

Índice

1- Resumo	1
Palavras-chave	2
2- Abstract	3
Keywords	4
3- Introdução	5
4- Abreviaturas	8
5- Materiais e Métodos.....	10
6- Resultados	12
6.1- Terapêuticas moleculares no cancro do pulmão: o início.....	12
6.2- Gene ALK: nasce no passado e fica para mudar o futuro	14
6.3- Um novo aliado: o Crizotinib	19
6.4- Quando e como testar a presença dos rearranjos do ALK.....	26
6.5- Novo desafio: as resistências	32
6.6- Inibidores ALK de segunda geração	37
7- Discussão e Conclusão.....	42
8- Agradecimentos	44
9- Referências.....	45

1- Resumo

O cancro do pulmão ocupa um lugar de destaque no que diz respeito ao número de mortes por patologia tumoral. É responsável pela maior taxa de mortalidade a nível mundial, pelo que o seu tratamento constitui um claro desafio para a medicina moderna. Na última década, testemunhámos uma mudança significativa na abordagem terapêutica dos doentes com cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC), principalmente devido à identificação de alterações oncogénicas-chave que abriram portas à utilização de terapêuticas direcionadas com resultados entusiasmantes.

O presente artigo de revisão focou a modificação recente das linhas orientadoras do tratamento de um subgrupo específico de doentes com cancro do pulmão, doentes com CPNPC ALK positivos, no contexto da oncologia moderna, e foi conseguido através de uma revisão da literatura referente ao surgimento, aplicabilidade e desenvolvimento destas novas terapêuticas.

Este paradigma foi estabelecido pela primeira vez com a descoberta de mutações no recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), associadas a elevada sensibilidade ao inibidor da tirosina-cinase (TKI) Gefitinib. Posteriormente, o ALK, um gene que codifica uma proteína tirosina cinase recetora identificada primariamente em linfomas anaplásicos, foi também ligado à atividade tumoral nos CPNPC em 2007, através da descoberta de rearranjos surpreendentemente responsivos a um inibidor da ALK-cinase, o Crizotinib. A sua extraordinária atividade e franco benefício clínico, nos doentes selecionados com os rearranjos (ALK positivos), levaram à sua aprovação acelerada pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2013. Contudo, e apesar deste novo fármaco constituir uma primeira linha em doentes devidamente selecionados, conduzir a um aumento da sobrevida, da qualidade de vida e induzir remissões, parece ainda não assegurar a cura, visto que, durante o tratamento,

os doentes desenvolvem resistências. Este obstáculo tem motivado novas linhas de investigação com o aparecimento de inibidores de segunda geração e redirecionamento de abordagens, fazendo crer que é efetivamente possível melhorar o prognóstico destes doentes, num futuro próximo.

Palavras-chave

Cinase do Linfoma Anaplásico; Neoplasmas do Pulmão; Terapia Molecular Dirigida; Proteínas Tirosina Cinase; Oncogenes, Crizotinib; Antagonistas e Inibidores; Diagnóstico; Resistência a Fármacos; Investigação.

2- Abstract

Lung neoplasms are the number one cause of cancer related deaths. They are responsible for the highest mortality rate worldwide and constitute an imminent challenge to modern medicine. Over the last decade, we witnessed a significant change in therapies concerning patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), mainly due to the identification of key oncogenic markers that widened the use of targeted therapies with encouraging results.

This review focused on the recent changes in the guidelines concerning the treatment of a specific subgroup of patients with lung cancer, positive for NSCLC ALK, and was achieved through a review of the literature concerning the appearance, applicability and development of these new therapies.

This paradigm was first established with the discovery of mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) that were highly sensitive to the tyrosine kinase inhibitor (TKI) Gefitinib. Subsequently, ALK, a gene encoding a tyrosine kinase receptor identified primarily in anaplastic lymphomas, was linked to tumor activity in NSCLC in 2007, through the discovery of rearrangements that are surprisingly responsive to an ALK kinase inhibitor, Crizotinib. Furthermore, its extraordinary activity and clear clinical benefit in selected patients (ALK positive), led to its accelerated approval by the FDA (Food and Drug Administration) in 2013. However, despite being the first-line of treatment in selected patients, leading to increased survival rates, quality of life and even inducing remissions, it does not seem to be a definitive cure, since patients are likely to develop resistances during treatment. This setback motivated not only new researches, leading to the arrival of second generation inhibitors but also changes in the approach of these patients. These developments

made us believe that it is indeed possible to improve the prognosis of these patients in a nearby future.

Keywords:

Anaplastic Lymphoma Kinase; Lung Neoplasms; molecular targeted therapy; Protein-Tyrosine Kinases; Oncogenes; Crizotinib; Antagonists & Inhibitors; Diagnosis; Drug resistance; Drugs, Investigational.

3- Introdução

O cancro do pulmão é a neoplasia mundialmente mais frequente e ainda a que apresenta maior taxa mortalidade associada (primeira no sexo masculino e segunda no sexo feminino precedida pelo cancro da mama), constituindo a causa de cerca de 27% das mortes por cancro nos Estados Unidos em 2014 e 19% a nível mundial em 2012. Dado este contexto epidemiológico, existem autores que consideram o cancro do pulmão um problema de saúde pública e uma patologia da modernidade, contando-se com 1.8 milhões de novos casos por ano e cerca de 1.6 milhões de mortes, ao contrário do que se pensava no início do século XX, altura em que era visto como uma doença rara (1); assim sendo, o tratamento do cancro do pulmão constitui um claro desafio para a medicina e investigação atuais, considerando-se uma área em constante evolução e cujas descobertas têm revelado um impacto significativo no prognóstico dos doentes.

Existem duas principais divisões do cancro do pulmão: o de pequenas células (CPPC) e o de não pequenas células (CPNPC), apresentando especificidades biológicas, orientações terapêuticas e prognósticos distintos entre si. O CPNPC é o tipo de apresentação mais frequente desta doença, representando cerca de 85% de todos os cancros do pulmão (2), e apresenta uma sobrevivência aos 5 anos entre 1 e 16% (3); pode ainda ser dividido em dois subtipos histológicos, os carcinomas escamosos e os não escamosos, sendo que este último grupo inclui, entre outros, os adenocarcinomas e os de carcinomas de grandes células (2). Desde há vários anos, que a terapêutica *gold-standard* de primeira linha para os doentes com CPNPC em estado avançado é a quimioterapia com dupletos, incluindo um platino, conseguindo níveis de resposta bastante baixos, inferiores a 10%, com efeitos na sobrevivência mediana apenas modestos (entre 8 e 10 meses) (4). Contudo, este panorama parece estar prestes a modificar-se.

Na última década, assistiu-se a uma renovação significativa na abordagem terapêutica do cancro do pulmão: apesar de já se reconhecer que a análise do subtipo histológico de cada tumor exerce um papel central na escolha dos citotóxicos quimioterápicos, têm vindo a ser identificadas alterações oncogénicas-chave, principalmente no CPNPC e mais frequentes em adenocarcinomas, passíveis de serem consideradas alvos de inovadoras armas terapêuticas.

O desenvolvimento destes agentes terapêuticos dirigidos e personalizados, desenvolvidos com o apoio das tecnologias atuais de análise genética e empenho e contribuição de inúmeros profissionais da área da saúde e investigação (em biologia molecular, genética) parece prometer um prognóstico bem mais positivo para certos grupos de doentes.

Esta visionária perspetiva de tratamento para o cancro do pulmão teve início em 2004, após a descoberta de mutações no gene EGFR de um subgrupo de doentes com adenocarcinoma que mostraram uma notável resposta a um fármaco inibidor da tirosina cinase EGFR, o Gefitinib, prolongando a sua sobrevivência e melhorando a qualidade de vida (5), comparativamente com os resultados em doentes tratados com o tradicional esquema de quimioterapia, revelando assim uma esperança entusiasmante para a alteração do curso da doença e evolução clínica dos doentes.

À semelhança da citada pioneira associação entre alterações oncogénicas chave - responsáveis pela proliferação e sobrevivência das células tumorais - e fármacos dirigidos à sua inativação, iniciou-se a pesquisa de outras variações genéticas com elevado grau de responsabilidade no processo de carcinogénese, que pudessem ser alvo de atuação para novos fármacos. Foi nesta conjuntura que em 2007 surgiu a primeira referência ao papel do gene ALK no cancro do pulmão: foram identificados rearranjos genéticos entre os genes ALK e o EML4, no CPNPC, geradores de uma proteína de fusão com papel ativo na carcinogénese. Com base nesta descoberta, e na associação eficaz previamente conseguida entre as mutações de EGFR e o Gefitinib, surgiu uma nova classe de agentes terapêuticos, os inibidores de

tirosina cinase ALK. O primeiro fármaco do grupo a ser desenvolvido foi o Crizotinib. O sucesso clínico do Crizotinib sobre doentes portadores do rearranjo EML4-ALK foi de tal modo evidente desde o início, que este sofreu aprovação acelerada pela FDA em 2013, apenas com base em estudos de fase I e II (3,6). Passou assim a ser permitida a sua prescrição a doentes com CPNPC ALK+, isto é, com o rearranjo, e aprovou-se igualmente o emprego do teste diagnóstico do rearranjo, baseado na técnica de *FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)*, para a seleção prévia dos doentes candidatos ao tratamento (7).

O ALK é um alvo terapêutico validado em várias neoplasias para além do CPNPC, nomeadamente no neuroblastoma pediátrico e linfoma anaplásico de células gigantes, onde foi reportado, em 1994, pela primeira vez (3,8,9).

Os rearranjos ALK são encontrados em apenas 5% dos CPNPC, no entanto esta percentagem, aparentemente pequena, representa mais de 60 000 doentes, dado que há registo de 1.3 milhões de novos casos de CPNPC por ano no mundo (10).

É atualmente reconhecido que a partir da identificação das mutações no EGFR e rearranjos ALK, se definiram 2 subtipos únicos de carcinomas do pulmão, predominantemente não escamosos, altamente responsivos aos respetivos inibidores de tirosina cinase, sendo portanto esta seleção histológica, e molecular, essencial para a orientação da terapêutica dos doentes (11).

Contudo, e apesar deste avanço médico extraordinário no tratamento, com uma ótima sensibilidade inicial dos tumores selecionados, a efetividade a longo prazo encontra-se limitada pelo desenvolvimento de resistências, condicionando PFS (sobrevivência livre de progressão) inferior a 1 ano e representando já o novo desafio à ciência, dentro do enorme progresso (12).

4- Abreviaturas

ALCL- Linfoma anaplásico de grandes células;

ALK- Cinase de linfoma anaplásico;

ALK+ - Rearranjo alvo presente;

C-KIT- proto-oncogene recetor de tirosina cinase;

C-Met- Proto-oncogene codificador do recetor do fator de crescimento do hepatócito;

CISH- *Chromogenic in situ hybridization*;

CPNPC- Cancro do pulmão de não pequenas células;

CPPC- Cancro do pulmão de pequenas células;

CR- Resposta completa;

EGFR- Recetor do fator de crescimento epidérmico;

EML4- Proteína tipo 4 associada a microtúbulos da equinoderme;

EML4-ALK – Gene resultante da fusão entre o ALK e o EML4;

FDA- *Food and Drug Administration*;

FISH- *Fluorescence in situ hybridization*;

HSP90- *heat shock protein 90*;

IHQ- Imunohistoquímica;

JAK-STAT- Cinase Janus associada a uma proteína transdutora e ativadora da transcrição;

v-KRAS- *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*;

KIF5- Gene pertencente à superfamília das cinesinas;

M-TOR- *Mechanistic Target Of Rapamycin (Serine/Threonine Kinase)*;

NPM- Nucleofosmina;

NPM-ALK – Gene resultante da fusão entre NPM e ALK;

ORR- Taxa de resposta global;

OS- Sobrevivência global;

PFS- Sobrevivência livre de progressão;

PR- Resposta parcial;

ROS1- Proto-oncogene codificador de uma proteína tirosina cinase ROS;

RTK's- Recetores de tirosina cinase;

RT-PCR- *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*;

SNC- Sistema Nervoso Central;

TKI's- Inibidores de tirosina cinase;

V-RAS- gene viral da família RAS;

WHO- *World Health Organization*.

5- Materiais e Métodos

A realização da presente tese de Mestrado, integrada no curso de Medicina, teve por base uma pesquisa intensiva sobre o tema a que se refere: “ALK e Cancro do Pulmão”, sempre com a orientação da Dra. Ana Figueiredo e com recurso a diversos meios de informação, mas, essencialmente, baseada na pesquisa em motores de busca validados na área de Medicina e recomendados ao longo do curso, nomeadamente o site *pubmed* e ainda o *clinical key*, (que compila artigos científicos de revistas e capítulos de diversos livros, permitindo seleccionar o modo de apresentação da informação mais adequando de acordo com o objetivo de cada pesquisa parcelar).

O tema abordado pelo trabalho é relativamente recente, sendo que, inicialmente, parecia fazer algum sentido a restrição da pesquisa aos últimos 5 anos, integrando apenas os artigos mais recentes; no entanto, o modo como foi seleccionada a informação sofreu algumas alterações com o avançar da própria revisão, obrigando a alargar a panóplia de materiais consultados, em termos de anos de publicação, a alguns mais antigos, permitindo compreender a forma como foi descoberta esta nova vertente de tratamento de cancro de pulmão desde o seu início e acompanhar a própria evolução na última década.

Os artigos foram pesquisados *online*, entre Novembro de 2015 e Janeiro de 2016, e as palavras-chave utilizadas foram os termos em inglês de maior relevância para a construção do projecto, uma vez que a maior parte da informação é publicada neste mesmo idioma: inicialmente a informação foi pesquisada de uma forma mais global, aplicando o termo “ALK” cruzado com “Lung cancer” em ambas as supracitadas bases de dados e no site <http://www.mycancergenome.org>, permitindo ter uma perspetiva inicial e mais abrangente da área, e então, a estes dois marcos, foram associados outros diferentes como “*statisics*”, “*diagnosis*”, “*therapy*”, “*inhibitors*”, “*resistance*”, “*new generation drugs*”.

A par destes métodos, utilizei ainda uma base de dados dos estudos a decorrer para me orientar em termos de localização temporal dos estudos e pesquisas que continuam ou já foram realizados neste âmbito, através do site: <https://clinicaltrials.gov>. Para esclarecimentos básicos a nível genético, recorri ainda ao <https://ghr.nlm.nih.gov> (associado à *U.S. National Library of Medicine*).

Por fim, consultei as novas *guidelines* que orientam a prática clínica nas questões inerentes aos testes para os rearranjos do ALK no cancro do pulmão: “IASLC atlas of ALK testing in lung cancer”, da autoria da Associação Internacional para o Estudo do Cancro do Pulmão, bem como a edição de 2015 da “Revista do Grupo de Estudos do Cancro do Pulmão”.

Todos os artigos utilizados nesta revisão de literatura encontram-se na última secção e referenciados segundo o sistema de *Vancouver*.

6- Resultados

6.1- Terapêuticas moleculares no cancro do pulmão: o início

Nos últimos anos assistiu-se a um extraordinário desenvolvimento de terapêuticas alvo para o cancro do pulmão. As primeiras alterações génicas a ser validadas como alvos (*driver mutations*) foram as do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), essencial para o crescimento e proliferação celulares: o EGFR é uma glicoproteína transmembranar, codificada pelo cromossoma 7 (região p12), com um domínio extra-celular que reconhece e liga ligandos específicos, um domínio transmembranar hidrofóbico e um domínio intracelular que contém a atividade enzimática da tirosina cinase, responsável pela ativação de vias de sinalização intracelulares associadas à proliferação e sobrevivência celular e à inibição da apoptose. Mutações que afetam a expressão ou a atividade do EGFR podem estar implicadas no aparecimento de neoplasias epiteliais, incluindo o CPNPC. As mutações neste gene foram associadas, maioritariamente, a adenocarcinomas e parecem ocorrer mais no sexo feminino, em não fumadores e ter maior prevalência em regiões orientais (40% dos CPNPC de doentes da Ásia oriental *versus* 10% no caso dos caucasianos); à sua sobreexpressão foi ainda atribuída a ocorrência de doença avançada e prognóstico reservado (13). Grande parte dos doentes com mutações neste gene estão então altamente propensos a desenvolver respostas às terapias dirigidas a estas mutações, havendo já sugestão de que diferentes mutações se podem associar a diferentes sensibilidades aos fármacos (14,15). Os primeiros fármacos deste grupo a ser aprovados e integrados nos planos terapêuticos do CPNPC foram o Gefitinib e o Erlotinib. Logo em estudos de fase I, demonstraram importante impacto clínico em doentes com CPNPC metastático e refratários à quimioterapia, estando estreitamente associados a respostas parciais ou melhoria clínica em pacientes com mutações deste gene. (16);

O Gefitinib foi o primeiro agente anti-EGFR a mostrar atividade anti-tumoral clinicamente significativa no cancro do pulmão, através dos resultados de 2 estudos de fase II, valendo-lhe a aprovação pela FDA em 2003 como terceira linha de tratamento em doentes com CPNPC localmente avançado ou metastático após falha de 2 regimes diferentes de quimioterapia (com base em compostos de platinum ou docetaxel). Posteriormente, um estudo de fase III (*the Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer – ISEL*), veio demonstrar ausência de benefício do Gefitinib na sobrevivência global dos doentes comparativamente ao uso de placebo, pelo que em Junho de 2005, o uso do fármaco foi limitado aos doentes participantes em estudos ou que já teriam iniciado esta terapêutica com melhoria clínica.

Posteriormente foi realizado um outro estudo de fase III, (*Iressa Pan-Asian Study – IPASS*), que comparou o uso de Gefitinib com o de esquemas de quimioterapia convencionais baseados em platino, associados a carboplatina ou paclitaxel, como primeira linha no tratamento de doentes com CPNPC avançado, não fumadores (ou doentes com carga tabágica leve) e com histologia de adenocarcinoma. Dos doentes participantes, cerca de 60% eram portadores de mutação no gene EGFR (candidatos à aplicação do fármaco), e este sub-grupo apresentou então uma sobrevivência mediana e uma sobrevivência livre de progressão superiores, maiores taxas de resposta e melhor qualidade de vida. (17). É no entanto importante observar, ao interpretar os números, que o estudo foi conduzido na Ásia, e que as mutações do EGFR tendem a ocorrer menos frequentemente em populações caucasianas.

O outro anti-EGFR, Erlotinib, desenvolvido em paralelo com o Gefitinib, mostrou em estudos de fase II, prolongar a sobrevivência em doentes com CPNPC após falha da primeira e segunda linhas de quimioterapia, especialmente em pacientes nunca fumadores (18). Após o ensaio de fase III - BR-21-, a sua aplicação clínica, foi aprovada pela FDA, em 2004. Posteriormente, e à semelhança do que acontecera com o Gefitinib, foi efetuado um estudo de fase III utilizando o Erlotinib em primeira linha em doentes europeus EGFR-mutados

(EURTAC). Em consequência dos excelentes resultados obtidos, com melhoria da sobrevivência livre de progressão nos doentes tratados com este fármaco, a indicação do uso do Erlotinib foi alterada e este foi sugerido como primeira abordagem, em detrimento da quimioterapia, nos doentes com CPNPC positivos para a mutação EGFR (19,20).

6.2- Gene ALK: nasce no passado e fica para mudar o futuro

O gene ALK (cinase de linfoma anaplásico), foi identificado em 1993, como um oncogene expresso em grande parte dos linfomas anaplásicos de grandes células (ALCL) não Hodgkin: quando descoberto, encontrava-se fundido com o gene da nucleofosmina (NPM) – já conhecido - por translocação entre o braço p do cromossoma 2, onde se localiza o ALK (2p23), e o q do cromossoma 5 que contém o NPM (5q35) (21). Entretanto, nos anos que se seguiram, outras proteínas de fusão envolvidas em processos de carcinogénese foram ligadas à atividade anormal de ALK, sugerindo a possibilidade de existirem outros parceiros para a combinação com o ALK, nomeadamente o TFG (*TRK - fused gene*) descoberto também em ALCL e originando duas diferentes proteínas quiméricas, e ainda em tumores de miofibroblastos, fundido com diferentes genes (tropomiosinas, clatrina, RNA-sintetase) (22,23). Estes achados começaram então a realçar o papel central das alterações do gene ALK em diferentes tipos de tumores.

Em 2007, foi identificado um novo rearranjo de ALK com o gene EML4, codificador de uma proteína estabilizadora de microtúbulos (proteína tipo 4 associada a microtúbulos da equinoderme), mas desta vez em tumores do pulmão, nomeadamente CPNPC. Para confirmar o potencial oncogénico deste gene, resultante da translocação EML4-ALK, a equipa de investigação criou plasmídeos com vários elementos incorporados, nomeadamente cada um dos genes participantes no rearranjo de forma individual, o gene EML4-ALK, e ainda vetores

com genes já expectáveis de induzir a formação de tumores, nomeadamente NPM-ALK e v-Ras, no sentido de comparar os efeitos após transfecção em modelos animais (ratinhos). Este ensaio mostrou a formação de tumores apenas nos ratinhos que tinham recebido a injeção de células portadoras das mutações NPM-ALK ou v-Ras (resultados esperados) e também nos ratinhos portadores de EML4-ALK ativo (figura 1). Posteriormente, numa perspetiva de utilização deste novo gene como alvo de tratamento anti-tumoral, os investigadores testaram a atividade de um inibidor de ALK no tratamento de tumores EML4-ALK+, já que alguns compostos desta família tinham mostrado, recentemente, atividade supressora do crescimento de células tumorais NPM-ALK+ em linfomas. Mais uma vez o resultado foi arrebatador, assistindo-se à indução da morte das células portadoras do gene EML4-ALK. Neste estudo inicial, este gene de fusão foi identificado em 6,7% dos doentes com CPNPC avaliados (5 casos em 75 doentes, todos eles asiáticos) (24).

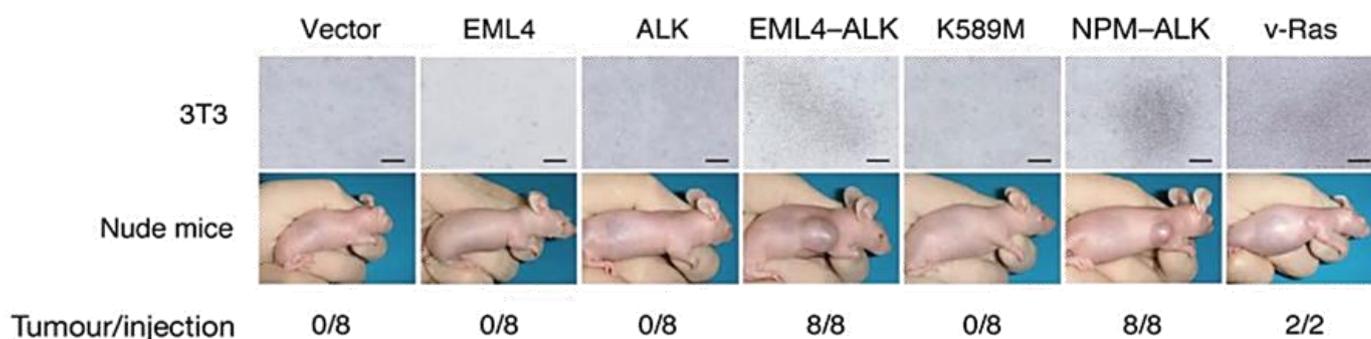


Fig. 1- Resultados da injeção subcutânea de células (3T3) transfectadas com plasmídeos, contendo os referidos genes, em modelos animais. A expressão fenotípica foi examinada 20 dias após a injeção. Pode-se observar a clara formação de um tumor no ratinho que recebeu o gene de fusão EML4-ALK (23).

Atualmente, sabe-se que é o rearranjo envolvendo o ALK mais frequente no CPNPC, sendo encontrado em cerca de 6% dos doentes (25), e nestes, maioritariamente nos adenocarcinomas (4-6%) (26). Mais recentemente foram descritos outros rearranjos do ALK no CPNPC, como a TFG-ALK, (27) e a KIF5B-ALK (28)

Seguiram-se outros estudos que comprovaram o potencial oncogénico destes rearranjos, destacando-se um em que o gene EML4-ALK, cuja expressão teria sido induzida nos ratinhos, foi colocado sob a ação de um promotor génico específico do pulmão, mostrando que todos os modelos transfectados desenvolviam adenocarcinomas do pulmão exprimindo a proteína de fusão (29). Depreendeu-se assim, com base nos resultados destes estudos em modelos, que o rearranjo EML4-ALK parecia ser suficiente para induzir formação de carcinomas do pulmão *in vivo*, indicando que este podia vir a constituir um alvo terapêutico de extrema relevância.

A forma ALK “wild-type” (sem rearranjos) codifica um recetor de tirosina cinase (RTK), que em termos celulares desempenha um papel idêntico ao dos restantes RTK, regulando algumas vias de sinalização responsáveis pelo controlo da proliferação e sobrevivência celulares, nomeadamente Ras–MAPK, PI3K–AKT e JAK-STAT (figura 2) (30).

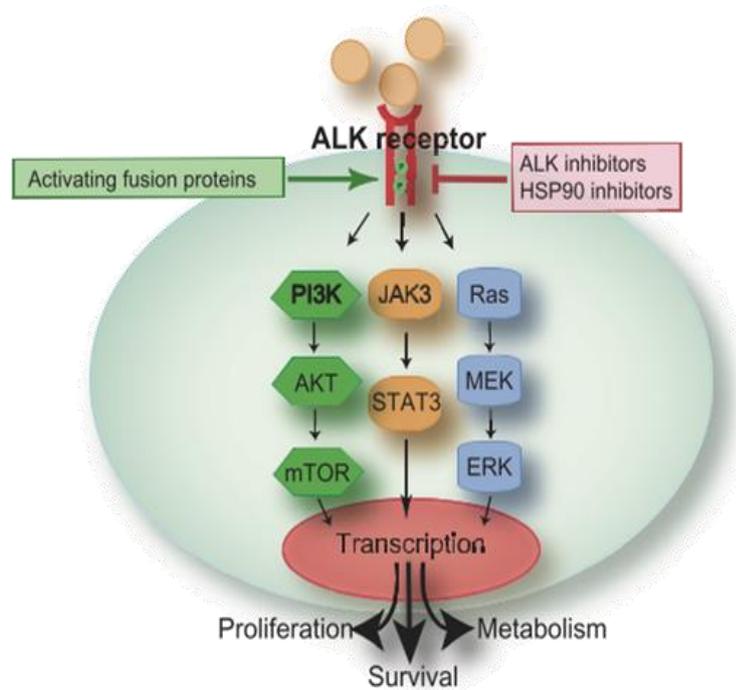


Fig. 2- Representação da cascata de sinalização aberrante ligada aos rearranjos de ALK; esta favorece a carcinogénese por ativação constitutiva do RTK e consequentemente das vias representadas (84).

Compreende-se assim que uma alteração neste recetor possa alterar o normal funcionamento destas vias de sinalização e estar na génese dos processos tumorais.

Este gene parece ainda estar ligado ao sistema nervoso central (SNC): considera-se que desempenha um importante papel ao nível do seu desenvolvimento, sendo expresso fisiologicamente numa fase precoce da vida humana, e parecendo ser também expresso também no SNC dos adultos mas de forma restrita às células neuronais e em menores concentrações (25).

O gene EML4-ALK, resulta de pequenas inversões na região p do cromossoma 2, onde se encontram originalmente ambos os genes em direções opostas, e que ficarão fundidos após ocorrer a inversão que envolve os dois loci - inv(2)(p21p23). (31)

Neste rearranjo envolvendo o ALK, o gene EML4 encontra-se em contínuo com a sua extremidade 5', e o resultado é então a fusão entre a correspondente proteína EML4 dos microtúbulos e a região intracelular do recetor ALK; a fusão promove uma dimerização/oligomerização das proteínas que se originam e conduz a uma ativação constitutiva do domínio cinase do ALK, ou seja, uma ativação do recetor tirosina cinase que se torna autónomo, independente de ligandos, ativando também, conseqüentemente, as vias que sinaliza. O resultado final desta alteração génica nas células portadoras, é a proliferação celular descontrolada e a perda de mecanismos apoptóticos, favorecendo a carcinogénese (31).

O gene EML4-ALK pode codificar diferentes variantes da correspondente proteína de fusão: normalmente, os rearranjos envolvem sempre o domínio intracelular da tirosina cinase, mas o gene EML4 encontra-se truncado em diferentes alturas da sua sequência (figura 3). Em 2013 conheciam-se já mais de 20 variantes, no entanto, ainda não foi estabelecida a importância clínica desta distinção (32) – estudos *in vitro* mostraram diferentes sensibilidades perante vários inibidores de ALK, mas o mesmo ainda não se verificou num cenário mais

clínico que elucide a necessidade de as distinguir com benefícios de escolha terapêutica para o doente (33).

No entanto, analisando a total população de CPNPC, apercebemo-nos que os rearranjos envolvendo o ALK são relativamente raros, mas que se tornam frequentes quando seleccionamos determinados perfis clínicos: adenocarcinomas com padrão histológico predominantemente em anel de sinete ou mucinoso cribiforme (34–36), estádios avançados, doentes com hábitos tabágicos leves ou inexistentes e idade jovem, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas em termos de sexo (37,38). A presença desta mutação parece ser também um fator prognóstico, apresentando estes doentes um pior *outcome* comparativamente aos doentes ALK negativos (39), com pior sobrevivência e risco aumentado de desenvolver metástases cerebrais e hepáticas.

Existem ainda diversos estudos que sugerem a exclusividade do gene EML4-ALK em relação às alterações dos genes EGFR e KRAS, significando que a presença de um destes exclui, na grande maioria dos casos, a existência dos outros (40,41).

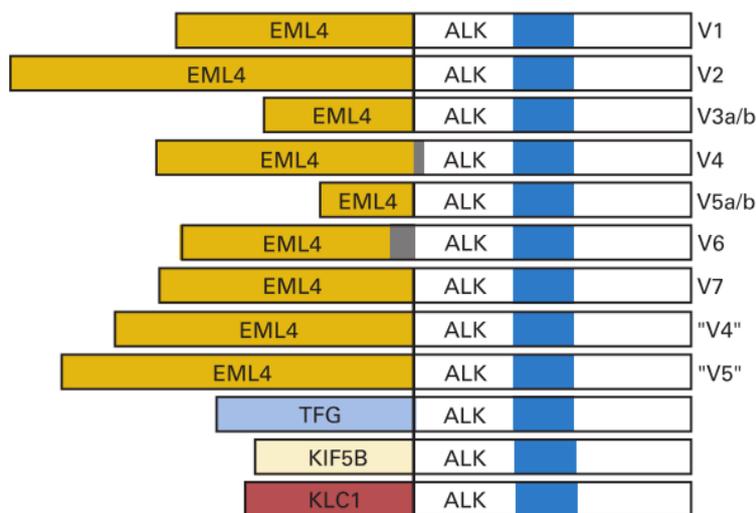


Fig. 3- Diferentes proteínas de fusão combinadas com o ALK e encontradas em cpnpc; mostra a predominância da combinação entre o ALK e EML4, conhecendo-se mais de 20 variantes diferentes; o rectângulo azul representa o domínio de tirosina cinase conservado em todas as diferentes variantes de proteínas de fusão (30).

6.3- Um novo aliado: o Crizotinib

Não há dúvidas quanto à natureza complexa e potencialmente fatal do cancro do pulmão, no entanto este panorama parece estar a modificar-se radicalmente: cada vez parecem estar mais claros os mecanismos subjacentes à fisiopatologia e comportamento tumoral, o que se reflete no prognóstico, destacando-se como principal razão a possibilidade, que se tornou real, de começar a aplicar terapêuticas dirigidas. Este novo conceito exige a identificação de alvos moleculares específicos com papel central na carcinogénese, que devem ser mensuráveis na clínica (qualitativa ou quantitativamente) e ter correlação com *outcomes* clínicos positivos quando a terapêutica dirigida é administrada (42). A descoberta de mutações ativadoras do gene EGFR e mais recentemente de genes de fusão envolvendo o ALK tem permitido aplicar o conceito: os doentes com CPNPC, (mais frequentemente adenocarcinomas), são selecionados através de biomarcadores (alterações génicas, principalmente do EGFR e ALK – figura 4), e mostram benefício clínico extraordinário inerente ao uso de inibidores de tirosina cinase dirigidos às alterações do EGFR do ALK, apresentando uma melhoria considerável no controlo do tumor e na própria sobrevivida.

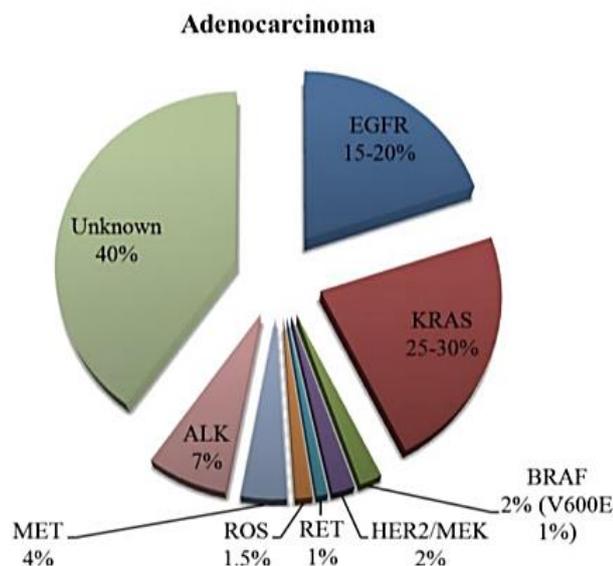


Fig.4- Incidência das alterações génicas conhecidas no adenocarcinomas do pulmão (o mais frequente dos CPNPC) (85).

O ALK foi validado como alvo terapêutico após serem conhecidos os resultados arrebatadores dos primeiros ensaios com o Crizotinib, um inibidor de tirosinas cinase atualmente utilizado em doentes com CPNPC avançado e ALK positivo, (cerca de 4%(-6%) dos CPNPC representando aproximadamente 40000 novos casos por ano dada a sua elevada incidência) (30).

O papel do Crizotinib, uma nova molécula concebida pela Pfizer® destinada inicialmente a inibir a tirosina cinase c-MET, foi avaliado em estudos pré-clínicos de seletividade e mostrou-se, de facto, mais potente contra o c-Met mas também ativo contra outros RTK's importantes no processo de oncogénese, nomeadamente ROS1 e ALK (43).

O primeiro estudo em humanos começou em 2006 com um ensaio de escalada de dose, em doentes com tumores sólidos. O desenho do ensaio determinava que fossem posteriormente efetuados estudos para deteção da expressão de ALK ou MET em doentes com tipos específicos de tumores, e que os doentes com evidência de ativação ALK ou MET fossem incluídos em coortes de expansão do estudo, medicados com a dose determinada previamente (250mg 2id, em ciclos de 28 dias).

Em 2007 os rearranjos do ALK são descobertos pela primeira vez no CPNPC. Com esta descoberta e os resultados promissores em dois doentes com CPNPC ALK positivos tratados na fase de escalada de dose, o protocolo sofreu uma emenda e em 2008 foi acrescentada uma nova coorte de doentes com estas características. Os dados destes 19 doentes revelaram uma taxa de respostas objetivas (ORR – *Overall Response Rate*) de 53%, mais tarde confirmada por um total de 82 doentes incluídos (57%) (44).

No primeiro ensaio de Fase I específico para CPNPC, internacional e multicêntrico - PROFILE 1001 (fig.8) -, foram avaliadas as respostas de 143 doentes ALK positivos em estadios avançados, tratados com Crizotinib. Atingiu-se uma ORR de 60.8% (87 respostas em 143 doentes, 3 delas completas (CR: *Complete Response*), e as restantes 84 parciais (PR:

Comentário
pena falar
Basta a par
terapêutica
O artigo é s

Partial Response), (fig. 5), uma sobrevivência livre de progressão (PFS: *Progression Free Survival*) de 9.7 meses e uma sobrevivência global (OS: *Overall Survival*) estimada aos 6 meses de 87.9% e aos 12 meses de 74.8%.

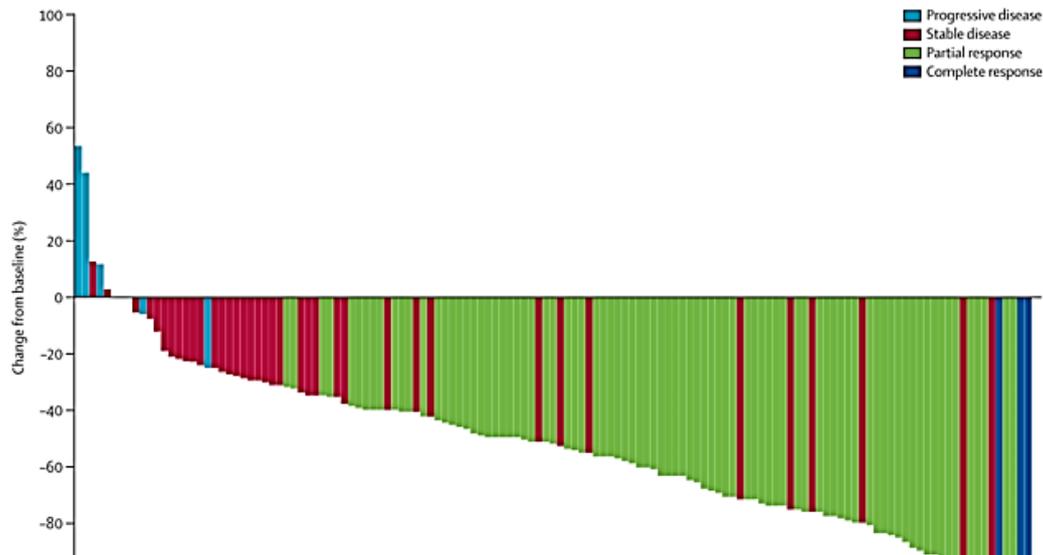


Fig.5- *Waterfall plot* – gráfico em cascata representando as impressionantes respostas dos doentes após o início do Crizotinib (representado pela linha de base). Adaptada de (45)

Trinta e nove doentes continuaram a tomar Crizotinib por mais 2 semanas para além da progressão, facto justificado pelo benefício clínico experimentado por estes doentes durante o ensaio. Foi relatada a ocorrência de efeitos adversos ao medicamento em 97% dos casos, no entanto estes foram maioritariamente de grau 1 ou 2, sendo os mais comuns: alterações oftalmológicas, náuseas, diarreia, obstipação, vómitos e edemas periféricos; as reações adversas mais graves, de grau 3 ou 4, foram neutropenia em 9 casos, subida dos níveis de alanina aminotransferase, hipofosfatémia e linfopenia (cada um destes em 6 doentes). Concluiu-se, nesta fase, que o Crizotinib era um fármaco bem tolerado, que induzia respostas rápidas e duradouras em doentes com CPNPC ALK positivo, parecendo demonstrar um potencial benefício em situações de primeira progressão da doença (45) . Estes resultados

iniciaram uma revolução no campo do tratamento do cancro do pulmão (fig. 6), uma vez que contrastavam nitidamente com os resultados da terapêutica *standard* em vigor.

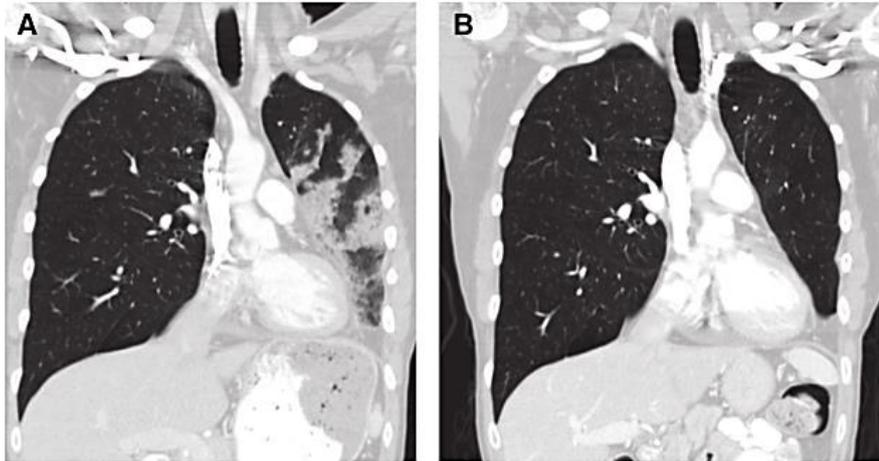


Fig.6- Resposta imagiológica típica de um doente EML4-ALK+ após 7 semanas de Crizotinib (30).

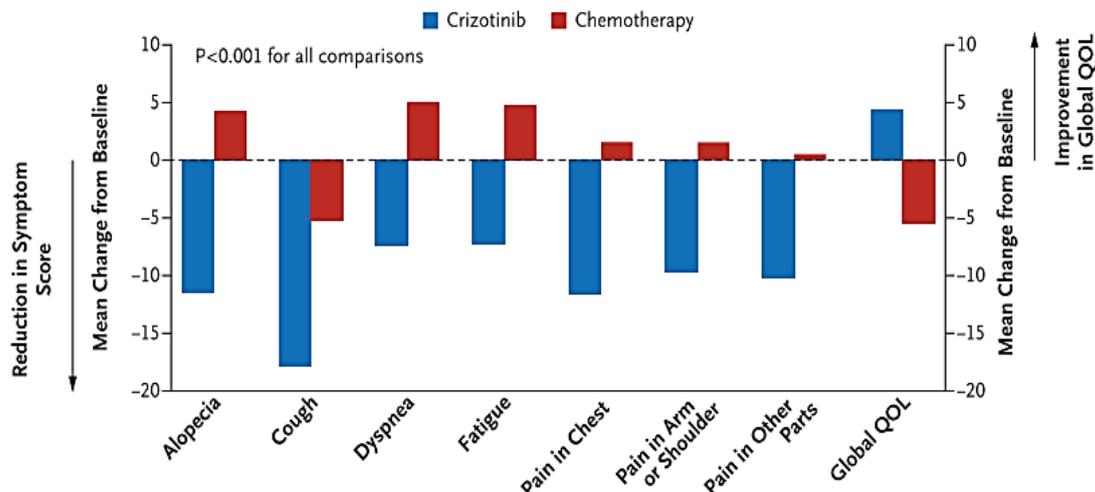
Resultados igualmente surpreendentes, foram alcançados com os estudos de fase II - PROFILE 1005 (fig.8) – que continuaram a avaliar a ação do Crizotinib em CPNPC avançados ALK positivos, previamente tratados com um duplete de citostáticos contendo um platino, verificando-se uma ORR de 59.8%, duração média da resposta de 45.6 semanas e uma PFS média de 8.1 meses (46).

Foi com base nas respostas impressionantes dos doentes à aplicação do Crizotinib, em estudos de fase I e II e no favorável risco-benefício, que a FDA aprovou precocemente o uso do Crizotinib, em Agosto de 2011, para o tratamento dos CPNPC (localmente avançados ou metastáticos) ALK positivos, etectados por um teste de técnica de FISH também aprovado a par do medicamento (3).

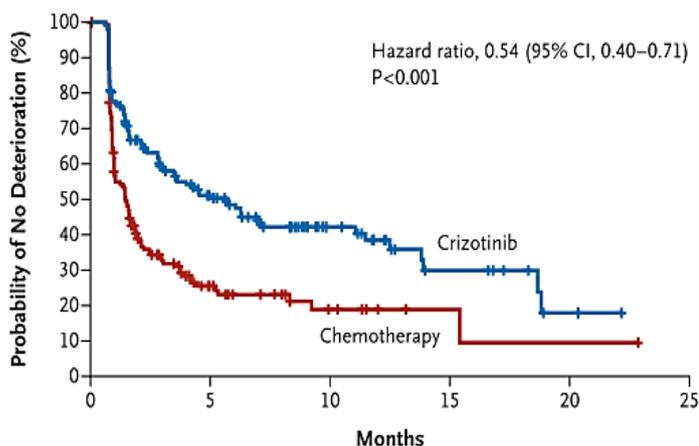
Por fim, dois estudos de fase III foram estruturados de modo a comparar os efeitos do Crizotinib com os da quimioterapia, em populações selecionadas: PROFILE 1007 e PROFILE 1014 (fig. 8). O ensaio PROFILE 1007 (fig.7) – A8081007, internacional, multicêntrico e randomizado, veio confirmar a eficácia clínica demonstrada nas fases anteriores: a amostra foi

de 347 doentes ITT (*intention to treat*), novamente constituída por doentes com CPNPC, em estadio avançado, positivos para ALK (selecionados pelo teste *Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit*®), previamente submetidos a um regime de quimioterapia com Platino e que recebiam, durante o estudo, ou o Crizotinib ou novo regime de quimioterapia (pemetrexed ou docetaxel). A PFS média encontrada foi de 7.7 meses no grupo tratado com Crizotinib e de 3.0 no grupo que recebeu quimioterapia (valores mostraram-se independentes de fatores de estratificação de subgrupos); a ORR foi de 65% para o Crizotinib e de 20% no braço que recebeu quimioterapia. No grupo tratado com Crizotinib, assistiu-se a uma gratificante CR e a 112 PR, enquanto no outro grupo não foram obtidas CR e contaram-se 34 PR. Em termos de OS, não foram encontradas diferenças significativas: o Crizotinib alcançou os 20.3 meses e a quimioterapia, 22.3 meses. No entanto, estamos perante um fator de confundimento (fenómenos de *crossover*) que poderá justificar estes últimos resultados de impacto na OS: 64% dos doentes do grupo que se submeteu a quimioterapia, recebeu posteriormente Crizotinib aquando da progressão da doença. Em relação à toxicidade, todos os doentes que receberam Crizotinib experimentaram algum tipo de reação adversa, 17% descontinuaram a terapêutica pelos efeitos adversos, 39% descontinuaram temporariamente, 16% tiveram redução da dose. No braço do estudo que recebeu quimioterapia, 98% dos doentes experimentaram efeitos adversos, 14% descontinuaram a terapêutica, 16% interromperam temporariamente e 15% tiveram redução da dose; note-se no entanto que, para a interpretação destes resultados, é necessário ter em conta que a duração do tratamento com Crizotinib foi 2 a 3 vezes mais longa que a da quimioterapia. Para o Crizotinib, as reações adversas mais frequentes (>25%) continuaram a ser as perturbações visuais, (incluindo casos de diplopia,

A Overall Change from Baseline in Symptoms and Global QOL



B Time to Deterioration with Respect to a Composite Lung-Cancer-Symptom End Point



No. at Risk	0	5	10	15	20	25
Crizotinib	162	61	25	9	2	0
Chemotherapy	151	22	8	2	1	0

Fig.7- Outcomes dos doentes num estudo de fase III conseguidos através da aplicação de um questionário destinado a esta avaliação: *European Organization for Research and Treatment of Cancer quality-of-life questionnaire (QLQ-C30)* adaptados ao cancro do pulmão (QLQ-LC13). O esquema **A** ilustra a mudança dos sintomas dos doentes comparativamente com uma linha de base. Os scores no questionário variam entre 0 e 100, e assim, no que concerne às barras dos sintomas, as pontuações mais altas reforçam a sua severidade, enquanto as negativas, indicam melhoria; Já na última barra, referente à qualidade de vida global, vemos que é positiva para o Crizotinib, ao contrário da da Quimioterapia, significando melhor qualidade de vida dos doentes tratados com este agente. O gráfico **B** mostra uma estimativa (de *Kaplan–Meier*) para o tempo da deterioração dos sintomas (considerando os 3 cardinais, tosse, dispneia e dor torácica) com cada métodos terapêutico. No caso do Crizotinib, esta deterioração demorou mais tempo a chegar, apresentando um tempo médio de 5.6 meses sendo mais rápido nos doentes sujeitos a Quimioterapia, chegando ao fim de uma média de 1.4 meses. Adaptado de (10)

fotofobia, fotopsia, visão turva, diminuição da acuidade visual, défices visuais e *vitreous floaters*), as náuseas, diarreia, vômitos, obstipação, edemas, elevação das transaminases e fadiga. Dos efeitos adversos de graus 3 e 4, o mais comum foi a elevação das transaminases (17%) e o mais grave, a pneumonia (4%). Outros efeitos tóxicos clinicamente significativos para além da hepatotoxicidade, foram a bradicardia, prolongamento do intervalo QT (no eletrocardiograma) e a doença pulmonar intersticial (em cerca de 5% dos doentes). (10). Os excelentes resultados deste ensaio levaram em, Novembro de 2013, à aprovação pela FDA do Crizotinib em segunda linha, em doentes com CPNPC ALK positivos.

O outro estudo de fase III - PROFILE 1014 – novamente internacional, multicêntrico e randomizado- comparou o efeito do Crizotinib com o da quimioterapia em doentes sem tratamento prévio, tentando apurar qual a terapêutica mais eficaz em primeira linha para os doentes com CPNPC, estadios IIIB e IV, positivos para ALK. Foram randomizados, participando um total de 343 doentes, recebendo no braço A 250 mg de Crizotinib 2 vezes por dia, ou no braço B quimioterapia (pemetrexed em associação com cisplatino ou carboplatino a cada 3 semanas até perfazer um máximo de 6 ciclos). No braço B foi permitido o *crossover* para Crizotinib após progressão da doença. Os resultados mostraram que foi atingido melhor PFS no grupo do Crizotinib, 10.9 meses em contraste com o valor no grupo da quimioterapia, 7.0 meses. A ORR foi também superior no grupo do Crizotinib, 74% *versus* 45% com quimioterapia, tal como probabilidade de sobrevivência no 1º ano (84% *versus* 79%). O perfil de segurança do Crizotinib foi consistente com o reportado anteriormente no PROFILE 1007, em que os doentes recebiam tratamento prévio com quimioterapia, ressalvando-se, no entanto, demonstração da capacidade de controlar a elevação das aminotransferases de grau 3 e 4 no grupo do Crizotinib (apresentada por 14% dos doentes desse grupo), com interrupções do fármaco ou ajustes de dose.

Concluiu-se também que a terapêutica com Crizotinib em primeira linha se associava a melhor qualidade de vida global e a uma maior capacidade de reduzir os sintomas relacionados com o próprio tumor. É ainda de notar que, apesar de a comparação directa entre estes últimos dois estudos de fase III não ser possível, a eficácia do Crizotinib como tratamento de primeira linha para estes doentes, parece ser superior à demonstrada pela inclusão do fármaco apenas em linhas de tratamento secundário, isto é, os doentes podem beneficiar mais do Crizotinib do que da realização de esquemas de quimioterapia baseados em platino como primeira abordagem terapêutica.

Study	Phase	Patients included	ORR (%)	PFS (months)	Author
PROFILE 1001	Phase I	N: 149 pt (NSCLC; ALK+)	60.8 (95% CI, 52.3-68.9)	9.7 (95% CI, 7.7-12.8)	Camidge 2012 (32)
PROFILE 1005	Phase II	N: 261 pt (NSCLC; ALK+)	60 (95% CI, 53.6-65.9)	8.1 (95% CI, 6.8-9.7)	Kim 2012 (33)
PROFILE 1007	Phase III (CZT vs. P/D)	N: 346 pt (NSCLC; ALK+)	65 vs. 19.5 P<0.0001	7.7 vs. 3.0 P<0.0001	Shaw 2013 (34)
PROFILE 1014	Phase III (CZT vs. C + P)	(NSCLC; ALK+)	Ongoing	Ongoing	(NCT01639001)

Fig.8- Ensaios clínicos mais relevantes em doentes ALK positivos (86). CZT- Crizotinib; P- Pemetrexid; D- docetaxel; C- cisplatina ou carboplatina; NSCLC- CPNPC.

6.4- Quando e como testar a presença dos rearranjos do ALK

É globalmente reconhecida a importância da deteção do rearranjo do gene ALK para a seleção dos doentes com CPNPC que beneficiarão da terapêutica dirigida. Contudo, não está ainda muito claro se as características clinicopatológicas poderão ajudar nesta tarefa. Sabe-se que os rearranjos do gene ALK são mais frequentes em adenocarcinomas - especialmente com padrão de células em anel de sinete (figura 9.B e C) ou mucinoso cribiforme -, doentes mais jovens, e ainda em doentes não fumadores ou ex-fumadores de baixa carga tabágica. A histologia parece ser o critério mais importante de seleção dos doentes candidatos: em mais de 12000 carcinomas do pulmão estudados, os rearranjos ALK foram encontrados

maioritariamente em tumores não escamosos e não neuroendócrinos (47), e portanto as *guidelines* recomendam, no mínimo, a pesquisa dos rearranjos genéticos em todos os doentes com CPNPC avançados que sejam adenocarcinomas ou possuam um componente adenocarcinomatoso (48). É ainda aconselhado testar a presença destes rearranjos noutros casos menos lineares: aqueles em que o carcinoma é classificado como CPNPC e não é possível excluir uma componente de adenocarcinoma (por exemplo nos casos de biópsias limitadas ou citologias), e ainda quando estamos perante um adenocarcinoma/ tumor misto com população de adenocarcinoma, mas em estadio inicial (I-IIIa) não abrangido pelas indicações terapêuticas de uso de Crizotinib, mas em que o teste molecular deve ser realizado no sentido de fornecer informação que poderá ser utilizada mais tarde, caso o tumor venha a recorrer ou evoluir (48). As *guidelines* do *The college of American Pathologists (CAP)/ International Association for the Study of Lung Cancer (IASLAC)/ Association for Molecular Pathology (AMP)*, sugerem que não devem ser utilizadas de forma rotineira a deteção da translocação ALK no grupo dos CPNPC escamosos. É de salientar, no entanto, que existe ainda alguma dificuldade na classificação histológica dos tumores do pulmão, no que concerne à diferenciação dos vários subtipos de CPNPC, e que este facto poderá justificar a percentagem (1.3% em mais de 1400) de carcinomas escamosos portadores de rearranjos ALK, e as discordâncias entre estudos nestes carcinomas. (47)

Esta complexidade da caracterização histológica dos tumores do pulmão está bastante ligada ao tipo de amostra habitualmente disponível para análise, habitualmente constituído por material de biópsias de pequenas dimensões e amostras citológicas, deixando os patologistas e clínicos na dúvida sobre a representatividade daquelas em relação ao total da massa tumoral. Como exemplo, e a corroborar este facto, temos os resultados de um estudo, efetuado por Rektman, em foi feita a reavaliação dos diagnósticos de 16 tumores de células

escamosas com evidência de EGFR e KRAS, e se chegou à conclusão que 15 desses tumores demonstravam componentes de adenocarcinoma (49).

Reconhece-se então uma relação de coexistência entre a histologia de adenocarcinoma avançado e os rearranjos do ALK, o que tem revolucionado o campo das terapêuticas e da prática clínica, tornando imperativa a subtipagem histopatológica precisa para que as terapêuticas dirigidas de que dispomos sejam eficazes (figura 9). Neste âmbito, a nova classificação de tumores do pulmão da *World Health Organization* (WHO), assume um importante papel já que é com base nesta classificação que são identificados os CPNPC que poderão ser portadores dos rearranjos. Esta classificação adaptou-se às novidades na área da pneumologia oncológica tornando mandatória a exata classificação histopatológica para selecionar os subgrupos de doentes, diminuindo o mais possível o número de CPNPC-NOS (*Not Otherwise Specified*). Nas classificações anteriores a distinção dos tumores era morfológica, baseava-se na microscopia ótica, usando técnicas de coloração de hematoxilina-eosina e eventualmente mucina. Na nova classificação as técnicas de Imuno-histoquímica (IHQ) são recomendadas, sempre que possível, não só para as pequenas biópsias e citologias, mas também em peças cirúrgicas de adenocarcinomas sólidos, carcinomas escamosos não queratinizantes, carcinomas de grandes células, tumores neuro-endócrinos e carcinomas sarcomatóides. Por outro lado, a necessidade de preservar material de biópsia para a realização de estudos moleculares levou também a que exista a indicação muito precisa de que devem ser realizados o mínimo possível de estudos de IHQ necessários para a sub-classificação dos tumores. Foi assim criada uma nova categorização de pequenas biópsias e citologias e uma abordagem completamente renovada para o adenocarcinoma (estas duas últimas, semelhantes às propostas pelas *Association for the Study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/ European Respiratory Society*, em 2011) (50).

Mais recentemente surgem novas evidências: a de que o tumor não é uma entidade estática, e que a sua arquitetura histológica e molecular pode variar ao longo do tempo e ser mesmo modificado pelo tratamento instituído; esta constante mudança parece exigir ou pelo menos levantar a hipótese da necessidade de rebiopsar o tumor e de fazer novas avaliações da histologia e dos marcadores moleculares após cada linha terapêutica.

Mas após estarmos face a um adenocarcinoma do pulmão em estadio avançado, como testar a presença de translocações do ALK? O método recomendado neste momento como *gold-standard* para este efeito é o FISH, um *kit* desenvolvido para os estudos iniciais destes fármacos. No entanto, e se devidamente validado, é possível os laboratórios considerarem válida a aplicação de um método de rastreio prévio a este FISH, capaz de uma pré-seleção dos doentes com adenocarcinoma, utilizando a IHC (51).

O teste FISH empregue nos estudos iniciais do Crizotinib em doentes com ALK-rearranjado, foi eficaz ao ponto de permitir a observação dos *outcomes* que acabaram por validar a aprovação do Crizotinib para uso clínico (grau de evidência B). Este método foi inicialmente aplicado segundo duas diferentes estratégias, *break-apart* e *fusion*, mas a primeira apresentou melhor correlação com os *outcomes* dos doentes e foi por isso a escolhida como referência na área (52,53). A FDA aprovou assim o *Abbott Molecular Probes*® (Figura 9.A), como teste diagnóstico acompanhante da seleção dos doentes a receber Crizotinib. Este teste comercial, inclui uma marcação com sonda de 300-kb em espectro de cor-de-laranja para a região telomérica 3' do gene ALK e uma sonda com marcação verde de 442-kb destinada à região centromérica 5', aparecendo o ALK original como sinal amarelo e o ALK rearranjado como dois sinais distintos verde e laranja “separados” (51). O teste é positivo se for detetada a presença de mais de 15% de células tumorais com rearranjo ALK (54).

Note-se ainda que o FISH exige uma amostra de pelo menos 50 células tumorais para a fidedignidade dos seus resultados, e portanto, não pode ser utilizada em cerca de 20% das biopsias tumorais (40,54). Apresenta ainda outras limitações: os elevados custos, a exigência de material como microscópio de fluorescência e formação própria para a interpretação dos resultados. Assim sendo, novas investigações têm focado a comparação do FISH com a IHC (envolvendo a aplicação de diferentes anticorpos), RT-PCR (reação polimerase em cadeia com uso de transcriptase reversa) multiplex ou quantitativo e CISH (hibridização *in situ* cromogénica) (55). No entanto, e salvaguardando a hipótese de não ser aplicado este método convencional e *gold standard*, está recomendada a realização de estudos de validação do teste aplicado, comprovando uma *performance* pelo menos comparável ao de referência no que

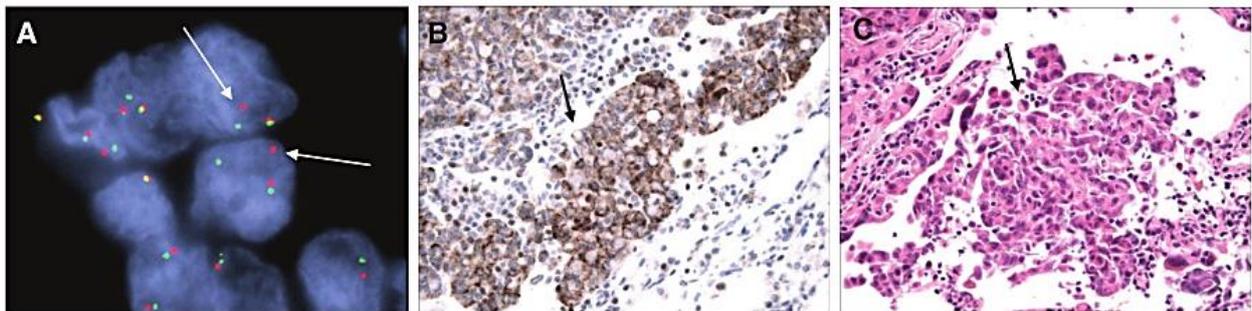


Fig.9- Métodos diagnósticos de CPNPC EML4-ALK+. A) Aplicação da técnica FISH a uma amostra tumoral positiva para o rearranjo. As setas mostram as diferentes marcações possíveis para os achados; B) Técnica de IHQ com coloração citoplasmática para ALK; C) coloração da mesma peça com Hematoxilina-Eosina; As setas de B) e C) realçam células em anel de sinete. Adaptada de (37).

concerne à intensidade, magnitude, precisão, sensibilidade e especificidade do sinal, devendo, este teste aplicado, ser ainda capaz de detetar as variantes de fusão do ALK com outros elementos que não apenas o EML4 (56).

Teoricamente, a IHC é capaz de detetar as proteínas de fusão do ALK, mas, o facto de algumas variantes existirem em baixas concentrações, dificulta o processo: por todas as vantagens apresentadas por este método (rapidez, simplicidade, baixos custos), este foi estudado como passível de identificar sobreexpressão de ALK rearranjado em adenocarcinomas, como alternativa ao FISH. No entanto, demonstrou resultados bastante

pobres com o anticorpo anti ALK1 (anticorpo monoclonal anti-humano CD246 de rato, tipicamente utilizado no caso dos linfomas), devido às baixas concentrações de proteínas de fusão rearranjadas no caso dos adenocarcinomas do pulmão, ao contrário do que sucede com os linfomas de células anaplásicas (51). Inúmeros esforços têm sido feitos nesta área, na tentativa de melhorar o método, aplicando técnicas de amplificação ou novos anticorpos, existindo já um teste comercializado que apresenta excelente reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade quando comparado com o FISH, (anticorpos ALK anti-humanos monoclonais de rato D5F3 e D9E4) (57,58).

A IHC mostra-se, assim, um método bastante popular, mas a ser utilizado para já como ferramenta de seleção inicial da potencialidade da peça histológica conter os rearranjos ALK, uma vez que permite observar simultaneamente a arquitetura tecidual e a histologia das células tumorais. Outros algoritmos, no entanto, defendem o emprego do FISH apenas subsequentemente a testes IHC duvidosos e desnecessário nos positivos com IHC. Assim sendo, até à data, a evidência parece insuficiente para aprovar uma recomendação que valide o emprego da IHC para ALK como determinante na prescrição de terapêutica com ALK TKIs, sendo utilizado apenas como método de *screening*, com a posterior verificação por FISH para a elegibilidade terapêutica. (51,59,60).

Por fim, as outras duas técnicas cuja aplicação tem sido estudada para o referido objetivo, são a RT-PCR e a CISH. A primeira, tem-se revelado uma técnica altamente específica e fiável, e baseia-se na identificação de variações de *breakpoints*, e combinações com a extremidade 5' de ALK, mas falha na deteção de variantes atípicas, que contenham por exemplo deleções ou inserções, e o custo da sua aplicação ainda se encontra sob avaliação. A CISH, é um novo método que pretende ultrapassar algumas dificuldades da FISH, um método automatizado de hibridização *in situ* cuja tecnologia ainda requer validação, embora existam já alguns algoritmos que incluam a sua execução (60).

Em suma, conhecem-se algoritmos diferentes para o diagnóstico dos rearranjos ALK: estes incluem as diversas técnicas, são propostos por diferentes autores e/ou grupos de estudo e espelham a controvérsia sobre a melhor combinação de procedimentos para o efeito, que se deve, principalmente, à complexidade de interpretação das características de cada tumor (61). A maioria recomenda um *screening* com IHC, pelas questões de custo-efetividade inerentes à necessidade de realizar testes em massa e a posterior verificação com FISH, que se mantém, para já, o *gold standard*.

6.5- Novo desafio: as resistências

Apesar da evidente atividade anti-tumoral do Crizotinib, os tumores com alterações do gene ALK, parecem desenvolver, inevitavelmente, resistência a este fármaco, na maioria das vezes no final de um ano de terapêutica, podendo no entanto a duração dos benefícios ser bastante variável, incluindo-se num espectro que se estende desde meses a anos (30,62). A resistência pode ser primária (ausência de resposta ao tratamento), ou secundária (após uma resposta inicial) (62), parecendo esta última ser a forma mais comum no caso da resistência ao Crizotinib. A identificação dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento das resistências é atualmente alvo de intensa investigação (12).

Pensa-se que a resistência primária, menos comum e bem menos compreendida, possa estar relacionada com características intrínsecas do próprio gene de fusão, que conferem diferenças de sensibilidade, observadas tanto com as diferentes variantes da fusão EML4-ALK como com os próprios genes associados em fusão com o ALK. Esta hipótese é suportada por estudos *in vitro* mas não apresentou correlação clínica até à data (estudos de fase I com o Crizotinib não conseguiram provar relação entre a resposta e as diferentes

variantes de EML4-ALK) (33,44). Outra causa para este tipo de resistência prende-se com as eventuais falhas técnicas no diagnóstico dos rearranjos, como a existência de falsos positivos na genotipagem. A técnica de FISH, apesar de ser a única aprovada pela FDA para deteção dos rearranjos, representa um desafio claro ao utilizador uma vez que a sua interpretação pode ser difícil, sendo possível hibridização aberrante, artefactos a diversos níveis, falha na interpretação dos resultados ou até, em último caso, verdadeiros positivos mas cujas translocações identificadas não produzam alterações funcionais (40). Outros mecanismos que parecem emergir como potenciais explicações são: a perda do próprio oncogene de fusão EML4-ALK, bem como interferência de processos farmacocinéticos inerentes ao metabolismo do fármaco, interações com outros fármacos, ou a correta adesão ao tratamento, tendo-se já verificado, por exemplo, no caso da Leucemia Mielóide Crónica em tratamento com Imatinib, que estes fatores possam ter impacto nos níveis de fármaco atingidos e interfiram com as concentrações terapêuticas ótimas, (não esquecendo que o Crizotinib é um fármaco de toma por via oral que exige o comprometimento dos doentes no cumprimento da posologia) (63,64).

A resistência secundária ou adquirida, por sua vez, pode surgir por diversos mecanismos (figura 10) que se incluem em duas categorias principais: a resistência ALK-dominante (tumores resistentes mas em que o ALK continua a ser o biomarcador oncogénico principal e em que o tumor permanece dependente da sua atividade), de que são exemplo o aparecimento de mutações secundárias ou amplificação do próprio gene ALK, e a resistência ALK-não dominante, em que o ALK passa a ser um alvo não principal, surgindo outras vias que coexistem com o rearranjo mas passam a assumir maior importância que este (33,62).

Na resistência adquirida em que o ALK continua a ser dominante, é comum os doentes desenvolverem outras mutações do gene, sendo este considerado o mecanismo responsável pela maioria dos casos de resistência ao Crizotinib. Alguns exemplos incluem: a mutação

ALK e Cancro do Pulmão: o futuro é hoje?

Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

L1196M, a primeira “*major gatekeeper*”, uma substituição de aminoácidos (leucina por metionina na posição 1196) que interfere com a ligação do próprio Crizotinib na região correspondente de EML4-ALK, (por alterar, primeiramente, o local de ligação do ATP ao recetor), e outras mutações distribuídas por locais secundários, mais longínquos ao local de ligação do fármaco, estando atualmente descritas 8 principais, responsáveis por cerca de 28% dos casos de resistência ao Crizotinib (fig. 10) (2). A mutação L1196M, interfere então com o local principal da ligação do Crizotinib; a G120R e a S120Y, ocorrem no domínio da cinase, na proximidade do local de ligação e reduzem a afinidade para o fármaco; a 1151Tins, apesar de distante ao local, diminui a afinidade da ligação entre o Crizotinib e o ATP, perturbando a sua ação e ainda podem ocorrer várias outras como F1174L (também encontrada em resistência de tumores de miofibroblastos ao Crizotinib e representando o resíduo F1174, o mais comumente mutado no neuroblastoma (65), C1156Y, D1203N e G1269A (63,65–67). Outro mecanismo recentemente identificado e inserido neste grupo de resistência adquirida, é a amplificação do ALK, em particular um “ganho” do número de cópias (aumento do número

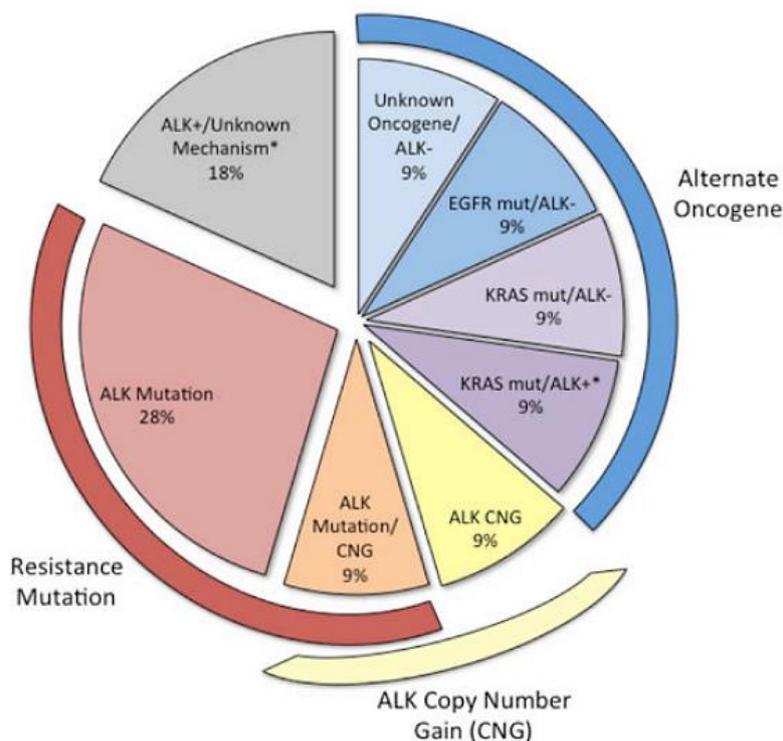


Fig.10- Frequências relativas dos mecanismos de resistência ao Crizotinib em CPNPC ALK+. Adaptado de (63).

de cópias do rearranjo em células tumorais sujeitas a terapêutica quando comparado com o estadio prévio ao tratamento), detetado em 18% dos casos (fig. 10) (67).

Por outro lado, os mecanismos não dominantes, contribuem para cerca de 20% dos casos de resistência adquirida ao fármaco nos CPNPC ALK-positivos, e incluem ativação de vias de sinalização alternativas que funcionam como *bypass* permitindo o desenvolvimento tumoral sem a necessidade de sinalização pelo alvo terapêutico, por exemplo por ativação das vias ligadas ao EGFR (fig.10), amplificações c-KIT, mutações KRAS, ou alterações em HSP90 ou PI3K/AKT/mTOR (68). Em relação à resistência ao Crizotinib associada a alterações da via ligada ao EGFR, o mecanismo preciso pelo qual ocorre não está ainda esclarecido, mas há relatos de aumento da sua ativação em alguns doentes, apesar de continuar a ser rara a ocorrência de mutações no EGFR concomitantes em tumores ALK+ (em grande parte da literatura consideradas até exclusivas), e portanto, esta sobre-ativação não parece ser devida a mecanismos de mutação do próprio gene EGFR. No entanto, note-se que existem casos em que a resistência ao inibidor do ALK é ultrapassada pela ressensibilização das células por inibição do próprio EGFR e posterior continuação do Crizotinib (30,63,67,69). Outra via envolvida na resistência ao Crizotinib por *bypass*, engloba alterações de c-Kit por amplificação génica, que se provou ser contornável por combinação de Imatinib e Crizotinib (30,67). As mutações de KRAS, por sua vez, parecem ter um significado incerto como indutoras de resistência, porque apesar de já terem sido identificadas em alguns doentes com resistência, a reprodução do mecanismo em laboratório não pareceu induzi-la tal como se pensava (30,63,70).

As alterações da histologia tumoral (trans-diferenciação), constituem outro mecanismo de resistência a terapêuticas com TKI's. Estes acontecimentos foram inicialmente reportados em adenocarcinomas com mutações no gene EGFR que foram submetidos a inibidores dirigidos a essas alterações, e desenvolveram resistência aos mesmos. Estes tumores foram

então rebiopsados e mostraram alterações fenotípicas surpreendentes, com modificação da histologia original de adenocarcinoma para CPPC ou modificações do componente epitelial para mesenquimatoso, com mudança evidente dos marcadores teciduais. A explicação base para estas ocorrências, permanece desconhecida, e parece ainda não existir documentação de semelhantes modificações histológicas a propósito de tumores ALK+ resistentes (62,67,71).

Por fim, considera-se ainda possível, a presença de resistência policlonal (62,63), traduzindo-se por coexistência de diferentes mecanismos de resistência no mesmo tumor ou alteração do comportamento tumoral com as mudanças da terapêutica, podendo ser justificável continuar o mesmo inibidor apesar das progressão da doença, até se iniciar uma nova terapêutica (72).

As dificuldades que esta realidade acarreta são evidentes e agravadas pelo facto de a amostra tecidual de que habitualmente dispomos, ser escassa e nem sempre representativa da totalidade do tumor.

A resistência adquirida ou secundária representa assim o mais recente desafio no campo das terapêuticas dirigidas, exigindo ainda uma mais aprofundada compreensão dos processos subjacentes, a ponderação da necessidade de rebiopsar os tumores (com balanço dos riscos *versus* benefícios) para monitorizar o seu comportamento, a procura de meios não invasivos para tal (biópsias líquidas e pesquisa de DNA tumoral no sangue/plasma) e ainda a noção da mutabilidade e dinâmica dos tumores devidas à aplicação das diferentes pressões seletivas das abordagens terapêuticas. (62,73,74).

6.6- Inibidores ALK de segunda geração

Os esforços atuais viram-se para o desenvolvimento de inibidores ALK de segunda geração, que se espera consigam ultrapassar as resistências e apresentar níveis terapêuticos de atividade no SNC, a par de, obviamente, serem capazes de prolongar a PFS e a OS.

O Ceritinib é um inibidor oral da tirosina cinase seletivo para o ALK, que atua competindo com o ATP, sendo vinte vezes mais potente que o Crizotinib. O estudo pré-clínico em modelos xenograft de CPNPC com rearranjos, mostrou marcada atividade em tumores ALK positivos resistentes ao Crizotinib e em tumores ainda sensíveis, sugerindo a possível aplicação deste inibidor tanto em doentes com doença progressiva como nos portadores de tumores não tratados. Após estes promissores resultados, iniciaram-se os estudos clínicos: o ensaio de fase I de escalada de dose (ASCEND 1) determinou a dose máxima tolerada de 750 mg uma vez por dia, a que se seguiu uma fase de expansão para um total de 246 doentes com CPNPC avançados com rearranjos ALK. Desta população, 163 eram pré-tratados com Crizotinib e 83 eram Crizotinib *naïves*, chegando-se a uma ORR de 58.5%, (54% nos pré-tratados e 66.3% nos *naïves*), e uma PFS mediana total de 8.2 meses (6.9 nos doentes que já tinham recebido Crizotinib e 10.4 nos *naïves*). A descontinuação do tratamento por efeitos adversos ocorreu em 10% dos doentes, e os mais comuns foram diarreia (86% dos doentes), vômitos e náuseas, (ambos em 80%), dor abdominal (54%) e fadiga (52%); foram também descritas alterações laboratoriais nestes doentes, incluindo diminuição da hemoglobina (84%), aumento das transaminases (entre 75-80%) e creatinina (58%), sendo as de grau 3 e 4 a elevação das transaminases (13-27%) e o aumento da glicémia (13%). Ocorreu ainda uma morte relacionada com o tratamento por doença pulmonar intersticial. Em suma, estes resultados confirmaram os anteriormente observados nos estudos pré-clínicos, mostrando que o Ceritinib parece ser ativo na maioria dos doentes com CPNPC e alterações

do ALK previamente tratados com Crizotinib (75); esta atividade aparenta ainda ser independente dos mecanismos de resistência subjacentes, pois ocorre tanto nos tumores com mutações de resistência detetadas como naqueles em estas que não foram encontradas, sugerindo que alguns tumores, apesar de resistentes ao Crizotinib, permanecem dependentes da ação dos rearranjos do ALK. A explicação sugerida para este facto é a possibilidade da inibição inicial promovida pelo Crizotinib ser sub-terapêutica, permitindo que os inibidores mais potentes de 2ª geração, como o Ceritinib, ultrapassem esta resistência inicial. Apesar destes promissores achados, o perfil de segurança associado ao estudo com o Ceritinib foi inferior ao registado com o Crizotinib, com uma maior percentagem de doentes a requerer diminuição da dose do fármaco: verificou-se maior incidência de efeitos adversos de grau 3 e 4 (diarreia em 7% dos doentes e náuseas em 5% sendo que, com o Crizotinib, não ocorria diarreia e náuseas só em 1% dos casos).

Recentemente, foi reportada a eficácia e segurança do Ceritinib num subgrupo de doentes do mesmo estudo com metástases cerebrais independentemente de terem recebido anteriormente Crizotinib. Dos 126 doentes nestas condições, a ORR dos previamente tratados com Crizotinib foi de 50% e dos *naive* 69.2%. (12,76)

Mesmo com esta nova aposta em inibidores de segunda geração, existem já relatos de emergência de resistências também ao Ceritinib. Até à data não se conhece muito sobre os mecanismos implícitos, mas existem já algumas referências a este facto, como por exemplo: a descoberta de uma associação entre a sobreexpressão de p-glicoproteína e o desenvolvimento de resistência a este TKI (77) e a deteção de mutações adquiridas no domínio da cinase do ALK, não coincidentes com as que mais comumente conferem resistência ao Crizotinib (não L1196M, G1269A, relatadas num pequeno estudo envolvendo 11 doentes que desenvolveram resistência ao Ceritinib, e cujas biópsias mostraram, em 5 desses doentes, as

mutações). Este achado sugere que os mecanismos de resistência surgem devido a pressões seletivas exercidas pelos diferentes TKIs sobre o tumor (78).

Dois estudos de fase II estão ainda em execução, sem resultados finais publicados, e pretendem avaliar o efeito do Ceritinib em doentes com CPNPC ALK positivos, previamente tratados com quimioterapia e com Crizotinib (NCT01685060-ASCEND 2) ou Crizotinib *naïves* (NCT01685138-ASCEND 3). Os primeiros resultados apontam para excelentes ORR (38.6% no ASCEND 2 e 63.7% no ASCEND 3). Dois outros estudos, de fase III, continuam em curso: o ensaio ASCEND 5 visa a comparação entre o efeito do Ceritinib e da quimioterapia em terceira linha, em pacientes com CPNPC ALK positivos tratados previamente com quimioterapia e Crizotinib, e o outro, ASCEND 4, pretende avaliar a ação do Ceritinib como primeira linha em doentes com as mesmas características (12,79). Em Abril de 2014 o Ceritinib teve aprovação acelerada pela FDA para utilização em doentes com CPNPC ALK positivos que progridam a tomar Crizotinib ou sejam intolerantes ao mesmo.

O Alectinib é outro inibidor ALK de segunda geração, dez vezes mais potente que o Crizotinib e altamente seletivo para o ALK. Em estudos pré-clínicos, o Alectinib mostrou ser ativo na presença de algumas mutações de resistência ao Crizotinib como a L1196M e outras secundárias como F1174L, R1275Q e a C1156Y, encaminhando os investigadores para a possibilidade de ser aplicado no tratamento dos doentes que se tenham tornado resistentes à ação do Crizotinib por meio destes mecanismos. O primeiro ensaio clínico a incluir este fármaco, foi um estudo multicêntrico de fase I/II que se baseou numa amostra de doentes japoneses com CPNPC ALK positivos identificados primeiro por IHQ e posteriormente por FISH. Um dos critérios de seleção para integrar o estudo era a ausência de tratamento prévio com qualquer inibidor de ALK. Na fase II do estudo, que contou com a participação de 46 doentes, foi administrada uma dose de 300mg duas vezes por dia, e obteve-se uma extraordinária ORR de 93.5%, correspondendo a 43 dos 46 doentes. As reações adversas de

grau III ocorreram em 26% dos casos (12 doentes) e as mais graves em 11% (5 doentes), destacando-se destes últimos casos, a diminuição de neutrófilos e o aumento dos níveis séricos de creatina fosfocinase. Não foram observadas reações de grau 4. (12)

Um outro estudo, decorreu nos Estados Unidos e envolveu 47 doentes, mas estes refratários ao Crizotinib: na fase I chegou-se à dose recomendada de 600 mg duas vezes por dia e na fase II, aplicou-se esta mesma dose e chegou-se a uma ORR de 54.5%. Os efeitos adversos mais comuns (verificados em pelo menos 15% dos doentes) foram a fadiga (30%), mialgias, edema periférico e elevação da creatinafosfocinase. Neste estudo, o Alectinib demonstrou ainda atividade antitumoral rápida e consistente contra metástases do SNC, explicada pela elevada penetração do Alectinib no SNC comparativamente à apresentada pelo Crizotinib. Mais recentemente, esta notória ação no SNC, foi de novo reforçada pelos resultados preliminares de um estudo com 28 doentes pré-tratados com Crizotinib, dos quais 19 apresentavam metástases cerebrais à partida, e que mostrou uma RR de 58.3%, uma taxa de controlo da doença (DCR) de 83.3% e a não progressão das metástases cerebrais em 13 dos doentes, 4 dos quais sem irradiação anterior; o perfil de segurança apresentado foi semelhante ao descrito nos estudos anteriores e não se verificou nenhuma descontinuação do tratamento por efeitos adversos (12,79,80). Está atualmente em curso um ensaio de fase III (ALEX) que pretende comparar o Crizotinib com o Alectinib em primeira linha.

Outros inibidores ALK de 2ª geração continuam a ser desenvolvidos: AP26113 (3-10 vezes mais potente que o Crizotinib em ensaios *in vitro*, demonstrou atividade contra a mutação *gatekeeper* L1196M e em doentes com metástases do SNC; o X-396, cerca de dez vezes mais potente que o Crizotinib, desencadeou respostas em doentes resistentes e também em doentes sem toma prévia de Crizotinib.

Outras medidas foram tentadas perante o mesmo problema de resistência noutros tumores, nomeadamente no combate das resistências em CPNPC EGFR positivos sob

Erlotinib, como a utilização de dosagens alternativas dos TKi's, com otimização das mesmas (81), e a combinação dos TKis com quimioterapia (ainda em estudo) (62).

A par do aparecimento destes novos fármacos de segunda geração, a prática clínica depara-se com uma nova questão: quando parar a administração dos fármacos.

Uma das correntes afirma que se deve continuar o Crizotinib mesmo após a progressão da doença e até ao início de uma nova estratégia, uma vez que a sua interrupção poderá desencadear um fenómeno de “*disease flare*”: com desenvolvimento das linhagens tumorais que continuaram sensíveis ao inibidor apesar da existência de outras que se terão tornado resistentes (72,82).

Uma outra hipótese, que se tem mostrado viável em doentes selecionados, isto é, aplicável em casos de oligoprogressão (como metastização para o SNC), é a terapêutica ablativa local associada à manutenção do Crizotinib (figura 11) (83).

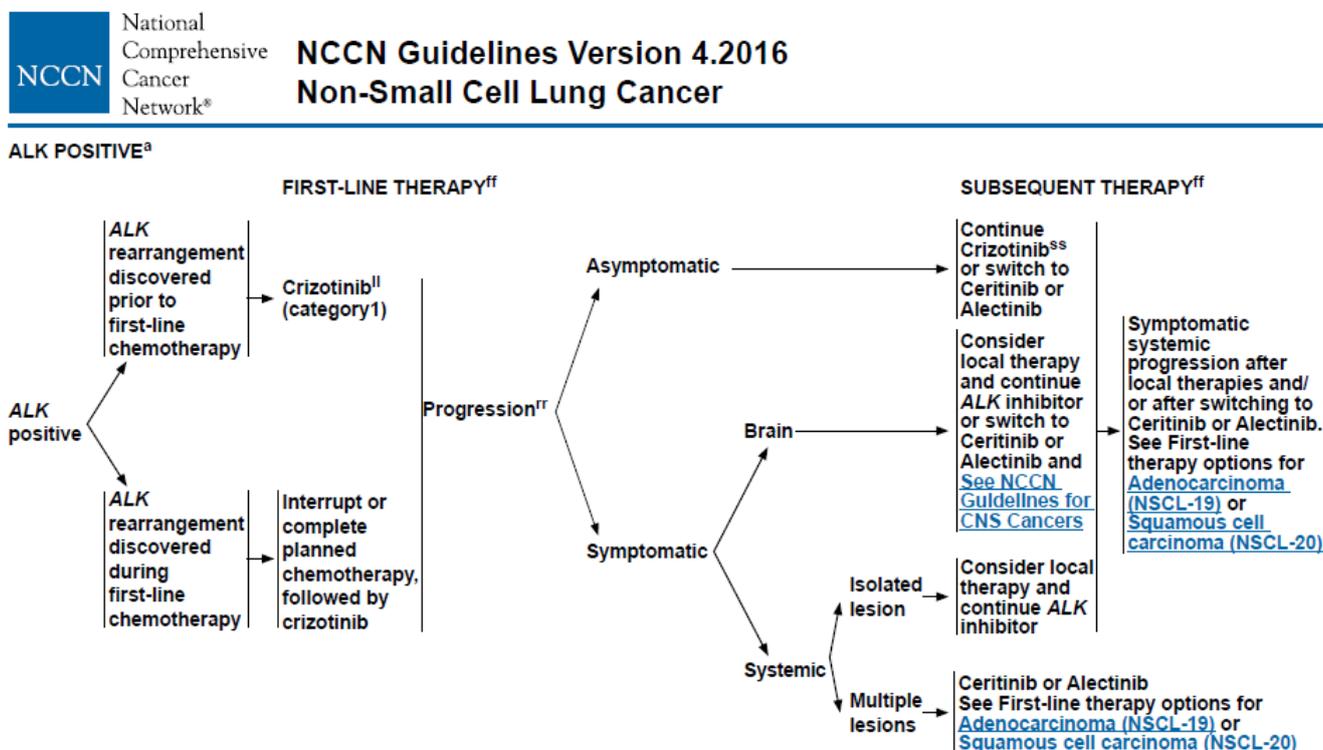


Fig.11- Algoritmo de tratamento de doentes com cnpnc ALK positivos proposto pela NCCN (*National Comprrehensive Cancer Network*), incluindo primeiras linhas terapêuticas e algumas opções após a progressão tumoral, iniciando ALK de 2ª geração, continuando Crizotinib ou recorrendo a terapias ablativas locais. Adaptado de (11).

7- Discussão e Conclusão

Para os doentes com adenocarcinoma do pulmão, o tratamento personalizado tornou-se uma realidade: é agora possível, mais do que no passado, tratar o doente e o seu tumor em particular, proporcionando melhor qualidade de vida e mais longa sobrevida. O sucesso começou a alcançar-se com a descoberta de elementos genéticos com papel chave na carcinogénese dos tumores do pulmão, de que é exemplo o rearranjo de ALK. Após este primeiro passo foram desenvolvidos fármacos dirigidos a estas mutações chave, nomeadamente às translocações do ALK. Primeiro surgiu o Crizotinib, aprovado de forma acelerada pela FDA pelos benefícios evidentes que apresentou logo em ensaios de fase I e II em doentes ALK positivos.

Perante estas evidências, identificou-se um novo subgrupo de tumores do pulmão, combinando características histológicas, genéticas e moleculares.

Para a seleção dos doentes candidatos à nova terapêutica, vários testes diagnósticos e algoritmos têm sido propostos, ponderando-se as vantagens e desvantagens de cada um bem como os limites de custo-benefício do seu emprego.

Porém este entusiasmo sofreu um revés, quando se começou a verificar a progressão da doença em pacientes sob tratamento com o inibidor de tirosina cinase, em média um ano após o início do tratamento. Esta progressão tem subjacentes mecanismos de resistência ao Crizotinib bastante complexos, que se tornaram o foco das investigações na área. Recomeçou então o ciclo: primeiro surge a necessidade de descobrir os mecanismos responsáveis pelo novo comportamento tumoral, que por sua vez, potencia a descoberta de estratégias terapêuticas dirigidas, a par da dúvida da combinação terapêutica mais adequada. No entanto, todo este processo é dificultado pelo carácter dinâmico do tumor e a concomitância de vias favorecedoras da sobrevivência tumoral. Muitas perguntas parecem persistir (como devemos

combinar os tratamentos de que dispomos? Quais os melhores timings para cada um? O futuro será o mapeamento tumoral? Como estudar os tumores de forma menos invasiva?), mas os esforços para encontrar as respostas permanecem. Estes esforços são alimentados pelo entusiasmo dos resultados surpreendentes a que temos vindo a assistir e pela vontade de dar um melhor prognóstico aos doentes com neoplasias do pulmão, a cada ano.

Todas estas descobertas, permitiram modificar a perspetiva terapêutica do cancro do pulmão. Inicialmente, aos doentes com CPNPC, oferecíamos medidas paliativas, depois esquemas de quimioterapia com aumento de sobrevida para alguns meses, e agora fármacos orais, menos tóxicos, específicos para cada tumor, permitindo um prognóstico consideravelmente melhor. Esta evolução para a aplicação real da medicina personalizada, marca o início de uma nova era, a qual, na passada década, julgávamos ser apenas um sonho.

ALK e o cancro do pulmão: o futuro é hoje?

8- Agradecimentos

Deixo expresso o meu agradecimento à Dra. Ana Figueiredo, Médica Pneumologista do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pelo entusiasmo que sempre me transmitiu sobre o tema, pela orientação e por toda a disponibilidade.

Agradeço ainda aos meus pais, pela sua contribuição na minha formação pessoal e académica, tendo-me facultado todos os meios necessários para alcançar mais esta etapa.

E por fim, a quem sempre acompanhou o processo de construção do artigo e me apoiou a cada desafio.

9- Referências

1. Hussain S. Lung Cancer and Personalized Medicine. 2016. Available from: <http://link.springer.com>.
2. Roviello G. The distinctive nature of adenocarcinoma of the lung. *Dove Press Journal: Onco Targets and Therapy*. 2015;2399–406.
3. Kazandjian D., Blumenthal G.M., Chen H-Y., He K., Patel M., Justice R, et al. FDA Approval Summary: Crizotinib for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangements. *The Oncologist*. 2014;19(10):e5–11.
4. Schiller J.H., Gandara D.R., Goss G.D., Vokes E.E. Non-small-cell lung cancer: then and now. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):981–3.
5. Pao W., Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):760–74.
6. Liao B-C, Lin C-C, Shih J-Y, Yang JC-H. Treating patients with ALK-positive non-small cell lung cancer: latest evidence and management strategy. *Ther Adv Med Oncol*. 2015;7(5):274–90.
7. Shaw AT, Solomon B, Mino-Kenudson M. Crizotinib and testing for ALK. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2011;9(12):1335–41.
8. Kwak E, Bang Y., Camidge R., Shaw A., Solomon B., Maki R., et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693–703.
9. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: A Children’s Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):472–80.
10. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385–94.
11. Ettinger D., Wood D., Arkeley W., Bazhenova L., Borghaei H. CD et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Non-Small Cell Lung Cancer. 2016. Available from: www.nccn.org/patients
12. Maione P, Sacco PC, Sgambato A, Casaluce F, Rossi a., Gridelli C. Overcoming resistance to targeted therapies in NSCLC: current approaches and clinical application. *Ther Adv Med Oncol*. 2015;7(5):263–73.

13. Meert a P, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte JJ, Mascaux C, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol*. 2002;20(4):975–81.
14. Paez JG, Jänne P a, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497–500.
15. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13306–11.
16. Ciardiello F., Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal*. 2008;
17. Mok T., Wu Y.,Thongprasert S. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxl in Pulmonary Adnocarcinoma. *New England Journal*. 2009;2209–20.
18. Shepherd F., Pereira J., Ciuleanu T., Tan E., Hirsh V., Thongprasert S. et al. Erlotinib in Previously Treated Nun-small-cell Lung Cancer. *New England Journal*. 2011;683–93.
19. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. Elsevier Ltd; 2011;12(8):735–42.
20. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. Elsevier Ltd; 2012;13(3):239–46.
21. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin’s lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281–4.
22. Hernández L, Pinyol M, Hernández S, Beà S, Pulford K, Rosenwald a, et al. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood*. 1999;94:3265–8.
23. Ma Z, Hill DA, Collins MH, Morris SW, Sumegi J, Zhou M, et al. Fusion of ALK to the Ran-binding protein 2 (RANBP2) gene in inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosom Cancer*. 2003;37(1):98–105.
24. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561–6.

25. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(1):11–23.
26. MacConaill LE. Advancing personalized cancer medicine in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(10):1210–6.
27. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer. *Cell*. 2007;131(6):1190–203.
28. Takeuchi K, Young LC, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry- based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(9):3143–9.
29. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19893–7.
30. Shaw AT, Engelman J. ALK in lung cancer: Past, present, and future. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):1105–11.
31. MANO H.. Review The EML4-ALK oncogene : targeting an essential growth driver in human cancer. *The Japan Academy*. 2015;91(5):193–201.
32. Horn L, Pao W. EML4-ALK: Honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4232–6.
33. Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, Peifer M, Sos ML, Koker M, et al. Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clin Cancer Res*. 2012;18(17):4682–90.
34. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 2009;22(4):508–15.
35. Kwak E., Bang Y., Camidge R. Shaw A., Solomon B., Maki R. et al., Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *New England Journal*. 2014;981–92.
36. Wong DWS, Leung ELH, So KKT, Tam IYS, Sihoe ADL, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*. 2009;115(8):1723–33.
37. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4247–53.
38. Zhao F, Xu M, Lei H, Zhou Z, Wang L, Li P, et al. Clinicopathological characteristics of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK fusion gene: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(2):1–13.

39. Yang P., Kulig K., Boland J, Erickson-Johnson M., Oliveira A., Wampfler J., et al. Worse disease free-survival in never smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2012; 7(1):90–7.
40. Camidge DR, Kono S a., Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2010;16(22):5581–90.
41. Zhang X, Zhang S, Yang X, Yang J, Zhou Q, Yin L, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer.* 2010;9:188.
42. Sledge GW. What Is Targeted Therapy? *J Clin Oncol.* 2005;23(8):1614–5.
43. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(12 Pt 1):3314–22.
44. Hylek EM, Hanna M, Al-khalidi HR, Ph D, Ansell J, Atar D, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non small cell lung cancer. 2014;981–92.
45. Camidge R., Bang Y., Kwak E., Iafrate J., Varella-Garcia M., Fox S., et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. 2014;13(10):1011–9.
46. Ou SHI. Crizotinib: A novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:471–85.
47. Hirsch F., Brambilla E., Tsao M. Candidates For ALK Testing. In: Tsao M., Hirsch F., Yatabe Y. (eds.) *IASLAC Atlas of ALK Testing In Lung Cancer.*, IASLAC Press. 2013 . p. 11-12.
48. Yatabe Y., Lantuéjoul S., Thunnissen E., Kerr K., Tsao M. Guidelines And Standardization Studies. In: Tsao M., Hirsch F., Yatabe Y. (eds.) *IASLAC Atlas of ALK Testing In Lung Cancer.*, IASLAC Press. 2013 . p. 61-62.
49. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):1167–76.
50. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol. International Association for the Study of Lung Cancer;* 2015;10(9):1240–2.

51. Lindeman N., Cagle P., Beasley M., Chitale D., Dacic S., Giaccone G., et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Patho. 2011;72(2):181–204.
52. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, Mehra R, Lafargue CJ, Moss BJ, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*. 2008;10(3):298–302.
53. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4275–83.
54. McLeer-Florin A, Lantuéjoul S. Why technical aspects rather than biology explain cellular heterogeneity in ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2012;4(3):240–1.
55. Yoshida A., Varella-Garcia M. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). In: Tsao M., Hirsch F., Yatabe Y. (eds.) *IASLAC Atlas of ALK Testing In Lung Cancer.*, IASLAC Press. 2013 . p. 17-28.
56. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, Ketterling RP, Olson SB, Quigley DI, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. *Genet Med*. 2011;13(7):667–75.
57. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1561–71.
58. Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer. A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2012;76(3):403–9.
59. Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, Wong K-K, Chirieac LR, Lindeman NI, et al. Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2013;8(3):322–8.
60. Lantuéjoul S., Varella-Garcia M., Thunnissen E., Yatabe Y. Comparison of Different Assay Platforms for ALK Testing. In: Tsao M., Hirsch F., Yatabe Y. (eds.) *IASLAC Atlas of ALK Testing In Lung Cancer.*, IASLAC Press. 2013 . p. 44-52.
61. Peled N., Palmer G., Hirsch F., Wynes M., Ilouze M., Varella-Garcia M., et al. Next Generation Sequencing Identifies and Immunohistochemistry Confirms a Novel Crizotinib Sensitive ALK Rearrangement in a Patient with Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. 2013;7(9):1–5.
62. Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3987–96.

63. Doebele R, Pilling A, Aisner D., Kutateladze T., Le A., Weickhardt A., et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged NON-Small Cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1472–82.
64. Larson R a., Druker BJ, Guilhot F, O’Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: A subanalysis of the IRIS study. *Blood.* 2008;111(8):4022–8.
65. Sasaki T, Okuda K, Zheng W, Butrynski J, Wang L, Gray NS, et al. The neuroblastoma associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK translocated cancers. 2011;70(24):10038–43.
66. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. October. 2010;16–21.
67. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK- Rearranged Lung Cancers. 2012;4(120):1–25.
68. Boland JM, Jang JS, Li J, Lee AM, Wampfler J a, Erickson-Johnson MR, et al. MET and EGFR mutations identified in ALK-rearranged pulmonary adenocarcinoma: molecular analysis of 25 ALK-positive cases. *J Thorac Oncol.* 2013;8(5):574–81.
69. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Zheng W, Lathan C, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. 2012;71(18):6051–60.
70. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, Vernovsky K, Kuhlmann G, Boisvert SL, et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: A clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med.* 2010;2(5):146–58.
71. Zakowski MF. EGFR Mutations in Small-Cell Lung Cancers. *N Engl J Med.* 2006;213–5.
72. Pop O, Pirvu A, Toffart A-C, Moro-Sibilot D. Disease Flare After Treatment Discontinuation in a Patient With EML4-ALK Lung Cancer and Acquired Resistance to Crizotinib. *J Thorac Oncol. International Association for the Study of Lung Cancer;* 2012;7(8):e1–2.
73. Peppercorn J. Toward improved understanding of the ethical and clinical issues surrounding mandatory research biopsies. *J Clin Oncol.* 2013;31(1):1–2.
74. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME, et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol.* 2013;31(1):17–22.
75. El-Osta H, Shackelford R. Personalized treatment options for ALK-positive metastatic non-small-cell lung cancer: Potential role for ceritinib. *Pharmgenomics Pers Med.* 2015;8:145–54.

76. Shaw AT, Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, et al. Ceritinib in ALK -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014;370(13):1189–97.
77. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L, et al. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* The Authors; 2015;3:54–66.
78. Luc Friboulet, Nanxin Li, Ryohei Katayama, Christian C. Lee, Justin F. Gainor, Adam S. Crystal, Pierre-Yves Michellys, Mark M. Awad, Noriko Yanagitani, Sungjoon Kim, AnneMarie C. Pferdekamper, Jie Li, Shailaja Kasibhatla and JA, Engelman. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. 2011;72(2):181–204.
79. Doebele RC, Garon E, Gerber DE, Goldberg SB, Shaw AT, Simon GR, et al. Molecularly Targeted Therapies in Non – Small-Cell Lung Cancer Annual Update 2014. 2015. 1-63 p.
80. Awad MM, Shaw AT. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: Crizotinib and beyond. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2014;12(7):429–39.
81. Chmielecki J., Foo J., Oxnard G., Hutchinson K., Ohashi K., Somwar R., et al. Optimization of Dosing for EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer with Evolutionary Cancer Modeling. 2012;3(90).
82. Chaft JE, Oxnard GR, Sima CS, Kris MG, Miller V a., Riely GJ. Disease flare after tyrosine kinase inhibitor discontinuation in patients with EGFR-mutant lung cancer and acquired resistance to erlotinib or gefitinib: Implications for clinical trial design. *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6298–303.
83. Weickhardt AJ, Dmedsc M, Scheier B, Burke JM, Gan G, Lu X, et al. Local ablative therapy of oligoprogressive disease prolongs disease control by tyrosine kinase inhibitors in oncogene addicted non-small cell lung cancer. 2013;7(12):1807–14.
84. Roberts PJ. Clinical use of crizotinib for the treatment of non-small cell lung cancer. *Biologics.* 2013;7:91–101.
85. Boolell V, Alamgeer M, Watkins D, Ganju V. The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1815–46.
86. Rolfo C, Passiglia F, Castiglia M, Raez LE, Germonpre P, Zwaenepoel K, et al. ALK and crizotinib : after the honeymoon ... what else ? Resistance mechanisms and new therapies to overcome it. 2014;3(4):250–61.
87. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2167–77.
88. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini P-L. 2011: the Immune Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2011;60(3):319–26.

ALK e Cancro do Pulmão: o futuro é hoje?

Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra