

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SERGIO LUNARDON PADILHA

PESQUISA DAS MUTAÇÕES EM AMPLIFICAÇÕES EM CORTES DE PARAFINA
DE PACIENTES COM NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL ATRAVÉS
DO MÉTODO NGS



CURITIBA

2018

SERGIO LUNARDON PADILHA

PESQUISA DAS MUTAÇÕES EM AMPLIFICAÇÕES EM CORTES DE PARAFINA
DE PACIENTES COM NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL ATRAVÉS
DO MÉTODO NGS

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e
da Saúde, no Curso de Pós-Graduação em Medicina
Interna e da Saúde, Setor de Ciências da Saúde
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Zanis Neto

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS – SIBI/UFPR,
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – SD, BIBLIOTECÁRIA CRISTIANE SINIMBU
SANCHEZ CRB9/1848, COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

P123 Padilha, Sergio Lunardon

Pesquisa das mutações em ampliações em cortes de parafina de pacientes com neoplasia trofoblástica gestacional através do método NGS [recurso eletrônico] / Sergio Lunardon Padilha. – Curitiba, 2018.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, 2018.

Orientador: Prof. Dr. José Zanis Neto.

1. Doença Trofoblástica Gestacional. 2. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. 3. Mola Hidatiforme. I. Zanis Neto, José. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: WP 465




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SERGIO LUNARDON PADILHA** intitulada: **PESQUISA DAS MUTAÇÕES EM AMPLIFICAÇÕES EM CORTES DE PARAFINA DE PACIENTES COM NEOPASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL ATRAVÉS DO MÉTODO NGS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 19 de Outubro de 2018.


JOSE ZANIS NETO
Presidente da Banca Examinadora


JOSE CLAUDIO CASALI DA ROCHA
Avaliador Externo


SERGIO OSSAMU IOSHII
Avaliador Externo


GRAZIELLE MORAES LOSSO
Avaliador Externo


PLINIO GASPERIN JUNIOR
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR);

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e da Saúde;

À professora Dr.^a Iara Messias Reason na perseverança na luta para desenvolver novas pesquisas em combate ao câncer;

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR);

Aos Patologistas Prof. Dr.^a Lúcia Noronha e Prof. Dr. Sergio Ioshii pela colaboração nas revisões anátomo patológicas;

Ao Laboratório Mantis e à Dr.^a Grazielle Moraes Losso pela realização dos testes moleculares e apoio na interpretação dos testes.

À Diretoria do Instituto de Oncologia do Paraná pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Bruno Maurizio Grillo, agradeço pela enorme colaboração, experiência e conhecimento.

RESUMO

Introdução: As Neoplasias Trofoblásticas Gestacionais (NTGs) compreendem um grupo heterogêneo de doenças raras, sendo que sua característica fundamental é a proliferação atípica do epitélio trofoblástico placentário. Em estudos anteriores estudou-se da expressão do ERBB2 em molas Hidatiforme através de processos imuno-histoquímicos, entretanto os resultados podem ser significativamente afetados por questões técnicas, especialmente em tecidos fixados em parafina, pela subjetividade na interpretação. As tecnologias para sequenciamento de DNA melhoraram muito, aumentando a velocidade na realização do exame, redução no custo e confiabilidade.

Método: O sequenciamento Next-Generation Sequencing (NGS) foi realizado na plataforma Gene Reader (QIAGEN) para regiões e variantes de interesse clínico dos genes *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *DDR2*, *EGFR*, *ESR1*, *ERBB2*, *FGFR1*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *NTRK1*, *PTEN*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *ROS1*, *RICTOR*. Também foram analisadas CNVs (Alteração do número de cópias) dos genes *EGFR*, *ERBB2*, *MET*, *FGFR1* e *RICTOR*. Para análise de dados foi utilizado o software Clinical Insight Analyze (QCI-A).

Resultado: Foram analisadas 15 amostras provenientes de NTGs as quais foram identificadas CNVs nos genes *ERBB2* (93%), *FGFR1* (53%), *RICTOR* (26%) e *EGFR* (46%). Também foi identificada mutações patogênicas nos *ERBB2*, *EGFR*, *FGFR1*, *ALK*, *NRAS*, *KRAS*, *MAP2k1*, *MET*, *PDGFRA*, *AKT*, *KIT*, *PIK3CA* e *ROS1*, entretanto com maior frequência no *EGFR*, *ERBB2* e *FGFR1*.

Conclusão: A alteração do número de cópias CNVs nos genes *ERBB2*, *EGFR*, *FGFR1* e *RICTOR* e mutações nos genes *EGFR*, *ERBB2* e *FGFR1* são características genotípicas envolvidas na patogênese das NTGs. A alta frequência de CNVs no gene *ERBB2* pode ser indicado como marcador de drogas alvo.

Palavras-chave: Doença Trofoblástica Gestacional. NGS. mutações.

ABSTRACT

Introduction: Gestational Trophoblastic Neoplasms (GTNs) comprise a heterogeneous group of rare diseases, and their fundamental characteristic is presenting an atypical proliferation of the placental trophoblastic epithelium. Although ERBB2 expression has been previously studied in hydatidiform moles using immunohistochemistry, those results may be significantly affected by technical issues, especially in paraffin-embedded tissues and subjectivity interpretation. New DNA sequencing technologies have dramatically improved for sequencing the entire genome, increasing test speed, reducing cost and reliability. **Methods:** Using NGS Qiagen reader for DNA sequencing, we evaluate the frequency of gene mutations and amplifications using a gene panel: ERBB2, AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PTEN, PDGFRA, PIK3CA, ROS1 and RICTOR in paraffin embedded GTNs. **Results:** Amplifications were found: ERBB2, EGFR, FGFR1 and RICTOR, mutations labeled as pathogenic were found in ERBB2, EGFR,FGFR1, ALK, NRAS, KRAS, MAP2k1, MET, PDGFRA, AKT, KIT, PIK3CA and ROS1, but higher number in EGFR, ERBB2 and FGFR1. **Conclusion:** Amplification and mutations of the ERBB2, EGFR, FGFR1 and RICTOR genes are highly expressed in the NTGs as part of their pathogenesis and supporting markers as a basis to a targeted drug therapy.

Keywords: Gestational Trophoblastic Neoplasms, NGS, mutations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ORIGEM GENÉTICA DAS GESTAÇÕES MOLARES COMPLETAS.....	16
FIGURA 2 - ORIGEM GENÉTICA DAS GESTAÇÕES MOLARES PARCIAIS	17
FIGURA 3 - IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PESQUISA DO ERBB2.....	24
FIGURA 4 - AVANÇOS NOS SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO	27
FIGURA 5 - VIA DE TRANSDUÇÃO DOS SINAIS CONTROLADOS PELA ATIVAÇÃO DO EGFR.....	30
FIGURA 6 - FREQUÊNCIA DA SUPEREXPRESSÃO DO ERBB2 NAS DIVERSAS NEOPLASIAS	31
FIGURA 7 - SÍTIOS DE ATUAÇÃO DAS MEDICAÇÕES ANTI ERBB2.....	32
FIGURA 8 - MICROSCOPIA ÓPTICA HE E AS VÁRIAS FORMAS HISTOPATOLÓGICAS DA NTG	42
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO DO QIAGEN	44
FIGURA 10 - FREQUÊNCIA DAS AMPLIFICAÇÕES NOS ONCOGENES ESTUDADOS.....	56
FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO DO ERBB2 E FGFR1	56

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ÍNDICE PROGNÓSTICO DAS NTGs	21
QUADRO 2 - INDICAÇÕES PARA QUIMIOTERAPIA	22
QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES	47
QUADRO 4 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 1.....	48
QUADRO 5 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 2.....	49
QUADRO 6 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 3.....	49
QUADRO 7 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 4.....	50
QUADRO 8 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 5.....	50
QUADRO 9 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 6.....	50
QUADRO 10 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 7.....	51
QUADRO 11 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 8.....	51
QUADRO 12 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 9.....	52
QUADRO 13 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 10.....	53
QUADRO 14 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 11.....	54
QUADRO 15 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 12.....	54
QUADRO 16 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 13.....	55
QUADRO 17 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 14.....	55
QUADRO 18 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 15.....	55
QUADRO 19 - PAINEL DAS AMPLIFICAÇÕES.....	56
QUADRO 20 - PAINEL DAS MUTAÇÕES	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ActD	- Actinomicina D
AJCC	- <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	- Adenosina Trifosfato
beta-HCG	- Subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana
CISH	- Hibridização <i>In Situ</i> Cromogênica
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DTG	- Doença Trofoblástica Gestacional
EGFR	- Fator de Crescimento Epidérmico
EMA-CO	- Etoposido, Methotrexato, ActD, Ciclofosfamida e Vincristina
EMA-EP	- Etoposido, Methotrexato, ActD, Etoposido e cisplatina
ERBB2	- <i>Avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ESMO	- Sociedade Europeia de Oncologia Médica
FGFR	- Receptor do Fator de Crescimento do Fibroblasto
FIGO	- Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FISH	- Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
hCG	- Gonadotrofina Coriônica
Her2-Neu	- ERBB2
ICE	- Ifosfamida, Etoposido e Cisplatina
IHQ	- Imuno-histoquímica
MAPK	- Proteína Quinase Mitogeno Ativada
MHC	- Mola Hidatiforme Completa
MHP	- Mola Hidatiforme Parcial
mTOR	- <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NGS	- Sequenciamento de Nova Geração
NTG	- Neoplasia Trofoblástica Gestacional
PC	- Paclitaxel e carboplatina
PD-1	- Morte Programada 1
PI3K	- Fosfatidilinositol 3-quinase
PVB	- Cisplatina, Vinblastina e Bleomicina
Rb	- Retinoblastoma
RE	- Receptor Estrogênico

- RICTOR - *Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*
(subunidade do *mTORC2*)
- RTK - Receptor da Tirosina Quinase
- TDM1 - Trastuzumabe Emtansina
- TE-TP - Paclitaxel e etoposido - paclitaxel e cisplatina
- TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta
- TKI - Inibidor da Tirosina Quinase
- TTE - Tumor Trofoblástico Epitelióide
- TTSP - Tumor Trofoblástico de Sítio Placentário
- VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
- β HCG - Fração beta da Gonadotrofina Coriônica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL	14
2.2.1	Definição.....	14
2.2.2	Epidemiologia	14
2.2.3	Patogenia	15
2.2.4	Genética	17
2.2.5	Oncogenes e genes supressores	19
2.2.6	Fatores de risco	20
2.2.7	Tratamento	22
2.3	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS ONCOGENES	23
2.3.1	Imuno-histoquímica	23
2.3.2	FISH	25
2.3.3	Biologia molecular	25
2.3.3.1	Sequenciamento de primeira geração	25
2.3.3.2	NGS.....	26
2.4	ONCOGENES	28
2.4.1	ERBB2 - HER2/NEU.....	28
2.4.1.1	Definição.....	28
2.4.1.2	Terapias alvo anti <i>ERBB2</i>	31
2.4.2	FGFR1	33
2.4.3	RICTOR.....	34
2.4.4	EGFR.....	35
2.4.5	MAP2K1	36
2.4.6	MET	36
2.4.7	RAS	37
2.4.8	ALK.....	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	DESENHO	41

4.2	PROTOCOLO DE DISSECÇÃO DA AMOSTRA	42
4.3	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL	43
4.4	ANÁLISE DO DNA TUMORAL	43
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

As Neoplasias Trofoblásticas Gestacionais (NTGs) compreendem um grupo heterogêneo de doenças raras, sendo que sua característica fundamental é a apresentação de proliferação atípica do epitélio trofoblástico placentário. Este processo proliferativo tem potencial para tornar-se uma neoplasia invasiva em 20% das molas hidatiformes.

O Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná é um centro de referência no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com Mola Hidatiforme em conjunto com o serviço de Oncologia Clínica dando continuidade ao tratamento nos casos de persistência molar e necessidade tratamento oncológico.

Apesar da expressão do ERBB2 ter sido estudada anteriormente em molas hidatiformes, demonstrando uma correlação entre a agressividade das molas hidatiformes e a sua expressão proteica, entretanto os resultados podem ser significativamente afetados por questões técnicas, especialmente em tecidos fixados em parafina, subjetividade sendo que apenas dois métodos foram aprovados para a seleção dos pacientes elegíveis aos anticorpos monoclonais anti Her2, o Dako Herceptest[®] e o Ventana Pathway[®].

A pesquisa de mutações e amplificações através do método NGS (Next Generation Sequencing), apresenta uma grande vantagem sobre os métodos já utilizados como: maior sensibilidade, pesquisa de mutações e amplificações gênicas, pesquisa de múltiplos genes ao mesmo tempo, favorecendo a identificação de um perfil ideal para a utilização de tratamentos baseados em anticorpos anti *HER2* como o trastuzumabe, o pertuzumabe e o TDM1 e os inibidores da tirosina quinase (TKIs) como o lapatinibe e o neratinibe.

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar as mutações e amplificações, através do método NGS em blocos de parafina de pacientes com diagnóstico de Neoplasia Trofoblástica Gestacional e como objetivos secundários determinar a frequência da expressão das mutações dos oncogenes *ERBB2*, *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *DDR2*, *EGFR*, *ESR1*, *FGFR1*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *NTRK1*, *PTEN*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *ROS1* e *RICTOR* e amplificações dos genes *ERBB2*, *EGFR*, *RICTOR*, *MET* e *VGFR1*.

A hipótese é que se possa identificar mutações e ampliações ainda não descritas nas neoplasias trofoblásticas gestacionais e que estas possam explicar a fisiopatologia da Mola Hidatiforme e delinear novos alvos terapêuticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

2.2.1 Definição

As Doenças Trofoblásticas Gestacionais pertencem a um grupo heterogêneo de doenças raras que se originam de uma fertilização anormal gerando uma proliferação atípica do epitélio trofoblástico placentário. A sua patogênese é única, uma vez que as lesões placentárias são originárias de tecido fetal e não materno. O processo proliferativo resultante tem potencial para se tornar uma neoplasia invasiva (SECKL et al., 2013).

Hipócrates foi provavelmente o primeiro a descrever a doença trofoblástica gestacional por volta de 400 aC em sua descrição da hidropisia do útero, embora outras observações tenham sido feitas desde então, Marchand associou primeiro a mola hidatiforme com a gravidez em 1895 (OBER; FASS, 1961).

O tecido trofoblástico saudável invade agressivamente o endométrio e desenvolve uma rica vascularização uterina, gerando uma conexão íntima entre o feto e a mãe, conhecida como placenta. O comportamento semelhante ao maligno é rigidamente controlado no trofoblasto saudável, entretanto na doença trofoblástica gestacional, os mecanismos regulatórios falham, resultando em tumores altamente invasivos, metastáticos e muito vasculares (MUELLER et al., 1990).

A doença trofoblástica gestacional (DTG) compreende um espectro de condições pré-malignas relacionadas com a gestação consistindo de molas hidatidiformes completas (MHC) e Molas Hidatiformes Parciais (MHP) e os distúrbios malignos da mola invasiva, coriocarcinoma, tumor trofoblástico de sítio placentário/tumor trofoblástico epitelioide (TTSP/TTE). As formas malignas da doença também são conhecidas como tumores ou neoplasias trofoblásticas gestacionais (NTG) (SECKL et al., 2013).

2.2.2 Epidemiologia

No Reino Unido a incidência é estimada de 1 a 3/1000 gestações para Mola Hidatiforme Completa (MHC) e 3/1000 gestações para a Mola Hidatiforme Parcial (MHP), apresentando dados semelhantes com outros países ocidentais. A doença trofoblástica gestacional é mais frequente na Ásia do que na América do Norte ou na Europa

(PALMER, 1994), talvez devido a diferenças na prevalência, discrepâncias entre dados baseados em hospitais, dados populacionais, ou disparidade na disponibilidade da revisão de patologia central. No Reino Unido, onde todos os pacientes são incluídos em um registro nacional, com revisão de patologia central, a incidência de mola hidátiforme completa é de cerca de uma por 1000 gestações e na mola parcial de três por 1000 gestações (NEWLANDS; PARADINAS; FISHER, 1998).

O risco de gravidez molar aumenta nas pessoas muito jovens <16 anos, mas está associado com idade materna avançada > 45 anos (BRACKEN; BRINTON; HAYASHI, 1984; STEIGRAD, 2003). O risco outra mola aumenta para 1% após uma gestação molar e após duas gestações molares, o risco de uma terceira mola é de 15% a 20% e não diminui com a mudança de parceiros (SECKL et al., 2013). Molas recorrentes em um único membro da família ocorre em 0,6 a 2,57% (PARAZZINI et al., 1984) e em casos raros familiares entre duas mulheres aparentadas (BERKOWITZ et al., 1998).

2.2.3 Patogenia

Tanto as molas hidatiformes quanto as neoplasias trofoblásticas originam-se do trofoblasto placentário, que é derivado da camada mais externa do blastocisto, chamada de trofectoderma. O trofoblasto é composto por citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e trofoblasto intermediário. O sinciciotrofoblasto invade o estroma endometrial após a implantação do blastocisto e secreta a hCG (Gonadotrofina Coriônica) e outras proteínas para regular o microambiente do local de implantação (SHIH; KURMAN, 2001).

O citotrofoblasto funde-se com sinciciotrofoblasto para formar as vilosidades coriônicas que cobrem o saco coriônico. O citotrofoblasto não viloso se diferencia em trofoblasto intermediário, categorizado como local de implantação ou tipo córion. O trofoblasto intermediário perde a capacidade de proliferar, mas invade a decidua e miométrio maternos de maneira altamente controlada, migrando para as artérias espirais maternas para facilitar a transferência de oxigênio e metabólitos entre o feto e a mãe (XU et al., 2002).

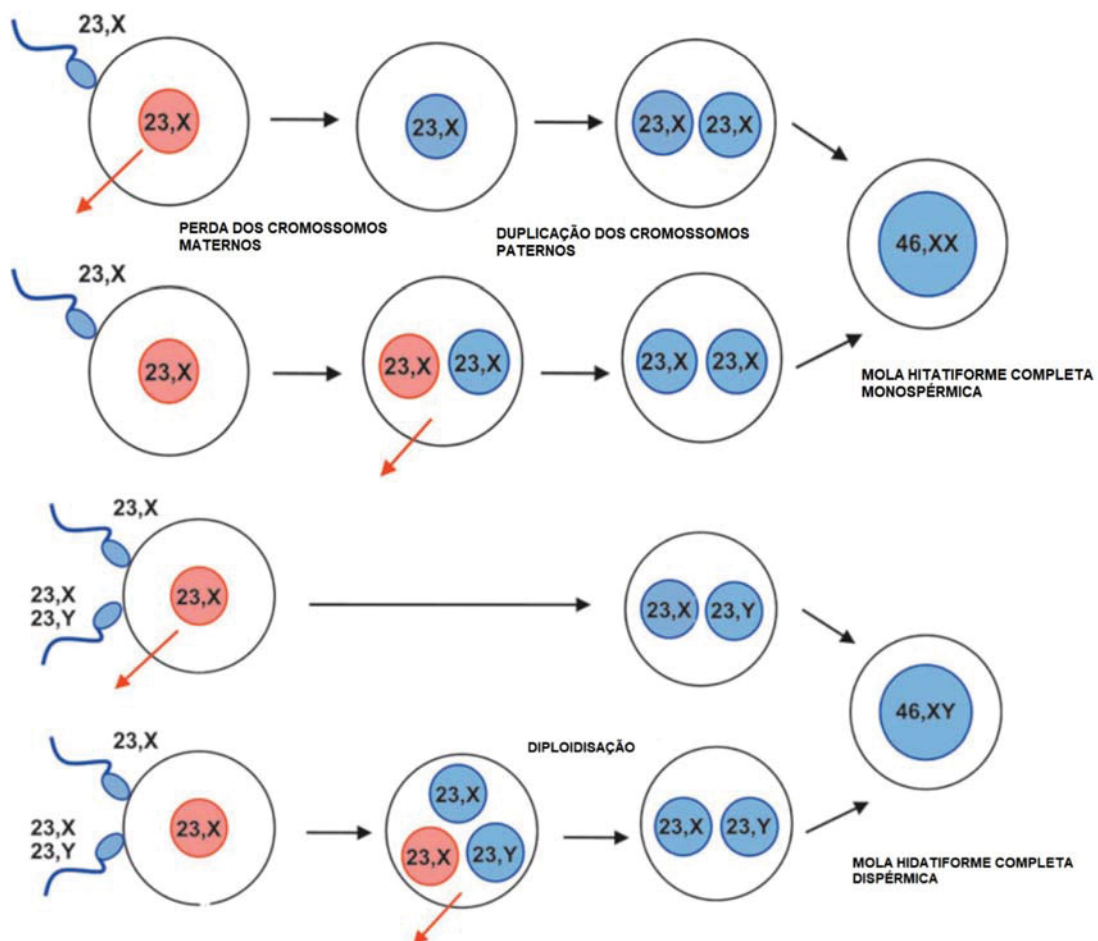
A invasão do trofoblasto saudável no endométrio materno é um evento normal e rigorosamente regulado na gravidez, necessário para a conexão vascular entre o feto e a mãe. Quando os mecanismos regulatórios estão comprometidos, surgem os tumores invasivos e vasculares, havendo um efeito inibitório do TGF- β e de um

proteoglicano, no crescimento, migração e invasão de células trofoblásticas, sendo que esta regulação negativa é perdida em lesões trofoblásticas (XU; CHAKRABORTY; LALA, 2001).

Está bem estabelecido que as molas hidatidiformes completas (CHM) são de origem androgenética, com todos os 46 cromossomos de origem paternalmente (VASSILAKOS; RIOTTON; KAJII, 1977). Esta origem androgenética pode surgir da fertilização de um óvulo “vazio” anuclear por dois espermatozoides separados (dispermia) ou por um espermatozoide que sofre divisão após a penetração ou seja monosspermia, (figura 1) (SZULMAN; SURTI, 1978a).

Estudos citogenéticos demonstraram que a maioria das molas completas (90 por cento) possuem um cariótipo 46 XX, e os cromossomos são inteiramente de origem paterna (KAJII; OHAMA, 1977).

FIGURA 1 - ORIGEM GENÉTICA DAS GESTAÇÕES MOLARES COMPLETAS



FONTE: SECKL et al. (2013).

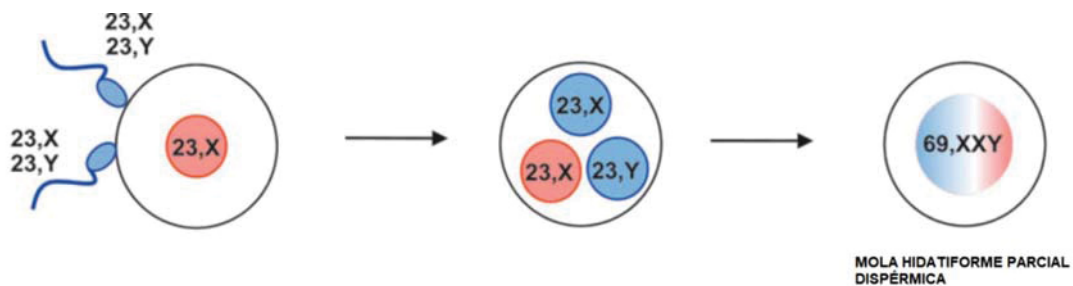
NOTA: MHC: Mola Hidatiforme Completa monosspermica origina-se da perda do genoma materno pré ou pós-fertilização, e duplicação do genoma paterno. Os diploides androgênicos são 46XX, 46YY. A Mola Hidatiforme Completa dispérmica é o resultado de dois espermatozoides fertilizando um óvulo que o genoma nuclear materno foi perdido e os androgênicos diploides podem ser 46XX ou 46XY.

Os cromossomos das molas completas 46XY, parecem ser inteiramente de origem paterna e provavelmente resultam de dispermia. Embora os cromossomos da mola completa sejam inteiramente de origem paterna, o DNA mitocondrial é de origem materna (AZUMA et al., 1991).

As molas parciais geralmente contêm tecidos embrionários ou fetais identificáveis. As vilosidades coriônicas variam em tamanho, com edema focal, cavitação e hiperplasia trofoblástica. As vilosidades coriônicas caracteristicamente têm inclusões trofoblásticas estromais proeminentes, e o trofoblasto de sítio de implantação pode exibir atipia focal e leve. A mola hidatiforme parcial (MHP) é geneticamente uma entidade completamente diferente, com um cariótipo triploide compreendendo dois conjuntos de cromossomos paternos e um conjunto de cromossomos maternos (JACOBS et al., 1982).

A maioria das molas parciais entre 90% e 93%, possuem um cariótipo triploide (69 cromossomos), com o conjunto haploide extra de cromossomos derivados tanto do pai como materna (LAWLER; FISHER; DENT, 1991), (figura 2).

FIGURA 2 - ORIGEM GENÉTICA DAS GESTAÇÕES MOLARES PARCIAIS



FONTE: SECKL et al. (2013).

NOTA: MHP: Mola Hidatiforme Parcial origina-se de uma fertilização de um único ovulo por dois espermatozoides. Esta concepção diândrica triploide pode ser 69XXX, 69XXY ou 69XYY.

2.2.4 Genética

Os primeiros estudos de cariótipo em gestações molares nos estudos pré citogenética com o descoberta de cromatina sexual ou corpúsculo de *Barr* presente na maioria dos molas completas (BAGGISH et al., 1968), foi confirmada posteriormente pela a presença de dois cromossomos X na maioria das molas, caracteristicamente de natureza androgênica e monospérmica (KAJII; OHAMA, 1977), entretanto, molas dispérmicas com cariótipo 46XY podem ocorrer raramente em 4% (SURTI; SZULMAN; O'BRIEN, 1979).

As MHPs são em geral triplóides com 69 cromossomos e geralmente contêm dois conjuntos de cromossomos paternos e um conjunto de maternos cromossomos diândricos. Os relatórios mais recentes, embora feitos em número limitado de casos, estimam que 80% das MHC têm um genoma diploide e são androgenéticas. Entre esses, 60% são monospérmicas e 20% são dispérmicas, as restantes 20% uma contribuição genômica biparental para seu genoma (KOVACS et al., 1991).

Vários grupos confirmaram os efeitos da natureza androgenética da maioria das molas e os mecanismos hipotéticos propostos para explicar a ausência do genoma materno nos tecidos molares. As molas androgenéticas originam-se de óvulos fertilizados em que o núcleo materno era eliminado ou inativado (WAKE; TAKAGI; SASAKI, 1978), ou ainda que as molas hidatiformes (MH) seriam originárias da fertilização de um ovo vazio por um espermatozóide haplóide que duplica sem citocinese para reconstituir um genoma diplóide (JACOBS et al., 1980).

O Gene 19q13.4, *NALP7*, causando MH recorrentes foi identificado pela descoberta de cinco mutações diferentes incluindo duas mutações do sítio doador de *splicing* (MURDOCH et al., 2006), estas mulheres são homozigotas ou composto heterozigótico para mutações em *NALP7*. Este gene é transcrito em uma variedade de tecidos humanos, incluindo oócitos não fertilizados nos estágios da vesícula germinativa e metáfase I bem como no endométrio. *NALP7* é parte da família das proteínas CATERPILLER desempenhando papel importante na inflamação e apoptose durante a resposta das células às infecções (TSCHOPP; MARTINON; BURNS, 2003).

O gene *NALP7* poderia ter um papel como efetivo no gene materno, sendo necessários nos oócitos para auxiliar o desenvolvimento embrionário inicial até a ativação do genoma embrionário. Tais genes não devem afetar a ovulação e fertilização, mas sua ausência levaria a parada precoce do embrião, apoiada pela expressão de *NALP7* em oócitos não fertilizados (MCINNES; MICHAUD, 2007).

O gene *TP53KIP2* é um inibidor de quinase dependente de ciclina, localizado no cromossomo 11p15.5, apresenta forte "imprinting" paterno e expresso predominantemente do alelo materno na maioria dos tecidos (MERCHANT et al., 2005). As MHCs contêm apenas genes paternos, o gene *TP53KIP2* não deve ter expressão ou muito reduzida nos núcleos de seus citotrofoblastos vilosos e células estromais. Em contraste, outros tipos de gestações molares, incluindo as MHP que contêm genes maternos mostram expressão nuclear positiva para *TP53KIP2* nos citotrofoblastos vilosos e células estromais (SEBIRE et al., 2004). O trofoblasto extra-viloso e a decídua demonstram

expressão positiva de *TP57KIP2* em MHP, aborto hidrópico e MHC. Os sinciotrofoblastos são negativos para expressão de *TP57KIP2* em todos os casos (HOFFNER et al., 2008).

2.2.5 Oncogenes e genes supressores

A oncogênese é um processo de múltiplas etapas, envolvendo o acúmulo de múltiplos eventos genéticos, incluindo ativação de oncogenes e perda de genes supressores de tumor. Alguns destes eventos genéticos foram estudados em NTG. Processos celulares importantes nos trofoblastos como: proliferação celular, maturação e a apoptose dependem do delicado equilíbrio entre a expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor materno (LI; TSAO; CHEUNG, 2002).

Alterações na expressão de genes supressores de tumor, como p53, p21 e Rb, comumente estão envolvidas em neoplasias humanas. O gene supressor de tumor p53 está localizado no cromossomo 17 e codifica para fosfoproteína nuclear de 53 kd que se liga ao DNA e inibe a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Seu papel na gênese tumoral é demonstrado por sua frequente ausência ou alteração nos cânceres humanos materna (LEVINE; MOMAND; FINLAY, 1991; LEVINE et al., 1994). Em estudos imuno-histoquímicos de molas hidatiformes não foram detectadas proteínas TP53 mutadas ou mesmo em sequenciamentos de DNA (CHEUNG et al., 1994). No estudo de Chan et al. (2018) foram detectadas altas frequências de mutações inativadoras do TP53 (59%) no exon sete.

O gene supressor de tumor retinoblastoma (*RB1*) é outro gene comumente envolvido em tumores. Em molas completas e coriocarcinomas foi encontrado uma expressão significativamente maior do gene *RB1* do que em molas parciais e placenta normal, vista principalmente em citotrofoblastos e trofoblastos extravilosos, mas nunca em sinciotrofoblastos (FULOP et al., 1998b).

Vários fatores de crescimento e oncogenes são anormalmente expressos em tecidos molares e coriocarcinomas, ambos possuem superexpressão do *MYC*, *ERBB2*, e *BCL2*. O receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) foi mais expresso em coriocarcinomas e em molas completas em comparação com placenta normal e molas parciais, sugerindo que os membros da família *EGFR* podem estar envolvidos na patogênese da NTG (HUSSEIN, 2009).

A expressão das oncoproteínas *MYC*, *ERBB2*, *FMS* e *BCL2* em placenta normal, molas parciais, molas completas e coriocarcinoma, sugeriu que a “*up-regulation*” destas

oncoproteínas pode ter um papel importante na patogênese da mola completa e do coriocarcinoma, entretanto as molas parciais não expressaram do mesmo modo estas oncoproteínas (FULOP et al., 1998a).

No estudo de Bauer e colaboradores, a expressão da proteína *ERBB2* foi significativamente mais intensa nas molas completas e no coriocarcinoma do que na placenta normal ou nas molas parciais. A superexpressão foi encontrada exclusivamente nos trofoblastos extra vilosos invasivos da mola completa e do coriocarcinoma, podendo estar relacionada a um maior comportamento proliferativo e mais agressivo da mola completa e coriocarcinoma (BAUER et al., 1997).

Sun e colaboradores estudaram a expressão proteica do *ERBB2* através da IHQ, mostrando que sua expressão pode estar associada à transformação da mola hidatiforme para a neoplasia trofoblástica gestacional (YAZAKI-SUN et al., 2006).

2.2.6 Fatores de risco

A maioria das mulheres com doença trofoblástica gestacional estão na idade reprodutiva, com um prognóstico bastante favorável, principalmente quando é prontamente tratável. Trata-se de uma doença relativamente benigna e a maioria das mulheres não requer quimioterapia após a evacuação uterina. Uma única evacuação uterina não tem efeito significativo sobre a fertilidade futura, e os resultados da gravidez em gestações subsequentes são comparáveis aos da população em geral, apesar de um ligeiro aumento do risco de novamente desenvolver a gravidez molar (TSE; NGAN, 2012).

Os dois fatores de risco mais importantes para a mola hidatiforme completa são a idade materna e a gravidez pré-molar. Mulheres muito jovens e mulheres com mais de 40 anos têm um risco maior de gravidez molar completa, com mulheres mais velhas tendo um risco 5 a 10 vezes maior (PARAZZINI et al., 1991).

Após a evacuação uterina, a doença pode persistir, sendo mais comum a persistência nos casos de mola completa. Os principais fatores de risco para doença persistente são: idade avançada, β HCG inicial acima de 100.000mUI/ml, história prévia de DTG, útero muito aumentado e presença de cistos tecaluteínicos (MURAD et al., 1990).

A persistência de doença ocorre em aproximadamente 20% das molas hidatiformes (SOPER, 2006). Nestes casos, a doença persistente é definida como Neoplasia Trofoblástica Gestacional, podendo se tratar de Mola Invasiva na maioria

dos casos, ou coriocarcinoma. A mola invasiva difere das molas hidatiformes pela presença de invasão do miométrio histologicamente. Já em casos de NTG após gestação normal, gestação ectópica ou aborto, a patologia mais comum é o coriocarcinoma. Em contraste com outras neoplasias malignas as NTGs são curáveis em 85-100% dos casos, até mesmo na presença de doença avançada e metástases (EL-HEWL; HANCOCK, 2007).

As Doenças Trofoblásticas Gestacionais se caracterizam por produzir a subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana, tornando-se o principal marcador de atividade da doença. Após a evacuação de uma gestação molar, os níveis de Beta-HCG devem ser monitorizados de modo seriado. De acordo com os critérios da FIGO (KOHORN, 2001). deve se suspeitar de NTG nos seguintes casos: platô do Beta-HCG (queda menor de 10% em 4 dosagens em um período de 3 semanas), aumento do Beta-HCG (aumento maior do que 10% em 3 dosagens em um período de 2 semanas) ou Beta-HCG detectável após 6 meses da curetagem. Como o tratamento da mola invasiva e do coriocarcinoma é o mesmo, não é necessário diagnóstico histológico da Neoplasia Trofoblástica Gestacional para o início da quimioterapia.

O sítio mais comum de metástases é o pulmão, que está envolvido em 80% das pacientes. Metástases vaginais ocorrem em 30% das pacientes e podem causar sangramentos e infecções. As metástases cerebrais e hepáticas são menos comuns, ocorrendo em 10% dos casos (SITA-LUMSDEN et al., 2012).

Em 2002, o AJCC publicou um sistema de escore prognóstico chamado *Prognostic Scoring Index* (quadro 1), para prever quais pacientes apresentariam resposta pobre à quimioterapia com agente único que inclui o metotrexato associado ao ácido folínico (MORTAKIS; BRAGA, 1990; GOLDSTEIN et al., 1998; KOHORN, 2001; 2002; EDGE; COMPTON, 2010).

QUADRO 1 - ÍNDICE PROGNÓSTICO DAS NTGs

FATORES PROGNÓSTICOS	0	1	2	4
Idade	<40	≥40		
Antecedente Gravídico	Mola	Aborto	Gestação a Termo	
Intervalo (meses)	<4	4-6	7-12	>12
Maior tumor	<3cm	3-5cm	≥5cm	
Sítio de Metástases	Pulmão	Baço, rim	Gaстрintestinal	SNC, Fígado
Número de Sítios de Metástases		1 a 4	5 a 8	>8
Falha à quimioterapia prévia			1 agente	≥2 agentes
Beta-HCG pré-tratamento	<10 ³ mUI/ml	10 ³ -10 ⁴ mUI/ml	10 ⁴ -10 ⁵ mUI/ml	≥10 ⁶ mUI/ml

FONTE: BERKOWITZ; GOLDSTEIN (2005); PECORELLI et al. (1999).

NOTA: Os pacientes com escore <7 são classificadas como de baixo risco e candidatas a quimioterapia com agente único. Já pacientes com escore ≥7 são consideradas de alto risco e candidatas a poliquimioterapia.

2.2.7 Tratamento

Em geral, a resistência primária após o agente a quimioterapia ocorre em 10 a 30 por cento dos pacientes com neoplasia trofoblástica gestacional de baixo risco, entretanto esse número sobe para entre 30 e 50% dos pacientes com NGT de baixo risco na presença de metástases. Pacientes que desenvolvem resistência ao agente único inicial geralmente respondem a agente único alternativo, sendo que em torno de 15% necessitarão poli quimioterapia (LURAIN, 2003). As indicações para a quimioterapia estão apresentadas no quadro 2.

QUADRO 2 - INDICAÇÕES PARA QUIMIOTERAPIA

- Aumento do PSA ou platô após a evacuação molar, definido como ≥ 4 valores de HCG > 3 semanas (dias 1,7,14 e 21) e dois consecutivos aumentos no HCG de 10% ou mais nas últimas 2 semanas (dias 1, 7 e 14) respectivamente;
- Sangramento vaginal intenso ou evidência de hemorragia gastrintestinal ou intraperitoneal;
- Evidência histológica de coriocarcinoma;
- Evidência de metástases no cérebro, fígado trato gastrintestinal, lesões vaginais >2cm ou opacidades > 2cm no Rx de tórax;
- HCG sérico ≥ 20.000 UI/L, > 4 semanas após a evacuação, pelo risco de perfuração uterina

FONTE: SECKL et al. (2013).

Para pacientes com um nível de β hCG abaixo de 300 UI/L, um agente único, a actinomicina D (ActD) seria a escolha padrão como segunda linha de tratamento, enquanto para mulheres com β hCG > 300 UI/L opta-se pelo esquema EMA-CO (etoposido, metotrexato, ActD, ciclofosfamida e vincristina). Usando-se este ponto de corte, aproximadamente 95% dos pacientes tratados com agente único completaram com sucesso o tratamento sem necessidade de terapia adicional, mas é importante notar que alguns estudos sugerem que pacientes com escores de maior risco (5 a 6), apresentam um risco maior de doença resistente em comparação aos escores prognósticos de baixo risco (SITA-LUMSDEN et al., 2012).

Apesar do sucesso da terapia primária com EMA-CO, cerca de 30 a 40 por cento das mulheres com NTG metastática de alto risco terá uma resposta incompleta à terapia de primeira linha ou irá recidivar após a remissão necessitando de poli quimioterapia adicional. Os fatores de risco para doença resistente ou recorrente incluem a presença de múltiplas metástases hepáticas, sistema nervoso central e resistência à quimioterapia de primeira linha (LURAIN; NEJAD, 2005; LURAIN; SINGH; SCHINK,

2010; POWLES et al., 2007). Particularmente quando há envolvimento da doença hepática a sobrevivência global é de 50% em cinco anos (AHAMED et al., 2012).

Para pacientes com doença resistente ou recorrente, não há um esquema padrão como sendo a melhor escolha. Podem ser utilizados os seguintes esquemas de quimioterapia: EMA-EP (Etoposido, Metotrexato, actinomicina D, alternando com cisplatina e etoposido) (SITA-LUMSDEN et al., 2012), Paclitaxel e etoposido alternados com paclitaxel e cisplatina (TE-TP) (OSBORNE et al., 2004), paclitaxel e carboplatina (PC) (RATHOD et al., 2015). Bleomicina, etoposido e cisplatina (BEP), ifosfamida, etoposido e cisplatina (ICE) (LURAIN; SINGH; SCHINK, 2010), Cisplatina, vimblastina e bleomicina (PVB) (DUBESHTER et al., 1989), como agente único a capecitabina (BIANCONI et al., 2007) e a doxorubicina lipossomal (POPADIUK; POWER, 2016).

Devido à raridade dessas doenças, os estudos clínicos prospectivos de difícil desenvolvimento, particularmente no caso das doenças recorrentes. Em relatos de casos, a administração do pembrolizumabe, um anticorpo monoclonal que age como um inibidor do ponto checagem imunológica contra a proteína da morte celular programada 1 (PD-1) em quatro pacientes com NTG resistente com alta expressão desta proteína (GHORANI et al., 2017). A justificativa deste tratamento foi evidenciada pela alta expressão do ligante da morte celular 1 (PD-L1) em estudos pela imunohistoquímica (BOLZE et al., 2017; VERAS et al., 2017; INAGUMA et al., 2016). Três das quatro pacientes da série de casos apresentaram respostas duráveis em 24, 15 e 5 meses após a interrupção do tratamento.

2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS ONCOGENES

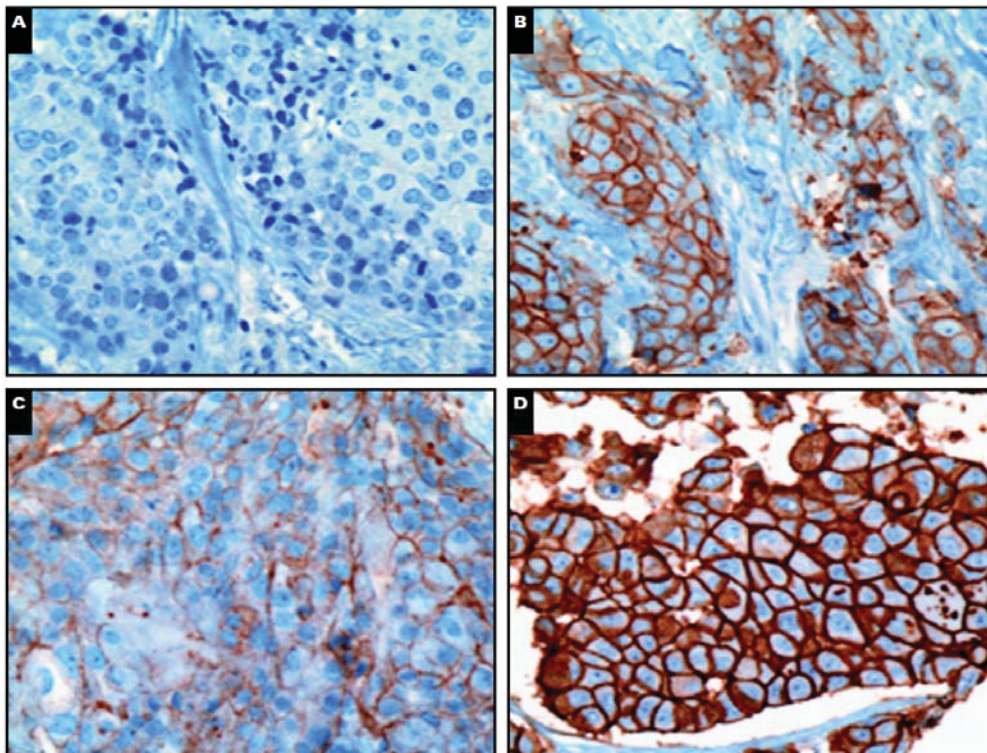
2.3.1 Imuno-histoquímica

A coloração por imuno-histoquímica (IHQ) tem sido o método predominante utilizado. Com a finalidade de fornecer uma interpretação significativa de uma imunoestimulação do *ERBB2*, foi necessário estabelecer uma relação entre o número dos seus receptores na superfície da célula e a sua distribuição de intensidade da imunomarcação. Há uma excelente correlação entre o status da cópia do gene e a expressão proteica quando o método é padronizado e realizado em espécimes cuidadosamente fixados, processados e incluídos (HAYES; THOR, 2002).

Entretanto os resultados podem ser significativamente afetados por questões técnicas, especialmente em tecidos fixados em parafina. As vantagens do teste IHC incluem sua ampla disponibilidade, custo relativamente baixo, fácil preservação de lâminas manchadas e uso de um microscópio de rotina. As desvantagens incluem o impacto de questões pré-analíticas, incluindo armazenamento, duração e tipo de fixação, intensidade de recuperação de antígeno, tipo de anticorpo (policlonal versus monoclonal), natureza das amostras de controle do sistema e mais importante, as dificuldades na aplicação de um sistema de pontuação subjetivo da lâmina (PRESS et al., 1994).

Dois “kits” IHQ estão comercialmente disponíveis para avaliar a expressão protéica do *ERBB2*: Dako Herceptest[®] e o Ventana Pathway[®]. Foram aprovados para venda e determinar a elegibilidade para os pacientes receberem Herceptin[®]. Na figura 3, observa-se a interpretação da amplificação do ERBB2 através da IHQ no câncer de mama.

FIGURA 3 - IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PESQUISA DO ERBB2



FONTE: HICKS; KULKARNI (2008).

NOTA: Microscopia de quatro tumores de mama corados pela técnica de imuno-histoquímica para pesquisa de ERBB2. A: escore 0, não há coloração da membrana. B: escore +2, coloração circunferencial da membrana em mais de 10% das células, porém fina. C: escore +1, coloração fraca e parcial da membrana de mais de 10% das células. D: escore +3, coloração circunferencial da membrana, grossa e retrátil, em mais de 10% das células. Os casos A e C são considerados negativos, o caso D é positivo. No caso B, é necessário o emprego da hibridização *in situ* (FISH) para o diagnóstico.

2.3.2 FISH

A técnica hibridização *in situ* fluorescente (FISH), também é dirigida por morfologia e bem como a IHC pode ser automatizada, tendo as vantagens de um sistema de escores mais objetivos pela presença de um controle interno integrado consistindo nos dois sinais do gene *ERBB2* presentes em todos os células neoplásicas no espécime. As desvantagens dos testes FISH incluem: o maior custo de cada teste, maior tempo necessário para a pontuação das lâminas, a necessidade de um microscópio fluorescente, a incapacidade de preservar as lâminas para armazenamento, revisão e ocasionalmente a identificação das células tumorais invasivas. Duas versões do ensaio FISH são aprovadas pela FDA: o teste *Ventana Inform*[®] que mede apenas cópias do gene *ERBB2* e o *Abbott-Vysis Pathvysion*[®] teste que inclui uma sonda do cromossomo 17 em um formato de duas cores. Estes ensaios são altamente equivalentes (WANG et al., 2001).

2.3.3 Biologia molecular

2.3.3.1 Sequenciamento de primeira geração

O grande marco e desenvolvimento das tecnologias da cadeia do carbono terminal foi desenvolvido por Sanger e colaboradores, estabelecendo por décadas a base das pesquisas de sequenciamento (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), referido como Sanger ou sequenciamento dideoxi, permaneceu como o mais utilizado para o sequenciamento do genoma humano (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001).

O sequenciamento de primeira geração em regiões exônicas de interesse nos exons mutados foi realizado por muitos anos para detectar mutações pontuais e pequenas inserções e deleções, entretanto como a maioria das mutações são heterozigóticas e em muitas vezes pela contaminação com material não tumoral, há uma diminuição intensa do sinal de transdução, resultando em numa redução da sensibilidade necessária para a identificação de maneira confiável deste sinal. Além disso, geralmente baseado em fluorescência *in situ* (HIBIB) a microscopia deve ser realizada em paralelo para detecção de alterações somáticas de número de cópias, rearranjos genômicos e fusões. Estas abordagens consomem muito tempo e uma grande quantidade de tecido (HEUCKMANN; THOMAS, 2015).

2.3.3.2 NGS

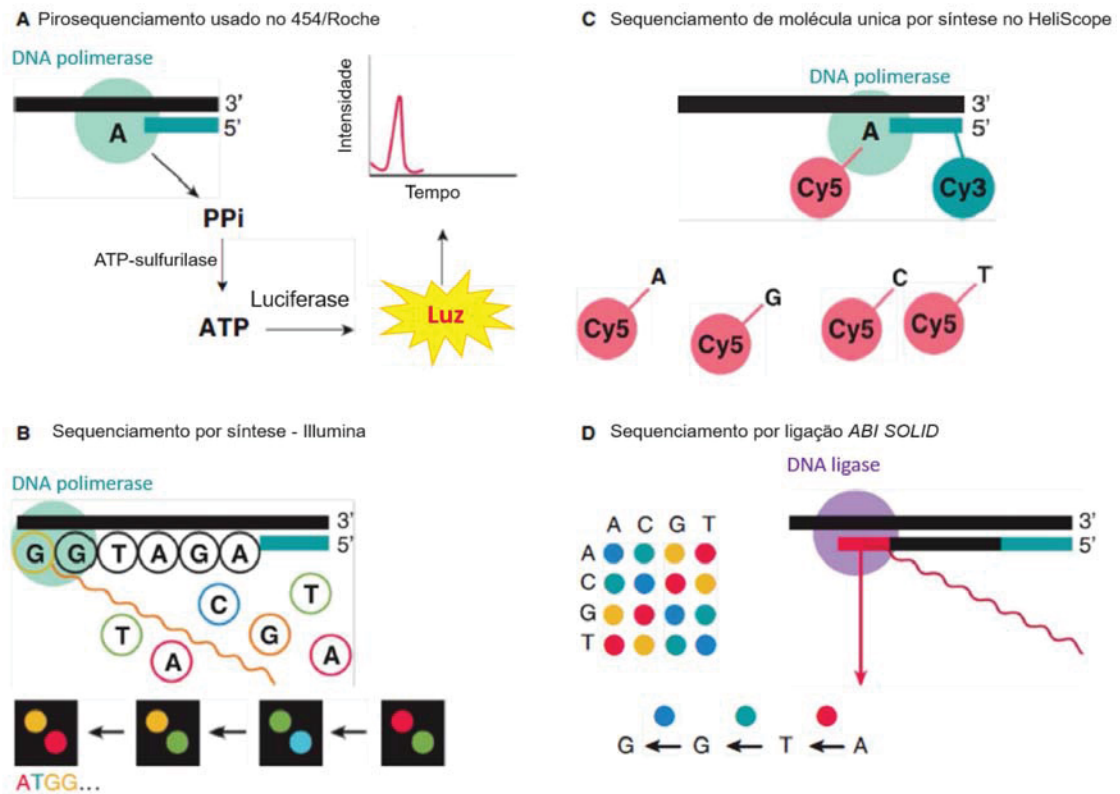
Em 2003 Luikart et al. (2003) publicaram: “A abordagem molecular ideal para a genômica populacional, deve descobrir centenas de marcadores polimórficos com um experimento que dê cobertura a todo o genoma de uma forma única, simples e confiável. Infelizmente, no momento não existe abordagem”. Agora, com o advento do sequenciamento de última geração (NGS) existem abordagens capazes de descobrir, sequenciar e genotipar milhares de marcadores em quase qualquer genoma de interesse em um único passo, mesmo em populações nas quais pouco ou nenhuma informação esteja disponível (STAPLEY et al. 2010).

As tecnologias para sequenciamento de DNA melhoraram muito, ao ponto de tornar-se prático para sequenciar o genoma inteiro de um indivíduo. O sequenciamento de última geração (NGS) utiliza sequenciamento paralelo de múltiplos pequenos fragmentos de DNA para determinar sequência. Esta tecnologia de alto rendimento permitiu um aumento dramático na velocidade e uma diminuição no custo em que o genoma de um indivíduo pode ser sequenciado.

Estas técnicas não dependem da amplificação por PCR, utilizando uma pequena quantidade de material tumoral para enriquecer as regiões genômicas de interesse (enriquecimento baseado em captura híbrida). Isto é seguido pelo sequenciamento massivo em paralelo de próxima geração e subsequente análise computacional (MARDIS, 2011).

O fluxograma de trabalho do sequenciamento padrão do DNA inclui três etapas principais: preparação da amostra, sequenciamento e análise de dados. As novas tecnologias melhoraram o protocolo Sanger, onde uma amostra de DNA é fragmentada, subclonada em vetores e amplificada por bactérias ou leveduras, posteriormente o DNA é isolado e sequenciado pela cadeia terminal pelo método de Sanger (MOROZOVA; HIRST; MARRA, 2009). Nas plataformas de segunda geração elimina-se a etapa de clonagem, sendo substituída por amplificação baseada em PCR que utiliza gotículas de emulsão para isolar modelos do DNA em microreatores separados, onde a amplificação é realizada (MARGULIES et al., 2005). Na figura 4 observam-se os avanços nos sequenciadores de nova geração.

FIGURA 4 - AVANÇOS NOS SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO



FONTE: MOROZOVA; HIRST; MARRA (2009).

NOTA: A: O pirosequenciamento 454/Roche utiliza uma tecnologia de sequenciamento que detecta nucleotídeos incorporados pela quimiluminescência, resultando na liberação de pirofosfato. B: O método *illumina* utiliza seqüências por síntese na presença de análogos de nucleotídeos marcados pela fluorescência. C: O sequenciamento por síntese de molécula única, detecta extensão de modelos usando rótulos Cy3 e Cy5 ligados ao *primer* de sequenciamento e nucleotídeos de entrada respectivamente. D: O método *SOLiD* sequencia modelos pela ligação sequencial de sondas rotuladas degeneradas. Duas bases implementadas codificam o instrumento *SOLiD* que permite a sondagem de cada posição do nucleotídeo duas vezes.

Há três métodos diferentes para o enriquecimento paralelo maciço a ser sequenciado: a captura de microarranjos, a amplificação multiplexada ou a seleção de híbridos com oligonucleotídeos ultralongos (GNIRKE et al., 2009). Baseando-se nesta técnica, todas as alterações genômicas relevantes como: mutações pontuais, inserções e deleções, alterações no número de cópias, rearranjos ou fusões genômicas, podendo detecta-las em um único ensaio, economizando material e tempo (ABEL; DUNCAVAGE, 2013).

Nas últimas duas décadas os estudos nas células do câncer de mama basearam-se na amplificação e superexpressão do *ERBB2*, havendo fisiologicamente uma dependência da continuação da sua ativação e das vias de sinalização, entretanto no câncer de pulmão de células não pequenas a ativação do *ERBB2*

demonstrou-se preferencialmente devida às mutações somáticas (GREULICH et al., 2012; LEE et al., 2006; BOSE et al., 2013), o que poderia influenciar em deixar-se de oferecer certas oportunidades terapêuticas potenciais quando pesquisamos apenas a superexpressão gênica (LEE et al., 2006).

Baseando se nesta premissa, um estudo identificou 27 mutações somáticas do *ERBB2*, das quais 17 eram únicas em 1,67% em cânceres de mama (BOSE et al., 2013). A maioria dos casos que contém mutações *ERBB2* que foram consideradas negativas para superexpressão do *ERBB2* na imuno-histoquímica e FISH, enquanto que 3 eram *ERBB2* positivos e 2 foram equívocas de acordo com as diretrizes atuais para avaliação do *ERBB2* (WOLFF et al., 2007).

2.4 ONCOGENES

2.4.1 ERBB2 - HER2/NEU

2.4.1.1 Definição

O gene “neu” foi originalmente identificado em tumores neuroectodérmicos de ratos, posteriormente foi isolado seu correspondente humano (SHIH et al., 1981). Este gene humano codifica para proteína com uma estrutura consistente com um receptor de fator de crescimento e sendo designado fator de crescimento epidérmico 2 (*ERBB2*), devido à sua semelhança com o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (COUSSENS et al., 1985). O oncogene *ERBB2* codifica para glicoproteína transmembrana do receptor com 185 KD e atividade intracelular da tirosina quinase, localizado no cromossomo 17q (KING; KRAUS; AARONSON, 1985).

O receptor do *ERBB2* pertence ao receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), que são críticos na ativação do sinal subcelular vias de transdução controlando o crescimento e diferenciação de células epiteliais (KLAPPER et al., 1999) e possivelmente a angiogênese. Foi anteriormente denominado *HER2/NEU* ou *ERBB-2* (PETIT et al., 1997).

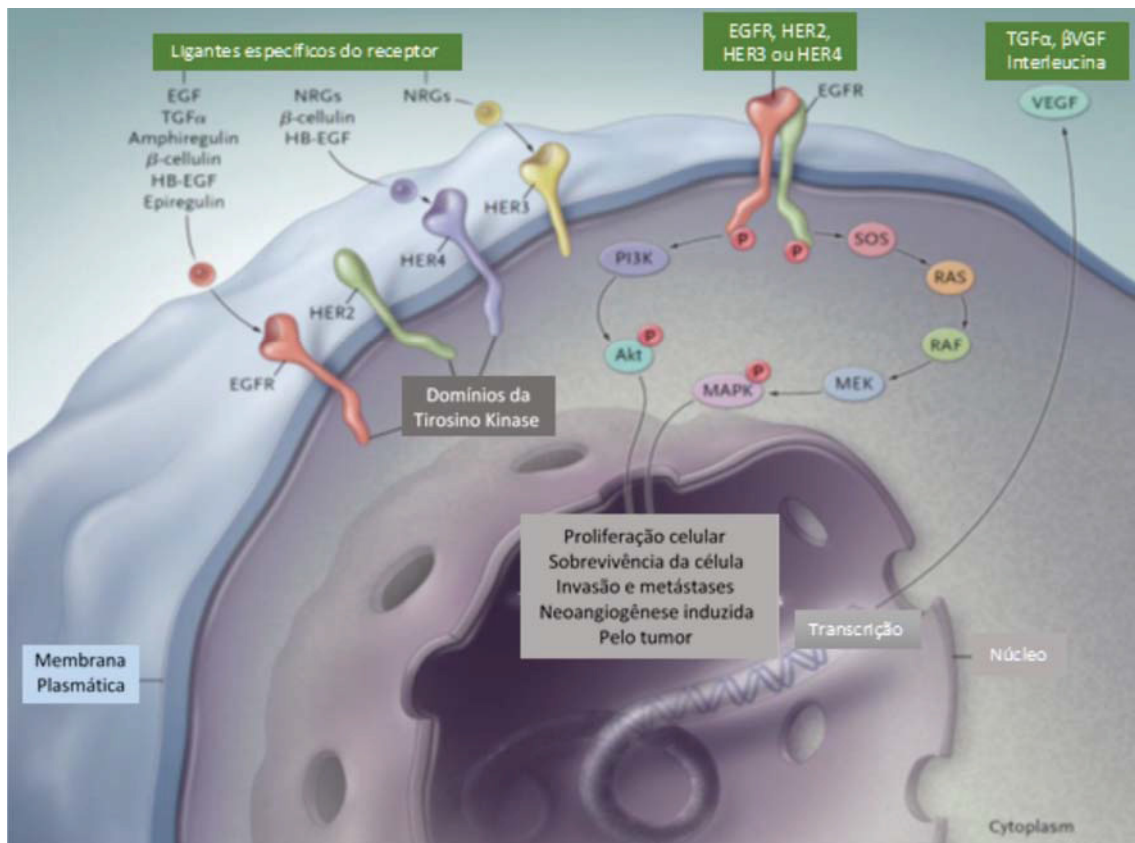
Esta família de receptores está envolvida na comunicação célula-célula e estroma-célula principalmente através de um processo conhecido como transdução de sinal, no qual fatores externos de crescimento, ou ligantes, afetam a transcrição de vários genes por fosforilação ou desfosforilação de uma série de proteínas transmembrana intracelular e intermediários de sinalização, muitos dos quais possuem atividade enzimática. A propagação do sinal ocorre quando a atividade enzimática de uma proteína ativa a atividade enzimática da próxima proteína na via (KARUNAGARAN et al., 1996).

As principais vias envolvidas na transdução de sinal, incluindo a via Ras/proteína quinase mitogeno ativada (*MAPK*), a via fosfatidilinositol 3-quinase *PI3K/AKT*, a Janus quinase *JAK*/transdutores de sinal e ativadores da transcrição (*STAT*), e a via da fosfolipase C γ (*PLC- γ*), em última análise, afeta a proliferação celular, a sobrevivência, a motilidade e a adesão. A ativação do receptor requer três variáveis, um ligante, um receptor e um fator de dimerização (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

Após um ligante conectar-se a um receptor do *ERBB2*, este deve interagir com outro receptor de estrutura idêntica ou relacionada em um processo conhecido como dimerização, a fim de desencadear a fosforilação e ativar as cascatas de sinalização. A conexão do ligante a um membro da família *EGFR*, o receptor pode dimerizar-se com um membro semelhante da família (homodimerização), ou com outros membros da família *EGFR*, *ERBB3* ou *ERBB4* (heterodimerização) (TZA HAR et al., 1996).

O receptor *HER2* tem um papel importante nas células normais de crescimento e diferenciação, entretanto a amplificação de o gene *ERBB2* leva à superexpressão do receptor que está ligado ao desenvolvimento de muitos tipos de canceres humanos incluindo mama, ovário, pulmão e o trato gastrointestinal (HYNES; STERN, 1994). Na figura 5 as vias de transdução dos sinais controlados pela ativação do *EGFR*.

FIGURA 5 - VIA DE TRANSDUÇÃO DOS SINAIS CONTROLADOS PELA ATIVAÇÃO DO EGFR



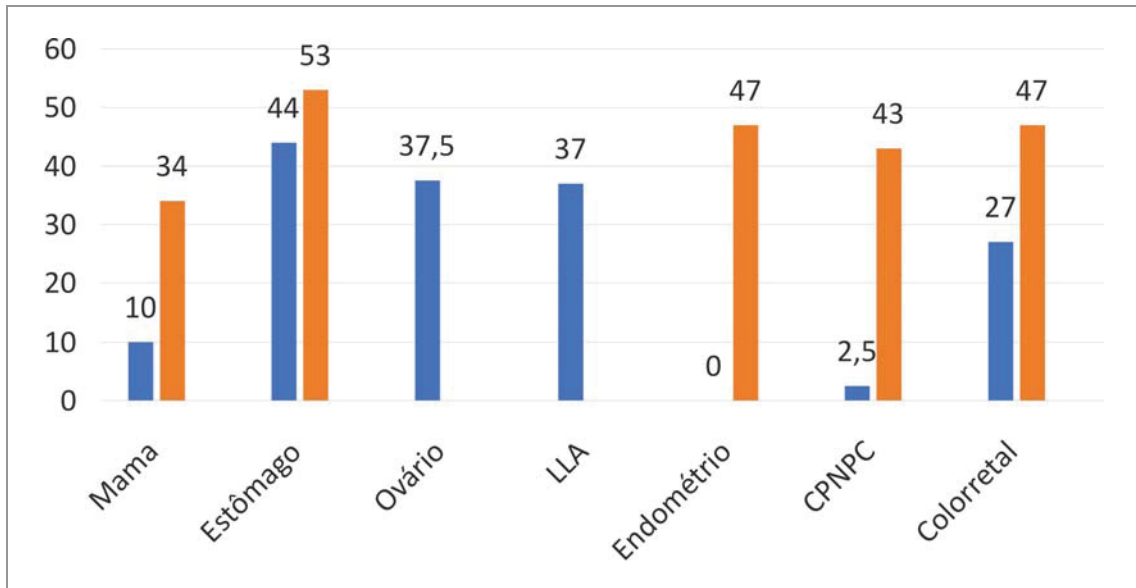
FONTE: CIARDIELLO ; TORTORA (2008).

NOTA: Três etapas podem ser esquematicamente definidas na ativação da sinalização intracelular dependente de *EGFR*. Primeiro, a ligação de um ligante específico do receptor ocorre na porção extracelular do *EGFR* ou de um dos receptores relacionados ao *EGFR* (*HER2*, *HER3*, ou *HER4*). Em segundo lugar, a formação de um dímero de *EGFR-EGFR* funcionalmente (homodímero) ou de um dímero de *EGFR-HER2*, *EGFR-HER3* ou *EGFR-HER4* (heterodímero) causa a fosforilação dependente de ATP dos resíduos de tirosina específicos no domínio intracelular de *EGFR*. Terceiro, essa fosforilação desencadeia um complexo programa de sinais intracelulares para o citoplasma e depois para o núcleo. As duas principais vias intracelulares ativadas pelo *EGFR* são a via *RAS-RAF-MEK-MAPK*, que controla a transcrição gênica, a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S bem como a proliferação celular e a via *PI3K-AKT*, que ativa uma cascata de sinais de anti-apoptose e sinais em favor da sobrevivência. O *BFGF* denota basicamente o fator de crescimento de fibroblastos, EGF de ligação a heparina a HB-EGF, MAPK proteína quinase ativada por mitógeno, fosfato P, *PI3K* fosfatidilinositol 3,4,5-quinase, fator de crescimento transformador de *TGFA* e fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*).

A amplificação ou a superexpressão das proteínas do gene *ERBB2* foi identificada de uma forma muito variada entre os estudos: no câncer de mama invasivo entre 10% a 34% (NAVOLANIC; STEELMAN; MCCUBREY, 2003), no câncer gástrico entre 44% a 53,4% (JORGENSEN; HERSOM, 2012), nos carcinomas epiteliais de ovário 37,5% (JAFRI et al., 2017), nas leucemias agudas linfoblásticas tipo B em 17% (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2016), nos carcinomas de pulmão, adenocarcinomas e carcinomas epidermóides entre 2,5% a 43% (GROB et al., 2012), nos carcinomas colorretais entre 27% e 47,7% (PARK et al., 2007; MARX et

al., 2010) e nos carcinomas de endométrio uma variação de 0% a 47% (BUZA et al., 2014), figura 6.

FIGURA 6 - FREQUÊNCIA DA SUPEREXPRESSION DO ERBB2 NAS DIVERSAS NEOPLASIAS



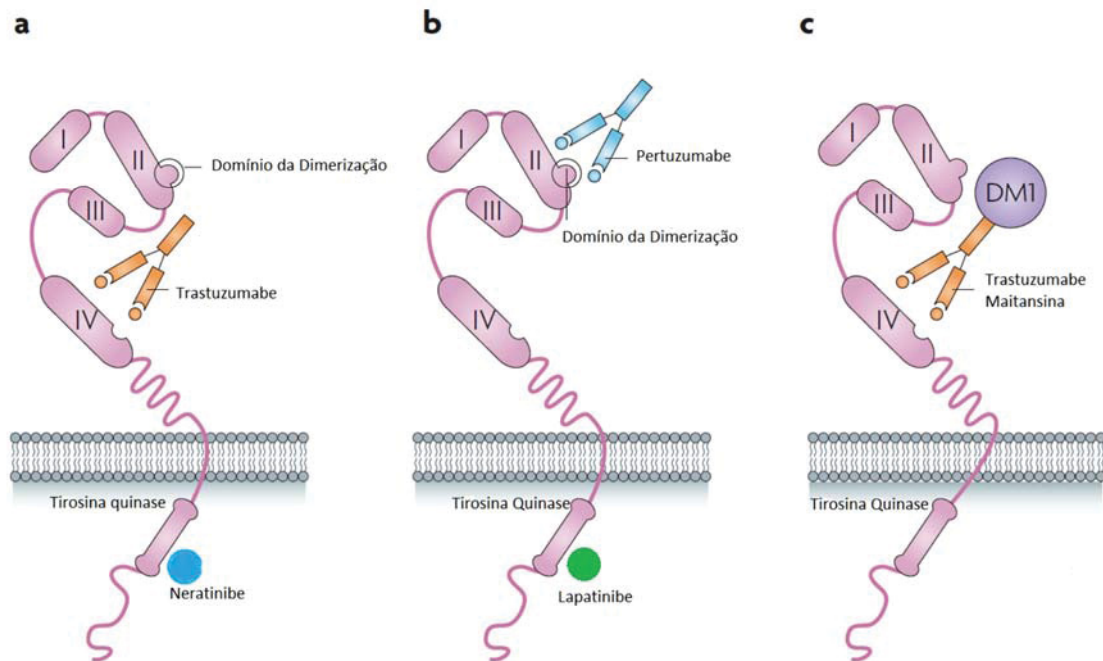
FONTES: NAVOLANIC; STEELMAN; MCCUBREY (2003). No câncer gástrico entre 44% a 53,4% (JORGENSEN; HERSOM, 2012); nos carcinomas epiteliais de ovário 37,5% (JAFRI; RIZVI, 2017); nas leucemias agudas linfoblásticas tipo B em 17% (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2016); nos carcinomas de pulmão, adenocarcinomas e carcinomas epidermóides entre 2,5% a 43% (GROB et al., 2012); nos carcinomas colorretais entre 27% e 47,7% (PARK et al., 2007; MARX et al., 2010); e nos carcinomas de endométrio uma variação de 0% a 47% (BUZA et al., 2014).

NOTA: A frequência das neoplasias que apresentam superexpressão é muito variável dentro da mesma entidade, revelando que há uma discrepância pré-analítica entre os estudos.

2.4.1.2 Terapias alvo anti *ERBB2*

Com o descobrimento da amplificação e superexpressão do *ERBB2* e a caracterização do seu impacto no comportamento no câncer de mama, resultaram no desenvolvimento de terapias direcionadas a este alvo. A hibridização in situ fluorescente (FISH), hibridização in situ cromogênica (CISH) e imuno-histoquímica para o *ERBB2* foram introduzidos como biomarcadores preditivos para determinar quais pacientes podem da terapia com agentes anti- *ERBB2* (anticorpos monoclonais como: trastuzumab e pertuzumab e os inibidores de tirosina quinase lapatinib e neratinibe) (SLAMON et al., 1987; ARTEAGA et al., 2011; BASELGA et al., 2012; MARTIN et al., 2017). Na figura 7, os diferentes mecanismos de ação das drogas anti *ERBB2*.

FIGURA 7 - SÍTIOS DE ATUAÇÃO DAS MEDICAÇÕES ANTI ERBB2



FONTE: BASELGA; SWAIN (2009).

NOTA: a) O anticorpo trastuzumabe liga-se diretamente ao domínio IV da região extracelular do *ERBB2*, suprimindo a atividade de sinalização e prevenindo a clivagem do domínio extracelular marcando as células tumorais com superexpressão do *ERBB2*, para futuro ataque através da citotoxicidade celular mediada por anticorpos. O neratinibe inibe a tirosina quinase; b) Pertuzumabe outro anticorpo monoclonal liga-se ao domínio II da região extracelular do *ERBB2*. Esta região contém o domínio de dimerização onde o Pertuzumabe se liga, prevenindo o *ERBB2* de formar dímeros com seus parceiros na sua sinalização. O Lapatinibe inibe a tirosina quinase; c) O anticorpo conjugado trastuzumabe-DM1 consiste do trastuzumabe conjugado com o agente anti-microtúbulo DM1 (derivado da maitansina). Depois de ligado ao *ERBB2* é internalizado e o DM1 é liberado no interior da célula exercendo efeitos citotóxicos.

Em torno de 20% de todos os tumores malignos de mama apresentam amplificação ou superexpressão do gene *ERBB2*, um receptor transmembrana da tirosina quinase, resultando em uma forma fenotípica mais agressiva e de mau prognóstico (ROSS et al., 2009). O tratamento com o anticorpo monoclonal humanizado trastuzumabe associado à quimioterapia aumentou a sobrevida global e sobrevida livre de progressão entre as pacientes com metástase *ERBB2* positiva câncer de mama. Outras terapias direcionadas ao *ERBB2* como: o Pertuzumabe, o TDM1 e o lapatinibe também adicionaram ganhos expressivos na sobrevida global (ZHU; VERMA, 2015).

Com base nos estudos prévios em câncer de mama foram realizados outros estudos que avaliaram a relação da amplificação do *ERBB2* no câncer gástrico correlacionando com características clínicas patológicas e determinando o seu prognóstico. Os resultados do estudo ToGA foram muito encorajadores, abrindo um

novo canal de esperança para o tratamento de câncer gástrico avançado (BANG et al., 2010).

O estudo HERACLES A, demonstrou que a utilização do duplo bloqueio com trastuzumabe e lapatinibe para os pacientes com câncer de cólon metastático refratário, que apresentaram superexpressão de *ERBB2*, resultou em uma taxa de resposta objetiva de 30% em pacientes intensamente pré-tratados sugerindo uma nova estratégia de terapia direcionada para linhas posteriores (SARTORE-BIANCHI et al., 2016).

2.4.2 FGFR1

A proliferação celular excessiva é uma das marcas registradas do câncer, e muitos baseados em estudos celulares e modelos em ratos, demonstraram que a sinalização do *FGF* (Fator de crescimento do fibroblasto) promove proliferação das células tumorais.

Como os receptores dos fatores de crescimento dos fibroblastos *FGFRs* desempenham um papel vital na patogênese do câncer, estas funções podem resultar de diversas aberrações vias de *FGFR*: (1) superexpressão do receptor causada por amplificação gênica ou regulação pós-transcricional; (2) as mutações *FGFR* produzindo receptores que exibem dependência reduzida do acoplamento do ligante para ativação; (3) translocações que levam à expressão de fusão das proteínas *FGFR* com atividade constitutiva de *FGFR* quinase; (4) mudança na isoforma e "splicing" alternativo do *FGFR* alterando substancialmente a especificidade do ligante, aumentando a amplitude do *FGF* levando à estimulação de células tumorais; (5) a superexpressão do *FGF* em células cancerígenas ou estromais e a regulação positiva do *FGF* da matriz extracelular leva à comunicação parácrina (WANG; DING, 2017).

As proteínas de ligação dos *FGFBP1* (*FGF Binding Protein 1*) foram isoladas originalmente como uma proteína de ligação à heparina dissolvida com *FGF2*. O cDNA de *FGFBP1* codifica um polipeptídeo de 234 aminoácidos que se liga a heparina, *FGF1* e *FGF2* (PRUDOVSKY et al., 2003). O *FGFBP1* é expresso em vários tumores humanos, incluindo câncer de mama e cólon. O *FGFBP1* pode limitar da taxa de crescimento tumoral, mas com efeito pró-angiogênico, facilitando a invasão tumoral (ABUHARBEID; CZUBAYKO; AIGNER, 2006).

A desregulação das vias de sinalização do *FGF* são implicadas em muitos tipos de humanos e animais. Ela pode ocorrer ao nível de expressão gênica,

expressão proteica dos ligantes ou receptores, podendo resultar de alterações na atividade transcricional ou amplificação gênica. A desregulamentação também pode resultar de mutações nos ligantes, nos receptores ou nas vias de sinalização à jusante do *FGF* (TURNER; GROSE, 2010).

Amplificação da região cromossômica 8p11-12, a localização genômica do *FGFR1*, é uma das amplificações focais mais comuns no câncer de mama, e ocorrendo em 10% dos cânceres de mama, predominantemente naqueles com receptor de estrogênio positivo (JACQUEMIER et al., 1994; REIS-FILHO et al., 2006). As amplificações do *FGFR1* também foram relatadas em carcinomas de células escamosas orais (FREIER et al., 2007) e menor incidência no câncer dos ovários (GORRINGE et al., 2007), bexiga (SIMON et al., 2001) e rabdmiossarcoma (MISSIAGLIA et al., 2009),⁹⁵ não havendo publicações deste oncogene em NTGs.

2.4.3 RICTOR

RICTOR é um componente importante do *mTORC2*, importante para a sua função já que sua inativação inibe a ativação do *AKT*. É um regulador crítico da via *PI3K/AKT*, desempenhando um papel importante nos tumores causados por alterações dos receptores da tirosina quinase. O gene *RICTOR* foi recentemente identificado amplificado nas neoplasias malignas, destacando seu papel no desenvolvimento do câncer e seu potencial terapêutico (SARBASSOV et al., 2005).

Vários estudos demonstraram uma amplificação do gene *RICTOR* ou superexpressão protéica em diferentes tipos de câncer. A amplificação do *RICTOR* foi encontrada no câncer de próstata neuroendócrino em 18%, no carcinoma de células escamosas do pulmão em 16%, nos sarcomas em 12%, no câncer de esôfago e de estômago em 10% (JEBALI; DUMAZ, 2018).

RICTOR foi identificado como o gene mais com amplificação mais frequente (14%) em uma coorte de pacientes com câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) metastáticos. A variação do número de cópias foi correlacionada com a expressão protéica em células SCLC e a sobrevida global foi significativamente diminuída nestes pacientes que apresentavam amplificação deste oncogene (SAKRE et al., 2017).

A correlação entre a superexpressão de *RICTOR*, a progressão tumoral e a redução na sobrevida em várias neoplasias, sugere que a amplificação do *RICTOR*

desempenha um papel importante na proliferação celular, na sobrevivência celular ou no microambiente tumoral (JEBALI; DUMAZ, 2018).

A importância da via *PI3K/AKT/mTOR* no câncer é conhecida há muitos anos, mas o papel central do *RICTOR* nesta via está apenas no início. Em vários tipos de câncer, foi demonstrado que a sua superexpressão em células tumorais leva a um aumento na proliferação, na sobrevivência celular, uma diminuição na apoptose em células cancerígenas, bem como uma remodelação do estroma, favorecendo o desenvolvimento tumoral. Esta superexpressão foi positivamente associada com progressão tumoral e pior sobrevida no câncer colorretal (GULHATI et al., 2011).

Como efetor crítico das RTKs, *RICTOR/mTORC2* tornou-se um valioso alvo terapêutico. A primeira geração de inibidores de *mTOR* (rapamicina e análogos) apenas como alvo *mTORC1*, apresentam uma baixa taxa de resposta, mas a segunda geração de inibidores competitivos do ATP (adenosina trifosfato) visando *mTORC1* e *mTORC2* mostraram maior efetividade que os análogos à rapamicina no tratamento do câncer renal (CHIARINI et al., 2015).

2.4.4 EGFR

O receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) pertence a um família de receptores de tirosina quinases que inclui três outros membros (*ERBB2*, *ERBB3* e *ERBB4*). Esses receptores são ancorados na membrana citoplasmática e compartilham uma estrutura semelhante que é composta de um domínio de conexão ao ligante extracelular, uma região curta hidrofóbica e um domínio intracitoplasmático da tirosina quinase. (SCALTRITI; BASELGA, 2006).

Utilizando-se o método FISH, combinada com a IHQ, demonstrou-se que o maior mecanismo de superexpressão do *EGFR* é a amplificação gênica, encontrada principalmente no câncer gástrico, colorretal, pulmonar, carcinoma dos ductos biliares, sarcomas de partes moles e em 14% dos cânceres epidermóides de esôfago (HANAWA et al., 2006).

O benefício clínico observado com anti-*EGFR* TKIs não se restringe aos pacientes que abrigam mutações deste gene, mas há uma forte correlação entre a sua amplificação e uma alta resposta a estes inibidores de tirosina quinase pela alta

frequência de amplificação coexistindo com mutações do *EGFR*. (SCALTRITI; BASELGA, 2006)

2.4.5 MAP2K1

As proteínas quinases estão envolvidas em vários processos biológicos incluindo metabolismo, expressão gênica, proliferação celular, motilidade, diferenciação, apoptose e têm papel importante na regulação da maioria dos sinais de transdução nas células eucarióticas (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001).

Vários tipos de estímulos extracelulares levam a respostas através da via da fosforilação sequencial das proteínas. A via de sinalização da proteína quinase miogênica ativada (*MAPK*) compreende uma família de proteína quinase que é essencial na regulação da sobrevivência, proliferação, diferenciação e motilidade das células tumorais (CHANG; KARIN, 2001).

Em uma série de 50 pacientes com Histiocitose de Células de Langerhans foi demonstrado mutações *MAP2K1* em 50% dos casos *BRAF* não mutados, enfatizando a importância do papel da via *MAP2K1* na sua patogênese. A mutação *BRAFV600E* foi publicada previamente em 35% a 70% dos casos, mas nesta série foi de 16% (ALAYED et al., 2016). Em outra série com 97 pacientes a mutação *MAP2K1* foi encontrada em 17,1% dos pacientes (KAIXUAN et al., 2016).

Foram também descritas mutações *MAP2K1* em pacientes com Leucemia de células pilosas (WATERFALL et al., 2014), em casos isolados de Leucemia Linfocítica Crônica (LANDAU et al., 2015) e em Linfoma Folicular Tipo Pediátrico (SCHMIDT et al., 2017).

2.4.6 MET

A sinalização *MET* desregulada pode ocorrer no câncer através de vários mecanismos incluindo: superexpressão, amplificação, sinalização autócrina e ativação mutacional (TOVAR; GRAVEEL, 2017). As primeiras mutações foram identificadas nos carcinomas papilíferos renais hereditários (SCHMIDT et al., 1997).

A incidência de mutações do gene *MET* no câncer de pulmão é de 3% para os de natureza escamosa e 8% para os adenocarcinomas (HEIST et al., 2016),

também foi detectada em 9% no câncer de mama avançado (DE MELO GAGLIATO et al., 2014) e nos carcinomas de ovário avançados em 7,4% (TANG et al., 2013).

As mutações do *MET* no câncer de pulmão estão frequentemente associadas à resistência nos casos refratários progredindo durante a utilização de TK anti *EGFR* como o erlotinibe. O tratamento combinado com inibidores *MET* e *EGFR*, savolitinibe e osimertinibe resultaram em uma resposta dramática (ROSEL et al., 2009).

2.4.7 RAS

As proteínas *RAS* têm papel importante no câncer humano e reconhecido por muitos anos e inspirado muitas tentativas para encontrar inibidores. Mutações nos reguladores *RAS*, como a neurofibromina e *SPRED1*, também são contribuintes importantes do câncer. Atividade anormal do *RAS* demonstram também significativo papel no autismo e em outras doenças neurológicas (SIMANSHU; NISSLEY; MCCORMICK, 2017).

A prevalência das mutações *RAS* no câncer humano é reconhecida há muitos anos e conta com aproximadamente um milhão de mortes por ano em todo o mundo, similar à tuberculose e malária. As mutações *missense* (mutação pontual com codificação de um aminoácido diferente do original) mais comuns são *KRAS* em 85%, *NRAS* em 12% e *HRAS* em 3%. A maioria delas ocorre nos códons 12, 13 ou 61 (SIMANSHU; NISSLEY; MCCORMICK, 2017).

As mutações *KRAS* estão presentes na maioria dos adenocarcinomas ductais pancreáticos e significativamente altos percentuais em câncer de pulmão e cólon, mas muito incomum no câncer de bexiga onde a forma mais comum é o *HRAS*. Em contraste a incidência de mutações *NRAS* ocorre em tumores hematopoiéticos e melanomas malignos (FORBES et al., 2011).

Os adenocarcinomas ductais de pâncreas apresentam a maior incidência de mutações *RAS*, concentram-se quase que exclusivamente no locus *KRAS* entre 69% (KIPP et al., 2010) a 95% (ALMOGUERA et al., 1988). Estas discrepâncias podem ser originadas de métodos analíticos diferentes durante a evolução do câncer, com taxas de 30% em fases iniciais e 100% nas avançadas (HEZEL et al., 2006).

As mutações *KRAS* são eventos comuns em 40% a 45% de todos os carcinomas colorretais, afetando principalmente os códons 12 e 13 em 80% e 20% respectivamente, em contraste muito menos frequente em *NRAS* entre 1% e 3%

(VAUGHN et al., 2011). Nos tumores de pulmão de células não pequenas, a frequência pode variar entre 16% e 40% das amostras analisadas e aproximadamente 94% de todas as mutações *KRAS* foi resultado de alterações nos resíduos de Glicina no códon 12 (GRAZIANO et al., 1999). As alterações G12C estão em torno de 40% de todas as mutações seguidas de G12V em 22% e G12D em 16% (GARASSINO et al., 2011), provavelmente relacionada ao tabagismo (AHRENDT et al., 2001).

Nos melanomas, as mutações *NRAS* são as mais frequentes observadas em torno de 20% a 30% e na maioria são as substituições Q61 em 86% (OMHOLT et al., 2002). No câncer de bexiga as mutações do *KRAS* encontradas variam entre 0% a 30% (BOULALAS et al., 2009). Nos carcinomas da tireoide anaplásicos e foliculares as mutações *NRAS* foram observadas em 17% e nos carcinomas das células de Hurtle em 16% (FORBES et al., 2011). Nas neoplasias malignas a mutação *RAS* pode variar de 5% na leucemia mieloide crônica a 27% na leucemia mielomonocítica crônica (REUTER; MORGAN; BERGMANN, 2000).

2.4.8 ALK

É um membro da superfamília do receptor da insulina tirosina quinase, caracterizada como uma proteína desconhecida da tirosina quinase nos linfomas anaplásicos de grandes células. Em torno de 2/3 deles possuem translocação balanceada, na qual há uma fusão do gene da nucleofosmina (*NPM*) no cromossomo cinco com a porção 3' do gene *ALK* no cromossomo 2, gerando a proteína de fusão *NPM-ALK*, resultando na expressão ativada do domínio *ALK* (MORRIS et al., 1995).

O linfoma anaplásico de grandes células é um linfoma de células T CD30+ de excelente prognóstico e geralmente curável após o tratamento. Tipicamente ocorre em crianças e adultos jovens ocorrendo em 3% dos linfomas nos adultos e está associado à translocação t(2;5)(p23;q35) resultando na expressão *ALK* que apresenta melhor prognóstico que os *ALK* negativos (GASCOYNE et al., 1999). Esta translocação gera a proteína de fusão *NPM-ALK* (MORRIS et al., 1995).

No câncer de pulmão de não pequenas células principalmente no adenocarcinoma, está associado a proteína associada ao microtúbulo equinodermico *like 4* (*EML4*) - *ALK* (SODA et al., 2007) foi identificada em 5% dos casos (ROSKOSKI, 2013), ela também tem um papel crítico na patogênese do neuroblastoma, onde a sua superexpressão ou mutações pontuais produzem uma enzima com sua

atividade aumentada, ocorrendo tanto na linha germinativa quanto somática (MOSSÉ et al., 2008).

A proteína *ALK* apresenta superexpressão nos rabdomyosarcomas alveolares em 81% e 32% no subtipo embrionário, entretanto encontrou-se um elevado número de cópias do gene *ALK* tanto nos subtipos alveolares em 88% quanto embrionário em 52% (VAN GAAL et al. 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil genético somático de pacientes com diagnóstico de NTG com persistência nos níveis elevados do β HCG após evacuação molar e que tenham recebido quimioterapia antineoplásica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência das mutações nos genes ERBB2, AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ESR1, FGFR1, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PTEN, PDGFRA, PIK3CA, ROS1 e RICTOR pela técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS).
- Avaliar a frequência de CNVs nos genes ERBB2, FGR1, EGFR e RICTOR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO

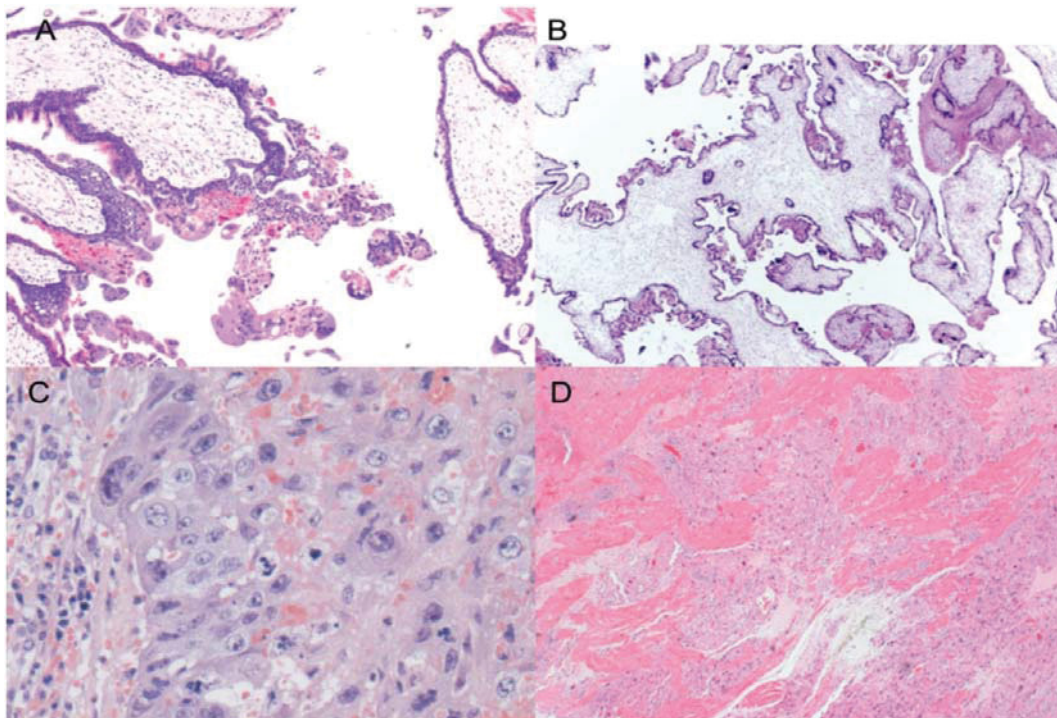
Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, com avaliação de documentação indireta (prontuário clínico), com análise do material anátomo patológico em parafina utilizando-se o método NGS para pesquisa de mutações dos oncogenes *ERBB2*, *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *DDR2*, *EGFR*, *ESR1*, *FGFR1*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *NTRK1*, *PTEN*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *ROS1* e *RICTOR* em amostras aleatórias nos casos de Neoplasia Trofoblástica Gestacional tratados no ambulatório de Oncologia Clínica do Complexo HC-UFPR no período de janeiro de 1998 a janeiro de 2014.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada avaliação descritiva dos dados por distribuição de frequência absoluta e relativa, por meio do uso de tabelas de frequência para as variáveis categóricas e estatística descritiva.

No período de janeiro de 1998 a janeiro de 2014, foram identificados 374 casos de gestação molar, as quais realizaram acompanhamento no Ambulatório de Mola do Departamento de Obstetrícia do Complexo HC-UFPR. Neste mesmo período, ocorreram 29.362 partos normais e cesarianos. Portanto, a taxa de incidência de mola foi de 1,27% em relação ao número de partos, 12 casos de mola a cada 1.000 partos. Dessa população, 79 pacientes foram encaminhadas ao ambulatório de Oncologia deste hospital por suspeita de Neoplasia Trofoblástica Gestacional. Foram estudadas 14 pacientes deste grupo.

A mola hidatiforme foi diagnosticada e classificada como completa ou parcial de acordo com critério anatomo-patológico (SZULMAN; ; SURTI, 1978b), e revisadas com patologista do serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Foram selecionados doze espécimes de mola hidatiforme fixados em formalina e emblocados em parafina, de pacientes que foram submetidos à quimioterapia antineoplásica por persistência de níveis elevados de gonadotrofina coriônica após evacuação por aspiração a vácuo. Na figura 8, os vários tipos histológicos das NTGs.

FIGURA 8 - MICROSCOPIA ÓPTICA HE E AS VÁRIAS FORMAS HISTOPATOLÓGICAS DA NTG



FONTE: FIGO ONCOLOGY COMMITTEE (2002).

NOTA: A) Mola Hidatiforme completa, B) Mola Hidatiforme Parcial, C) Coriocarcinoma, D) Tumor Trofoblástico de Sítio Placentário. Todas são caracterizadas por formas anômalas de proliferação trofoblástica, associadas a dismorfia das vilosidades coriônicas na MHC e MHP, mas sem invasão trofoblástica anormal ou nas vilosidades no CC e TTSP. (Magnificações originais x40, x20, x200, x100 respectivamente).

O critério utilizado para diagnóstico e progressão da NTG foi o FIGO 2000: estágio I – a doença é confinada ao útero; estágio II – a doença estende-se para fora do útero, mas limitada às estruturas genitais; estágio III – a doença estende-se aos pulmões, com ou sem envolvimento do trato genital; IV – a doença estende-se a outros sítios metastáticos.

4.2 PROTOCOLO DE DISSECÇÃO DA AMOSTRA

Para a dissecção da amostra para posterior extração do DNA foram realizados dez cortes histológicos de 12 μm de espessura, utilizando-se micrótomos limpos e navalhas descartáveis. Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças e distendidas em lâminas novas e estéreis.

Os cortes histológicos (12 μm) foram colocados em solução álcool absoluto/ água destilada, passadas para o banho-maria histológico com água destilada e distendidos em lâminas.

A desparafinação foi realizada mergulhando-se as lâminas em dois banhos de xilol, por 5 minutos cada um, seguindo de dois banhos de álcool absoluto, por 2 minutos cada um.

Após a desparafinação, a área de interesse do corte foi dissecada (raspada) com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada amostra) em tubos *ependorff* de 1,5 ml.

4.3 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL

O DNA foi extraído através do Kit comercial (QIAmp® DNA *Mini Kit* – Qiagen; Califórnia, USA) conforme recomendado pelo fabricante.

Adicionou-se 180 µl de tampão ATL no fragmento de tecido dissecado em um tubo *ependorff* de 1,5 ml e homogeneizou-se por vórtex; adicionou-se 25 µL de solução de Proteinase K, homogeneizou-se por vórtex durante 15 minutos e incubou-se a 56°C por 24h em banho seco até completar a lise; adicionou-se 200 µL do tampão AL e incubou-se a 70°C por 10 minutos em banho quente; adicionou-se 200 µL de etanol (96% – 100%) e homogeneizou-se por vórtex por 15 segundos; cuidadosamente, a mistura da etapa 4 foi aplicada numa coluna Spin e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, desprezou-se o tubo coletor com o centrifugado, trocando-o por um limpo; adicionou-se 500 µL do buffer AW1 na coluna Spin e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto.

Após a centrifugação desprezou-se o tubo coletor com o centrifugado trocando-o por um limpo; adicionou-se 500 µL do tampão AW2 na coluna spin e centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação desprezou-se o tubo coletor centrifugado; a coluna spin foi colocada num tubo *ependorff* de 1,5 ml e adicionou-se 50 µL do buffer AE de eluição. Incubou-se a temperatura ambiente por 1 min. e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minutos; a amostra de DNA extraída foi armazenada a – 20°C.

4.4 ANÁLISE DO DNA TUMORAL

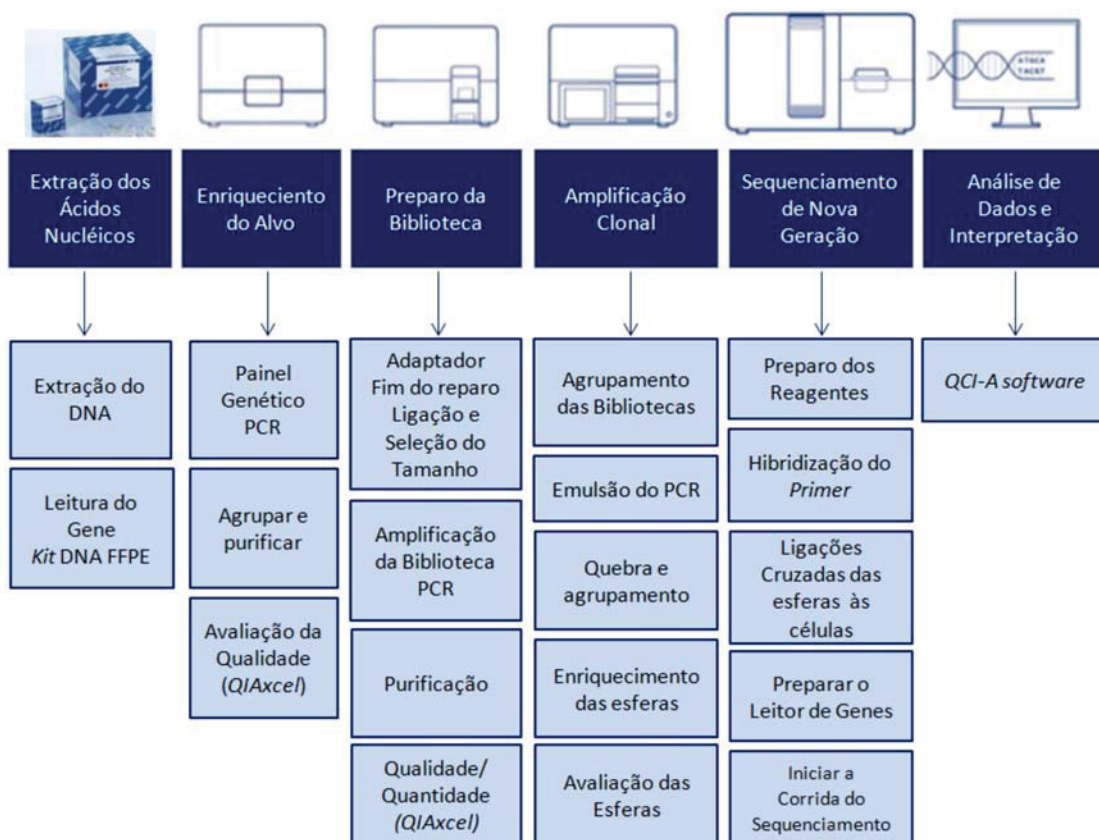
A tecnologia de seqüenciamento por síntese do *GeneReader* consiste inicialmente na incorporação de *dNTPs* (nucleotídeos marcados com fluorescência e reversíveis), seguidos por *dNTPs* reversíveis e não marcados (“nucleotídeos escuros”). O sequenciamento do *GeneReader* utiliza uma química de corantes de quatro cores rotulando cada cor indicando uma base diferente (A, C, G ou T) que é incorporado no fragmento de DNA.

Os terminais reversíveis facilitam a adição de um nucleotídeo de cada vez na cadeia crescente dos moldes do DNA. Após a detecção do sinal de cada esfera, as marcações fluorescentes e os terminais são removidos, permitindo um novo ciclo de incorporação, assegurando alta precisão de sequenciamento com boa relação custo benefício.

As bibliotecas de DNA são clonalmente amplificadas em esferas usando o *GeneRead QIAcube*® para servir como modelo de sequenciamento. Após a hibridização de um *primer* de sequenciamento, o modelo de inicialização (*primer-template*) são imobilizadas através de interação direta vidro-grânulo para produzir uma matriz de alta densidade em um Célula de Fluxo *GeneReader*. Para ler o conteúdo dos modelos em cada esfera, inicialmente a matriz dos fragmentos é submetida aos reagentes contendo *dNTPs*. Estas bases são incorporadas através da DNA polimerase modificada no final da cadeia crescente do DNA, de acordo com a cadeia complementar.

A matriz é posteriormente capturada por uma câmera digital de alta resolução e a emissão fluorescente de cada uma das quatro cores em suas posições da matriz são medidas e registradas. Finalmente, a matriz é exposta para separação química e romper os corantes fluorescentes e terminais reversíveis que em seguida, permitem que as bases adicionais sejam incorporadas. Este ciclo é então repetido no *GeneReader*. O fluxograma de trabalho deve seguir a sequência conforme a figura 9.

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO DO QIAGEN



FONTE: <<https://www.qiagen.com/br/shop/sequencing/>>.

NOTA: Demonstração do fluxograma de trabalho envolvendo as várias fases dos processos do NGS.

O sequenciamento *Next-Generation Sequencing* (NGS) foi realizado na plataforma *Gene Reader* (QIAGEN) para regiões e variantes de interesse clínico dos genes *AKT1* (NM_001014432.1), *ALK* (NM_004304.4), *BRAF* (NM_004333.4), *DDR2* (NM_006182.2), *EGFR* (NM_005228.3), *ESR1* (NM_001122742.1), *ERBB2* (NM_004448.2), *FGFR1* (NM_023110.2), *KIT* (NM_000222.2), *KRAS* (NM_004985.3), *MAP2K1* (NM_002755.3), *MET* (NM_001127500.1), *NRAS* (NM_002524.4), *NTRK1* (NM_002529.3), *PTEN* (NM_000314.4), *PDGFRA* (NM_006206.4), *PIK3CA* (NM_006218.2), *ROS1* (NM_002944.2) e *RICTOR* (NM_152756.3). Também foram analisadas CNVs (*copy number variants*) dos genes *EGFR*, *ERBB2*, *MET*, *FGFR1* e *RICTOR*.¹

O resultado final foi uma cobertura de 100% das bases com profundidade $\geq 60x$. O uso dos *unique molecular index* (UMIs) nesta metodologia, permitiu uma maior confiança na chamada de variantes, uma vez que elimina mutações artificiais que podem ser geradas durante o processo de amplificação dos alvos e construção das bibliotecas, além de auxiliar na detecção de variantes raras $\leq 1\%$.

As leituras foram alinhadas contra o genoma de referência UCSC (hg19) e processadas no software *Clinical Insight Analyze* (QCI-A). As variantes encontradas foram classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas, benignas, provavelmente benignas e variantes de significado incerto (VUS), de acordo com os critérios do American College of Medical Genetics. Este painel neste painel não detecta grandes alterações estruturais, como translocações, deleções, duplicações e inversões

O software inclui o acesso aos seguintes bancos de dados e ferramentas: QIAGEN Clinical Insight-Interpret (5.2.20180316), *Ingenuity Knowledge Base*² (Pandora 180304.000), CADD (v1.3), *Centomd* (4.1), EVS (ESP6500SI-V2)³, *Allele Frequency Community* (2018-01-17)⁴, JASPAR (2013-11)⁵, *Ingenuity Knowledge Base Snapshot Timestamp* (2018-03-04 11:39:39.0)⁶, *Vista Enhancer* hg18 (2012-07)⁷, *Vista Enhancer*

¹ Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation>>. Acesso em: 10 out. 2018.

² Disponível em: <<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

³ Disponível em: <<https://www.centogene.com/digital-solutions/mutation-database-centomd.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

⁴ Disponível em: <<http://www.allelefrequencycommunity.org/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

⁵ Disponível em: <<http://jaspar.genereg.net/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

⁶ Disponível em: <<https://www.qiagenbioinformatics.com/files/flyers/IPA>>. Acesso em: 10 out. 2018.

⁷ Disponível em: <<https://enhancer.lbl.gov/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

hg19 (2012-07), OMIM (May 26, 2017)⁸, gnomAD (2.0.1)⁹, *Clinical Trials* (Pandora 180304.000)¹⁰, BSIFT (2016-02-23), TCGA (2013-09-05)¹¹, PolyPhen-2 (v2.2.2)¹², 1000 *Genome Frequency* (phase3v5b)¹³, *Clinvar* (2018-01-03)¹⁴, DGV (2016-05-15), COSMIC (v83)¹⁵, *TargetScan* (6.2), SIFT4G (2016-02-23)¹⁶. HGMD (2017.4)¹⁷, PhyloP hg18 (2009-11)¹⁸, PhyloP hg19 (2009-11)¹⁹, DbSNP (150(2017-07-10))²⁰, ExAC (0.3.1)²¹.

⁸ Disponível em: <<https://www.omim.org/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

⁹ Disponível em: <<http://gnomad.broadinstitute.org/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁰ Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02553109>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹¹ Disponível em: <<https://cancergenome.nih.gov/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹² Disponível em: <<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹³ Disponível em: <<http://www.internationalgenome.org/faq/how-can-i-get-allele-frequency-my-variant/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁴ Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁵ Disponível em: <<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁶ Disponível em: <www.targetscan.org/>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁷ Disponível em: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁸ Disponível em: <<https://ccg.vital-it.ch/mga/hg18/phylop/phylop.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

¹⁹ Disponível em: <<https://ccg.vital-it.ch/mga/hg19/phylop/phylop.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

²⁰ Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

²¹ Disponível em: <<http://exac.broadinstitute.org/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

5 RESULTADOS

De um total de 79 pacientes com diagnóstico de NTG, com idade variando entre 16 e 49 anos, sendo que a idade mediana foi de 25 anos. O diagnóstico histopatológico de Mola Hidatiforme Parcial em 15,2%, Mola Hidatiforme Completa em 41,7%, Mola Hidatiforme em 15,2%, Coriocarcinomas em 8,9%, aborto em 5%, Mola invasora em 1,3%, Tumor de Sítio Placentário em 1,3% e 11,4% sem anátomo patológico disponível.

Em relação ao estadiamento da Neoplasia Trofoblástica Gestacional, a grande maioria das pacientes apresentava Estádio Clínico (EC) I (62%), EC II 2,5%, EC III 35,5% e nenhuma paciente EC IV. Os sítios de acometimento mais comuns foram: 62% útero, 33% pulmões, 2,5% vagina, e 2,5 pulmões e vagina.

Destas pacientes que progrediram após a evacuação molar, foram coletados 33 blocos de parafina em arquivo com material molar de onde foram pesquisadas as mutações através do método NGS, de modo aleatório em 15 amostras.

As características clínicas destas pacientes encontram-se no quadro 3. A idade mediana foi de 22 anos, foram 11 molas completas (73,3%), 2 coriocarcinoma (13,3%), 2 molas parciais (13,3%), estágio clínico I, limitadas ao útero em 9 (60%), estágio clínico III com acometimento pulmonar em 5 (40%), baixo risco em 11 (73,3%), alto risco em 4 (26,7%), monoquimioterapia em 9 (60%) e poliquimioterapia em 6 (40%). Todas as pacientes responderam favoravelmente ao tratamento.

QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES

N.º	IDADE (anos)	AP	EC	RISCO	LOCAL	QT	DESFECHO
1	18	MC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
2	31	CC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
3	29	MP	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
4	32	MP	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
5	25	MC	III	Baixo	Pulmões	MTX+LV, ActD	RC
6	20	MC	III	Alto	Pulmões	MTX+LV, EMA-CO	RC
7	20	MC	III	Baixo	Pulmões	MTX+LV, ActD, EMA-CO	RC
8	20	MC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
9	22	MC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
10	18	MC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
11	17	MC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
12	34	MC	I	Baixo	Útero	MTX+LV	RC
13	50	MC	III	Alto	Pulmões	EMA-CO	RC
14	20	MC	III	Alto	Pulmões	EMA-CO	RC
15	31	CC	III	Alto	Pulmões	EMA-CO	RC

FONTE: O autor (2018).

NOTA: AP – Anátomo Patológico; EC – Estadiamento Clínico; QT – Quimioterapia; MP – Mola Parcial; MC – Mola Completa; CC – Coriocarcinoma; MTX – Metotrexato; LV – Leucovorin (Ácido Folínico), EMA-CO – Etoposídeo, Metotrexato, Actinomicina D, Ciclofosfamida e Vincristina; ActD – Actinomicina D; RC – Remissão Completa; RP – Remissão parcial.

Este quadro mostra as características clínicas das pacientes com NTG incluídas no estudo.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 1: *ALK*, exon 23, mudança do nucleosídeo 3645+5G>A e perda de função; *DDR2*, exon 18, 2308G>A, mudança do aminoácido para V770M e perda de função; *EGFR*, exon 19, nucleotídeo alterado 2197C>T, mudança de aminoácido para P733S e perda de função; *EGFR*, exon 19, nucleotídeo alterado 2278C>T, mudança de aminoácido para L760F e ganho de função; *EGFR*, exon 20, nucleotídeo alterado 2305G>A, mudança de aminoácido para V769M e ganho de função; *EGFR*, exon 21, nucleotídeo alterado 2590G>A, mudança de aminoácido para A864T e ganho de função; *EGFR*, exon 20, nucleotídeo alterado 2324G>A, mudança de aminoácido para C7154Y e perda de função; *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, exon 9, nucleotídeo alterado 1170_1171delGGinsAA, mudança de aminoácido para M390_V391delinsIM e perda de função; *FGFR1*, exon 11, nucleotídeo alterado 1453G>A, mudança de aminoácido para G485R e ganho de função; *KRAS*, exon 2, nucleotídeo alterado 85G>A, mudança de aminoácido para V29M e perda de função; *NRAS*, exon 2, nucleotídeo alterado 38G>A, mudança de aminoácido para G13D e ganho de função; *NRAS*, exon 2, nucleotídeo alterado 29G>A, mudança de aminoácido para G10E e perda de função; *NRAS*, exon 3, nucleotídeo alterado 173C>T, mudança de aminoácido para T58I e ganho de função; *RICTOR*, amplificação e ganho de função, estão demonstradas no quadro 4.

QUADRO 4 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 1

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ALK</i>	23	c.3645+5G>A	4,08		Perda de Função
<i>DDR2</i>	18	c.2308G>A	12	p.V770M	Perda de Função
<i>EGFR</i>	19	c.2197C>T	9,69	p.P733S	Perda de Função
<i>EGFR</i>	19	c.2278C>T	6,59	p.L760F	Ganho de Função
<i>EGFR</i>	20	c.2305G>A	5,61	p.V769M	Ganho de Função
<i>EGFR</i>	21	c.2590G>A	7,58	p.A864T	Ganho de Função
<i>EGFR</i>	20	c.2324G>A	5,13	p.C775Y	Perda de Função
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de Função
<i>FGFR1</i>	9	c.1170_1171delGGinsAA	5,06	p.M390_V391delinsIM	Perda de Função
<i>FGFR1</i>	11	c.1453G>A	12	p.G485R	Ganho de Função
<i>KRAS</i>	2	c.85G>A	9,48	p.V29M	Perda de Função
<i>NRAS</i>	2	c.38G>A	6,67	p.G13D	Ganho de Função
<i>NRAS</i>	2	c.29G>A	6,14	p.G10E	Perda de Função
<i>NRAS</i>	3	c.173C>T	7,84	p.T58I	Ganho de Função
<i>RICTOR</i>				Amplificação	Ganho de Função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais, del - deleção, ins - inserção.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 1,

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 2: *EGFR*, amplificação, ganho de função; *ERBB2*, amplificação e com ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função; *ERBB2*, amplificação e ganho de função, estão demonstradas no quadro 5.

QUADRO 5 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 2

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de Função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de Função

FONTE: O autor (2018).

Este quadro demonstra as amplificações na amostra 2.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 3: *ERBB2*, exon 21, mudança do nucleosídeo 2542G>T, mudança de aminoácido para A848S e perda de função; *FGFR1*, exon 17, mudança do nucleotídeo 2198T>C, mudança de aminoácido para M733T e perda de função; *MAP2K1*, exon 6, mudança do nucleotídeo 659C>T, mudança de aminoácido para A220V e ganho de função, estão demonstradas no quadro 6.

QUADRO 6 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 3

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>	21	c.2542G>T	5,08	p.A848S	Perda de função
<i>FGFR1</i>	17	c.2198T>C	14	p.M733T	Perda de função
<i>MAP2K1</i>	6	c.659C>T	4,92	p.A220V	Ganho de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 3.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 4: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, amplificação e ganho de função; *RICTOR*, amplificação e ganho de função, estão demonstradas no quadro 7.

QUADRO 7 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 4

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>RICTOR</i>				Amplificação	Ganho de função

FONTE: O autor (2018).

Este quadro demonstra as mutações na amostra 4.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 5: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, exon 9, mudança do nucleotídeo 1234A>C, mudança de aminoácido para M412L e ganho de função, estão demonstradas no quadro 8.

QUADRO 8 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 5

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>	9	c.1234A>C	5,83	p.M412L	Ganho de Função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 5.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 6: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função, estão demonstrados no quadro 9.

QUADRO 9 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 6

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 6.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 7: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, exon 3, mudança do nucleotídeo 352G>C, mudança de aminoácido para A118P e perda de função, estão demonstrados no quadro 10.

QUADRO 10 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 7

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>EGFR</i>	3	c.352G>C	5,65	p.A118P	Perda de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 7.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 8: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, amplificação e ganho de função; *DDR2*, exon 18, mudança do nucleotídeo 2333G>A, mudança de aminoácido para W778 e perda de função, estão demonstrados no quadro 11.

QUADRO 11 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 8

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>DDR2</i>	18	c.2333G>A	12	p.W778*	Perda de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 8.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 9: *EGFR*, exon 18, mudança do nucleotídeo 2125G>A, mudança do aminoácido para E709K e ganho de função; *EGFR*, exon 17, mudança do nucleotídeo 2042_2043delGGinsAA, mudança do aminoácido para R681K e perda de função; *EGFR*, exon 21, mudança do nucleotídeo 2492G>A e ganho de função; *EGFR*, exon 21, mudança do nucleotídeo 2500G>A, mudança do aminoácido para V834M e ganho de função; *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, amplificação e ganho de função; *ERBB2*, exon 8, mudança do nucleotídeo 1021+5C>T e perda de função; *ERBB2* exon 24, mudança do nucleotídeo 2968C>T, mudança do aminoácido para Q990* e perda de função; *AKT*, exon 5, mudança do nucleotídeo 47-48G>A e função

normal; *AKT*, exon 5, mudança do nucleotídeo 124C>T, mudança do aminoácido para P42S e perda de função; *ALK*, exon 25, mudança do nucleotídeo 3806G>A, mudança do aminoácido para G1269E e ganho de função; *ALK*, exon 23, mudança do nucleotídeo 3538G>A, mudança do aminoácido para V1180I e perda de função; *ALK*, exon 23, mudança do nucleotídeo 3602G>A, mudança do aminoácido para G1201E e ganho de função; *FGFR1*, exon 16, mudança do nucleotídeo 2105C>T, mudança do aminoácido para P702L e perda de função; *FGFR1*, exon 16, mudança do nucleotídeo 2084C>T, mudança do aminoácido para T695I e perda de função; *FGFR1*, exon 15, mudança do nucleotídeo 1997G>A, mudança do aminoácido para W666* e perda de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função; *MAP2K1*, exon 6, mudança do nucleotídeo 601C>T, mudança do aminoácido para R201C e perda de função; *MAP2K1*, exon 6, mudança do nucleotídeo 670G>A, mudança do aminoácido para V224M e ganho de função; *MET*, exon 16, mudança do nucleotídeo 3376G>A p.A1126T, mudança do aminoácido para A1126T e perda de função; *PDGFRA*, exon 18, mudança do nucleotídeo 2524G>A, mudança do aminoácido para D842N e ganho de função; *PDGFRA*, exon 18, mudança do nucleotídeo 2548G>A, mudança do aminoácido para V850M e ganho de função; *PIK3CA*, exon 21, mudança do nucleotídeo 3146G>A, mudança do aminoácido para G1049D e perda de função; *ROS1*, exon 38, mudança do nucleotídeo 6041G>A, mudança do aminoácido para G2014E e perda de função; *RICTOR*, amplificação e ganho de função, estão demonstrados no quadro 12.

QUADRO 12 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 9

continua

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>EGFR</i>	18	c.2125G>A	7,89	p.E709K	Ganho de Função
<i>EGFR</i>	17	c.2042_2043delGGinsAA	6,09	p.R681K	Perda de Função
<i>EGFR</i>	21	c.2492G>A	7,35	p.R831H	Ganho de Função
<i>EGFR</i>	21	c.2500G>A	6,25	p.V834M	Ganho de Função
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de Função
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de Função
<i>ERBB2</i>	8	c.1021+5C>T	5,2		Perda de Função
<i>ERBB2</i>	24	c.2968C>T	5,61	p.Q990*	Perda de Função
<i>AKT1</i>	5	c.124C>T	14	p.P42S	Perda de Função
<i>ALK</i>	25	c.3806G>A	7,38	p.G1269E	Ganho de Função
<i>ALK</i>	23	c.3538G>A	16	p.V1180I	Perda de Função
<i>ALK</i>	23	c.3602G>A	7,28	p.G1201E	Ganho de Função
<i>FGFR1</i>	16	c.2105C>T	7,92	p.P702L	Perda de Função
<i>FGFR1</i>	16	c.2084C>T	4,72	p.T695I	Perda de Função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de Função

QUADRO 12 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 9

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	conclusão EFEITO NA PROTEÍNA
<i>FGFR1</i>	15	c.1997G>A	5,83	p.W666*	Perda de Função
<i>MAP2K1</i>	6	c.601C>T	8,84	p.R201C	Perda de Função
<i>MAP2K1</i>	6	c.670G>A	10	p.V224M	Ganho de Função
<i>MET</i>	16	c.3376G>A	18	p.A1126T	Perda de Função
<i>PDGFRA</i>	18	c.2524G>A	10	p.D842N	Ganho de Função
<i>PDGFRA</i>	18	c.2548G>A	7,09	p.V850M	Ganho de Função
<i>PIK3CA</i>	21	c.3146G>A	12	p.G1049D	Perda de Função
<i>RICTOR</i>				Amplificação	Ganho de Função
<i>ROS1</i>	38	c.6041G>A	20	p.G2014E	Perda de Função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais, del - deleção, Ins - inserções.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 9.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 10: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função; *MAP2K1*, exon 6, mudança do nucleotídeo 578C>T, mudança de aminoácido para P193L e perda de função; *RICTOR*, amplificação e ganho de função, estão demonstrados no quadro 13.

QUADRO 13 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 10

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>MAP2K1</i>	6	c.578C>T	4,51	p.P193L	Perda de função
<i>RICTOR</i>				Amplificação	Ganho de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 10.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 11: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, amplificação e ganho de função; *EGFR*, exon 8, mudança do nucleotídeo 964G>A, mudança de aminoácido para G322S e perda de função; *EGFR*, exon 8, mudança do nucleotídeo 905C>T, mudança de aminoácido para T302I e perda de função; *ALK*, exon 25, mudança do nucleotídeo 3754G>A, mudança de aminoácido para A1252T e perda de função; *ERBB2*, exon 5, mudança do nucleotídeo 589_590delCCinsTT, mudança de aminoácido para P197L e perda de função; *ERBB2*, exon 5, mudança do nucleotídeo 628_633dupGAGGAT, mudança de aminoácido para E210_D211dup e perda de

função; *ERBB2*, exon 8, mudança do nucleotídeo 985C>T, mudança de aminoácido para Q329* e perda de função; *ERBB2*, exon 8, mudança do nucleotídeo 988C>T, mudança de aminoácido para R330W e perda de função; *ERBB2*, exon 21, mudança do nucleotídeo 2581delA, mudança de aminoácido para I861fs*50 e perda de função; *ERBB2*, exon 21, mudança do nucleotídeo 2540C>T, mudança de aminoácido para A847V e perda de função, estão demonstrados no quadro 14.

QUADRO 14 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 11

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>EGFR</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>EGFR</i>	8	c.964G>A	14	p.G322S	Perda de função
<i>EGFR</i>	8	c.905C>T	7,09	p.T302I	Perda de função
<i>ALK</i>	25	c.3754G>A	26	p.A1252T	Perda de Função
<i>ERBB2</i>	5	c.589_590delCCinsTT	4,84	p.P197L	Perda de função
<i>ERBB2</i>	5	c.628_633dupGAGGAT	11	p.E210_D211dup	Perda de função
<i>ERBB2</i>	8	c.985C>T	24	Q329*	Perda de função
<i>ERBB2</i>	8	c.988C>T	17	p.R330W	Perda de função
<i>ERBB2</i>	21	c.2581delA	7,45	p.I861fs*50	Perda de função
<i>ERBB2</i>	21	c.2540C>T	13	p.A847V	Perda de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais, dup - duplicação, del - deleção, ins - inserção, fs - *frame shift*.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 11.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 12: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função; *MET*, exon 10, mudança do nucleotídeo 2274G>T mudança de aminoácido para W847V e perda de função, estão demonstrados no quadro 15.

QUADRO 15 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 12

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>MET</i>	10	c.2274G>A	7,32	p.W758*	Perda de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 12.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 13: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função, estão demonstrados no quadro 16.

QUADRO 16 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 13

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 13.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 14: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, exon 16, mudança do nucleotídeo 2088_2089delGGinsAA, mudança de aminoácido para G697S e perda da função; *KIT* exon 17, mudança do nucleotídeo 1943G>A, mudança de aminoácido para G648D e perda da função, estão demonstrados no quadro 17.

QUADRO 17 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 14

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>	16	c.2088_2089delGGinsAA	8,2	p.G697S	Perda de função
<i>KIT</i>	17	c.1943G>A	5,6	p.G648D	Perda de função

FONTE: O autor (2018).

NOTA: p - mutações pontuais.

Este quadro demonstra as mutações na amostra 14.

Foram encontradas as seguintes alterações patológicas dos genes na amostra 15: *ERBB2*, amplificação e ganho de função; *FGFR1*, amplificação e ganho de função, estão demonstrados no quadro 18.

QUADRO 18 - MUTAÇÕES DA AMOSTRA 15

ONCOGENE	EXON	NUCLEOTÍDEO ALTERADO	FRAÇÃO ALÉLICA (%)	MUDANÇA	EFEITO NA PROTEÍNA
<i>ERBB2</i>				Amplificação	Ganho de função
<i>FGFR1</i>				Amplificação	Ganho de função

FONTE: O autor (2018).

Foram encontradas amplificações nos genes *ERBB2* em 14 de 15 amostras (93%), *FGFR1* em 8 de 15 (53%), *RICTOR* em 4 de 15 (26%), *EGFR* em 7 de 15 (46%) e não houve amplificação no oncogene *MET* conforme o quadro 19 e figura 10.

QUADRO 19 - PAINEL DAS AMPLIFICAÇÕES

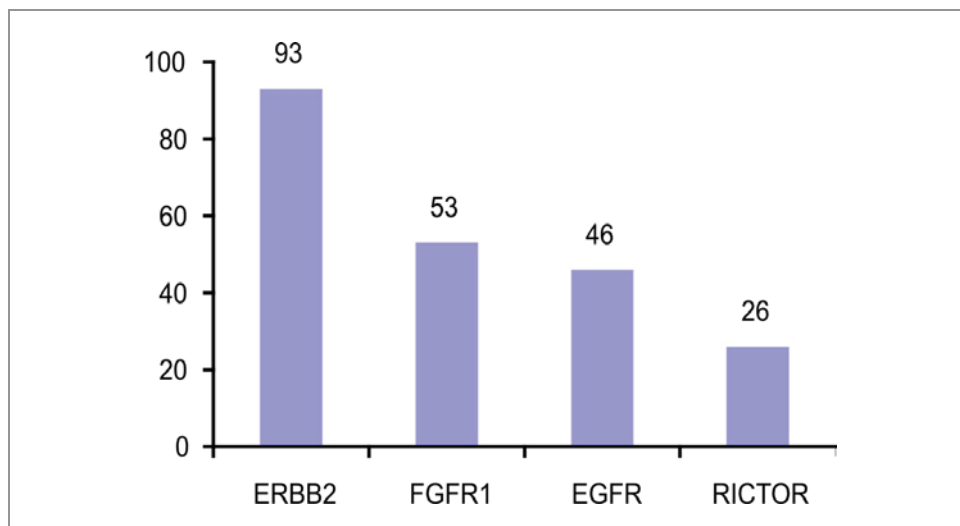
ONCOGENE	PACIENTES														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>ERBB2</i>	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>FGFR1</i>		A			A	A			A	A		A	A		A
<i>RICTOR</i>	A			A					A	A					
<i>EGFR</i>		A		A	A			A	A	A	A				
<i>MET</i>															

FONTE: O autor (2018).

NOTA: A - Amplificação.

Foram encontradas amplificações nos genes *ERBB2* em 14 de 15 amostras (93%), *FGFR1* em 8 de 15 (53%), *RICTOR* em 4 de 15 (26%), *EGFR* em 7 de 15 (46%) e nenhuma mutação no oncogene *MET*.

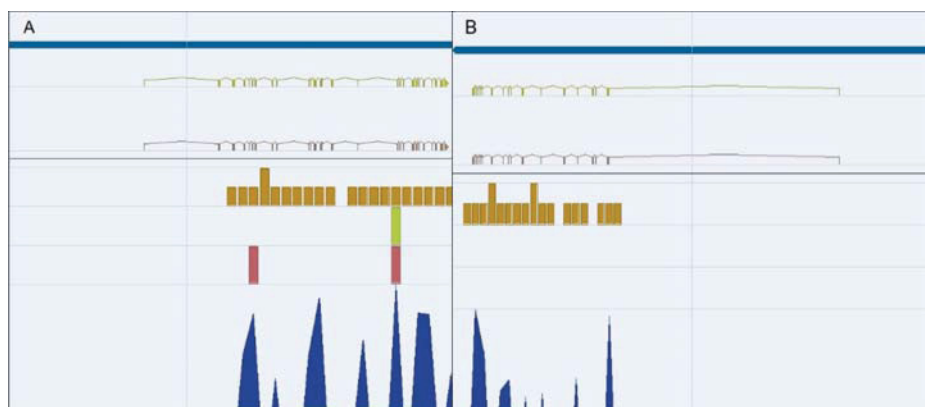
FIGURA 10 - FREQUÊNCIA DAS AMPLIFICAÇÕES NOS ONCOGENES ESTUDADOS



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Observou-se que as amplificações mais frequentes foram relacionadas aos oncogenes *ERBB2*, *EGFR*, *FGFR1* e *RICTOR*.

FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO DO ERBB2 E FGFR1



FONTE: O autor (2018).

NOTA: A - demonstração gráfica da amplificação do *ERBB2* no cromossomo 15; B - amplificação do *FGFR1* no cromossomo 8.

Foram encontradas mutações nos oncogenes *EGFR* (p.P733S; p.L760F; p.V769M; p.A864T; p.A118P; p.E709K; p.R681K; c.2492G>A; p.V834M; p.G322S; p.T302I; p.C775Y), *ERBB2* (p.A848S; c.1021+5C>T; p.Q990*; p.P197L; p.E210_D211dup; p.R330W; p.I861fs*50; p.A847V; p.Q329*), *FGFR1* (p.M390_V391delinsIM; p.G485R; p.M733T; p.M412L; p.T695I; p.W666*; p.G697S), in *ALK* (c.3645+5G>A; p.G1269E; p.V1180I; p.G1201E; p.A1252T), *MAP2K1* (p.A220V; p.R201C; p.V224M; p.P193L), *NRAS* (p.G13D; p.G10E; p.T58I), *DDR2* (p.V770M; p.W778*), *MET* (p.A1126T; p.W758*), *PDGFRA* (p.D842N; p.V850M), *ROS1* (p.G2014E) *AKT1* (p.P42S), *KIT* (p.G648D), *PIK3CA* (p.G1049D) e *KRAS* (p.V29M). Observa-se que a maioria das mutações foram encontradas nos genes *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *ALK*, *MAP2K1* e *RAS* (quadro 20).

QUADRO 20 - PAINEL DAS MUTAÇÕES

ONCOGENE	PACIENTES														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>ERBB2</i>			M						2M		6M				
<i>FGFR1</i>	2M		M		M				3M					M	
<i>MAP2K1</i>			M						2M	M					
<i>EGFR</i>	5M						M		4M		2M				
<i>DDR2</i>	M							M							
<i>MET</i>									M			M			
<i>NRAS</i>	3M														
<i>ALK</i>	M										M				
<i>PDGFRA</i>									2M						
<i>ROS1</i>									M						
<i>AKT1</i>									M						
<i>KIT</i>														M	
<i>PIK3CA</i>									M						
<i>KRAS</i>	M														
<i>BRAF</i>															
<i>ESR1</i>															
<i>NRTK1</i>															
<i>PTEN</i>															
<i>RICTOR</i>															

FONTE: O autor (2018).

NOTA: M - Mutações.

Neste quadro mostra-se o painel das mutações patogênicas. Houve um predomínio das mutações em *ERBB2*, *FGFR1*, *MAP2K1*, *EGFR*. O número indica quantas mutações podem ocorrer na mesma amostra.

6 DISCUSSÃO

Com o propósito de identificar a frequência de mutações em oncogenes associados com a transformação maligna das molas hidatiformes foram realizados estudos utilizando um painel de 17 genes, baseados no potencial terapêutico de cada um deles.

Alguns estudos mostraram que tanto a MHC monospérmica quanto a dispermica apresentam semelhante potencial maligno, podendo sugerir que o excesso de genes paternos é responsável pela coriocarcinogênese (LAWLER; FISHER; DENT, 1991) tanto as contribuições paternas como maternas para o genoma trofoblástico são necessários para manter um desenvolvimento equilibrado de embriões e extra-embrionários tecidos. Quando ocorre um desequilíbrio, como no conceito androgenético, haveria proliferação desregulada de trofoblastos e falha do desenvolvimento embrionário normal.

Vários fatores de crescimento e oncogenes são anormalmente expressos em tecidos molares e coriocarcinomas, ambos possuem super-expressão do *MYC*, *ERBB2*, e *BCL2*. A expressão proteica do *EGFR* foi mais expressa em coriocarcinomas e em molas completas em comparação com placenta normal e molas parciais, sugerindo que os membros da família *EGFR* podem estar envolvidos na patogênese da NTG (HUSSEIN, 2009).

A expressão das oncoproteínas *MYC*, *ERBB2*, *FMS* e *BCL2* foi estudada em placenta normal, molas parciais, molas completas e coriocarcinoma. O estudo sugeriu que a “up-regulation” sinérgica das oncoproteínas *c-myc*, *c-erb-ERBB2*, *FMS* e *BCL2* pode ser importante na patogênese da mola completa e do coriocarcinoma, entretanto as molas parciais não expressaram do mesmo modo estas oncoproteínas (FULOP et al., 1998b).

A expressão da proteína *ERBB2* foi significativamente mais intensa nas molas completas e no coriocarcinoma do que na placenta normal ou nas molas parciais. A superexpressão foi encontrada exclusivamente nos trofoblastos extra vilosos invasivos da mola completa e do coriocarcinoma, podendo estar relacionada a um maior comportamento proliferativo e mais agressivo da mola completa e coriocarcinoma (BAUER et al., 1997; YAZAKI-SUN et al., 2006).

No presente estudo além da expressão do *ERBB2*, também houve expressão significativa do *EGFR*, *FGFR1* e *RICTOR*, correlacionando a patogênese das NTGs com um processo de amplificação gênica tanto da via do *EGFR*, *VGFR* quanto da

via *mTOR*. A instabilidade genômica revela-se como processo importante, quando observamos o número de mutações que ocorrem concomitantes à amplificação gênica.

A amplificação ou a superexpressão das proteínas do gene *ERBB2* foi identificada de uma forma muito variada entre os estudos: no câncer de mama invasivo entre 10% a 34% (NAVOLANIC et al., 2003), no câncer gástrico entre 44% a 53,4% (JORGENSEN; HERSOM, 2012) nos carcinomas epiteliais de ovário 37,5% (JAFRI; RIZVI, 2017), nas leucemias agudas linfoblásticas tipo B em 17% (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2016), nos adenocarcinomas e carcinomas epidermóides de pulmão entre 2,5% a 43% (GROB et al., 2012), nos carcinomas colorretais entre 27% (MARX et al., 2010) e 47,7% (PARK et al., 2007), e nos carcinomas de endométrio uma variação de 0% a 47% (BUZA et al., 2014).

Apesar dos estudos demonstrarem uma correlação entre a superexpressão do *ERBB2* e a agressividade das molas hidatiformes (JELINCIC et al., 2003), não houve uma padronização na implementação de testes validados tanto por IHQ ou por FISH, para a seleção de potenciais alvos terapêuticos com drogas anti *ERBB2*.

O encontro da amplificação do *ERBB2* em mais de 90% das pacientes estudadas através do NGS, além de contribuir para a compreensão da fisiopatologia das NTGs, a superexpressão do *ERBB2* oferece uma base sólida para a utilização de medicações anti-*ERBB2* nos pacientes refratários ou em combinação ao tratamento convencional no sentido de redução da toxicidade e aumento na eficácia.

Em torno de 20% de todos os cânceres de mama apresentam amplificação ou superexpressão do gene *ERBB2* (ROSS et al., 2009). O tratamento com o anticorpo monoclonal humanizado anti-*ERBB2* trastuzumab, além de quimioterapia, como comparado com a quimioterapia isoladamente, melhora a sobrevida global e livre de progressão entre pacientes com metástase *ERBB2* positiva câncer de mama, bem como outras terapias direcionadas ao *ERBB2* como: Pertuzumabe, TDM1 e lapatinibe (ZHU; VERMA, 2015).

Seguindo os estudos prévios com câncer de mama outros estudos avaliaram a relação da amplificação do *ERBB2* no câncer gástrico, correlacionando com características clínicas patológicas e determinando o seu prognóstico. Os resultados do estudo ToGA foram muito encorajadores, abrindo um novo canal de esperança para o tratamento de câncer gástrico avançado (BANG et al., 2010).

Um duplo bloqueio na expressão de *ERBB2* no estudo HERACLES A, resultou em uma taxa de resposta objetiva de 30% em pacientes pré-tratados com câncer

colorretal metastático com superexpressão para o *ERBB2* em câncer de cólon metastático e refratário às terapias padrão, sugerindo uma nova estratégia de terapia direcionada para linhas posteriores (SARTORE-BIANCHI et al., 2016).

Conforme os estudos apresentados a utilização de quimioterápicos combinados com anticorpos monoclonais contra *ERBB2*, representam um avanço no tratamento de pacientes com câncer de mama, estômago e cólon. A utilização dos anticorpos monoclonais contra o *ERBB2* em molas hidatiformes refratárias aos tratamentos convencionais, ou em substituição às drogas tradicionais reduzindo o efeito colateral como alopecia, náuseas, vômitos, neutropenia, oferece uma excelente oportunidade de resposta adicional sem aumento da toxicidade.

Nos casos mais complexos de metástases no sistema nervoso central, a utilização do lapatinibe, uma tirosina quinase de baixo peso molecular associada à capecitabina ou ainda o TDM1 provaram ser eficazes em pacientes com câncer de mama com metástases cerebrais e que não foram submetidas à radioterapia, portanto uma excelente alternativa para àquelas com amplificação do *ERBB2* (BACHELOT et al., 2013).

O *FGFR1* é um receptor oncogênico da tirosina quinase envolvido no crescimento e sobrevivência celular através da ativação de várias vias, incluindo as vias *PI3K/AKT/MTOR* e *RAS/RAF/MAPK*. A amplificação, fusões e superexpressão de proteínas causam a ativação do *FGFR1*. A amplificação da região cromossômica 8p11-12, a localização genômica do *FGFR1*, é uma das amplificações focais mais comuns no câncer de mama, e ocorrendo em 10% dos cânceres de mama, predominantemente naqueles com receptor de estrogênio positivo. As amplificações do *FGFR1* também foram relatadas em carcinomas de células escamosas orais e menor incidência no câncer dos ovários, bexiga e rabadomiossarcoma (TURNER; GROSE, 2010).

O *FGFR1* encontrou-se amplificado em 53% das amostras, demonstrando um papel importante deste gene na patogênese das NTGs. A participação da via do *VEGFR1* também parece ter papel muito importante na angiogênese, portanto há forte correlação entre as características clínicas destes tumores e a superexpressão dos fatores vasculares e endoteliais por serem muito vascularizados e sangramento fácil.

Há um grande potencial na utilização de medicamentos que agem nos tumores muito vascularizados como ocorre nos sarcomas principalmente no que se refere ao pazopanibe (CRANMER; LOGGERS; POLLACK, 2016). A expressão do *VEGF* nos

sarcomas e utilização de medicamentos anti *VEGF* (LINCH et al., 2014), também pode se refletir nas NTGs com o encontro da superexpressão do *VEGFR1* e pode favorecer a utilização de medicamentos anti *VEGF* como: sorafenibe, regorafenibe, pazopanibe, sunitinibe e ponatinibe são medicamentos com um grande potencial a serem exploradas no futuro nas neoplasias trofoblásticas.

Vários estudos demonstraram uma amplificação do gene *RICTOR* ou superexpressão protéica em diferentes tipos de câncer. A amplificação do *RICTOR* foi encontrada no câncer de próstata neuroendócrino em 18%, no carcinoma de células escamosas do pulmão em 16%, nos sarcomas em 12%, no câncer de esôfago e de estômago em 10% (JEBALI; DUMAZ, 2018).

RICTOR foi identificado como o gene mais frequentemente amplificado (14%) em uma coorte de pacientes com câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) metastáticos. A variação do número de cópias foi correlacionada com a expressão protéica em células CPPC. A sobrevida global foi significativamente diminuída nos pacientes com SCLC e amplificação do *RICTOR* (SAKRE et al., 2017).

O encontro da amplificação *RICTOR* sugere um envolvimento da via mTOR nas NTGs. Considerando os estudos anteriores inibindo esta via, também parece uma via alternativa a ser explorada para os casos refratários e expressão do *RICTOR*, tendo como drogas potenciais àquelas que atuam na via *mTOR* como: o everolimus e o tensesolimus.

Utilizando-se o método FISH, combinada com a IHQ, demonstrou-se que o maior mecanismo de superexpressão do *EGFR* é amplificação gênica, encontrada principalmente no câncer gástrico, colorretal, pulmonar, carcinoma dos ductos biliares, sarcomas de partes moles e em 14% dos cânceres epidermóides de esôfago (HANAWA et al., 2006).

Encontrou-se *EGFR* amplificado em 46% nas NTGs, demonstrando sua importância na sua patogênese. Existem várias drogas alvo envolvidas com mutações e amplificações do *EGFR* e o benefício clínico observado com anti-*EGFR* TKIs não se restringindo aos pacientes que abrigam mutações do gene *EGFR*. Existe também uma forte correlação entre a amplificação do gene *EGFR* e uma alta resposta aos *EGFR* TKIs pela frequência de amplificação do *EGFR* coexistindo com mutações do *EGFR*. (SCALTRITI; BASELGA, 2006).

No câncer de pulmão de células não pequenas as mutações do exon 19 e 21 são preditivas de resposta (SCALTRITI; BASELGA, 2006), entretando os

anticorpos monoclonais anti *EGFR* como o panitumumabe e o cetuximabe têm seu uso limitado nos carcinomas colorretais *RAS* não mutado e carcinomas epidermóides avançados de cabeça e pescoço. Não há estudos de anticorpos monoclonais anti *EGFR* ou TKIs em molas hidatiformes, entretanto poderia ser uma alternativa como alvo terapêutico em situações de refratidade em pacientes que apresentassem superexpressão deste oncogene.

As mutações no oncogene *MAPK1* ocorreram nos linfomas foliculares pediátricos em 49% dos casos, resultando na ativação do ERK (SCHMIDT et al., 2017). Também foram encontradas em 33% dos casos na doença de Rosai-Dorfman uma doença histiocítica com uma patogênese pouco definida. Estudos moleculares recentes revelaram mutações recorrentes nos genes da *MAPK/ERK* na histiocitose das células de Langerhans e doença de Erdheim-Chester (GARCES et al., 2017). Ainda não foram descritas estas mutações em NTGs.

As mutações no gene *MET*, a ativação da tirosina quinase do receptor de *MET* pelo seu ligante, o factor de crescimento de hepatócitos (*HGF*), tem sido implicada numa variedade de processos celulares, incluindo proliferação celular, sobrevivência, migração, motilidade e invasão. A sinalização de *MET/HGF* ativada correlaciona-se com a gênese tumoral e metástases, sendo considerada um alvo robusto para o desenvolvimento de novos tratamentos anticâncer, mas ainda não haviam sido descritas nas NTGs.

Vários ensaios clínicos foram conduzidos para avaliar a segurança e a eficácia de inibidores seletivos de *HGF/MET*. Atualmente, não há um método ideal ou padronizado para a avaliação precisa e confiável dos níveis de *MET* ou outros biomarcadores que sejam preditivos da resposta do paciente à terapêutica a ele (ZHANG; DU; ZHANG, 2016).

7 CONCLUSÕES

A utilização do NGS para a identificação de mutações e ampliações dos genes relacionados ao câncer é uma técnica muito sensível, confiável e de custo benefício, pois podem ser avaliados inúmeros genes ao mesmo tempo.

O encontro de mutações e ampliações relacionadas ao *ERBB2*, *EGFR*, *FGFR* e *RICTOR*, abrem uma oportunidade no esclarecimento da patogênese e das vias de sinalização das neoplasias malignas. A ocorrência de inúmeras mutações associadas à amplificação gênica sugere que há instabilidade genômica e que tenha papel importante da fisiopatologia das NTGs.

O papel da via de sinalização do *EGFR*, *ERBB2* e *FGFR1* parecem ter um papel fundamental na fisiopatologia das neoplasias trofoblásticas gestacionais. A identificação destes marcadores e uso de drogas alvo, abre um amplo campo de alternativas no tratamento de tumores refratários como drogas isoladas, ou a incorporação destas medicações nos esquemas terapêuticos tradicionais, aumentando a resposta e reduzindo a toxicidade.

Apesar das limitações quanto ao número de amostras, este estudo é inovador do ponto de vista do perfil genético perante as NTGs. É o primeiro estudo utilizando a técnica de NGS e genes de alvo terapêutico, encontrando tanto ampliações quanto mutações ainda não descritas anteriormente.

REFERÊNCIAS

- ABEL, H. J.; DUNCAVAGE, E. J. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. **Cancer Genetics**, v.206, n.12, p.432-440, 2013.
- ABUHARBEID, S.; CZUBAYKO, F.; AIGNER, A. The Fibroblast Growth Factor-binding protein FGF-BP. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38, n.9, p.1463-1468, 2006.
- AHAMED, E.; SHORT, D.; NORTH, B.; SAVAGE, P. M.; SECKL, M. J. Survival of women with gestational trophoblastic neoplasia and liver metastases: is it improving? **Journal of Reproductive Medicine**, v.57, n.5-6, p.262-269, 2012.
- AHRENDT, S. A.; DECKER, P. A.; ALAWI, E. A.; ZHU, Y. R.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; YANG, S. C.; HAASLER, G. B.; KAJDACSZY-BALLA, A.; DEMEURE, M. J.; SIDRANSKY, D. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. **Cancer**, v.92, n.6, p.1525-1530, 2001.
- ALAYED, K.; MEDEIROS, L. J.; PATEL, K. P.; ZUO, Z.; LI, S.; VERMA, S.; GALBINCEA, J.; CASON, R. C.; LUTHRA, R.; YIN, C. C. BRAF and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis: a study of 50 cases. **Human Pathology**, v.52, p.61-67, 2016.
- ALMOGUERA, C.; SHIBATA, D.; FORRESTER, K.; MARTIN, J.; ARNHEIM, N.; PERUCHO, M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**, v.53, n.4, p.549-554, 1988.
- ARTEAGA, C. L.; SLIWKOWSKI, M. X.; OSBORNE, C. K.; PEREZ, E. A.; PUGLISI, F.; GIANNI, L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v.9, n.1, p.16-32, 2011.
- AZUMA, C.; SAJI, F.; TOKUGAWA, Y.; KIMURA, T.; NOBUNAGA, T.; TAKEMURA, M.; KAMEDA, T.; TANIZAWA, O. Application of gene amplification by polymerase chain reaction to genetic analysis of molar mitochondrial DNA: the detection of anuclear empty ovum as the cause of complete mole. **Gynecologic Oncology**, v.40, n.1, p.29-33, 1991.
- BACHELOT, T.; ROMIEU, G.; CAMPONE, M. et al. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. **Lancet. Oncology**, v.14, n.1, p.64-71, 2013.
- BAGGISH, M. S.; WOODRUFF, J. D.; TOW, S. H.; JONES JR., H. W. Sex chromatin pattern in hydatidiform mole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.102, n.3, p.362-370, 1968.

- BANG, Y. J.; VAN CUTSEM, E.; FEYEREISLOVA, A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. **Lancet**, v.376, n.9742, p.687-697, 2010.
- BASELGA, J.; CORTES, J.; KIM, S. B. et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v.366, n.2, p.109-119, 2012.
- BASELGA, J.; SWAIN, S.M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nature Reviews. Cancer**, v.9, n.7, p.463-475, 2009.
- BAUER, M.; HORN, L. C.; KOWALZIK, J.; MAIR, W.; CZERWENKA, K. c-erbB-2 amplification and expression in gestational trophoblastic disease correlates with DNA content and karyotype. **General & Diagnostic Pathology**, v.143, n.2-3, p.185-190, 1997.
- BERKOWITZ, R. S, GOLDSTEIN, D. P. Gestational trophoblastic diseases. In: HOSKINS, W. J.; PEREZ, C.A.; YOUNG, R. C.; BARAKAT, R. R.; MARKMAN, M.; RANDALL, M. E. (Eds.). **Principles and Practice of Gynecologic Oncology**. 4.ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p.1055-1076.
- BERKOWITZ, R. S.; IM, S. S.; BERNSTEIN, M. R.; GOLDSTEIN, D. P. Gestational trophoblastic disease. Subsequent pregnancy outcome, including repeat molar pregnancy. **Journal of Reproductive Medicine**, v.43, n.1, p.81-86, 1998.
- BIANCONI, M.; JANKILEVICH, G.; OTERO, S.; NASSIF, J.; STORINO, C. Successful salvage of a relapsed high risk gestational trophoblastic neoplasia patient using capecitabine. **Gynecologic Oncology**, v.106, n.1, p.268-271, 2007.
- BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v.411, n.6835, p.355-365, 2001.
- BOLZE, P. A.; PATRIER, S.; MASSARDIER, J.; HAJRI, T.; ABBAS, F.; SCHOTT, A. M.; ALLIAS, F.; DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M.; FREYER, G.; GOLFIER, F.; YOU, B. PD-L1 Expression in Premalignant and Malignant Trophoblasts From Gestational Trophoblastic Diseases Is Ubiquitous and Independent of Clinical Outcomes. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.27, n.3, p.554-561, 2017.
- BOSE, R.; KAVURI, S. M.; SEARLEMAN, A. C.; SHEN, W.; SHEN, D.; KOBOLDT, D. C.; MONSEY, J.; GOEL, N.; ARONSON, A. B.; LI, S.; MA, C. X.; DING, L.; MARDIS, E. R.; ELLIS, M. J. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. **Cancer Discovery**, v.3, n.2, 224-237, 2013.
- BOULALAS, I.; ZARAVINOS, A.; KARYOTIS, I.; DELAKAS, D.; SPANDIDOS, D. A. Activation of RAS Family genes in urothelial carcinoma. **Journal of Urology**, v.181, n.5, p.2312-2319, 2009.
- BRACKEN, M. B.; BRINTON, L. A.; HAYASHI, K. Epidemiology of hydatidiform mole and choriocarcinoma. **Epidemiologic Reviews**, v.6, p.52-75, 1984.

- BUZA, N.; DANA, M.; ROQUE, M. D.; ALESSANDRO, D.; SANTIN, M. D. HER2/neu in Endometrial Cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.138, n.3, p.343-350, 2014.
- CHAN, K.; WONG, E. S.; WONG, O. G.; NGAN, H. Y.; CHEUNG, A. N. Identification of nonsynonymous TP53 mutations in hydatidiform moles. **Mutation Research**, v.809, p.20-23, 2018.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v.410, n.6824, p.37-40, 2001.
- CHEUNG, A. N. Y.; SRIVASTAVA, G.; CHUNG, L. P.; NGAN, H. Y. S.; MAN, T. K.; LIU, Y. T.; CHEN, W. Z.; COLLINS, R. J.; WONG, L. C.; MA, H. K. Expression of the p53 gene in trophoblastic cells in hydatidiform moles and normal human placentas. **Journal of Reproductive Medicine**, v.39, n.3, p.223-227, 1994.
- CHIARINI, F.; EVANGELISTI, C.; MCCUBREY, J. A.; MARTELLI, A. M. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36, n.2, p.124-135, 2015.
- CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. EGFR antagonists in cancer treatment. **New England Journal of Medicine**, v.358, n.11, p.1160-1174, 2008.
- COUSSENS, L.; YANG-FENG, T. L.; LIAO, Y.-C. et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. **Science**, v.230, n.4730, p.1132-1139, 1985.
- CRANMER, L. D.; LOGGERS, E. T.; POLLACK, S. M. Pazopanib in the management of advanced soft tissue sarcomas. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.12 p.941-955, 2016.
- DE MELO GAGLIATO, D.; JARDIM, D. L.; FALCHOOK, G. et al. Analysis of MET genetic aberrations in patients with breast cancer at MD Anderson Phase I unit. **Clinical Breast Cancer**, v.14, n.6, p.468-474, 2014.
- DUBESHTER, B.; BERKOWITZ, R. S.; GOLDSTEIN, D. P.; BERNSTEIN, M. Vinblastine, cisplatin and bleomycin as salvagetherapy for refractory high-risk metastatic gestational trophoblastic disease. **Journal of Reproductive Medicine**, v.34, n.3, p.189-192, 1989.
- EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of Surgical Oncology** v.17, n.6, p.1471-1474, 2010.
- EL-HEWL, L. M.; HANCOCK, B. W. Treatment of metastatic gestacional trophoblastic neoplasia. **The Lancet. Oncology**, v.8, n.8, p.715-724, 2007.
- FIGO Oncology Committee. FIGO staging for gestational trophoblastic neoplasia 2000. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v.77, n.3, p.285-287, 2002.

FORBES, S. A.; BINDAL, N.; BAMFORD, S.; COLE, C.; KOK, C. Y.; BEARE, D.; JIA, M.; SHEPHERD, R.; LEUNG, K.; MENZIES, A.; TEAGUE, J. W.; CAMPBELL, P. J.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. **Nucleic Acids Research**, v.39, Database issue, p.D945-950, 2011.

FREIER, K.; SCHWAENEN, C.; STICHT, C.; FLECHTENMACHER, C.; MÜHLING, J.; HOFELE, C.; RADLWIMMER, B.; LICHTER, P.; JOOS, S. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Oral Oncology**, v.43, n.1, p.60-66, 2007.

FULOP, V.; MOK, S. C.; GENEST, D. R.; GATI, I.; DOSZPOD, J.; BERKOWITZ, R. S. p53, p21, Rb and mdm 2 oncoproteins: expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. **Journal of Reproductive Medicine**, v.43, n.2, p.119-127, 1998a.

FULOP, V.; MOK, S. C.; GENEST, D. R.; SZIGETVARI, I.; CSEH, I.; BERKOWITZ, R. S. c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins: expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. **Journal of Reproductive Medicine**, v.43, n.2, p.101-110, 1998b.

GARASSINO, M. C.; MARABESE, M.; RUSCONI, P.; RULLI, E.; MARTELLI, O.; FARINA, G.; SCANNI, A.; BROGGINI, M., Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in nonsmall-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v.22, n.1, p.235-257, 2011.

GARCES, S.; MEDEIROS, L. J.; PATEL, K. P.; LI, S.; PINA-OVIEDO, S.; LI, J.; GARCES, J. C.; KHOURY, J. D.; YIN, C. C. Mutually exclusive recurrent KRAS and MAP2K1 mutations in Rosai-Dorfman disease. **Modern Pathology**, v.30, n.10, p.1367-1377, 2017.

GASCOYNE, R. D.; AOUN, P.; WU, D.; CHHANABHAI, M.; SKINNIDER, B. F.; GREINER, T. C.; MORRIS, S. W.; CONNORS, J. M.; VOSE, J. M.; VISWANATHA, D. S.; COLDMAN, A.; WEISENBURGER, D. D. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. **Blood**, v.93, n.11, p.3913-3921, 1999.

GHORANI, E.; KAUR, B.; FISHER, R. A.; SHORT, D.; JONEBORG, U.; CARLSON, J. W.; AKARCA, A.; MARAFIOTI, T.; QUEZADA, S. A.; SARWAR, N.; SECKL, M. J. Pembrolizumab is effective for drug-resistant gestational trophoblastic neoplasia. **Lancet**, v.390, n.10110, p.2343, 2017.

GNIRKE, A.; MELNIKOV, A.; MAGUIRE, J.; ROGOV, P.; LEPROUST, E. M.; BROCKMAN, W.; FENNELL, T.; GIANNOUKOS, G.; FISHER, S.; RUSS, C.; GABRIEL, S.; JAFFE, D. B.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C. Solution hybrid selection with ultralong oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. **Nature Biotechnology**, v.27, n.2, p.182-189, 2009.

GOLDSTEIN, D. P.; ZANTEN-PRZYBYSZ, I. V.; BERNSTEIN, M. R.; BERKOWITZ, R. S. Revised FIGO staging system for gestational trophoblastic tumors. Recommendations regarding therapy. **Journal of Reproductive Medicine**, v. 43, n.1, p.37-43, 1998.

- GORRINGE, K. L.; JACOBS, S.; THOMPSON, E. R.; SRIDHAR, A.; QIU, W.; CHOONG, D. Y.; CAMPBELL, I. G. High-resolution single nucleotide polymorphism array analysis of epithelial ovarian cancer reveals numerous microdeletions and amplifications. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.16, p.4731-4739, 2007.
- GRAZIANO, S. L.; GAMBLE, G. P.; NEWMAN, N. B.; ABBOTT, L. Z.; ROONEY, M.; MOOKHERJEE, S.; LAMB, M. L.; KOHMAN, L. J.; POIESZ, B. J. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.17, n.2, p.668-675, 1999.
- GREULICH, H.; KAPLAN, B.; MERTINS, P. et al. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n.36, p.14476-14478, 2012.
- GROB, T. J.; KANNENGIESSER, I.; TSOURLAKIS, M. C. et al. Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. **Modern Pathology**, v.25, n.12, p.1566-1573, 2012.
- GULHATI, P.; BOWEN, K. A.; LIU, J.; STEVENS, P. D.; RYCHAHOU, P. G.; CHEN, M.; LEE, E. Y.; WEISS, H. L.; O'CONNOR, K. L.; GAO, T.; EVERS, B. M. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. **Cancer Research**, v.71, n.9, p.3246-3256, 2011.
- HANAWA, M.; SUZUKI, S.; DOBASHI, Y.; YAMANE, T.; KONO, K.; ENOMOTO, N.; OOI, A. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. **International Journal of Cancer**, v.118, n.5, p.1173-1180, 2006.
- HAYES, D. F.; THOR, A. D. c-erbB-2 in breast cancer: Development of a clinically useful marker. **Seminars in Oncology**, v.29, n.3, p.231-245, 2002.
- HEIST, R. S.; SHIM, H. S.; GINGIPALLY, S. et al. MET Exon 14 Skipping in Non-Small Cell Lung Cancer. **Oncologist**, v.21, n.4, p.481-486, 2016.
- HEUCKMANN, J. M.; THOMAS, R. K. A new generation of cancer genome diagnostics for routine clinical use: overcoming the roadblocks to personalized cancer medicine. **Annals of Oncology**, v.26, n.9, p.1830-1837, 2015.
- HEZEL, A. F.; KIMMELMAN, A. C.; STANGER, B. Z.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes & Development**, v.20, n.10, p.1218-1249, 2006.
- HICKS, D. G.; KULKARNI, S. HER2+ Breast Cancer, Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. **American Journal of Clinical Pathology**, v.129, n.2, p.263-273, 2008.
- HOFFNER, L.; DUNN, J.; ESPOSITO, N.; MACPHERSON, T.; SURTI, U. p57KIP2 immunostaining and molecular cytogenetics: combined approach aids in diagnosis of morphologically challenging cases with molar phenotype and in detecting androgenic cell lines in mosaic/chimeric conceptions. **Human Pathology**, v.39, n.1, p.63-72, 2008.

HUSSEIN, M. R. Analysis of p53, BCL-2 and epidermal growth factor receptor protein expression in the partial and complete hydatidiform moles. **Experimental and Molecular Pathology**, v.87, n.1, p.63-69, 2009.

HYNES, N. E.; STERN, D. F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1198, n.2-3, p.165-184, 1994.

INAGUMA, S.; WANG, Z.; LASOTA, J.; SARLOMO-RIKALA, M.; MCCUE, P. A.; IKEDA, H.; MIETTINEN, M. Comprehensive Immunohistochemical Study of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1): Analysis in 5536 Cases Revealed Consistent Expression in Trophoblastic Tumors. **American Journal of Surgical Pathology**, v.40, n.8, p.1133-1142, 2016.

JACOBS, P. A.; SZULMAN, A. E.; FUNKHOUSER, J.; MATSUURA, J. S.; WILSON, C. C. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. **Annals of Human Genetics**, v.46, n.3, p.223-231, 1982.

JACOBS, P. A.; WILSON, C. M.; SPRENGLE, J. A.; ROSENSHEIN, N. B.; MIGEON, B. R. Mechanism of origin of complete hydatidiform moles. **Nature**, v.286, n.5774, p.714-716, 1980.

JACQUEMIER, J. ; ADELAIDE, J.; PARC, P.; PENAULT-LLORCA, F.; PLANCHE, J.; DELAPEYRIERE, O.; BIRNBAUM, D. Expression of the FGFR1 gene in human breast-carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v.59, n.3, p.373-378, 1994.

JAFRI, A.; RIZVI, S. Frequency of Her2/Neu Protein Expression in Ovarian Epithelial Cancers. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan**, v.27, n.9, p.544-546, 2017.

JEBALI, A.; DUMAZ, N. The role of RICTOR downstream of receptor tyrosine kinase in cancers. **Molecular Cancer**, v.17, n.1, p.39, 2018.

JELINCIC, D.; HUDELIST, G.; SINGER, C. F.; BAUER, M.; HORN, L. C.; BILEK, K.; CZERWENKA, K. Clinicopathologic profile of gestational trophoblastic disease. **Wiener klinische Wochenschrift**, v.115, n.1-2, p.29-35, 2003.

JORGENSEN, J. T.; HERSOM, M. HER2 as a prognostic marker in gastric cancer-a systematic analysis of data from the literature. **Journal of Cancer**, v.3, p.137-144, 2012.

KAIXUAN, Z.; KOICHI, O.; YIXIONG, L.; WEICHEN, Z.; LU, W.; LINNI, F.; MINGYANG, L.; XIA, L.; ZHE, W.; SHUANGPING, G.; QINGGUO, Y. YING, G. BRAFV600E and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis occur predominantly in children. **Hematological Oncology**, v.35, n.4, p.1-7, 2016.

KAJII, T.; OHAMA, K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. **Nature**, v.268, n.5621, p.633-634, 1977.

KARUNAGARAN, D.; TZAHAR, E.; BEERLI, R. R.; CHEN, X.; GRAUS-PORTA, D.; RATZKIN, B. J.; SEGER, J. R.; HYNES, N. E.; YARDEN, Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: Implications for breast cancer. **EMBO Journal**, v.15, n.2, p.254-264, 1996.

KING, C. R.; KRAUS, M. H.; AARONSON, S. A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. **Science**, v.229, n.4717, p.974, 1985.

KIPP, B. R.; FRITCHER, E. G.; CLAYTON, A. C.; GORES, G. J.; ROBERTS, L. R.; ZHANG, J.; LEVY, M. J.; HALLING, K. C. Comparison of KRAS mutation analysis and FISH for detecting pancreatobiliary tract cancer in cytology specimens collected during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.12, n.6, p.780-786, 2010.

KLAPPER, L. N.; GLATHE, S.; VAISMAN, N.; HYNES, N. E.; ANDREWS, G. C.; SELA, M.; YARDEN, Y. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.9, p.4995, 1999.

KOHORN, E. I. The new FIGO 2000 staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic disease: description and critical assessment. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.11, n.1, p.73, 2001.

KOHORN, E. I. Negotiating a staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic neoplasia. A progress report. **Journal of Reproductive Medicine**, v.47, n.6, p.445, 2002.

KOVACS, B. W.; SHAHBAHRAMI, B.; TAST, D. E.; CURTIN, J. P. Molecular genetic analysis of complete hydatidiform moles. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.54, n.2, p.143-152, 1991.

LANDAU, D. A.; TAUSCH, E.; TAYLOR-WEINER, A. N. et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. **Nature**, 526, n.7574, p.525-530, 2015.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, n.6822, p.860-921, 2001.

LAWLER, S. D.; FISHER, R. A.; DENT, J. A prospective genetic study of complete and partial hydatidiform moles. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.164, 5 Pt 1, p.1270-1277, 1991.

LEE, J. W.; SOUNG, Y. H.; SEO, S. H.; KIM, S. Y.; PARK, C. H.; WANG, Y. P.; PARK, K.; NAM, S. W.; PARK, W. S.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; YOO, N. J.; LEE, S. H. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.1, p.57-61, 2006.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v.351, n. 6326, p.453-456, 1991.

LEVINE, A. J.; PERRY, M. E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumoursuppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v.69, n.3, p.409-416, 1994.

LI, H. W.; TSAO, S. W.; CHEUNG, A. N. Y. Current Understandings of the Molecular Genetics of Gestational Trophoblastic Diseases. **Placenta**, v.23, n.1, p.20-31, 2002.

LINCH, M.; MIAH, A. B.; THWAY, K.; JUDSON, I. R.; BENSON, C. Systemic treatment of soft-tissue sarcoma – gold standard and novel therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.11, n.4, p.187-202, 2014.

LUIKART, G.; ENGLAND, P. R.; TALLMON, D.; JORDAN, S.; TABERLET, P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. **Nature Reviews. Genetics**, v.4, n.12, p.981-994, 2003.

LURAIN, J. R. Pharmacotherapy of gestational trophoblastic disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.4, n.11, p.2005-2017, 2003.

LURAIN, J. R.; NEJAD, B. Secondary chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v.97, n.2, p.618-623, 2005.

LURAIN, J. R.; SINGH, D. K.; SCHINK, J. C. Management of metastatic high-risk gestational trophoblastic neoplasia: FIGO stages II-IV: risk factor score > or =7. **Journal of Reproductive Medicine**, v.55, n.5-6, p.199-207, 2010.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v.470, n.7333, p.198-203, 2011.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v.437, n.7057, p.376-380, 2005.

MARTIN, M.; HOLMES, F. A.; EJLERTSEN, B. et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet. Oncology**, v.18, n.2, p.1688-1700, 2017.

MARX, A.H.; BURANDT, E. C.; CHOSCHZICK, M. et al. Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. **Human Pathology**, v.41, n.11, p.1577-1585, 2010.

MCINNES, R. R.; MICHAUD, J. L. Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics. **Clinical Genetics**, v.71, p.25-34, 2007.

MERCHANT, S. H.; AMIN, M. B.; VISWANATHA, D. S.; MALHOTRA, R. K.; MOEHLENKAMP, C.; JOSTE, N. E. p57KIP2 immunohistochemistry in early molar pregnancies: emphasis on its complementary role in the differential diagnosis of hydropic abortuses. **Human Pathology**, v.36, n.2, p.180-186, 2005.

MISSIAGLIA, E.; SELFE, J.; HAMDY, M.; WILLIAMSON, D.; SCHAAF, G.; FANG, C.; KOSTER, J.; SUMMERGILL, B.; MESSAHEL, B.; VERSTEEG, R.; PRITCHARD-JONES, K.; KOOL, M.; SHIPLEY, J. Genomic imbalances in rhabdomyosarcoma cell lines affect expression of genes frequently altered in primary tumors: an approach to identify candidate genes involved in tumor development. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.48, n.6, p.455-467, 2009.

MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. A. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.10, p.135-151, 2009.

MORRIS, S. W.; KIRSTEIN, M. N.; VALENTINE, M. B.; DITTMER, K.; SHAPIRO, D. N.; LOOK, A. T. SHAPIRO, D. N.; LOOK, A. T.; SALTMAN, D. L. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. **Science**, v.267, n.5196, p.316-317, 1995.

MORTAKIS, A. E.; BRAGA, C. A. "Poor prognosis" metastatic gestational trophoblastic disease: the prognostic significance of the scoring system in predicting chemotherapy failures. **Obstetrics and Gynecology**, v.76, n.2, p.272-277, 1990.

MOSSÉ, Y. P.; LAUDENSLAGER, M.; LONGO, L. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v.455, n.7215, p.930-935, 2008.

MUELLER, U. W.; HAWES, C. S.; WRIGHT, A. E.; PETROPOULOS, A.; DEBONI, E.; FIRGAIRA, F. A.; MORLEY, A. A.; TURNER, D. R.; JONES, W. R. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. **Lancet**, v.336, n.8709, p.197-200, 1990.

MURAD, T. M.; LONGLEY, J. V.; LURAIN, J. R.; BREWE, J. I. Hydatiform mole: clinicopathologic associations with the development of postevacuation trophoblastic disease. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v.32, n.4, p.359-367, 1990.

MURDOCH, S.; DJURIC, U.; MAZHAR, B.; SEOUD, M.; KHAN, R.; KUICK, R.; BAGGA, R.; KIRCHEISEN, R.; AO, A.; RATTI, B.; HANASH, S.; ROULEAU, G. A.; SLIM, R. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. **Nature Genetics**, v.38, n.3, p.300-302, 2006.

NAVOLANIC, P. M.; STEELMAN, L. S.; MCCUBREY, J. A. EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy. **International Journal of Oncology**, v.22, n.2, p.237-252, 2003.

NEWLANDS, E. S.; PARADINAS, F. J.; FISHER, R. A. Recent advances in gestational trophoblastic disease. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.13, n.1, p.225-244, 1998.

OBER, W. B.; FASS, R. O. The early history of choriocarcinoma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.172, p. 299-426, 1961.

OMHOLT, K.; KARSBERG, S.; PLATZ, A.; KANTER, L.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. **Clinical Cancer Research**, v.8, n.11, p.3468-3474, 2002.

OSBORNE, R.; COVENS, A.; MIRCHANDANI, D.; GERULATH, A. Successful salvage of relapsed high-risk gestational trophoblastic neoplasia patients using a novel paclitaxel-containing doublet. **Journal of Reproductive Medicine**, v.49, n.8, p.655-661, 2004.

PALMER, J. R. Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease. **Journal of Reproductive Medicine**, v.39, n.3, p.155-162, 1994.

PARAZZINI F.; LA VECCHIA C.; FRANCESCHI S.; MANGILI G. Familial trophoblastic disease: case report. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.149, n.4, p.382-383, 1984.

PARAZZINI, F.; MANGILI, G.; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; BOCCIOLONE, L.; FASOLI, M. Risk factors for gestational trophoblastic disease: a separate analysis of complete and partial hydatidiform moles. **Obstetrics and Gynecology**, v.78, n.6, p.1039-1045, 1991.

PARK, D. I.; KANG, M. S.; OH, S. J.; KIM, H. J.; CHO, Y. K.; SOHN, C. I.; JEON, W. K.; KIM, B. I.; HAN, W. K.; KIM, H.; RYU, S. H.; SEPULVEDA, A. R. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, v.22, n.5, p.491-497, 2007.

PECORELLI, S.; BENEDET, J. L.; CREASMAN, W. T.; SHEPHERD, J. H. FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v.64, n.1, p.5-10, 1999.

PETIT, A. M.; RAK, J.; HUNG, M. C.; ROCKWELL, P.; GOLDSTEIN, N.; FENDLY, B.; KERBEL, R. S. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. **American Journal of Pathology**, v.151, n.6, p.1523-1530, 1997.

POPADIUK, C.; POWER, P. Pegylated Liposomal Doxorubicin Is an Active Agent for Chemotherapy-Resistant Choriocarcinoma: A Report of Two Cases. **Journal of Reproductive Medicine**, v.61, n.5-6, p.215-218, 2016.

POWLES, T.; SAVAGE, P. M.; STEBBING, J.; SHORT, D.; YOUNG, A.; BOWER, M.; PAPPIN, C.; SCHMID, P.; SECKL, M. J. A comparison of patients with relapsed and chemo-refractory gestational trophoblastic neoplasia. **British Journal of Cancer**, n.5, v.96, p.732-737, 2007.

PRESS, M. F.; HUNG, G.; GODOLPHIN, W.; AND SLAMON, D. J. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. **Cancer Research**, v.54, n.10, p.2771-2777, 1994.

PRUDOVSKY, I.; MANDINOVA, A.; SOLDI, R.; BAGALA, C.; GRAZIANI, I.; LANDRISCINA, M.; TARANTINI, F.; DUARTE, M.; BELLUM, S.; DOHERTY, H.; MACIAG T. The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. **Journal of Cell Science**, v.116, 116(Pt 24), p.4871-4881, 2003.

RATHOD, P. S.; KUNDARGI, R.; PALLAVI, V. R.; VIJAY, C. R.; DEVI, U. K.; BAFNA, U. D. Refractory Gestational Trophoblastic Neoplasia: A Novel Drug Combination With Paclitaxel and Carboplatin Produces Durable Complete Remission. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.25, n.9, p.1737-1741, 2015.

REIS-FILHO, J. S.; SIMPSON, P. T.; TURNER, N. C. et al. FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.22, p.6652-6662, 2006.

REUTER, C. W.; MORGAN, M. A.; BERGMANN, L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? **Blood**, v.96, n.5, p.1655-1669, 2000.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, S.; POMERANTZ, A.; DEMICHELIS-GOMEZ, R.; BARRERA-LUMBRERAS, G.; BARRALES-BENITEZ, O.; AGUAYO-GONZALEZ, A. Expression of HER2/Neu in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Revista de Investigación Clínica**, v.68, n.4, p.171-175, 2016.

ROSELL, R.; MORAN, T.; QUERALT, C. et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.10, p.958-967, 2009.

ROSKOSKI, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. **Pharmacological Research**, v.68, n.1, p.68-94, 2013.

ROSS, J. S.; SLODKOWSKA, E. A.; SYMMANS, W. F.; PUSZTAI, L.; RAVDIN, P. M.; HORTOBAGYI, G. N. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **Oncologist**, v.14, n.4, p.320-368, 2009.

SAKRE, N.; WILDEY, G.; BEHTAJ, M.; KRESAK, A.; YANG, M.; FU, P.; DOWLATI, A. RICTOR amplification identifies a subgroup in small cell lung cancer and predicts response to drugs targeting mTOR. **Oncotarget**, v.8, n.4, p.5992-6002, 2017.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI S, M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v.307, v.5712, p.1098-1101, 2005.

SARTORE-BIANCHI, A.; TRUSOLINO, L.; MARTINO, C. et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. **Lancet. Oncology**, v.17, n.6, p.738-746, 2016.

SCALTRITI, M.; BASELGA, J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.18, p.5268-5272, 2006.

SCHMIDT, J.; RAMIS-ZALDIVAR, J. E.; NADEU, F. et al. Mutations of MAP2K1 are frequent in pediatric-type follicular lymphoma and result in ERK pathway activation. **Blood**, v.130, n.3, p.323-327, 2017.

SCHMIDT, L.; DUH, F. M.; CHEN, F. et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the Met proto-oncogene in papillary renal carcinomas. **Nature Genetics**, v.16, n.1, p.68-73, 1997.

- SEBIRE, N. J.; REES, H. C.; PETSON, D.; SECKL, M. J.; NEWLANDS, E. S.; FISHER, R. A. p57KIP2 immunohistochemical staining of gestational trophoblastic tumors does not identify the type of the causative pregnancy. **Histopathology**, v.45, n.2, p.135-141, 2004.
- SECKL, M. J.; SEBIRE, N. J.; FISHER, R. A.; GOLFIER, F.; MASSUGER, L.; SESSA, C.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v.24, Sup6, p.39-50, 2013.
- SHIH, C.; PADHY, L. C.; MURRAY, M.; WEINBERG, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. **Nature**, v.290, n.5803, p.261-264, 1981.
- SHIH, I. M.; KURMAN, R. J. The pathology of intermediate trophoblastic tumors and tumor-like lesions. **International Journal of Gynecological Pathology**, v.20, n.1, p.31-47, 2001.
- SIMANSHU, D. K.; NISSLEY, D. V.; MCCORMICK, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. **Cell**, v.170, n.1, p.17-33, 2017.
- SIMON, R.; RICHTER, J.; WAGNER, U. et al. High-throughput tissue microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer. **Cancer Research**, v.61, n.11, p.4514-4519, 2001.
- SITA-LUMSDEN, A.; SHORT, D.; LINDSAY, I.; SEBIRE, N. J.; ADJOGATSE, D.; SECKL, M. J.; SAVAGE, P. M. Treatment outcomes for 618 women with gestational trophoblastic tumors following a molar pregnancy at the Charing Cross Hospital, 2000-2009. **British Journal of Cancer**, v.107, n.11, p.1810, 2012.
- SLAMON, D. J.; CLARK, G. M.; WONG, S. G.; LEVIN, W. J.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v.235, n.4785, p.177-182, 1987.
- SODA, M.; CHOI, Y. L.; ENOMOTO, M. et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. **Nature**, v.448, p.561-566, 2007.
- SOPER, J. T. Gestational trophoblastic disease. **Obstetrics and Gynecology**, v.108, n.1, p.176-187, 2006.
- STAPLEY, J.; REGER, J.; FEULNER, P. G.; SMADJA, C.; GALINDO, J.; EKBLUM, R.; BENNISON, C.; BALL, A. D.; BECKERMAN, A. P.; SLATE, J. Adaptation genomics: the next generation. **Trends in Ecology & Evolution**, v.25, n.12, p.705-712, 2010.
- STEIGRAD, S. J. Epidemiology of gestational trophoblastic diseases. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.17, n.6, p.837-847, 2003.
- SURTI, U.; SZULMAN, A. E.; O'BRIEN, S. Complete (classic) hydatidiform mole with 46XY karyotype of paternal origin. **Human Genetics**, v.51, n.2, p.153-155, 1979.

SZULMAN, A. E.; SURTI, U. The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.131, n.6, p.665-671, 1978a.

SZULMAN, A. E.; SURTI, U. The syndromes of hydatidiform mole. II Morphologic evolution of the complete and partial mole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.132, n.1, p.20-27, 1978b.

TANG, C.; JARDIM, D. L.; FALCHOOK, G. S. et al. MET nucleotide variations and amplification in advanced ovarian cancer: characteristics and outcomes with c-Met inhibitors. **Oncoscience**, v.1, n.1, p.5-13, 2013.

TOVAR, E. A.; GRAVEEL, C. R. MET in human cancer: germline and somatic mutations. **Annals of Translational Medicine**, v.5, n.10, p.205, 2017.

TSCHOPP, J.; MARTINON, F.; BURNS, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.4, n.2, p.95-104, 2003.

TSE, K. Y.; NGAN, Y. S., Gestational trophoblastic disease. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.26, n.3, p.357-370, 2012.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast Growth Factor signalling: from development to cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v.10, n.2, p.116-129, 2010.

TZAHAR, E.; WATERMAN, H.; CHEN, X.; LEVKOWITZ, G.; KARUNAGARAN, D.; LAVI, S.; RATZKIN, B. J.; YARDEN, Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. **Molecular and Cellular Biology**, v.16, n.10, p.5276-5287, 1996.

VAN GAAL, J. C.; FLUCKE, U. E.; ROEFFEN, M. H.; DE BONT, E. S.; SLEIJFER, S.; MAVINKURVE-GROOTHUIS, A. M.; SUURMEIJER, A. J.; VAN DER GRAAF, W. T.; VERSLEIJEN-JONKERS, Y. M. Anaplastic lymphoma kinase aberrations in rhabdomyosarcoma: clinical and prognostic implications. **Journal of Clinical Oncology**, v.30, n.3, p.308-315, 2012.

VASSILAKOS, P.; RIOTTON, G.; KAJII, T. Hydatidiform mole: two entities: a morphologic and cytogenetic study with some clinical consideration. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.127, n.2, p.167-170, 1977.

VAUGHN, C. P.; ZOBELL, S. D.; FURTADO, L. V.; BAKER, C. L.; SAMOWITZ, W. S. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v.50, n.5, p.307-312, 2011.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v.291, n.5507, p.1304-1351, 2001.

VERAS, E.; KURMAN, R. J.; WANG, T. L.; SHIH, I. M. PD-L1 Expression in Human Placentas and Gestational Trophoblastic Diseases. **International Journal of Gynecological Pathology**, v.36, n.2, p.146-153, 2017.

- WAKE, N.; TAKAGI, N.; SASAKI, M. Androgenesis as a cause of hydatidiform mole. **Journal of the National Cancer Institute**, v.60, n.1, p.51-57, 1978.
- WANG, S.; DING, Z. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer. **Tumor Biology**, v.5, p.1-10, 2017.
- WANG, S.; SABOORIAN, M. H.; FRENKEL, E.; HYNAN, L.; GOKASLAN, S. T.; ASHFAQ, R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: Comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. **Journal of Clinical Pathology**, v.53, n.5, p.374-381, 2001.
- WATERFALL, J. J.; ARONS, E.; WALKER, R. L.; PINEDA, M.; ROTH, L.; KILLIAN, J. K.; ABAAN, O. D.; DAVIS, S. R.; KREITMAN, R. J.; MELTZER, P. S. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. **Nature Genetics**, v.46, n.1, p.8-10, 2014.
- WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E.; SCHWARTZ, J. N. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.25, n.1, p.118-145, 2007.
- XU, G.; CHAKRABORTY, C.; LALA, P. K. Expression of TGF-beta signaling genes in the normal, premalignant, and malignant human trophoblast: loss of smad3 in choriocarcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.287, n.1, p.47-55, 2001.
- XU, G.; GUIMOND, M. J.; CHAKRABORTY, C.; LALA, P. K. Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product. **Biology of Reproduction**, v.67, n.2, p.681-689, 2002.
- YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.2, n.2, p.127-137, 2001.
- YAZAKI-SUN, S.; DAHER, S.; DE SOUZA ISHIGAI, M. M.; ALVES, M. T.; MANTOVANI, T. M.; MATTAR, R. Correlation of c-erbB-2 oncogene and p53 tumor suppressor gene with malignant transformation of hydatidiform mole. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v.32, n.3, p.265-272, 2006.
- ZHANG, Y.; DU, Z.; ZHANG, M. Biomarker development in MET-targeted therapy. **Oncotarget**, v.7, n.24, p.37370-37389, 2016.
- ZHU, X.; VERMA, S. Targeted therapy in HER2-positive metastatic breast cancer: a review of the literature. **Current oncology**, 22(Suppl 1), p.S19-S28, 2015.