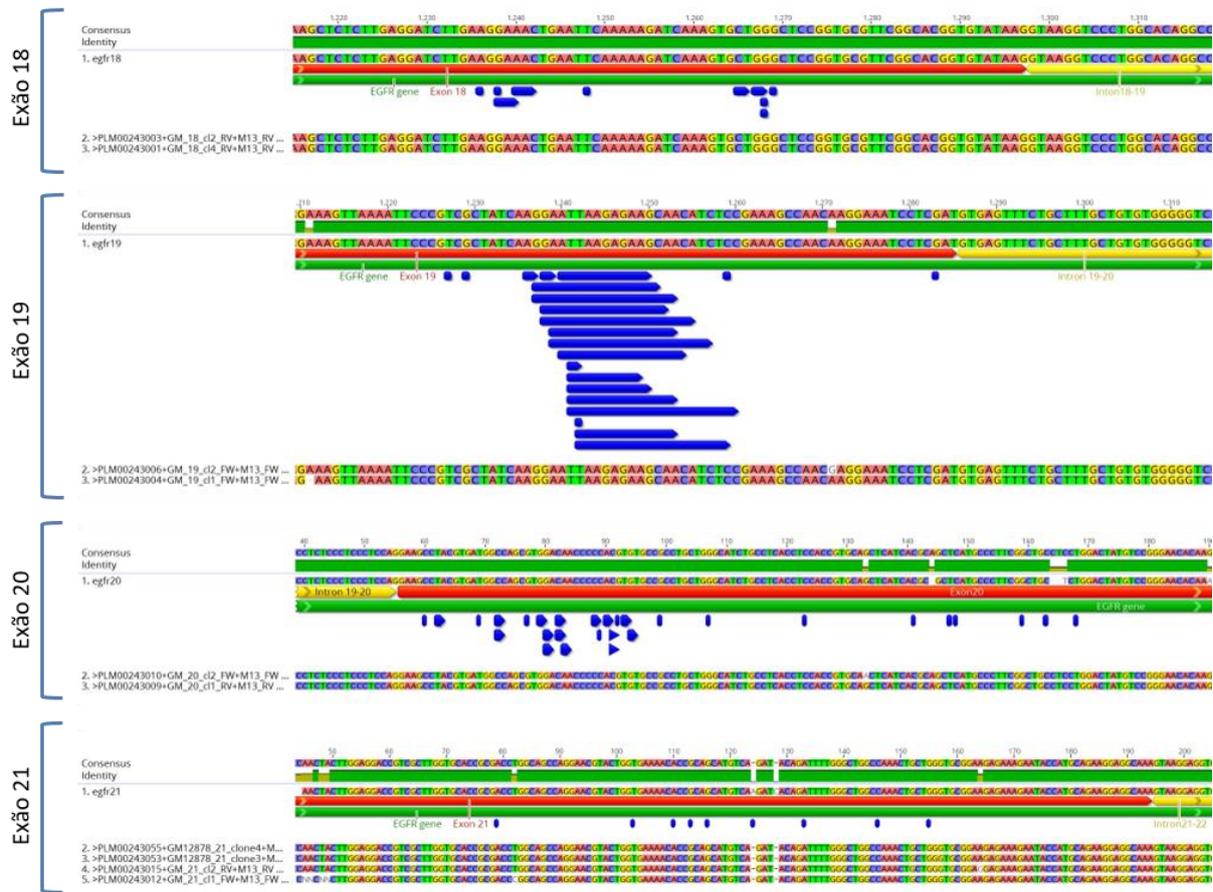
### IV.3 Desenvolvimento do método para análise de mutações no *EGFR* em cfDNA- Multiplex PCR e NGS

De forma a testar a eficiência dos “primers” na amplificação dos exões 18, 19, 20, 21 do gene *EGFR* procedeu-se à otimização da reação de amplificação por PCR inicialmente usando como “template” DNA genómico (Figura IV.4a) e de seguida cfDNA (Figura IV.4b). Além de serem testadas diferentes Tm (temperatura de “melting”), testaram-se diferentes enzimas Taq polimerase, concentração de “primers”, número de ciclos e quantidades de DNA. Foi também necessária a otimização da amplificação com os “primers” com adaptadores para NGS em DNA genómico (Figura IV.4c) e em cfDNA (Figura IV.4d). O resultado das reações de PCR demonstra a amplificação específica e eficiente dos exões 18-21 do EGFR, que possuem os tamanhos esperados quando observados em gel de agarose. Além disso, foi possível verificar que com baixas quantidades de cfDNA (2 ng) foi possível obter amplificação do produto de interesse. Os produtos desta amplificação com o “template” de DNA genómico (de uma linha celular de referência GM12878) foram clonados e sequenciados, tendo sido provada a especificidade dos “primers” (Figura IV.5).

De seguida passou-se à otimização da reação de multiplex PCR, que irá permitir num mesmo tubo e numa única reação, amplificar os 4 exões de interesse do gene *EGFR*, acrescentando-lhes o adaptador necessário para a sua sequenciação por NGS. Essa reação foi otimizada para o seu uso com cfDNA. Verificou-se que a simples amplificação com “primers” com adaptadores não é a melhor opção, sendo necessária uma primeira amplificação com “primers” normais e uma reamplificação com os “primers” com adaptadores para NGS (Figura IV.4.e).



**Figura IV. 4-** Otimização da reação de PCR. Géis de agarose com o resultado da amplificação por PCR dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* em DNA genómico (a, c) e cfDNA (b, d) com os “primers” sem (a, b) e com adaptadores para NGS (c, d) e com o resultado do multiplex PCR (e).

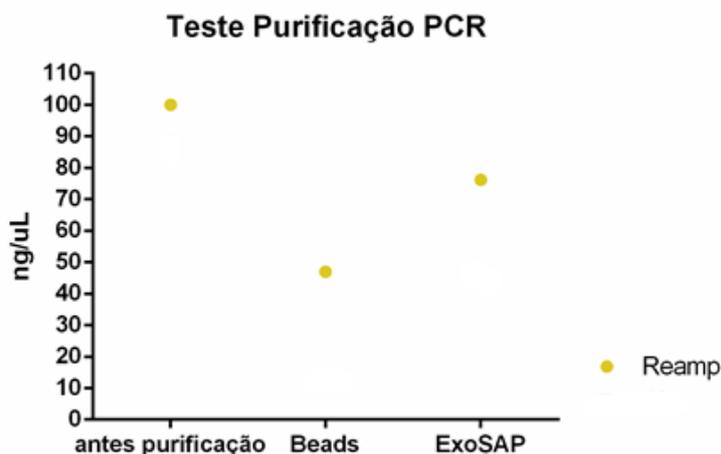


**Figura IV. 5-** Alinhamento dos clones isolados por PCR dos exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR*.

Antes de proceder à sequenciação dos produtos do multiplex PCR por NGS, estes foram purificados com dois métodos diferentes – ExoSAP GO™ (Grisp) e Ready to Surf PCR Kits- “Magnetic NanoBeads” for PCR (STABvida (Stab Vida). O kit NanoBeads tem por base o uso de esferas magnéticas às quais o DNA amplificado se liga, permitindo assim isola-lo e purifica-lo. O ExoSAP GO utiliza enzimas para limpar o produto amplificado por PCR, hidrolisando o excesso de “primers” e nucleótidos numa única etapa. Verificou-se que este último método de purificação apresenta maior rendimento uma vez que há menos perda de quantidade de DNA após o procedimento (Figura IV.6).

Relativamente aos dados de NGS (dados apresentados na Tabela IV.2), verificou-se que todos os exões de *EGFR* amplificados por multiplex PCR foram identificados por sequenciação. Além disso, em cada um dos exões foram mapeados um maior número de reads na amostra purificada com as “Magnetic beads” do que com o ExoSAP-GO, demonstrando que apesar de haver mais perda de quantidade, o produto da purificação tem maior qualidade.

Também foi detetada uma deleção específica no exão 19 do gene *EGFR* – *p.E746\_A750delELREA* com uma frequência de cerca de 50%, indicando estar em heterozigotia. Além disso, este resultado demonstra o valor deste método na identificação de mutações no *EGFR* em amostras de cfDNA em pacientes com CPNPC.



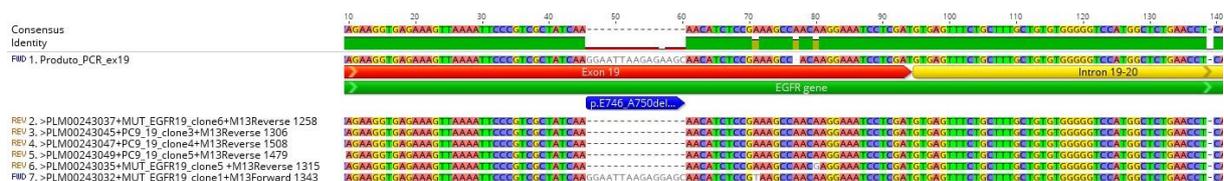
**Figura IV. 6-** Quantificação dos produtos do multiplex PCR purificados com os métodos ExoSAP GO™ (Grisp) e Ready to Surf PCR Kits- Magnetic NanoBeads for PCR (STABvida (Stab Vida)).

**Tabela IV. 2-** Resultados de “Next Generation Sequencing” – NGS- do produto de Multiplex PCR de cfDNA com “primers” *EGFR*.

Resultados NGS		Magnetic NanoBeads- Produto Multiplex PCR purificado	ExoSAP- Produto Multiplex purificado
Genes/Exões identificados		Número de “reads” mapeados	
<i>EGFR</i>	Exão 18	176949	88435
	Exão 19	359973	149789
	Exão 20	314996	135298
	Exão 21	249299	101267
<b>Mutações detetadas no <i>EGFR</i></b>	<b>Tipo</b>	<b>Terapia</b>	<b>Frequência</b>
Exão 19 <i>p.E746_A750delELREA</i>	Deleção	Sensibilidade: Gefitinib, Erlotinib, Afatinib	55,9      64,41

De seguida procedeu-se ao isolamento, clonagem e sequenciação pelo método Sanger do exão 19 do gene *EGFR* (amplificado por PCR) desta amostra de cfDNA assim como de DNA

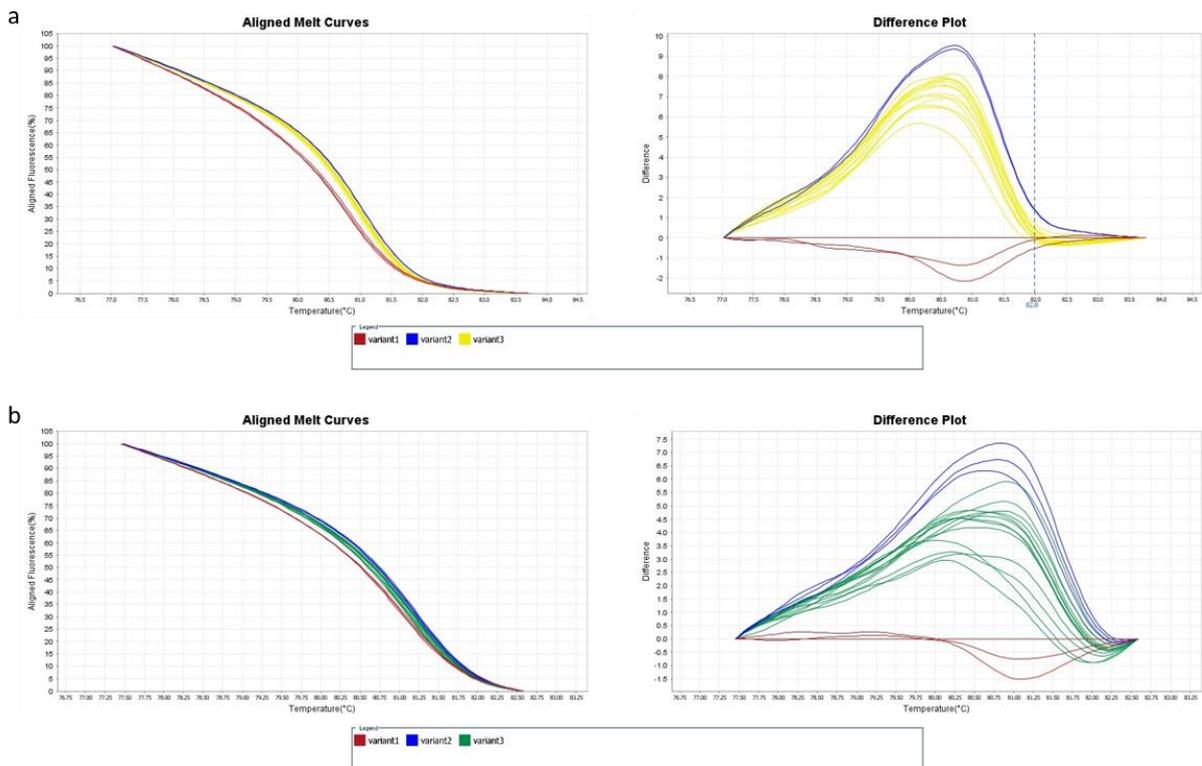
genómico de uma linha celular que está descrita como tendo a mesma mutação (PC9), de forma a comprovar o resultado de NGS e a isolar esta mutação num DNA plasmídeo. Quando alinhados os resultados da sequenciação com o produto PCR esperado através da ferramenta CLUSTAL W do software Geneious, verifica-se a presença da mutação referida anteriormente nos clones da amostra da linha celular PC9 e num dos clones da amostra de cfDNA (MUT), sendo o outro clone normal (Figura IV.7), comprovando o resultado de NGS.



**Figura IV. 7-** Alinhamento dos clones isolados por PCR do exão 19 do gene *EGFR* em cfDNA contendo a mutação p.E746\_A750delELREA e DNA genómico da PC9.

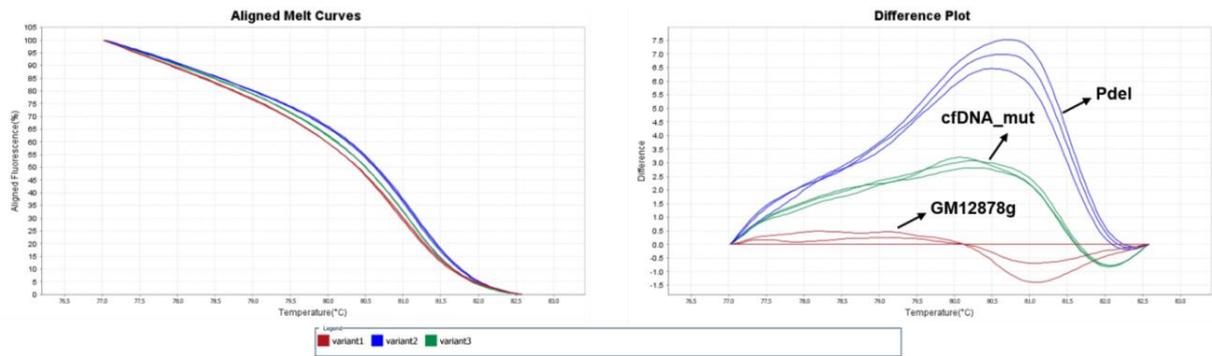
#### IV.4 Desenvolvimento do método para análise de mutações no *EGFR* em cfDNA- HRM

A utilização de ensaios de HRM tendo vista um método alternativo ao NGS na identificação de mutações em cfDNA, apresenta a vantagem de detetar mudanças mínimas numa determinada temperatura de fusão de um amplicão alvo devido a uma variação na sequência em comparação com o “wild-type”, com elevada sensibilidade. Iniciamos a otimização do método pela análise do exão 19 do gene *EGFR*, uma vez que já possuímos uma mutação do exão 19 isolada em DNA plasmídico, DNA genómico da linha celular PC9 e uma amostra de cfDNA com a mesma mutação, assim como DNA plasmídico deste exão sem mutação e DNA genómico da linha celular de referência GM12878 (controles). Numa primeira análise, procedemos à titulação do DNA plasmídico do exão 19 do gene *EGFR* da linha PC9 em DNA genómico de uma linha celular normal (iniciando em 50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 1% 0,5% e 0,25%). Como se pode observar na Figura IV.8 (e Figura Suplementar A1, em Anexo), foi possível detetar 3 variantes pela análise do HRM: a variante 1 que corresponde à linha GM12978 (normal), a variante 2 que é o DNA plasmídico com a mutação no exão 19 da linha celular PC9 isolada (Pdel) e a variante 3 que corresponde às diferentes titulações (GM12878g+Pdel), identificando este conjunto como uma nova variante. Assim, a utilização desta técnica permite detetar a presença de uma mutação com 0,25% de frequência de alelos mutantes.



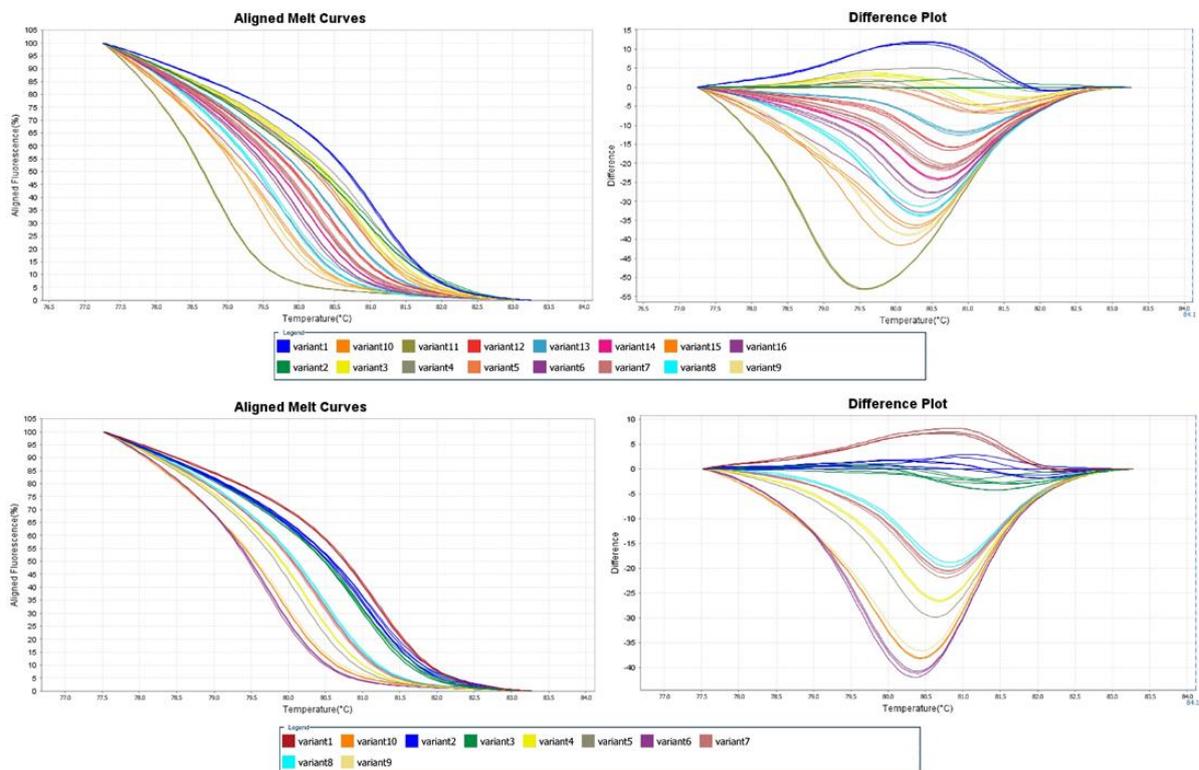
**Figura IV. 8-** Resultado do HRM demonstrando a detecção da mutação pela análise das variantes. Variante 1 que corresponde à linha GM12978 (normal), a variante 2 que é o DNA plasmidico com a mutação no exão 19 da linha celular PC9 isolada (Pdel) e a variante 3 que corresponde às diferentes titulações (GM12878g+Pdel). A variante 3 em ambos dos gráficos (a e b) corresponde as diferentes percentagens de titulações de frequência dos alelos mutantes (50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% e 0,25%).

Depois da otimização do ensaio de HRM, realizamos um ensaio com cfDNA com a mutação em causa de forma a verificar a sensibilidade do método na detecção da mutação identificada por NGS. Na experiência foi utilizado o cfDNA que possui a mutação p.E746\_A750delELREA (cfDNA\_mut), a linha celular de referência do genoma humano (GM12878g) e o DNA plasmídico do exão 19 do gene *EGFR* da linha celular PC9 (Pdel). Foi possível confirmar que através desta técnica conseguimos detetar a presença da mutação que foi anteriormente identificada por NGS assim como, a distinção da GM12878g da Pdel por variantes (Figura IV.9).



**Figura IV. 9-** Resultado do HRM demonstrando a detecção da mutação p.E746\_A750delELREA (cfDNA\_mut) e das diferentes variantes. Variante 1- GM12878; Variante 2- Pdel e Variante 3- cfDNA\_mut. Os gráficos mostram três perfis de fusão diferentes correspondentes a amostras mutacionais a verde (Variante 3), controle positivo a azul (Variante 2) e controle normal vermelho (Variante 2).

Com o resultado anterior, seguiu a necessidade de avaliar e validar a técnica com mais amostras de cfDNA de diferentes doadores saudáveis. Assim, foi realizado outro ensaio de HRM com os diferentes cfDNA, com a GM12878g, PC9g, Pdel, cfDNA\_mut e o SERASEQ como controles do ensaio como demonstrado na figura IV.10 (e Figura Suplementar A2, em Anexo).

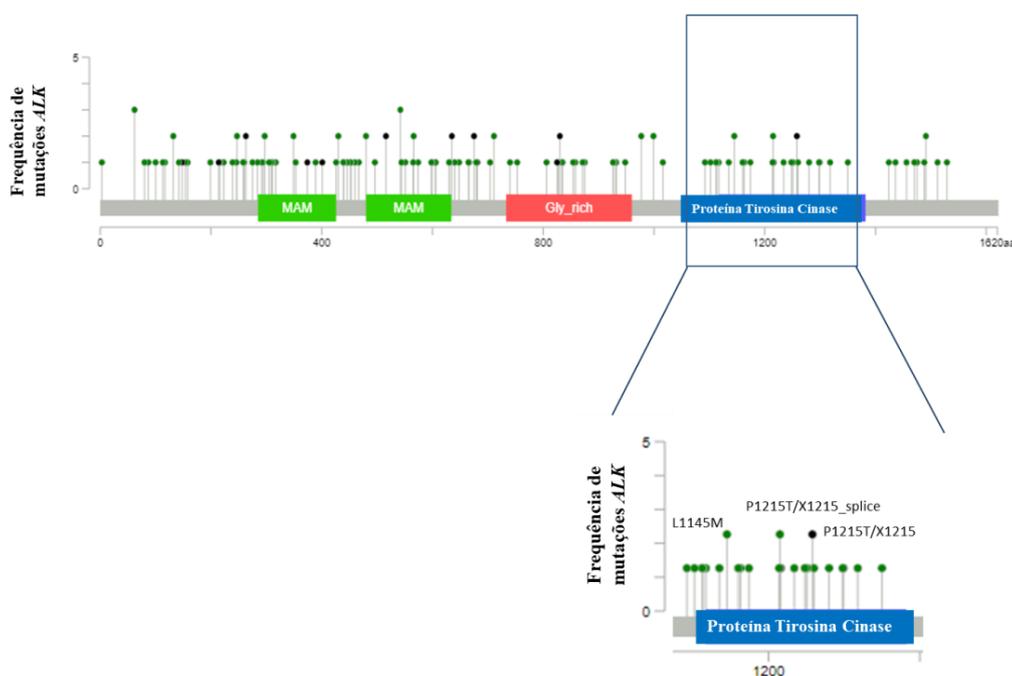


**Figura IV. 10-** Resultado do HRM demonstrando a presença das diferenças entre os cfDNA e os controles pelas diferentes variantes.

## IV.5 Análise das alterações do *ALK* preditivas de resposta terapêutica

Como referido anteriormente, as alterações no gene *ALK* são consideradas também biomarcadores preditivos de resposta terapêutica em doentes com CPNPC. Assim, apesar de ocorrerem numa menor percentagem nestes pacientes quando comparadas com o gene *EGFR*, iniciamos também a análise deste gene de forma a englobar a sua análise nas biópsias líquidas de pacientes com CPNPC.

Para tal, procedeu-se à análise de dados das mutações no *ALK* em outras bases de dados como o The cBioPortal for Cancer Genomics para determinar a frequência das mutações no *ALK*. Os dados apresentados nesta base de dados resultam do estudo combinado de 6122 amostras, de 5718 pacientes em 17 estudos sobre o *ALK*. Assim, foi possível verificar que a grande maioria das mutações detetadas no *ALK* estão presentes no domínio tirosina cinase, sendo a que tem maior frequência a L1145M (Figura IV.11).



**Figura IV. 11-** Distribuição da frequência das alterações do *ALK* ao longo da proteína. Na proteína está descrito a localização dos diferentes constituintes da proteína. A verde- “MAM domain”; vermelho – “Glycine rich protein”; azul – “Protein tyrosine kinase”. Verde- Mutações missense; Preto- Mutações truncadas (“Nonsense”, “Nonstop”, “Frameshift deletion”, “Frameshift insertion”).

Para desenvolver um teste que permita fazer a deteção de mutações no gene *ALK* preditivas de resposta terapêutica em doentes com CPNPC foi necessária proceder à análise “in silico” das mutações somáticas com relevância clínica, ou seja, mutações preditivas de resposta ao

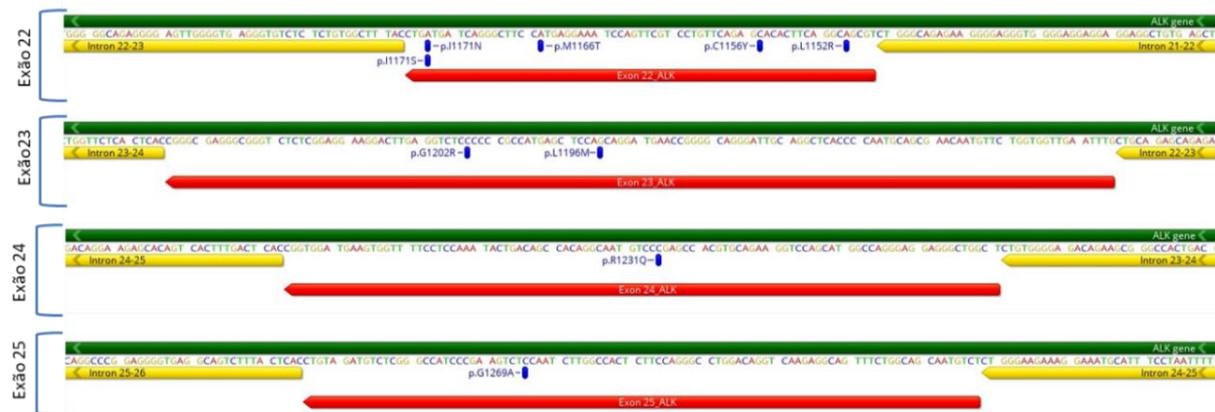
tratamento em CPNPC. Esta análise englobou a pesquisa em bases de dados como a COSMIC cancer database, onde estão descritas 12154 mutações relativas a CPNPC, juntamente com pesquisa bibliográfica. Foi, portanto, necessário fazer uma triagem das mesmas. Apenas as mutações no gene *ALK* localizadas ao longo da proteína e que possuíam indicação relativamente à sua implicação na resposta terapêutica (em artigos ou bases de dados) foram consideradas (Tabela IV.3).

**Tabela IV. 3-** Análise “in silico” das mutações do *ALK* em pacientes com CPNPC, descritas no COSMIC cancer database.

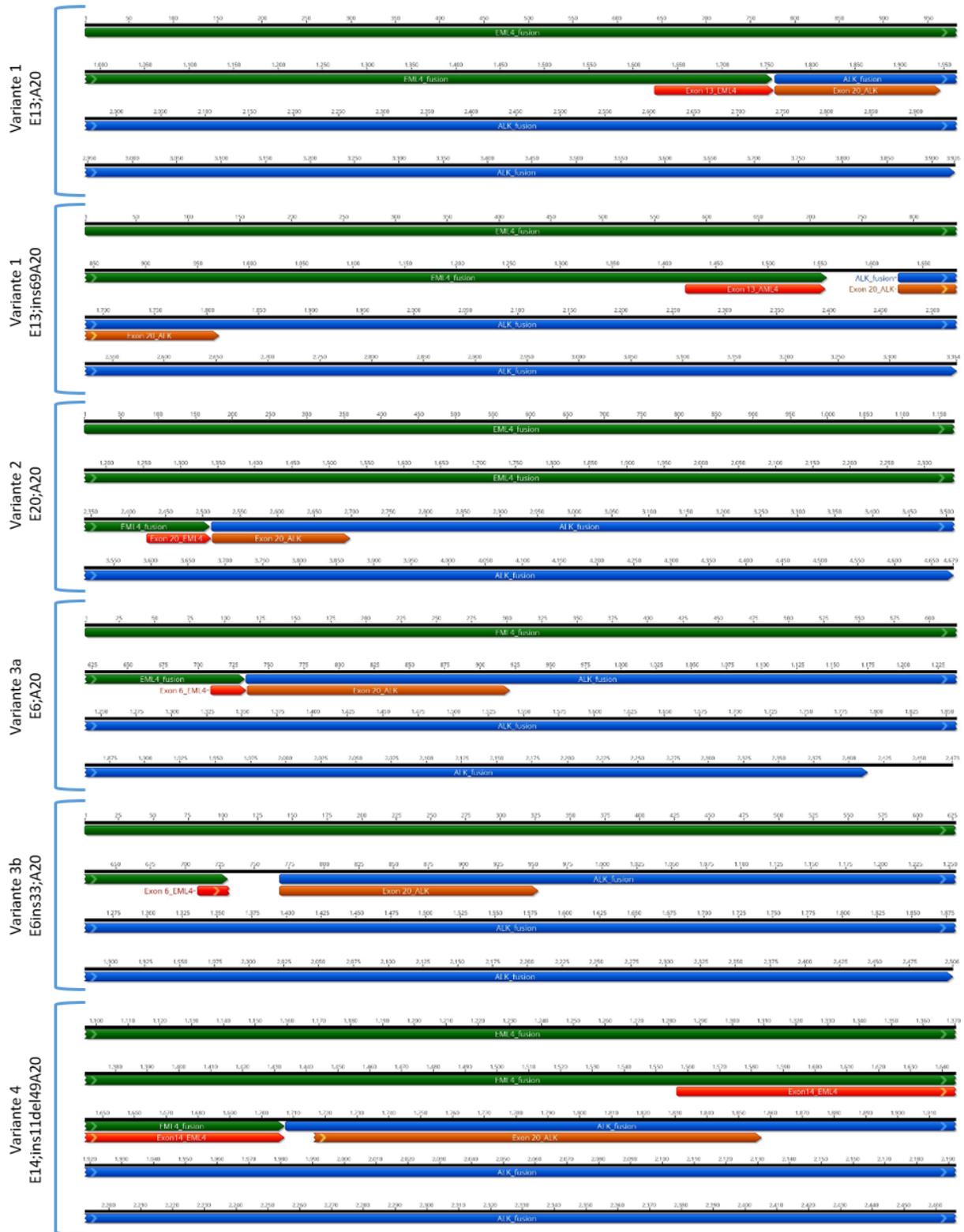
AA Mutação	CDS Mutação	Mutação ID	Resistência	Sensibilidade
<b>p.G1269A (Substitution - Missense, position 1269, G→A)</b>	c.3806G>C (Substitution, position 3806, G→C)	COSV66557991	Crizotinib	Ceritinib Alectinib Brigatinib Lorlatinib
<b>p.L1152R (Substitution - Missense, position 1152, L→R)</b>	c.3455T>G (Substitution, position 3455, T→G)	COSV66563747	Crizotinib Alectinib	Ceritinib
<b>p.C1156Y (Substitution - Missense, position 1156, C→Y)</b>	c.3467G>A (Substitution, position 3467, G→A)	COSV66562303	Lorlatinib Crizotinib Ceritinib	Alectinib
<b>p.M1166T (Substitution - Missense, position 1166, M→T)</b>	c.3497T>C (Substitution, position 3497, T→C)	COSV66588108	-	Lorlatinib
<b>p.I1171S (Substitution - Missense, position 1171, I→S)</b>	c.3512T>G (Substitution, position 3512, T→G)	COSV66567934	Alectinib	-
<b>p.I1171N (Substitution - Missense, position 1171, I→N)</b>	c.3512T>A (Substitution, position 3512, T→A)	COSV66556242	Crizotinib Alectinib	Ceritinib
<b>p.L1196M (Substitution - Missense, position 1196, L→M)</b>	c.3586C>A (Substitution, position 3586, C→A)	COSM99137	Lorlatinib	Crizotinib Ceritinib Alectinib
<b>p.G1202R (Substitution - Missense, position 1202, G→R)</b>	c.3604G>A (Substitution, position 3604, G→A)	COSV66555808	Crizotinib Alectinib Ceritinib	Ceritinib
<b>p.R1231Q (Substitution - Missense, position 1231, R→Q)</b>	c.3692G>A (Substitution, position 3692, G→A)	COSV66558755	-	Alectinib Ceritinib Brigatinib Lorlatinib

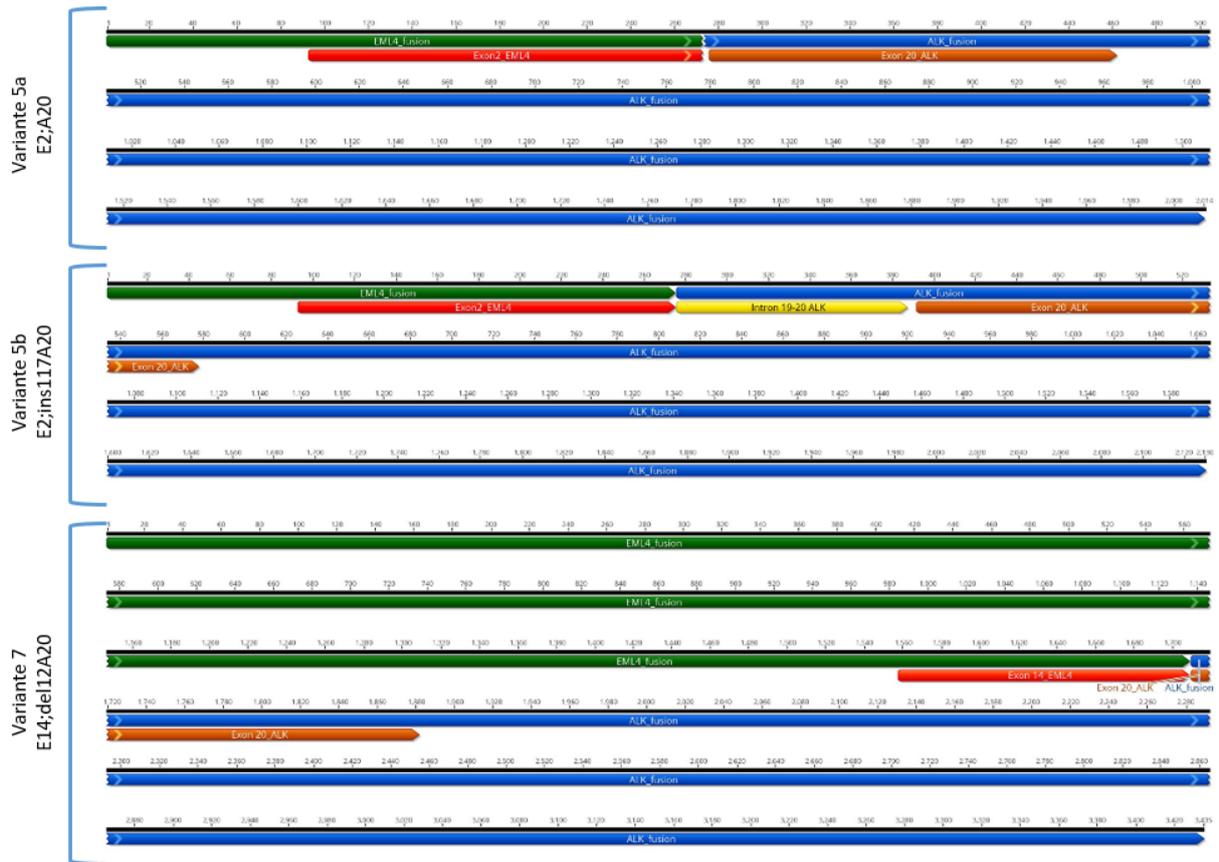
Com a realização da análise preliminar em bases de dados das alterações no gene *ALK* relacionadas com resposta terapêutica em pacientes com CPNPC, foi possível mapear fisicamente as diferentes mutações nos diferentes exões do gene *ALK* (Figura IV.12). No entanto, o que é mais frequentemente observado em CPNPC é a fusão do gene *EML4* com o gene *ALK*- por norma ocorre sempre no exão 20- podendo a quebra do gene *EML4* ocorrer em diferentes exões, sendo os mais importantes neste estudo o que se encontram no domínio tirosina cinase (22, 23, 24 e 25). A fusão *EML4-ALK* que apresenta mais mutações descritas é

o exão 22, estas diferenças nas fusões influenciam diretamente na resposta à terapia. De forma, analisamos as sequências das diferentes variantes presentes na base de dados Nucleotide do Genebank do NCBI e mapeamos nessas sequências os genes *EML4* e *ALK* (Figura IV.13) através da ferramenta Blastn do Geneious de forma a podermos desenhar ensaios para detecção destas alterações em cfDNA de pacientes com CPNPC, utilizando o gene *ALK* futuramente como um biomarcador preditivo de resposta terapêutica.



**Figura IV. 12-** Mapeamento das mutações do gene *ALK*, nos respetivos, descritas como preditivas em pacientes com CPNPC com base em dados COSMIC. A amarelo está representado os intrões, a vermelho os exões do gene *ALK* e a azul as mutações.





**Figura IV. 13-** Mapeamento dos genes *EML4* e *ALK* nas seqüências das variantes das fusões *EML4-ALK* descritas com preditivas em pacientes com CPNCP com base em dados *COSMIC*.

## **Capítulo V- Discussão**



## **V.1 Biópsias Líquidas- Otimização de procedimentos de acondicionamento e extração de cfDNA**

A introdução da medicina personalizada baseada na genómica conduziu a vários avanços na caracterização molecular de vários tipos de tumor, como o CPNPC. A utilização de amostras de tecido tumoral (que normalmente estão fixadas em formalina e embebidas em parafina – FFPE) para análise do perfil de mutações apresenta diversas desvantagens: impossibilidade da obtenção de biópsias devido ao estado avançado da doença, baixa qualidade/rendimento da extração de DNA a partir de amostras FFPE e baixa sensibilidade analítica das técnicas laboratoriais utilizadas. Neste sentido, a análise de cfDNA derivado de amostras de biópsia líquida, em particular de plasma, representa uma alternativa estabelecida para analisar a presença de mutações no *EGFR* para determinar qual o tratamento a adotar (Malapelle *et al.* 2016).

A presença de cfDNA de origem tumoral em pacientes com cancro demonstrou ser uma potencial ferramenta para o diagnóstico e prognóstico da doença. Nesse sentido, é de extremo interesse otimizar os procedimentos pré-analíticos e analíticos para maximizar o desempenho das análises baseadas em cfDNA. Por esse motivo, e tendo em vista a produção de um teste simples, certificado e com maior sensibilidade para a deteção de mutações associadas a diferentes respostas terapêuticas em biópsias líquidas de doentes com CPNPC, foi necessário otimizar/determinar diferentes fatores como: melhor método de extração de cfDNA; condições de armazenamento (tipo de tubos, tempo entre a colheita e extração).

No que se refere ao tipo de matriz utilizado para a extração de cfDNA, determinou-se o uso de plasma em detrimento do soro, tendo por base estudos já publicados, nos quais consideram as amostras de plasma com menor variabilidade e menos propensas a sofrer contaminação celular, em comparação com o soro (Trigg *et al.* 2018). Apesar das amostras de soro apresentarem maior quantidade de cfDNA quando comparadas com o plasma, pensa-se que se deve ao maior nível de lise de leucócitos durante a coagulação do sangue apresentando assim, maiores riscos de contaminação por DNAg (Bronkhorst *et al.* 2016). Assim, de forma geral, é recomendado o uso de plasma como fonte de obtenção cfDNA para todas as análises, pois contêm quantidades mais elevadas de ácidos nucleicos derivados do tumor.

A capacidade de isolar o cfDNA do plasma é indubitavelmente a etapa mais importante de todo o processo, uma vez que todas as análises posteriores dependem do seu sucesso. É, portanto, necessário adotar a melhor técnica de processamento das amostras (dupla centrifugação, que não altere o rendimento de obtenção de cfDNA e por contrapartida melhore

a qualidade do cfDNA) e a melhor técnica / kit de extração de cfDNA que pode fornecer a máxima quantidade de cfDNA com elevada qualidade. Para determinar qual o melhor método de extração de cfDNA, testamos 3 kits diferentes, todos baseados no uso de esferas magnéticas para a extração/purificação pois, a extração de cfDNA com esferas magnéticas origina maior recuperação de cfDNA com melhor qualidade do que com um sistema de coluna de rotação de membrana de sílica (Nakashima *et al.* 2018). Assim, os kits testados foram os GenElute UltraMag Cell-Free DNA – Millipore, cfKapture – MAGBIO e MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation – Applied Biosystems. Apesar da semelhança do método de extração (duas centrifugações → lise/ligação + esferas magnéticas → lavagens → eluição), o kit GenElute, em comparação com os outros aqui apresentados, é o que se apresenta melhor rendimento de extração, mais rápido e o mais fácil de execução e assim, o menos suscetível a erros de manuseamento que podem resultar em perdas de cfDNA. No entanto, a utilização da Proteinase K (que não é fornecida com o kit) que se apresenta como facultativa, mostra-se essencial (como aconselhado pelo fabricante, o seu uso aumenta o rendimento em mais de 50%). Estas características anteriormente referidas (rapidez, facilidade de manuseamento, rendimento) são essenciais para o uso na prática clínica. Além da diminuição da concentração de cfDNA nas amostras extraídas com o kit cfKapture, este é mais moroso e com mais reagentes/passos no processo de extração, o que implica não ser o ideal para o uso rotineiro em diagnóstico. O kit MAgMAX, em comparação com os outros dois kits, é o que apresenta menor rendimento de extração de cfDNA e compreende uma segunda fase de extração/lavagens, o que pode comprometer a eficácia do kit e provocar uma perda elevada de cfDNA.

Todos estes kits apresentam a vantagem de se adaptarem conforme a quantidade de plasma inicial disponível. A quantidade de plasma está diretamente relacionado com um maior rendimento de extração, onde maiores volumes iniciais de plasma possibilitam uma maior sensibilidade de deteção da variante minoritária (Devonshire *et al.* 2014) assim como, o volume de eluição que varia com a quantidade inicial (exceto MagMax, em que o pequeno volume de eluição é constante).

A extração de cfDNA a partir de plasma é um desafio porque as concentrações de cfDNA costumam ser baixas independentemente do método de extração. Em média, a concentração de cfDNA em plasma de doadores saudáveis rondam 1,8 – 44 ng/mL (Fleischhacker e Schmidt 2007, Ammerlaan e Betsou 2019). Os nossos resultados da extração de cfDNA demonstraram ser muito mais eficientes, com concentrações mais de 10 vezes superiores em indivíduos saudáveis (451 ng/mL ± 150,4). Além da eficiência do método de extração, existem outros

fatores biológicos que podem influenciar na concentração de cfDNA (peso, idade, realização exercício físico, doença, gravidez).

Para o sucesso da utilização de cfDNA como uma alternativa às biópsias tradicionais, é necessário conseguir obter amostras íntegras e livres de contaminação durante todo o processo. Os tubos de colheita de sangue representam um ponto-chave no sucesso da extração do cfDNA. Neste trabalho, comparamos a capacidade de dois tubos de colheita de sangue na estabilização de cfDNA em amostras de plasma: Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) (Roche) e Blood STASIS 21- cfDNA (MAGBIO). Os tubos Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) (Roche) contém uma solução que evita a lise celular para permitir maior detecção de cfDNA e K<sub>3</sub>DTA que impede a coagulação do sangue. Os tubos da Blood STASIS 21- ccfDNA (MAGBIO) têm a capacidade de estabilizar o cfDNA por até 21 dias à temperatura ambiente, segundo o fabricante, e previnem a apoptose de células do sangue e fragmentação do DNA genômico. Quando comparadas as concentrações de cfDNA obtidas com os dois tubos de colheita verificamos que os Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) (Roche) são eficientes na preservação de cfDNA, tendo sido obtidas concentrações mais altas (315,0 ng/mL ± 218,8). Por outro lado, os tubos Blood STASIS 21- ccfDNA (MAGBIO) apresentarem menores níveis de concentração de cfDNA, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa devido ao elevado desvio padrão que apresentam, consequência da variação da concentração de cfDNA entre os diferentes kits e dadores testados. No entanto, estes últimos tubos não estão aprovados para uso clínico, o que motivou a nossa escolha pelos primeiros tubos em detrimento destes.

Como o processamento imediato do sangue nem sempre é possível em ambiente clínico, torna-se essencial determinar o período de tempo entre a colheita de sangue e a extração de cfDNA, de forma a manter a integridade e pureza (livre de contaminação com DNA genômico) das amostras de cfDNA. Devidos aos resultados obtidos, os tubos da cfDNA (Cell-Free DNA Collection Tube (CE-IVD) (Roche) foram os escolhidos para testar a capacidade para preservar o cfDNA, realizando a extração do cfDNA às 0h, 3 dias e 6 dias após a colheita de sangue com os kits GenElute UltraMag Cell-DNA e MagMAX Total Total Free Cellule Isolation Acid. Conseguimos determinar que estes tubos apresentam uma elevada capacidade de preservar o cfDNA durante 6 dias, sendo este resultado consistente com as recomendações do seu fabricante e com estudos anteriores (Nikolaev *et al.* 2018, Parackal *et al.* 2019). Nikolaev e colegas (2018), os quais referem que não é recomendável ultrapassar os 6 dias entre a colheita e o manuseamento das amostras, pois aumenta a probabilidade de lise glóbulos brancos aumentando, assim, a concentração de DNAg. Os resultados obtidos confirmam que não há

presença de DNAg nas amostras durante os primeiros 7 dias à temperatura ambiente, havendo um aumento significativo na proporção de 305/41 pb (usado para medir os amplicões de DNAg) a partir de uma semana da colheita.

Com os nossos resultados demonstramos que os tubos Cell-Free DNA Collection Tubes<sup>®</sup> (Roche) são adequados para a colheita de biópsias líquidas (amostras de sangue) para estudos clínicos de cfDNA, podendo aguardar a amostra até por 6 dias até ao seu processamento e à extração do cfDNA, que deverá ocorrer com o kit baseado na utilização de esferas magnéticas GenElute UltraMag Cell-DNA. No entanto, é indispensável que a colheita, armazenamento, envio e processamento das amostras ocorra dentro desse período de tempo para limitar falsos negativos e positivos devido aos elevados níveis de DNAg que possam surgir.

## **V.2 Desenvolvimento do método para análise de mutações no *EGFR* em cfDNA- NGS e HRM**

Para o desenho dos ensaios para análise de alterações nos genes *EGFR* e *ALK* em amostras de biópsias líquidas de pacientes com CPNPC foi necessário realizar um estudo “in silico” para que as regiões analisadas incluíssem todas as mutações do *EGFR* e as mutações e fusões do *ALK* com valor preditivo de resposta ao tratamento com TKIs em CPNPC (descritas na base de dados COSMIC). A escolha dos genes *EGFR* e *ALK* para o desenvolvimento deste trabalho teve por base dois fatores: serem os genes que se apresentam alterados com maior frequência em pacientes CPNPC e estarem os dois envolvidos diretamente na resposta terapêutica aos TKIs. Neste trabalho, apesar do gene *ALK* ter sido analisado só em termos de mutações e fusões e desenho de “primers” para a sua análise em cfDNA/cfRNA, o trabalho aqui desenvolvido para o *EGFR* será futuramente realizado para o *ALK*. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos (multiplex PCR seguido de NGS e HRM) para a deteção de alterações no gene *EGFR* em cfDNA de pacientes de CPNPC foi o foco desta dissertação.

Como já referido anteriormente, após análise da localização de mutações no gene *EGFR* descritas em CPNPC com implicações terapêuticas (Exões 18, 19, 20 e 21), foi necessário o desenho de um conjunto de “primers” que englobem características que os tornem ideais para a sua utilização com os seguintes critérios: tamanho do amplicão ser semelhante entre os 4 exões (cerca de 160 pb); não formarem dímeros entre eles; incluir todas as mutações de interesse no *EGFR* descritas em CPNPC. Além dos critérios específicos para o desenho dos “primers” para o nosso trabalho, existem outros que de uma forma geral são necessários para

realização do PCR convencional/Multiplex de sucesso como: 1) tamanho dos “primers”; 2) tamanho do produto; 3) temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos “primers Forward” e “Reverse” ser semelhante, com diferenças de temperatura inferior a 3 °C; 4) Conteúdo de GC dos “primers”: 40-60% (Shen *et al.* 2010). Estes mostraram ser eficientes para amplificação dos exões 18, 19, 20 e 21 do *EGFR* por PCR tanto a partir de amostras de DNA genômico como de cfDNA, resultando num produto de 160 pb que foi posteriormente sequenciado (sequenciação Sanger).

Para a utilização da técnica de NGS para sequenciar os exões de interesse do gene *EGFR* a partir de amostras de cfDNA, foi necessário otimizar protocolos de PCR e de Multiplex PCR onde foi possível obter amplificação do produto de interesse com baixas quantidades de cfDNA (2ng). A quantidade de cfDNA necessária para amplificação do gene de interesse é igual em comparação com o kit aprovado pela FDA- The cobas® *EGFR* Mutation Test v.2.

No que se refere aos resultados de NGS das amostras de cfDNA amplificadas com “primers” para os exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* por multiplex PCR e purificadas com diferentes métodos, todos os exões de interesse foram mapeados e as amostras que tinham um maior número de “reads” foram a purificadas com as “Magnetic beads” o que indica uma maior qualidade (apesar de haver maior perda de material durante a purificação). O número de “reads” para o exão 19 do *EGFR* foi de 359973 o que demonstra que a utilização de cfDNA é viável para a detecção de mutações somáticas, uma vez que esse número deve exceder 300000 (Ohira *et al.* 2016).

Com a utilização do NGS foi possível detetar uma deleção específica no exão 19 do gene *EGFR* – p.E746\_A750delELREA, com uma frequência de 55,6%, demonstrando o valor deste método na identificação de mutações de *EGFR* usando cfDNA de pacientes com CPNPC. Existem estudos que referem que há mutações que são detetadas apenas no plasma, como mutação de resistência *EGFR* T790M e não pela análise de tecido por NGS. Nestes casos, as biópsias líquidas demonstram ser ainda mais importantes, uma vez que esta mutação (T790M) provavelmente não é detetada na biópsia de tecido inicial porque frequentemente surge durante a terapia como um mecanismo de resistência contra o tratamento com inibidor da tirosina cinase do *EGFR* (Alborelli *et al.* 2019). Estes dados confirmam a eficácia de nossa estratégia de teste e destacam o valor clínico do uso da biópsia líquida – cfDNA- como uma ferramenta alternativa à biópsia de tecido para monitorizar a evolução do tumor durante o tratamento.

O desenvolvimento de ensaios de HRM utilizando o cfDNA representa um método alternativo ao NGS na identificação de mutações. Esta técnica apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 67% em pacientes com CPNPC (Joy *et al.* 2020). Assim, para

desenvolver o HRM como um método alternativo ao NGS na detecção de mutações no gene *EGFR*. Esta análise focou-se no exão 19 do gene *EGFR* visto que possuíamos a mutação p.E746\_A750delELREA isolada em DNA plasmídico. Para testar a sensibilidade do ensaio, procedemos à titulação desta mutação em DNA genómico de uma linha celular normal e verificamos que através desta técnica conseguimos detetar a presença da mutação em percentagens relativamente baixas, ou seja, com uma frequência alélica de 0,25%. Este valor foi a fração de alelo mutante mais baixo identificado que pode ser detetado num ensaio de HRM, independente do tipo de mutação somática no *EGFR* (Joy *et al.* 2020). Além disso, este ensaio também se mostrou eficiente na detecção da mesma mutação (p.E746\_A750delELREA) presente em cfDNA. Esta mutação foi anteriormente detetada nesta amostra por NGS e encontra-se em heterozigotia, o que está de acordo com os dados de HRM que mostram esta amostra como tendo uma terceira variante, ou seja, uma mistura entre a Variante 1 (DNA não mutado) com a Variante 2 (DNA plasmídico com a mutação isolada). Estes dados validam o ensaio de HRM na detecção de mutações somáticas em cfDNA, sendo necessária uma análise de um maior número de mutações. Apesar de terem sido analisadas mais amostras de cfDNA de diferentes doadores saudáveis por HRM, tendo sido observada a presença de diferentes variantes, a validação destes resultados e a sua análise mais pormenorizada aguarda a sequenciação por NGS. No entanto, o HRM tem vindo a ser apontada como uma alternativa para a análise de mutações no gene *EGFR* em amostras de soro, havendo uma concordância dos resultados com os do tecido de 91,67% (Hu *et al.* 2012). Esta técnica tem como principais vantagens o baixo custo, alto rendimento, sensibilidade e especificidade. Os nossos resultados assim como de outros estudos apresentam a técnica de HRM como uma alternativa potencial e valiosa para análise de rotina de mutações no gene *EGFR* a partir de amostras de plasma de pacientes com CPNPC.

## **Capítulo VI- Conclusão e Perspetivas Futuras**



## VI- Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras

Com o objetivo de encontrar uma alternativa viável às biópsias sólidas, as biópsias líquidas constituem uma grande vantagem para a utilização corrente na prática clínica, podendo a sua análise determinar com precisão a progressão do tumor e o prognóstico e identificar com mais eficácia as terapias direcionadas apropriadas. A dificuldade de preservar a integridade do cfDNA ao longo de todo o processo desde a colheita até ao seu processamento/extração requereu a necessidade de otimizar todos procedimentos pré-analíticos e analíticos para maximizar o desempenho das análises baseadas em cfDNA. Para usar a análise do cfDNA com confiança, a otimização e padronização do processo são cruciais assim, assumirmos com os nossos resultados a melhor metodologia para promover as melhores práticas no processamento e análise do cfDNA. Assim, verificamos que os melhores tubos de conservação do cfDNA são os tubos cfDNA Cell-Free DNA Collection Tube (Roche) que mantêm a integridade do cfDNA por 6 dias e livre de contaminação de DNAg (quando este tempo não é ultrapassado) e determinamos o melhor kit de extração como o GenElute UltraMag Cell-DNA, sendo este o que apresentava o melhor rendimento entre os 3 kits testados.

Estabelecido o procedimento para o acondicionamento e extração de cfDNA de biópsias líquidas, passamos ao desenho dos ensaios experimentais para amplificação e deteção de regiões do gene *EGFR* frequentemente alteradas em CPNPC. A combinação de multiplex PCR com “primers” específicos para os exões 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* em amostras de cfDNA combinada com a técnica de NGS, mostrou-se eficiente na deteção dos diferentes exões, tendo sido reportada a presença de uma deleção no exão 19 do gene *EGFR* (p.E746\_A750delELREA), numa frequência de 55,6% e com um total de reads de 359973, o que demonstra que a utilização de cfDNA é viável para a deteção de mutações somáticas por NGS. Como uma alternativa ao NGS, desenvolvemos ensaios de HRM especificamente para o exão 19 do gene *EGFR*. Este método mostrou-se eficiente na deteção da presença da mutação p.E746\_A750delELREA em percentagens relativamente baixas, conseguindo assim determinar a sensibilidade em 0,25% de fração de alelo mutante. Com o HRM também conseguimos identificar a mesma mutação em cfDNA previamente reportada nos resultados de NGS, validando a utilização destes ensaios para a deteção de mutações somáticas utilizando o cfDNA. Será necessário no futuro, ampliar o número de amostras analisadas por NGS e HRM e dar continuidade à otimização dos ensaios de HRM para os outros exões de *EGFR*. Além disso, esta análise deverá incluir outros genes que estão envolvidos na resistência os TKIs, como o *ALK*, de forma a ser criado um painel mais abrangente para aplicação na prática clínica.

Com os resultados obtidos é possível concluir, que a utilização das biópsias líquidas poderá constituir uma alternativa válida e confiável para a detecção de mutações no *EGFR* utilizando o cfDNA como uma forma de detetar biomarcadores preditivos de resposta à terapia, colmatando falhas atuais das biópsias sólidas. No entanto, para validar o uso de biópsias líquidas em detrimento das sólidas, os resultados da análise de ambas em pacientes com CPNPC deverão ser confrontados de forma a confirmar a sua precisão e sensibilidade.

## **Capítulo VII- Referências Bibliográficas**



## VII- Referências bibliográficas

- Akula, S., Kamasani, S., Sivan, S. K., Manga, V., Vudem, D. R.eKancha, R. K. (2018). "Computational analysis of epidermal growth factor recetor mutations predicts differential drug sensitivity profiles toward kinase inhibitors." *Journal of thoracic oncology* **13**(5): 721-726.
- Alamgeer, M., Ganju, V.eWatkins, D. N. (2013). "Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer." *Current opinion in pharmacology* **13**(3): 394-401.
- Alborelli, I., Generali, D., Jermann, P., Cappelletti, M. R., Ferrero, G., Scaggiante, B., et al. (2019). "Cell-free DNA analysis in healthy individuals by next-generation sequencing: a proof of concept and technical validation study." *Cell Death & Disease* **10**(7): 534.
- Alcaide, M., Cheung, M., Hillman, J., Rassekh, S. R., Deyell, R. J., Batist, G., et al. (2020). "Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR." *Scientific reports* **10**(1): 1-10.
- Alix-Panabières, C.ePantel, K. (2016). "Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy." *Cancer discovery* **6**(5): 479-491.
- Ammerlaan, W.eBetsou, F. (2019). "Biospecimen science of blood for cfDNA genetic analyses." *Current Pathobiology Reports* **7**(2): 9-15.
- Aran, V.eOmerovic, J. (2019). "Current Approaches in NSCLC Targeting K-RAS and EGFR." *International journal of molecular sciences* **20**(22): 5701.
- Ayati, A., Moghimi, S., Salarinejad, S., Safavi, M., Pouramiri, B.eForoumadi, A. (2020). "A review on progression of epidermal growth factor recetor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy." *Bioorganic Chemistry*: 103811.
- Banini, B. A.eSanyal, A. J. (2019). "The use of cell free DNA in the diagnosis of HCC." *Hepatoma research* **5**.
- Barta, J. A., Powell, C. A.eWisnivesky, J. P. (2019). "Global epidemiology of lung cancer." *Annals of global health* **85**(1).
- Bayliss, R., Choi, J., Fennell, D. A., Fry, A. M.eRichards, M. W. (2016). "Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs." *Cell Mol Life Sci* **73**(6): 1209-1224.
- Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N.eXu, Z. (2010). "Epidermal growth factor recetor (EGFR) in lung cancer: an overview and update." *Journal of thoracic disease* **2**(1): 48.
- Boolell, V., Alamgeer, M., Watkins, D. N.eGanju, V. (2015). "The evolution of therapies in non-small cell lung cancer." *Cancers* **7**(3): 1815-1846.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: a cancer journal for clinicians* **68**(6): 394-424.
- Bronkhorst, A. J., Aucamp, J. & Pretorius, P. J. (2016). Methodological variables in the analysis of cell-free DNA. *Circulating Nucleic Acids in Serum and Plasma—CNAPS IX*, Springer: 157-163.
- Cameron, L. & Solomon, B. (2015). "New Treatment Options for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer." *Current Treatment Options in Oncology* **16**(10): 49.
- Chen, Y.-J. (2012). "Mechanisms underlying resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer." source: *Biological and Biomedical Reports* **2**(3 (2012)): 141-148.
- Cheng, L., Alexander, R. E., MacLennan, G. T., Cummings, O. W., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., et al. (2012). "Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine." *Modern Pathology* **25**(3): 347-369.
- Childress, M. A., Himmelberg, S. M., Chen, H., Deng, W., Davies, M. A. & Lovly, C. M. (2018). "ALK fusion partners impact response to ALK inhibition: differential effects on sensitivity, cellular phenotypes, and biochemical properties." *Molecular Cancer Research* **16**(11): 1724-1736.
- Chiu, C.-H., Yang, C.-T., Shih, J.-Y., Huang, M.-S., Su, W.-C., Lai, R.-S., et al. (2015). "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment response in advanced lung adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I mutations." *Journal of thoracic oncology* **10**(5): 793-799.
- Choi, Y., Kang, I.-C., Cho, E., Kim, J., Jeong, K. & Jung, S. (2013). "Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations of the Kinase Domain Inhibitor for an Epidermal Growth Factor Receptor." *Bulletin of the Korean Chemical Society* **34**.
- Chou, T.-Y., Chiu, C.-H., Li, L.-H., Hsiao, C.-Y., Tzen, C.-Y., Chang, K.-T., et al. (2005). "Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer." *Clinical Cancer Research* **11**(10): 3750-3757.
- da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A. & Tsao, M. S. (2011). "EGFR mutations and lung cancer." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **6**: 49-69.

- de Bruin, E. C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D. C., Yates, L., et al. (2014). "Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution." *Science* **346**(6206): 251-256.
- Devonshire, A. S., Whale, A. S., Gutteridge, A., Jones, G., Cowen, S., Foy, C. A., et al. (2014). "Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**(26): 6499-6512.
- Dogan, S., Shen, R., Ang, D. C., Johnson, M. L., D'Angelo, S. P., Paik, P. K., et al. (2012). "Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers." *Clinical Cancer Research* **18**(22): 6169-6177.
- Eck, M. J. & Yun, C.-H. (2010). "Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1804**(3): 559-566.
- El-Osta, H. & Shackelford, R. (2015). "Personalized treatment options for ALK-positive metastatic non-small-cell lung cancer: potential role for Ceritinib." *Pharmgenomics Pers Med* **8**: 145-154.
- Fleischhacker, M. & Schmidt, B. (2007). "Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **1775**(1): 181-232.
- Friboulet, L., Li, N., Katayama, R., Lee, C. C., Gainor, J. F., Crystal, A. S., et al. (2014). "The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer." *Cancer Discov* **4**(6): 662-673.
- Gadgeel, S. M., Gandhi, L., Riely, G. J., Chiappori, A. A., West, H. L., Azada, M. C., et al. (2014). "Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study." *The lancet oncology* **15**(10): 1119-1128.
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., et al. (2015). "Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer." *New England Journal of Medicine* **372**(21): 2018-2028.
- Gaur, P., Bhattacharya, S., Kant, S., Kushwaha, R., Singh, G. & Pandey, S. (2018). "EGFR mutation detection and its association with clinicopathological characters of lung cancer patients." *World Journal of Oncology* **9**(5-6): 151.

- Gazdar, A. (2009). "Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors." *Oncogene* **28**(1): S24-S31.
- Golding, B., Luu, A., Jones, R.eViloria-Petit, A. M. (2018). "The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC)." *Molecular cancer* **17**(1): 1-15.
- Gridelli, C., Peters, S., Sgambato, A., Casaluce, F., Adjei, A. A.eCiardiello, F. (2014). "ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC." *Cancer treatment reviews* **40**(2): 300-306.
- Grunt, M., Hillebrand, T.eSchwarzenbach, H. (2017). "Clinical relevance of size selection of circulating DNA." *Translational Cancer Research*: S171-S184.
- Haghgoo, S. M., Allameh, A., Mortaz, E., Garssen, J., Folkerts, G., Barnes, P. J., et al. (2015). "Pharmacogenomics and targeted therapy of cancer: Focusing on non-small cell lung cancer." *European Journal of Pharmacology* **754**: 82-91.
- Hallberg, B.ePalmer, R. (2016). "The role of the ALK recetor in cancer biology." *Annals of Oncology* **27**(suppl\_3): iii4-iii15.
- Harrison, P. T., Vyse, S.eHuang, P. H. (2019). Rare epidermal growth factor recetor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Seminars in Cancer Biology*, Elsevier.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D.eBoshoff, C. (2018). "The biology and management of non-small cell lung cancer." *Nature* **553**(7689): 446-454.
- Hofman, V. J., Ilie, M.eHofman, P. M. (2016). "Detection and characterization of circulating tumor cells in lung cancer: Why and how?" *Cancer cytopathology* **124**(6): 380-387.
- Hu, C., Liu, X., Chen, Y., Sun, X., Gong, Y., Geng, M., et al. (2012). "Direct serum and tissue assay for EGFR mutation in non-small cell lung cancer by high-resolution melting analysis." *Oncology reports* **28**(5): 1815-1821.
- Huang, L.eFu, L. (2015). "Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors." *Acta Pharmaceutica Sinica B* **5**(5): 390-401.
- Imai, K.eTakaoka, A. (2006). "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer." *Nature Reviews Cancer* **6**(9): 714-727.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R.-D., et al. (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." *Cancer research* **61**(4): 1659-1665.
- Johnson, T. W., Richardson, P. F., Bailey, S., Brooun, A., Burke, B. J., Collins, M. R., et al. (2014). "Discovery of (10 R)-7-Amino-12-fluoro-2, 10, 16-trimethyl-15-oxo-10, 15, 16,

- 17-tetrahydro-2H-8, 4-(metheno) pyrazolo [4, 3-h][2, 5, 11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations." *Journal of medicinal chemistry* **57**(11): 4720-4744.
- Joy, R. A., Thelakkattusserry, S. K., Vikkath, N., Bhaskaran, R., Krishnan, S., Vasudevan, D., et al. (2020). "Somatic mutation detection efficiency in EGFR: a comparison between high resolution melting analysis and Sanger sequencing." *BMC Cancer* **20**(1): 902.
- Kim, E., Feldman, R.eWistuba, II (2018). "Update on EGFR Mutational Testing and the Potential of Noninvasive Liquid Biopsy in Non-Small-cell Lung Cancer." *Clin Lung Cancer* **19**(2): 105-114.
- Kobayashi, Y.eMitsudomi, T. (2016). "Not all EGFR mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy." *Cancer Science* **107**.
- Kobayashi, Y., Togashi, Y., Yatabe, Y., Mizuuchi, H., Jangchul, P., Kondo, C., et al. (2015). "EGFR exon 18 mutations in lung cancer: molecular predictors of augmented sensitivity to afatinib or neratinib as compared with first-or third-generation TKIs." *Clinical Cancer Research* **21**(23): 5305-5313.
- Kohsaka, S., Petronczki, M., Solca, F.eMaemondo, M. (2019). "Tumor clonality and resistance mechanisms in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: implications for therapeutic sequencing." *Future Oncology* **15**(6): 637-652.
- Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Yoshida, K., Hida, T., Tsuboi, M., et al. (2006). "Analysis of epidermal growth factor recetor gene mutation in patients with non–small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib." *Clinical Cancer Research* **12**(19): 5764-5769.
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T.eGrinshpun, A. (2019). "Life and death of circulating cell-free DNA." *Cancer biology & therapy* **20**(8): 1057-1067.
- Landau, M.eBen-Tal, N. (2008). "Dynamic equilibrium between multiple active and inactive conformations explains regulation and oncogenic mutations in ErbB recetors." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **1785**(1): 12-31.
- Leal, L. F., de Paula, F. E., De Marchi, P., de Souza Viana, L., Pinto, G. D. J., Carlos, C. D., et al. (2019). "Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations." *Scientific reports* **9**(1): 1-10.

- Lee, C. K., Brown, C., Gralla, R. J., Hirsh, V., Thongprasert, S., Tsai, C.-M., et al. (2013). "Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis." *Journal of the National Cancer Institute* **105**(9): 595-605.
- Li, W., Qiu, T., Guo, L., Ling, Y., Gao, Y., Ying, J., et al. (2018). "Primary and acquired EGFR T790M-mutant NSCLC patients identified by routine mutation testing show different characteristics but may both respond to osimertinib treatment." *Cancer letters* **423**: 9-15.
- Lianidou, E.eHoon, D. (2017). "Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics."
- Lin, C., Shi, X., Yang, S., Zhao, J., He, Q., Jin, Y., et al. (2019). "Comparison of ALK detection by FISH, IHC and NGS to predict benefit from crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer." *Lung Cancer* **131**: 62-68.
- Lin, J. J., Zhu, V. W., Yoda, S., Yeap, B. Y., Schrock, A. B., Dagogo-Jack, I., et al. (2018). "Impact of EML4-ALK variant on resistance mechanisms and clinical outcomes in ALK-positive lung cancer." *Journal of clinical oncology* **36**(12): 1199.
- Majem, M., Juan, O., Insa, A., Reguart, N., Trigo, J. M., Carcereny, E., et al. (2019). "SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018)." *Clinical and Translational Oncology* **21**(1): 3-17.
- Malapelle, U., Pisapia, P., Rocco, D., Smeraglio, R., di Spirito, M., Bellevicine, C., et al. (2016). "Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients." *Translational lung cancer research* **5**(5): 505.
- Malik, S. M., Maher, V. E., Bijwaard, K. E., Becker, R. L., Zhang, L., Tang, S. W., et al. (2014). "US Food and Drug Administration approval: crizotinib for treatment of advanced or metastatic non-small cell lung cancer that is anaplastic lymphoma kinase positive." *Clinical Cancer Research* **20**(8): 2029-2034.
- Mamdani, H., Ahmed, S., Armstrong, S., Mok, T.eJalal, S. I. (2017). "Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment." *Translational lung cancer research* **6**(6): 648-660.
- Martin, P., Kelly, C. M.eCarney, D. (2006). "Epidermal growth factor recetor-targeted agents for lung cancer." *Cancer Control* **13**(2): 129-140.
- Mattox, A. K., Bettgowda, C., Zhou, S., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W.eVogelstein, B. (2019). "Applications of liquid biopsies for cancer." *Science translational medicine* **11**(507): eaay1984.

- Mok, T., Wu, Y.-L., Lee, J. S., Yu, C.-J., Sriuranpong, V., Sandoval-Tan, J., et al. (2015). "Detection and dynamic changes of EGFR mutations from circulating tumor DNA as a predictor of survival outcomes in NSCLC patients treated with first-line intercalated erlotinib and chemotherapy." *Clinical Cancer Research* **21**(14): 3196-3203.
- Mosesson, Y.eYarden, Y. (2004). Oncogenic growth factor recetors: implications for signal transduction therapy. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Nakashima, C., Sato, A., Abe, T., Kato, J., Hirai, M., Nakamura, T., et al. (2018). "Automated DNA extraction using cellulose magnetic beads can improve EGFR point mutation detection with liquid biopsy by efficiently recovering short and long DNA fragments." *Oncotarget* **9**(38): 25181-25192.
- Nikolaev, S., Lemmens, L., Koessler, T., Blouin, J.-L.eNousspikel, T. (2018). "Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory." *Analytical biochemistry* **542**: 34-39.
- Nishimoto, S., Fukuda, D., Higashikuni, Y., Tanaka, K., Hirata, Y., Murata, C., et al. (2016). "Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance." *Science advances* **2**(3): e1501332.
- Ohira, T., Sakai, K., Matsubayashi, J., Kajiwara, N., Kakihana, M., Hagiwara, M., et al. (2016). "Tumor volume determines the feasibility of cell-free DNA sequencing for mutation detection in non-small cell lung cancer." *Cancer Science* **107**(11): 1660-1666.
- Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." *Science* **304**(5676): 1497-1500.
- Parackal, S., Zou, D., Day, R., Black, M.eGuilford, P. (2019). "Comparison of Roche Cell-Free DNA collection Tubes® to Streck Cell-Free DNA BCT® s for sample stability using healthy volunteers." *Practical laboratory medicine* **16**: e00125.
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., et al. (2012). "Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial." *The lancet oncology* **13**(3): 239-246.
- Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G., Smirolfo, V., Picciotto, M., Zanghi, M., et al. (2017). "Third generation EGFR TKIs in EGFR-mutated NSCLC: where are we now and where are we going." *Critical reviews in oncology/hematology* **117**: 38-47.

- Sabir, S. R., Yeoh, S., Jackson, G.eBayliss, R. (2017). "EML4-ALK variants: biological and molecular properties, and the implications for patients." *Cancers* **9**(9): 118.
- Santarpia, M., Liguori, A., #039, Aveni, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., et al. (2018). "Liquid biopsy for lung cancer early detection." *Journal of thoracic disease*: S882-S897.
- Schmidt-Hansen, M., Berendse, S., Hamilton, W.eBaldwin, D. R. (2017). "Lung cancer in symptomatic patients presenting in primary care: a systematic review of risk prediction tools." *Br J Gen Pract* **67**(659): e396-e404.
- Schuchert, M. J., Normolle, D. P., Awais, O., Pennathur, A., Wilson, D. O., Luketich, J. D., et al. (2019). "Factors influencing recurrence following anatomic lung resection for clinical stage I non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **128**: 145-151.
- Sequist, L. V., Gettinger, S., Senzer, N. N., Martins, R. G., Jänne, P. A., Lilenbaum, R., et al. (2010). "Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non–small-cell lung cancer." *Journal of clinical oncology* **28**(33): 4953.
- Sequist, L. V., Neal, J. W., Jett, J. R.eRoss, M. (2016). "Personalized, genotypedirected therapy for advanced non-small cell lung cancer." *UpToDate, UpToDate*.
- Sequist, L. V., Soria, J.-C., Goldman, J. W., Wakelee, H. A., Gadgeel, S. M., Varga, A., et al. (2015). "Rociletinib in EGFR-mutated non–small-cell lung cancer." *New England Journal of Medicine* **372**(18): 1700-1709.
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J.eHaber, D. A. (2007). "Epidermal growth factor recetor mutations in lung cancer." *Nature Reviews Cancer* **7**(3): 169-181.
- Sharma, S. V., Fischbach, M. A., Haber, D. A.eSettleman, J. (2006). "'Oncogenic shock': explaining oncogene addiction through differential signal attenuation." *Clinical Cancer Research* **12**(14): 4392s-4395s.
- Shaw, A. T., Solomon, B. J., Besse, B., Bauer, T. M., Lin, C.-C., Soo, R. A., et al. (2019). "ALK resistance mutations and efficacy of lorlatinib in advanced anaplastic lymphoma kinase-positive non–small-cell lung cancer." *Journal of clinical oncology* **37**(16): 1370.
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., et al. (2010). "MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design." *BMC Bioinformatics* **11**(1): 143.
- Sher, T., Dy, G. K.eAdjei, A. A. (2008). *Small cell lung cancer*. Mayo Clinic Proceedings, Elsevier.

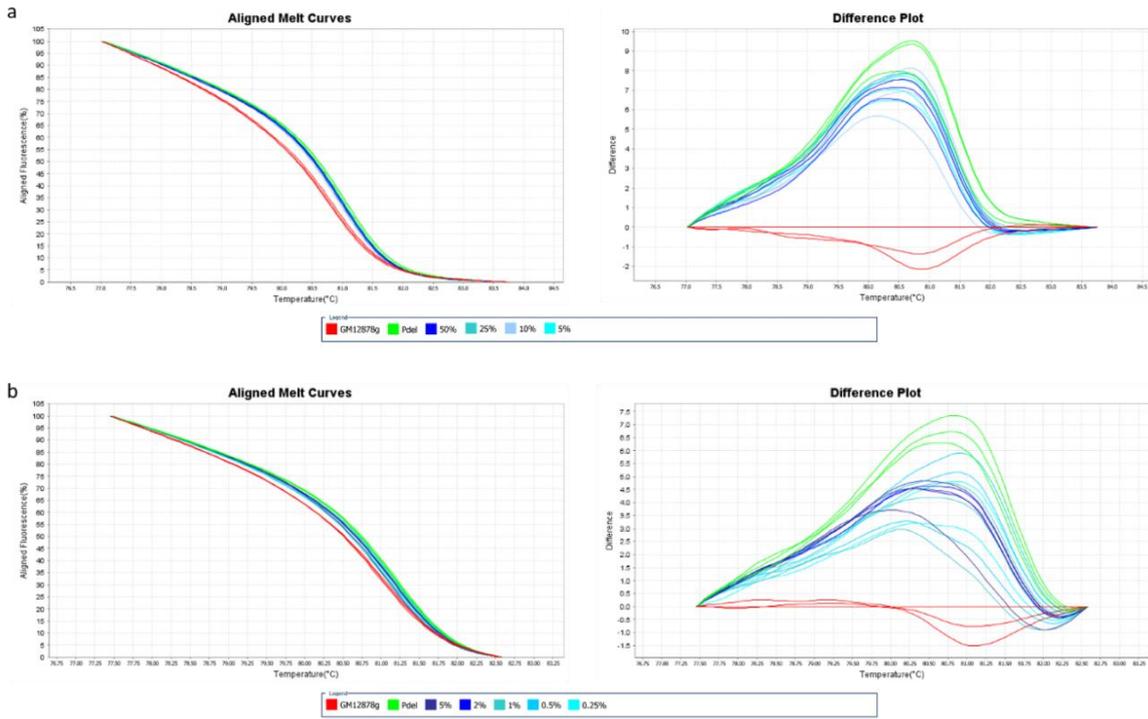
- Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I. I., et al. (2005). "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers." *Journal of the National Cancer Institute* **97**(5): 339-346.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2020). "Cancer statistics, 2020." *CA: a cancer journal for clinicians* **70**(1): 7-30.
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., et al. (2007). "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." *Nature* **448**(7153): 561-566.
- Song, Z., Ge, Y., Wang, C., Huang, S., Shu, X., Liu, K., et al. (2016). "Challenges and perspectives on the development of small-molecule EGFR inhibitors against T790M-mediated resistance in non-small-cell lung cancer: miniperspective." *Journal of medicinal chemistry* **59**(14): 6580-6594.
- Su, J., Zhong, W.-Z., Zhang, X., Huang, Y., Yan, H., Yang, J., et al. (2017). "Molecular characteristics and clinical outcomes of EGFR exon 19 indel subtypes to EGFR TKIs in NSCLC patients." *Oncotarget* **8**.
- Sullivan, I., Planchard, D. (2016). "ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments." *Ther Adv Med Oncol* **8**(1): 32-47.
- Tan, C.-S., Gilligan, D., Pacey, S. (2015). "Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer." *The lancet oncology* **16**(9): e447-e459.
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., et al. (2016). "Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer." *Science translational medicine* **8**(346): 346ra392-346ra392.
- Travis, W. D. (2004). "Pathology & genetics tumours of the lung, pleura, thymus and heart." *World Health Organization classification of tumours*.
- Trigg, R. M., Martinson, L. J., Parpart-Li, S., Shaw, J. A. (2018). "Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature." *Heliyon* **4**(7): e00699.
- Tuononen, K., Sarhadi, V. K., Wirtanen, A., Rönty, M., Salmenkivi, K., Knuutila, A., et al. (2013). "Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: a comparison of four methods." *BioMed research international* **2013**.
- Vansteenkiste, J., De Ruyscher, D., Eberhardt, W., Lim, E., Senan, S., Felip, E., et al. (2013). "Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice

- Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Annals of Oncology* **24**(suppl\_6): vi89-vi98.
- Vora, N. L., Johnson, K. L., Subhabrata, B., Catalano, P. M., Hauguel-De Mouzon, S.eBianchi, D. W. (2012). "A multi-factorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI." *Prenatal diagnosis* **32**(9): 912.
- Vyse, S.eHuang, P. H. (2019). "Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer." *Signal Transduction and Targeted Therapy* **4**(1): 5.
- Wang, S., Song, Y.eLiu, D. (2017). "EAI045: the fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance." *Cancer letters* **385**: 51-54.
- Wu, W., Haderk, F.eBivona, T. G. (2017). "Non-Canonical Thinking for Targeting ALK-Fusion Onco-Proteins in Lung Cancer." *Cancers (Basel)* **9**(12).
- Wu, Y.-C., Chang, I.-C., Wang, C.-L., Chen, T.-D., Chen, Y.-T., Liu, H.-P., et al. (2013). "Comparison of IHC, FISH and RT-PCR methods for detection of ALK rearrangements in 312 non-small cell lung cancer patients in Taiwan." *PLoS ONE* **8**(8): e70839.
- Yasuda, H., Park, E., Yun, C.-H., Sng, N. J., Lucena-Araujo, A. R., Yeo, W.-L., et al. (2013). "Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor recetor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer." *Science translational medicine* **5**(216): 216ra177-216ra177.
- Yoshida, T., Oya, Y., Tanaka, K., Shimizu, J., Horio, Y., Kuroda, H., et al. (2016). "Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer." *J Clin Oncol* **34**(28): 3383-3389.
- Yun, C.-H., Mengwasser, K. E., Toms, A. V., Woo, M. S., Greulich, H., Wong, K.-K., et al. (2008). "The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(6): 2070-2075.
- Zappa, C.eMousa, S. A. (2016). "Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances." *Translational lung cancer research* **5**(3): 288.
- Zou, H. Y., Li, Q., Lee, J. H., Arango, M. E., McDonnell, S. R., Yamazaki, S., et al. (2007). "An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms." *Cancer Res* **67**(9): 4408-4417.

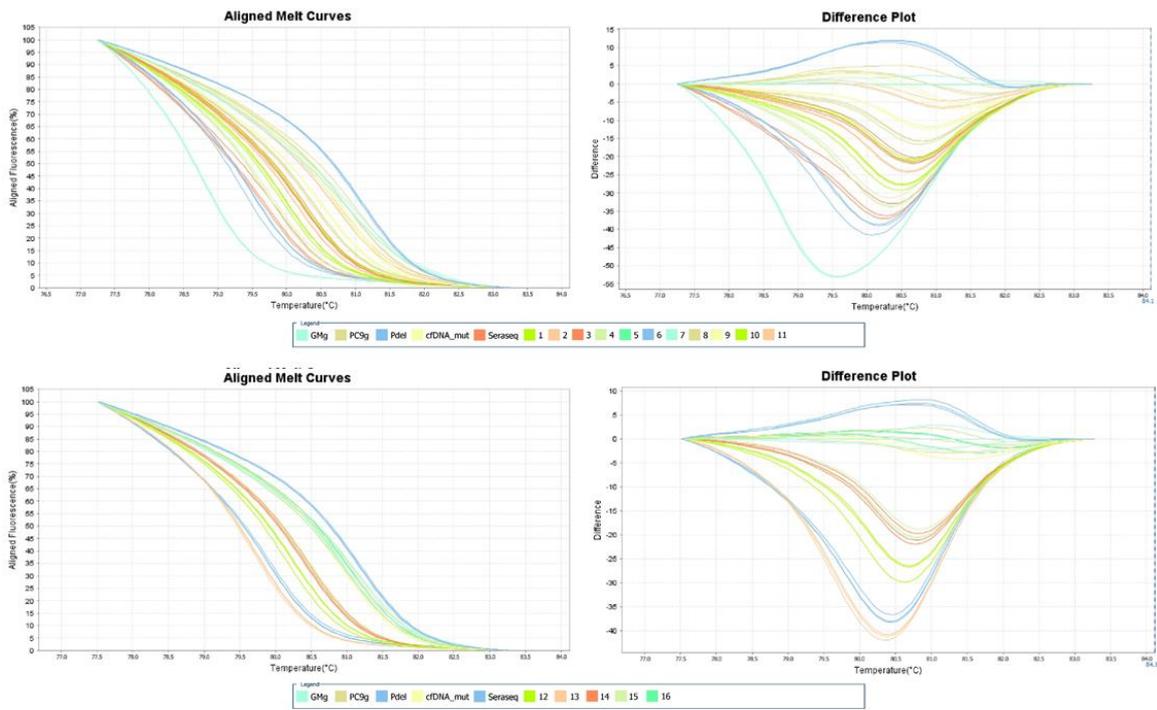
## **Anexos**



# ANEXOS



**Figura A. 1-** Resultado do HRM demonstrando a presença da mutação (Pdel) nas diferentes percentagens.



**Figura A. 2 -** Resultado do HRM demonstrando a presença das diferenças entre os cfDNA e os controles.