

# **TEZA DE DOCTORAT (REZUMAT)**

**PROFIL GENOMIC AL CANCERULUI BRONHOPULMONAR  
PRIMITIV CU CELULE NON-MICI SI INVAZIE DE GANGLIONI  
MEDIASTINALI**

**CONDUCATOR STIINTIFIC:  
Prof. univ. dr. TEODOR HORVAT**

**DOCTORAND:  
GRIGOROIU V. MADALINA LIDIA**

**Bucuresti  
2017**

**A. PARTEA GENERALĂ**

1. Introducere, motivatia alegerii temei si importanta problematicii abordate .....	2
2. Cancerul pulmonar: epidemiologie, tipuri anatomopatologice, caracteristici genetice si moleculare, prognostic, tratament.....	4
2.1. Epidemiologie.....	4
2.2. Tipuri anatomopatologice.....	5
2.3. Caracteristici genetice si moleculare.....	6
2.4. Prognosticul cancerului pulmonar.....	7
2.5. Tratament .....	8

**B. PARTEA SPECIALĂ****3. PROFIL GENOMIC AL CANCERELOR BRONHO-PULMONARE PRIMITIVE CU CELULE NON-MICI ȘI INVAZIE DE GANGLIONI MEDIASTINALI**

3.1. Obiective .....	10
3.2. Metode .....	10
3.3. Strategie .....	10
3.4. Etapele proiectului .....	11
3.4.1. Generarea materialului biologic preterapeutic .....	11
3.4.1.a. Selectarea și introducerea în studiu a pacienților .....	12
3.4.1.b. Înregistrarea și anonimizarea pacienților .....	13
3.4.1.c. Recoltarea eșantioanelor biologice .....	13
3.4.1.d. Crio-conservarea și transportul eșantioanelor .....	14
3.4.1.e. Reevaluare a pacienților după chimioterapia neoadjuvantă .....	14
3.4.2. Definirea loturilor de prognostic .....	15
3.4.3. Analiza microarray și validarea rezultatelor .....	16
3.4.4. Analiza bioinformatică .....	17
3.4.5. Secvențierea întregului exom tumoral .....	18
3.5. Parteneri .....	19
3.6. Rezultate .....	20
3.6.1. Pacienți incluși în studiu .....	20
3.6.2. Chimioterapia neoadjuvantă .....	20
3.6.3. Chirurgie .....	21
3.6.4. Răspuns histopatologic .....	21
3.6.5. Clasificarea în loturi prognostice .....	21
3.6.6. Profile de expresie microarray și căi de semnalizare .....	22
3.6.6.1. Experimentele microarray și analiza bioinformatică .....	22
3.6.6.1.a. Analiza diferențială a expresiei între țesutul normal și tumoral .....	22
3.6.6.1.b. Analiza diferențială a expresiei <i>responders versus non-responders</i> ....	23
3.6.6.2. Analiza căilor de semnalizare .....	25
3.6.7. Secvențierea exomului ( <i>Whole exome sequencing</i> ) .....	26
3.7. Concluzii .....	28
3.8. Bibliografie .....	31

## A. PARTEA GENERALĂ

### 1. Introducere, motivatia alegerii temei si importanta problematicii abordate

Cancerul pulmonar este o problemă majoră de sănătate în România și în lume. Este un cancer cu incidența crescută și mortalitate ridicată, în ciuda progreselor constante în tehnicile de diagnostic imagistic și a tratamentelor medico-chirurgicale. Cancerul pulmonar este principala cauza de deces prin cancer în lume reprezentând aproximativ 1,2 milioane de decese în fiecare an [1]. Supraviețuirea la 5 ani a tuturor stadiilor este în jur de 16% [1].

Chimioterapia citotoxică standard oferă doar un beneficiu de supraviețuire limitat. Dezvoltarea de terapii specifice este cea mai mare promisiune pentru tratarea cu succes a acestei boli. Secvențierea exomului unui număr mare de probe tumorale de cancer pulmonar a oferit o primă imagine a profilului mutațiilor somatice a acestor tumori. Este de așteptat ca secvențierea viitoare a întregului exom și a întregului genom al cancerului pulmonar să dezvăluie un peisaj mai detaliat al mutațiilor somatice care pot fi exploatate în scopuri terapeutice.

Rata de supraviețuire foarte redusă a cancerului pulmonar reflectă insuficiența chimioterapiei citotoxice tradiționale. Mutațiile somatice care activează oncogene duc frecvent la dependența celulelor tumorale de produsele oncogenice modificate [2,3] o proprietate exploatată de terapia țintită. Prin urmare, identificarea leziunilor oncogenice recurente de care depinde supraviețuirea celulei tumorale ar putea duce la noi terapii ale cancerului pulmonar.

Pacienții cu cancer pulmonar cu celule non-mici (CPCNM) în stadiul IIIA (invazia ganglionilor mediastinali – N2+) reprezintă un grup heterogen de pacienți: Ruckdeschel [4], împarte acești pacienți în trei grupe: ganglioni N2 cu invazie minimă sau microscopică, descoperiți întâmplător în timpul sau după intervenția chirurgicală; pacienți cu N2+ diagnosticați pre-operator, imagistic sau chirurgical; și pacienții cu N2+ masiv, din mai multe stații ganglionare. În ultimii 20 de ani, au fost propuse mai multe strategii de tratament diferite pentru a trata pacienții cu CPCNM în stadiul IIIA [5].

Mai multe studii clinice de faza II și III au demonstrat fezabilitatea clinică și îmbunătățirea supraviețuirii prin administrarea chimioterapiei neoadjuvante [6-14]. În cele mai multe dintre aceste studii, sterilizarea ganglionilor mediastinali (downstaging) și rezecția chirurgicală completă sunt predictorii ai supraviețuirii pe termen lung [8, 9].

În cazul unui cancer bronho-pulmonar cu celule non-mici cu invadarea ganglionilor mediastinali (N2+), atitudinea terapeutică acceptată în prezent este cea a unui abord multimodal ce constă din chimioterapie neoadjuvantă pe baza de săruri de platină, urmată de rezecție chirurgicală completă pentru pacienții care au răspuns sau au fost stabiliți de chimioterapie. După chimioterapia neoadjuvantă, aproximativ 5% din pacienți vor avea un răspuns complet. Majoritatea pacienților vor avea un răspuns parțial (mai mult de 50% reducere tumorală), dar numărul pacienților care vor fi doar stabiliți sau vor avea un răspuns minor, rămâne foarte important (aproximativ 40%). Supraviețuirea globală la 5 ani a pacienților cu cancer bronho-pulmonar cu celule non-mici cu invadarea ganglionilor mediastinali (N2) este de 20-25%, însă analiza de subgrup arată că supraviețuirea la 5 ani a celor care au răspuns la chimioterapie este de 42%, versus 10% la cei care nu au răspuns la chimioterapie (15).

Este prin urmare evident că pentru aproximativ 40% dintre pacienții în stadiul IIIA tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă nu aduce niciun beneficiu, în schimb expune pacientul riscului efectelor adverse și al diferitelor complicații dintre care unele majore. În plus, aceste tratamente sunt în general foarte costisitoare.

Studiul de față are ca obiectiv determinarea unei semnături genice cu valoare de prognostic, care să permită definirea acestui grup de pacienți înainte de orice tratament.

Studiul este multicentric și datele clinico-patologice și moleculare sunt prospective începând cu ianuarie 2011 și până în decembrie 2012.

Această lucrare a fost totodată ocazia realizării unei treceri în revista a stadiului cunoștințelor actuale de biologie moleculară cu privire la cancerul pulmonar cu celule non-mici, precum și a stadiului dezvoltării tehnicilor de studiu în biologia moleculară.

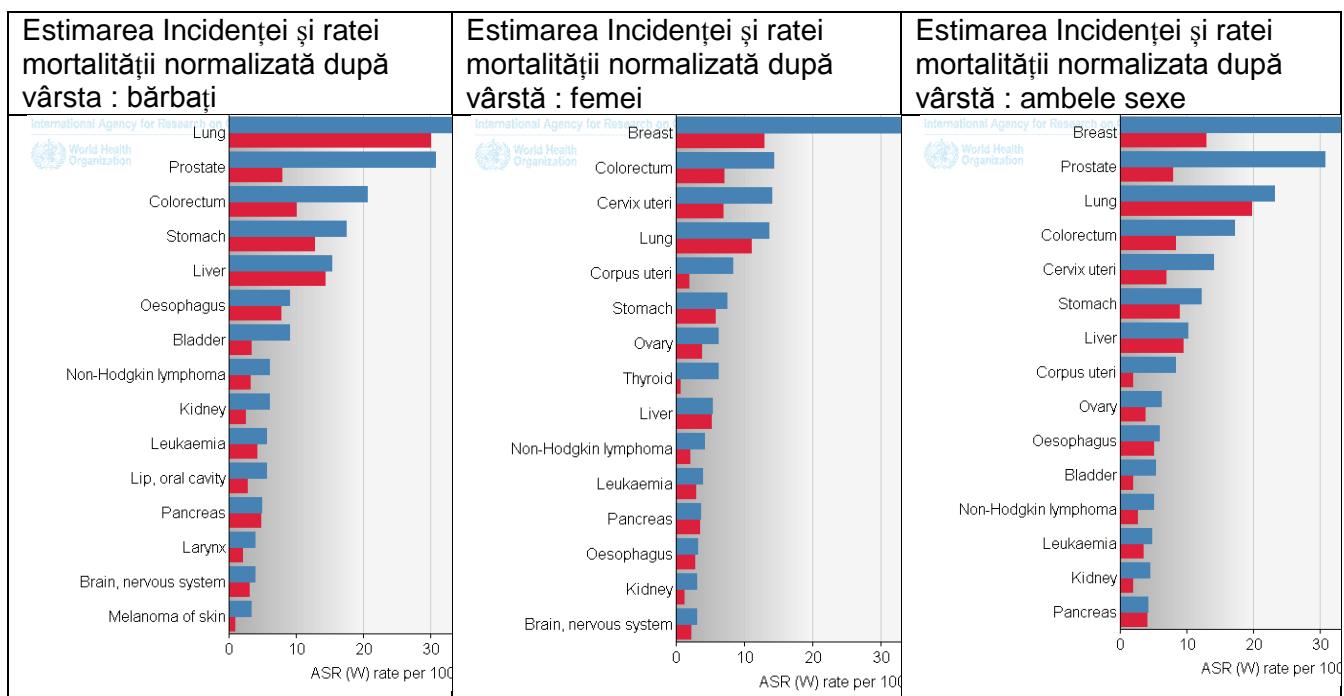
Rezultatele au făcut obiectul mai multor prezentări orale și prin postere, precum și publicarea unor lucrări în reviste de specialitate. În fine, un brevet de invenție cu titlul „Mutații Genice Ca Semnături Prognostice În Cancerul Pulmonar Cu Celule Non-Mici La Pacienții Cu Răspuns Vs. Fără Răspuns La Chimioterapie” a fost depus în mai 2014.

## 2. Cancerul pulmonar: epidemiologie, tipuri anatomopatologice, caracteristici genetice si moleculare, prognostic, tratament

### 2.1. Epidemiologie

În 2012 au fost diagnosticate 1,8 milioane de cazuri noi (12,9% din totalul cancerelor) (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>).

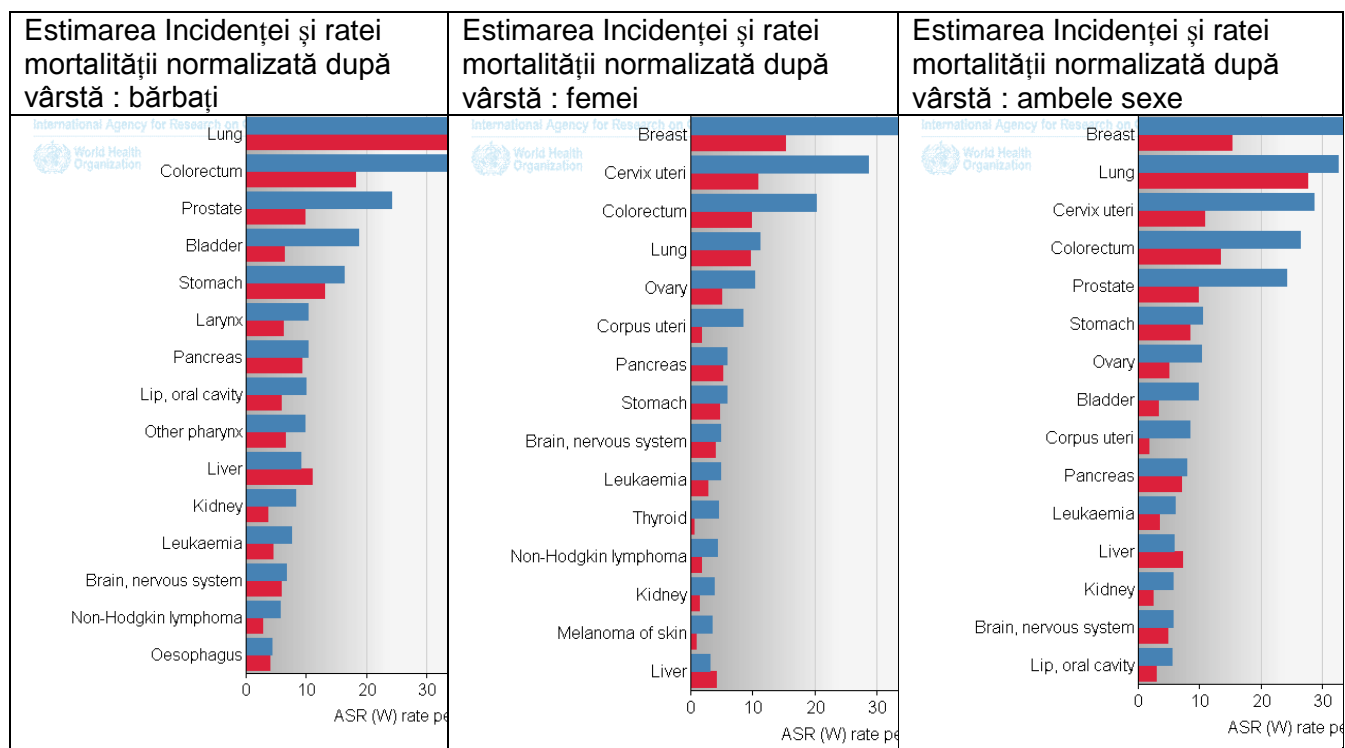
Cifrele mortalității, foarte apropiate de cele ale incidenței, îl plasează ca primă cauză de deces prin cancer la bărbați și pe locul trei la ambele sexe (Figura 1).



**Figura 1: Incidența, Mortalitatea și Prevalența la 5 ani a cancerului pulmonar în lume, în funcție de sex (GLOBOCAN 2012, IARC).**

În România, peste 70% dintre bolnavii de cancer pulmonar sunt diagnosticați în stadii avansate, iar 90% dintre aceștia nu supraviețuiesc mai mult de un an de la diagnostic. Cancerul bronhopulmonar se situează pe locul II după cel de prostată la bărbați și cel de sân la femei, însă ca mortalitate ocupă primul loc la ambele sexe (Figura 2). Unul din trei decese prin cancer în rândul bărbaților și unul din patru decese prin cancer în rândul femeilor sunt cauzate de cancerul pulmonar. Între 1960 și 1990, decesele prin cancer pulmonar în rândul femeilor au

crescut cu aproximativ 40%. Anual, mai mult de 330.000 de români sunt diagnosticați ca având cancer pulmonar și mai mult de 300.000 decedează din cauza acestei boli.



**Figura 2: Incidența, Mortalitatea și Prevalența la 5 ani a cancerului pulmonar în România, în funcție de sex (GLOBOCAN 2012, IARC).**

## 2.2. Tipuri anatomopatologice

Marea majoritate a cancerelor bronșice sunt carcinoame – proliferări maligne ale celulelor epiteliale.

Din punct de vedere histologic există două mari categorii de carcinoame pulmonare: carcinoame cu celule non mici ce reprezintă aproximativ 80% din cancerele pulmonare primitive și carcinoame cu celule mici ce reprezintă aproximativ 17% din cancerele pulmonare primitive (16).

Alte tipuri de cancer pulmonar primitiv sunt: tumori carcinoide 0,8% (17), sarcoame 0,1% și cancer necaracterizate 1,9% (18).

Carcinoamele cu celule non mici au un prognostic și tratament similar. În această categorie există trei subtipuri: carcinomul epidermoid 31,2% (16), derivate din țesutul pulmonar,

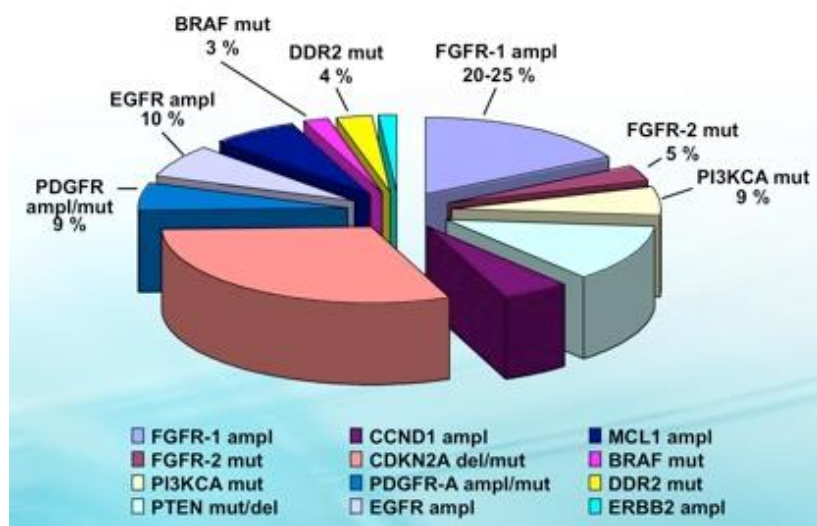
adenocarcinomul cu subtipurile papilar, solid, acinar și lepidic, 29,4% (16), derivate din glandele bronșice și carcinomul pulmonar cu celule mari.

### 2.3. Caracteristici genetice si moleculare

Ca și alte tipuri de cancer, cancerul de plămân este provocat prin activarea oncogenelor sau prin inactivarea genelor supresoare de tumori (19).

Analiza genomică detaliată a cancerelor pulmonare și progresele tehnologice au permis punerea în evidență numeroase alterări moleculare și căi de activare a mecanismului oncogenic.

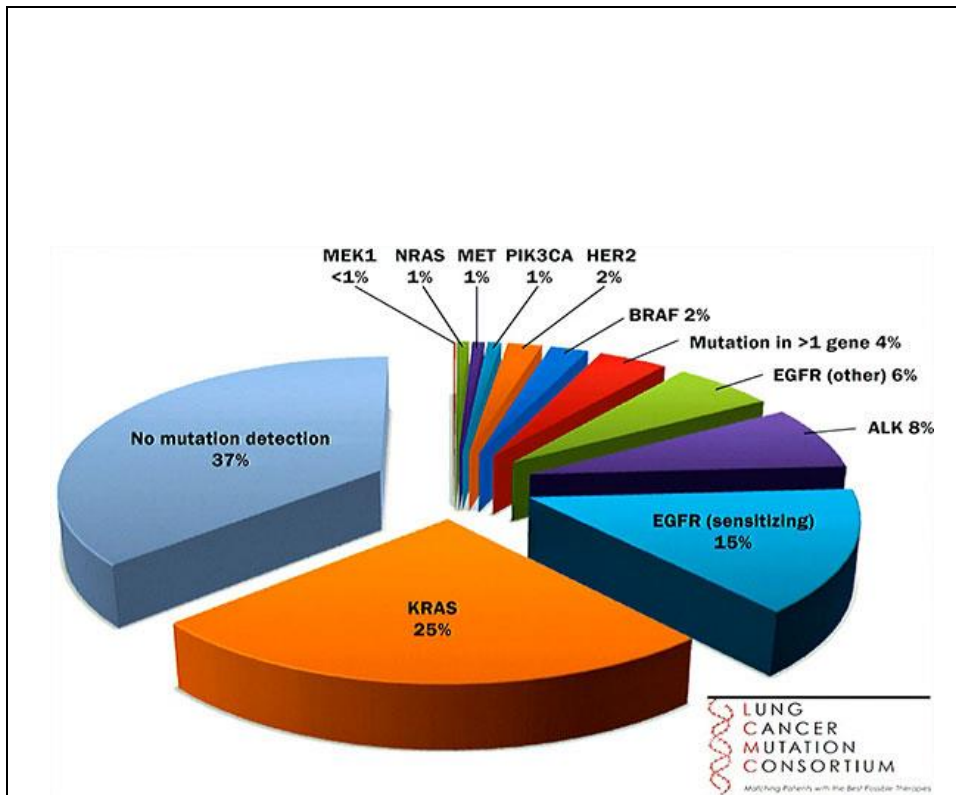
În prezent, 63% din cancerelor pulmonare epidermoide prezintă alterări moleculare ce ar putea deveni o țintă terapeutică (Figura 3).



*Ampl: amplificare; del: deleție; mut: mutație*

**Figura 3. Anomaliile moleculare ale cancerelor pulmonare epidermoide.**

Analiza mutațiilor moleculare în adenocarcinomul pulmonar a identificat 26 de gene mutate în mod semnificativ, dintre care unele cum ar fi *KRAS*, *TP53*, *STK11*, *EGFR*, și *CDKN2A*, sunt deja cunoscute ca fiind implicate în cancerul pulmonar (Figura 4).



**Figura 4. Prevalența mutațiilor în Adenocarcinomul pulmonar după Lung Cancer Mutation Consortium (<http://www.golcmc.com>).**

Modificări somatice ale 7 oncogene în cancerul pulmonar [20]: KRAS, EGFR, ALK, ERBB2, BRAF, HER2 și ROS1 se exclud reciproc. Cinci dintre aceste gene (KRAS, EGFR, ALK, ERBB2, BRAF) sunt regăsite în mai mult de 50% din adenocarcinoamele pulmonare. De fapt, pacienții cu mutații în aceste cinci gene pot reprezenta până la 90% dintre pacienții asiatici care nu au fumat niciodată [21]. Prin urmare, posibilitatea de a inhiba terapeutic funcțiile acestor gene modificate ar reprezenta un progres semnificativ în lupta împotriva cancerului pulmonar.

#### **2.4. Prognosticul cancerului pulmonar**

Cancerul pulmonar are un prognostic prost în general. În ciuda ameliorărilor în plan diagnostic și terapeutic din ultimii ani, nu s-a putut realiza nici o ameliorare notabilă a supraviețuirii de-a lungul timpului.

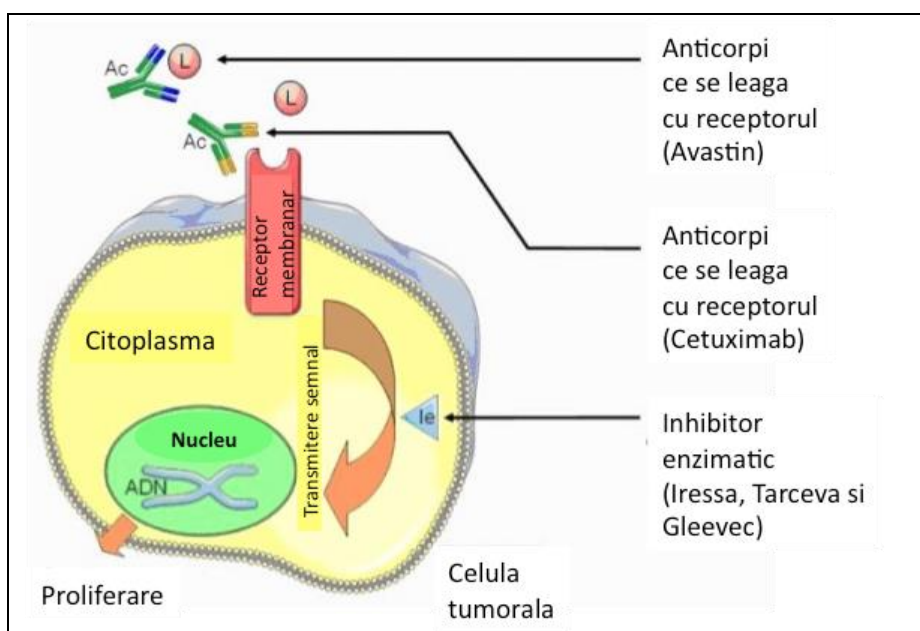
În lume, cancerul pulmonar reprezintă cea mai frecventă cauză de deces prin cancer. Numărul deceselor prin cancer pulmonar în lume este estimat la aproximativ 1 din 5 (1,59 milioane de decese, 19,4% din decesele prin cancer).

## 2.5. Tratament

Alegerea tratamentului se face după luarea în considerare a mai multor factori:

- cancerul: tip, formă, stadiu
- vârsta pacientului
- starea generală exprimată prin scorul de performanță și/sau indicele Karnovsky
- maladiile asociate ale pacientului și tratamentele în curs

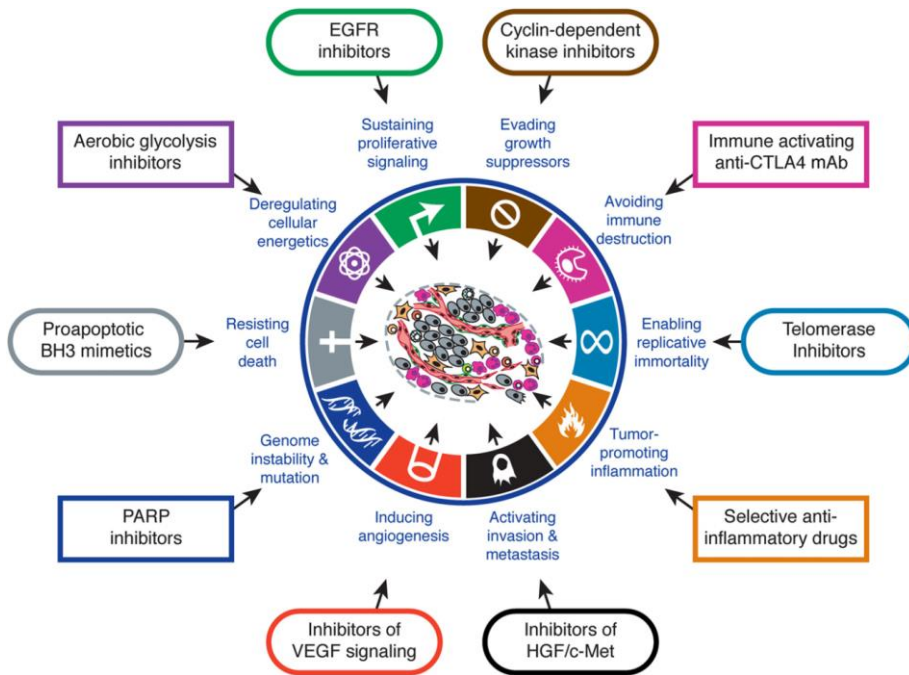
Mijloacele terapeutice sunt reprezentate de tratamentul chirurgical, chimioterapie, radioterapie și bioterapii țintite. În mod uzual, strategia terapeutică se stabilește în funcție de stadiu. La ora actuală, bioterapiile țintite sunt rezervate stadiilor avansate (Figura 5).



**Figura 5. Bioterapii țintite disponibile pentru tratamentul cancerului pulmonar.**

Bioterapiile țintite sunt medicamente ce blochează mecanismele de creștere proprii celulei canceroase. Cele mai utilizate tratamente țintite utilizate în prezent pentru tratarea cancerului pulmonar sunt: Erlotinib (Tarceva®), Bevacizumab (Avastin®), Gefitinib (Iressa®), Afatinib (Giotrif®), Osimeritinib (Tagrisso®).

Progresul remarcabil realizat în decriptarea mecanismelor de carcinogeneză în ultimele trei decade, au permis dezvoltarea mai multor tipuri de molecule terapeutice ce țintesc în mod specific unul dintre aceste mecanisme. Câteva dintre ele sunt reprezentate în figura 6 (22).



**Figura 6: Tratamente ce țintesc mecanisme moleculare specifice în cancerul pulmonar.**

## **B. PARTEA SPECIALA**

### **3. PROFIL GENOMIC AL CANCERELOR BRONHO-PULMONARE PRIMITIVE CU CELULE NON-MICI ȘI INVAZIE DE GANGLIONI MEDIASTINALI**

#### **3.1. Obiective**

1. Determinarea profilului genic corelat cu un prognostic favorabil în cancerule bronho-pulmonare cu celule non-mici și invazia ganglionilor mediastinali
2. Determinarea unui profil genic favorabil chimioterapei neoadjuvante
3. Recoltarea și conservarea în banca de tumori a probelor de sânge și de urină de la pacienții incluși, pentru analize ulterioare de proteomică și definire de biomarkeri

#### **3.2. Metode**

Am prelevat chirurgical (mediastinoscopie sau videotoracoscopie) eșantioane de ganglioni mediastinali tumorali de la pacienți cu cancer pulmonar cu celule non-mici în stadiul IIIA N2+ înainte de tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă. Pacienții au fost apoi tratați prin chimioterapie (biterapie bazată pe săruri de platină). O primă evaluare a răspunsului la chimioterapie s-a făcut după două cicluri și pacienții care au evoluat sub tratament nu au fost tratați chirurgical. O a doua evaluare a răspunsului la chimioterapie a fost făcută pe piesa de rezecție chirurgicală. Cu pacienții care au avut un răspuns complet la chimioterapie (lipsa de țesut tumoral rezidual în tumoră și ganglioni) și pacienții la care ganglionii mediastinali nu mai prezentau țesut tumoral rezidual (downstage) s-a constituit Lotul B, al pacienților cu prognostic favorabil. Pacienții care mai prezentau țesut tumoral rezidual în cel puțin o stație ganglionară mediastinală pe piesa operatorie, împreună cu pacienții care nu au fost operați, au constituit Lotul A, al pacienților cu prognostic nefavorabil.

#### **3.3. Strategie**

Două tipuri de analize de genom au fost realizate pe eșantioanele de țesut ganglionar tumoral prelevat din ganglionii mediastinali înainte de tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă: *hibridizare prin microarrays* și secvențierea exomului total (*Whole Exome Sequencing*).

### 3.4. Etapele proiectului:

1. Generarea materialului biologic preterapeutic pentru investigația genomică și activități specifice băncii de țesuturi și organe
2. Definirea loturilor de prognostic.
3. Analiza microarray și validarea rezultatelor
4. Analiza bioinformatică
5. Secvențierea exomului tumoral

Figura 7 rezumă etapele proiectului.

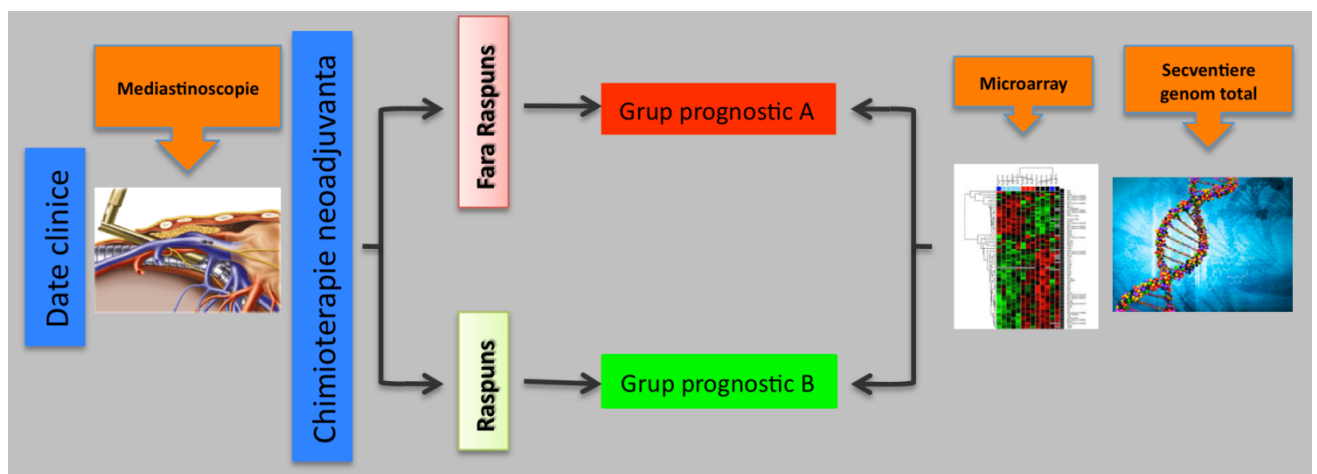


Figura 7. Etapele proiectului

#### 3.4.1 Generarea materialului biologic preterapeutic

În aceasta etapa s-a realizat:

- a. Selectarea și introducerea în studiu a pacienților: criterii de includere, criterii de excludere, obținerea consimțământului
- b. Înregistrare a datelor civile și clinice pentru fiecare pacient
- c. Anonimizare a pacienților după introducerea în studiu
- d. Recoltarea materialului biologic prin mediastinoscopie sau videotoracoscopie și confirmare a invaziei ganglionilor mediastinali. S-au inclus definitiv în studiu eșantioane tisulare cu un conținut de țesut tumoral superior la 70%.

- e. Crio-conservarea în nitrogen lichid la  $-196^{\circ}\text{C}$  a materialului biologic destinat analizei genomice și transportul esanțioanelor
- f. Reevaluare a pacienților după chimioterapia neoadjuvantă

Toate probele de țesut și datele clinice relevante au fost obținute prospectiv de la departamentele de chirurgie toracică de la Spitalul Hotel Dieu din Paris afiliat la Facultatea de Medicină Paris 5 Rene Descartes și de la Spitalul Allgemeines Krankenhaus Universitätskliniken din Viena în perioada ianuarie 2011 - decembrie 2012. Materialul biologic recoltat a fost stocat în biobănci în congelare

#### **3.4.1.a. Selectarea și introducerea în studiu a pacienților**

##### **Criterii de includere:**

- pacient > 18 ani
- semnarea consimțământului
- tumora pulmonară confirmată prin examinare computer tomografică și/sau fibroscopie bronșică
- adenopatie mediastinală confirmată prin CT și/sau TEP
- bilanț negativ de extindere la distanță confirmat prin examinare CT a suprarenalelor, examinare CT sau/și RMN cerebrală, examinare TEP
- histologie de CPCNM confirmat prin fibroscopie bronșică, puncție-biopsie sub control CT și/sau mediastinoscopie/toracoscopie.

##### **Criterii de non-includere**

- refuzul pacientului
- pacient > 18 ani dar incapabil de discernământ, chiar dacă această incapacitate este temporară
- chimioterapie pentru un alt cancer în anul ce precede diagnosticul CPCNM

##### **Criterii de excludere**

- la cererea pacientului, după semnarea consimțământului
- ganglioni mediastinali negativi la examenul histologic extemporaneu efectuat în timpul mediastinoscopiei

- mai puțin de 70% țesut tumoral în eșantioanele de ganglioni mediastinali prelevate prin mediastinoscopie
- anularea intervenției chirurgicale la pacienții care au răspuns la chimioterapia neoadjuvantă
- cancer pulmonar secundar la examinarea histopatologica definitivă

### **Consimțământul pacienților**

În cadrul cercetării biomedicale, pacientul și-a exprimat liber consimțământul de a participa la studiu, după ce a fost pe deplin informat de către medical investigator, în cadrul unei consultații unde a avut ocazia să pună toate întrebările pe care le-a considerat necesare și după ce a avut un timp de gândire.

#### **3.4.1.b. Înregistrarea și anonimizarea pacienților**

Pacienții eligibili și care au semnat consimțământul, au fost înregistrați în studiul GPN2 folosind un soft de anonimizare. Fiecărui pacient îi este atribuit un număr de cod propriu. Fiecare centru de includere a fost responsabil de confidențialitatea acestor informații.

#### **3.4.1.c. Recoltarea eșantioanelor biologice**

Mai multe tipuri de eșantioane biologice au fost prelevate:

- aproximativ 10 ml de urină în dimineața intervenției de mediastinoscopie sau videothoracoscopie
- 18 ml de sânge periferic pe masa de operație înainte de mediastinoscopie sau videothoracoscopie
- ganglioni mediastinali tumorali și non-tumorali prin mediastinoscopie sau videothoracoscopie
- la pacienții care au răspuns la chimioterapia neoadjuvantă și au beneficiat de rezecție pulmonară, s-a prelevat țesut tumoral și non-tumoral din tumora primitivă și ganglionii mediastinali precum și țesut pulmonar la distanță de tumora pulmonară

Cu ocazia **rezecției pulmonare** pentru pacienții eligibili în urma tratamentului prin chimioterapie adjuvantă, s-au prelevat esantioane tisulare din tesuturile ganglionare tumorale si non-tumorale, din tumora si din tesut pulmonar normal.

#### 3.4.1.d. Crio-conservarea și transportul eșantioanelor

Toate eșantioanele biologice destinate studiului GPN2 au fost cântărite, etichetate, conservate în azot lichid la -80°C și transportate periodic din centrele de recoltare către Laboratorul de Genom al Institutului Clinic Fundeni. Transportul s-a efectuat cu avionul, eșantioanele fiind menținute în gheață carbonică pe toată perioada transportului.

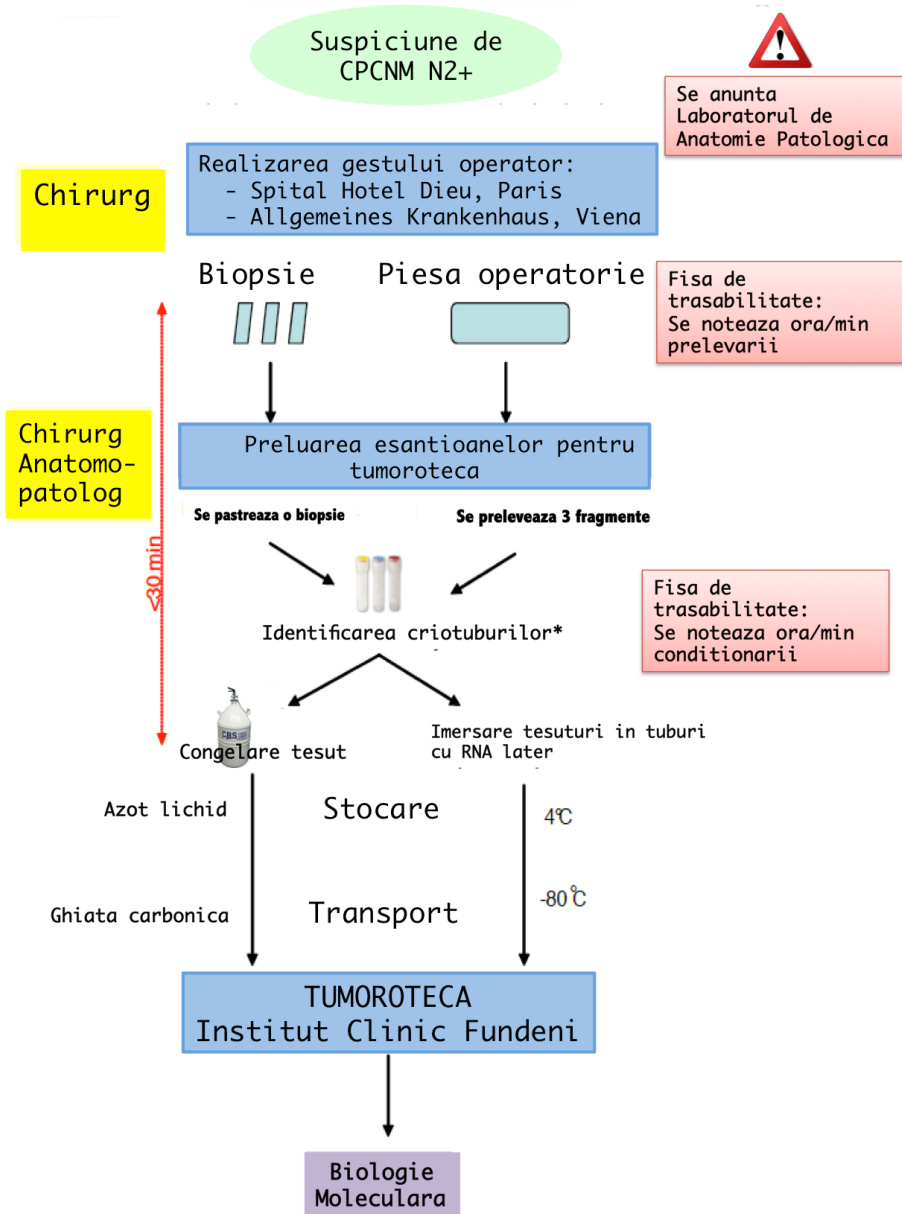
În [figura 8](#) sunt redată etapele parcurse de eșantioanele biologice de la suspiciunea diagnostică de CPCNM și invazie de ganglioni mediastinali și până la constituirea tumorotecii.

#### 3.4.1.e. Reevaluare a pacienților după chimioterapia neoadjuvantă

Evaluarea răspunsului la tratamentul prin chimioterapie s-a făcut după criteriile OMS de reevaluare după tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă ([Tabel 1](#)):

<i>Modificarea sumei produșilor diametrelor</i>	
<i>Răspuns Complet (RC)</i>	<i>Dispariția leziunilor la 4 săptămâni de la încheierea chimioterapiei</i>
<i>Răspuns Parțial (RP)</i>	<i>Diminuarea cu cel puțin 50% a leziunilor la 4 săptămâni de la încheierea chimioterapiei</i>
<i>Maladie Stabilizată</i>	<i>Lipsa de răspuns (RC sau RP) Lipsa de progresiune</i>
<i>Progresarea Maladiei</i>	<i>Creșterea cu cel puțin 25% a sumei produșilor diametrelor leziunilor față de momentul reducerii maxime sau apariția de noi leziuni</i>

**Tabel 1. Criteriile OMS de definire a răspunsului la chimioterapia neoadjuvantă în tratamentul cancerului bronho-pulmonar cu celule non-mici.**



\*Pacient: GPN2 - initialele institutiei in care s-a facut prelevarea - initialele numelui si prenumelui pacientului - numarul ordinii de includere

**Figura 8. Traseul eşantioanelor biologice.**

### 3.4.2. Definirea loturilor de prognostic

O a doua evaluare a răspunsului la chimioterapie a fost făcută pe piesa de rezecție chirurgicală. Cu pacienții care au avut un răspuns complet la chimioterapie (lipsa de țesut tumoral rezidual în tumoră și ganglioni) și pacienții la care ganglionii mediastinali nu mai prezentau țesut tumoral rezidual (downstage) s-a constituit Lotul B, al pacienților cu prognostic favorabil. Pacienții care mai prezentau țesut tumoral rezidual în cel puțin o stație ganglionară mediastinală pe piesa operatorie, împreună cu pacienții care nu au fost operați, au constituit

Lotul A, al pacienților cu prognostic nefavorabil.

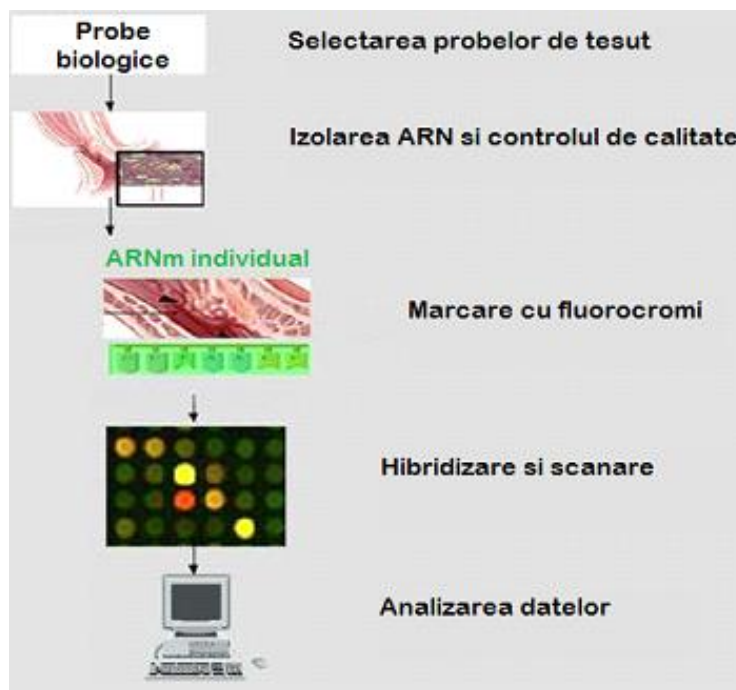
### 3.4.3. Analiza microarray și validarea rezultatelor

Pentru analiza microarray s-a utilizat tehnologia Agilent One-Color Microarray- Based Gene Expression Analysis, versiunea 5.5 / februarie 2007 (figura 9). Au fost folosite lamele microarray slides Whole Human Genome Oligo Microarray with SurePrint Technology 4 x 44 K.

Acest protocol oferă posibilitatea comparării ulterioare a materialului genic studiat și mai ales a realizării unor comparații de subgrup, rezultate din analiza inițială.

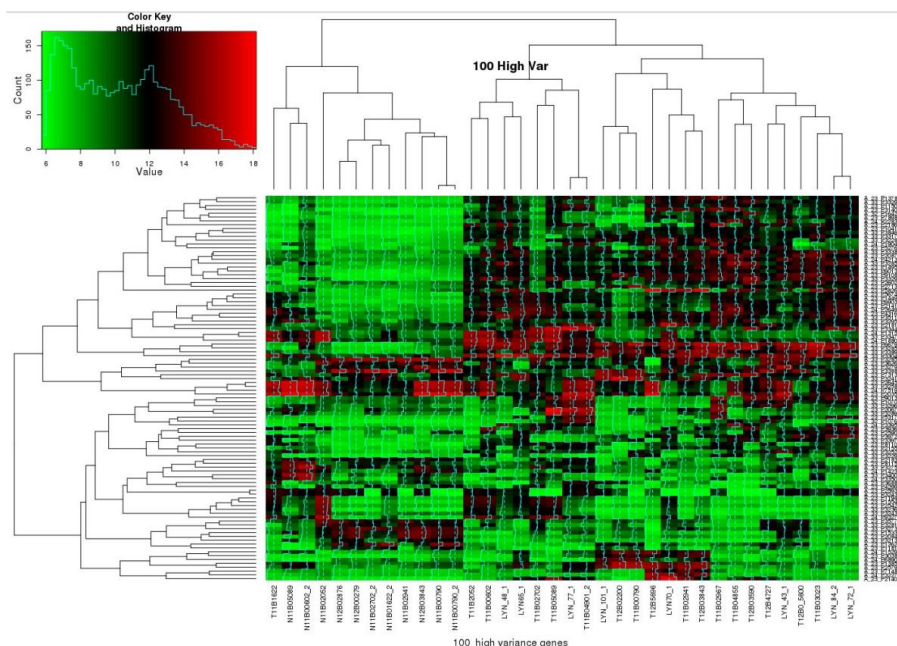
ARN total s-a obținut folosind protocolul Sigma TRIAGENT. ARN total a fost purificat cu Rneasy (Qiagen), în timp ce ADN a fost purificat cu coloane de ADN Qiagen. Concentrațiile au fost calculate cu ajutorul tehnologiei spectrofotometrică (Nanodrop ND1000) iar degradarea ARN a fost evaluată cu Agilent Lab-on-a-chip technology (Bioanalyser 2100).

După prepararea eșantioanelor tisulare, extracția ADN genomic s-a realizat cu Kit-ul Qiagen Genomic DNA urmărind instrucțiunile producătorului. Extracția ARN a urmat aceleași principii folosind kitul Absolutely RNA Microprep (Agilent Technologies).



**Figura 9. Protocol de analiză microarray.**

Profilele genice au fost identificate prin compararea nivelului de expresie în țesutul tumoral cu țesutul normal. Graficul de tip heat map al expresiilor genice sunt prezentate în Figura 10.



**Figura 10. Graficul de tip heat map al expresiilor genice pentru primele 100 cele mai variabile gene.**

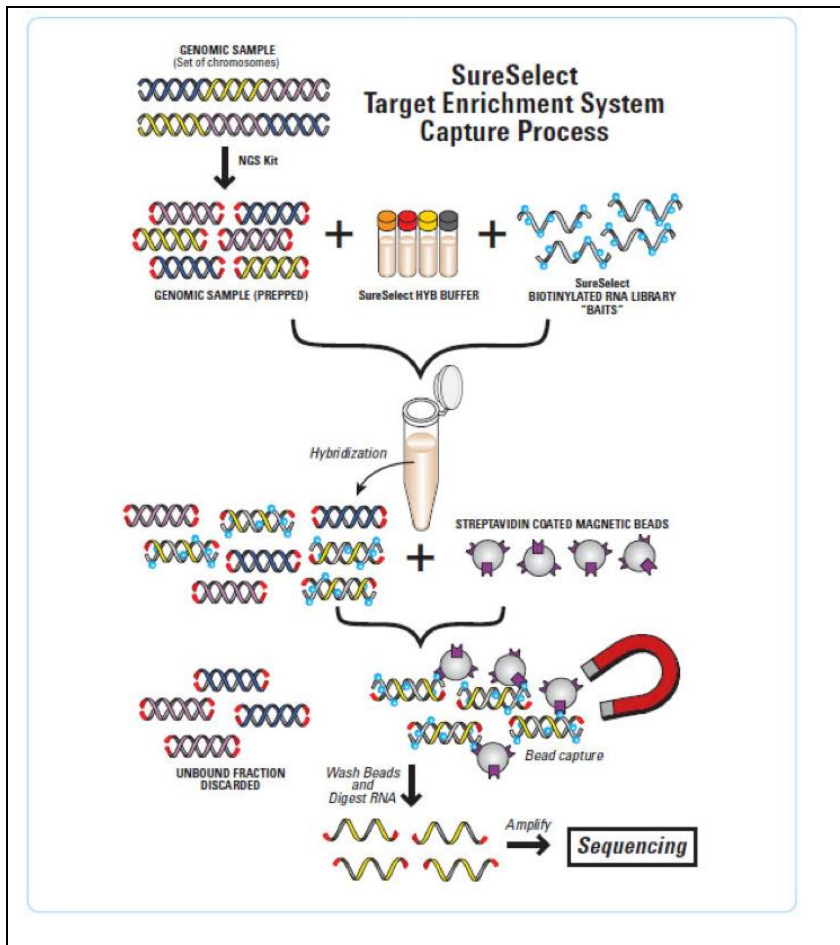
#### 3.4.4. Analiza bioinformatică

În această etapă s-a realizat procesarea datelor de microarray pentru a identifica genele și căile de semnalizare activate în cancerul bronho-pulmonar cu celule non-mici în stadiul de invazie a ganglionilor mediastinali. S-a realizat asocierea genelor determinate ca fiind supra- sau sub-exprimate în experimente, unor căi relevante din punct de vedere biologic, conform informațiilor existente despre aceste căi în baze de date specializate cum ar fi: KEGG, Biocarta, Gene Ontology, GENMAPP. S-au determinat căile de semnalizare cele mai promițătoare după integrare și interpretarea tuturor datelor experimentale. Programul de analiză a căilor de semnalizare folosește tehnologia Advaita, tehnologie folosită în mai multe Universități din Statele Unite ale Americii (Harvard, Columbia, California, Karmanos Cancer Institute), Franța și Anglia.

**3.4.5. Secvențierea întregului exom tumoral** – s-a utilizat platforma *HiSeq2000 Illumina*, cu 50X coverage mediu pentru zonele de interes. Tehnologia Illumina de secvențiere paralelă în masă se bazează pe secvențierea prin sinteză [23].

Secvențierea exomului se desfășoară în două etape: capturarea și izolarea exomului, urmata de secvențiere, ceea ce permite determinarea variantelor genetice ce prezintă secvențe proteice alterate. Tehnologia de capturare a exomului utilizată (Figura 11) a fost de tipul “solution-based”. Prin această tehnologie, eşantioanele de ADN sunt fragmentate și puse în contact cu

oligonucleotide legate de biotina (baits) care vor hibridiza în mod selectiv regiunile țintă din genom (exomul). Pentru aceasta sunt utilizate câmpuri magnetice de streptavidină ce vor lega bazele biotinate (biotina se leagă de streptavidina cu o afinitate extrem de mare). Părțile din genom care nu au fost legate de streptavidină sunt eliminate și eșantionul obținut este amplificat printr-o reacție de polimerizare în lanț (PCR).



**Figura 11. Tehnologia de capturare a exomului, după Agilent Technologies**  
<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3083> )

### Analiza statistică

În analiza datelor, tehnologia Illumina se bazează pe o cantitate foarte mare de secvențe citite în paralel. O eșantionare în profunzime (numărul mediu de nucleotide care a contribuit la determinarea secvenței) și o acoperire uniformă asigură o determinare a diferențelor genetice cu mare precizie.

În analiza statistică, variabilele dihotomice au fost exprimate ca numere absolute și procente și variabilele cantitative au fost rezumate ca valori medii cu primul și al treilea cuartil.

Asocierea dintre variabilele calitative a fost verificată prin intermediul testului  $\chi^2$  sau testul Fisher. Semnificația statistică a diferenței dintre valorile medii a fost testată prin Mann-Whitney U-test pentru probele nepereche.

### 3.5. Parteneri

Mai multe instituții din Europa, Asia și România au fost implicate în Realizarea proiectului (Figura 12).



**Figura 12. Partenerii proiectului GPN2**

Astfel, recoltarea materialului biologic s-a făcut în Serviciul de Chirurgie Toracică și Transplant pulmonar de la Allgemeines Krankenhaus – Universitätskliniken, din Viena, Austria sub îndrumarea Prof. Dr. Walter Klepetko și în Serviciul de Chirurgie Toracică de la Spitalul Hôtel Dieu, din Paris, sub îndrumarea Prof. Dr. Jean-Francois Regnard.

În cadrul Laboratorului de Analiza Genomică al Institutului Clinic Fundeni s-a realizat analiza materialului genomic prin tehnici specifice de microarray. Datele brute rezultate au fost supuse analizei bioinformatică sub îndrumarea Prof. Dr. Sorin Draghici șeful catedrei de Sisteme Biologice din Departamentul de Computer Science de la Wayne State University din Detroit.

În sfârșit, secvențierea genomului prin tehnici de capacitate înaltă și analiza statistică a rezultatelor s-a realizat în China, la Beijing Genomics Institute ([www.bgi.com](http://www.bgi.com)).

Rezultatele provenite de la diferiții parteneri ai proiectului GPN2 au fost centralizate la Institutul Clinic Fundeni.

## **3.6. REZULTATE**

### **3.6.1. Pacienți incluși în studiu**

Un total de 73 de pacienți deja diagnosticați sau suspecti de CPCNM în stadiul IIIA clinic au fost incluși inițial în studiu. Toți pacienții au beneficiat de o procedură chirurgicală (mediastinoscopie sau toracoscopie) pentru confirmarea histologică a invaziei ganglionilor mediastinali. Un total de 44 de pacienți au fost excluși din studiu în urma analizei histologice a țesuturilor ganglionare mediastinale prelevate. Un total de 29 de pacienți în stadiul IIIA (invazia ganglionilor mediastinali – N2+) dovedit histopatologic au rămas în studiu.

### **3.6.2. Chimioterapia neoadjuvantă**

Numărul mediu de cicluri de chimioterapie administrate a fost de 3 (interval 2-4). Toți pacienții au fost tratați cu o biterapie pe baza de saruri de platină: Cisplatina (n=23, 79%) sau Carboplatina (n=5, 21%). Toxicitatea la chimioterapia neoadjuvantă a fost în majoritatea cazurilor ușoară sau moderată (gradul 1-2). Trei pacienți (10%) au avut de grad 3/4 de toxicitate, care a inclus 2 leucopenii și o tromboză venoasă profundă complicată cu embolie pulmonară și deces după primul ciclu de chimioterapie. Răspunsul clinic a fost evaluat la cei 28 pacienți care au terminat tratamentul de inducție prin chimioterapie. Rata globală de răspuns clinic la chimioterapia neoadjuvantă a fost de 15 pacienți (54%). Acești pacienți au beneficiat ulterior de intervenție chirurgicală.

### **3.6.3. Chirurgie**

Un pacient a avut carcinoza pleurala descoperita la toracotomie și nu a beneficiat de rezecție chirurgicală. Restul de 14 (50%) pacienți au beneficiat de o rezecție chirurgicală completă R0.

### **3.6.4. Răspuns histopatologic**

În total, 7 (25%) pacienți au avut un downstaging al bolii inițiale și au fost incluși în Lotul B al pacienților sensibili la chimioterapie. Restul de 21 de pacienți (cei care au evoluat sub chimioterapie – 13 pacienți, și cei care nu au avut un downstaging prin chimioterapie – 8 pacienți) au fost incluși în Lotul A ai pacienților care nu au răspuns la chimioterapie.

În [figura 13](#) este redat fluxul de includere al pacienților de la momentul suspiciunii clinice de CPCNM și invazia ganglionilor mediastinali și până la formarea loturilor prognostice.

### 3.6.5. Clasificarea în loturi prognostice

- g. **Lotul A** - 21 de pacienți care nu au răspuns la chimioterapie sau au avut răspunsuri minore ori au fost doar stabilizați prin chimioterapie neoadjuvantă (criterii OMS).
- h. **Lotul B** – 7 pacienți care au avut un răspuns obiectiv la chimioterapie neoadjuvantă (criterii OMS).

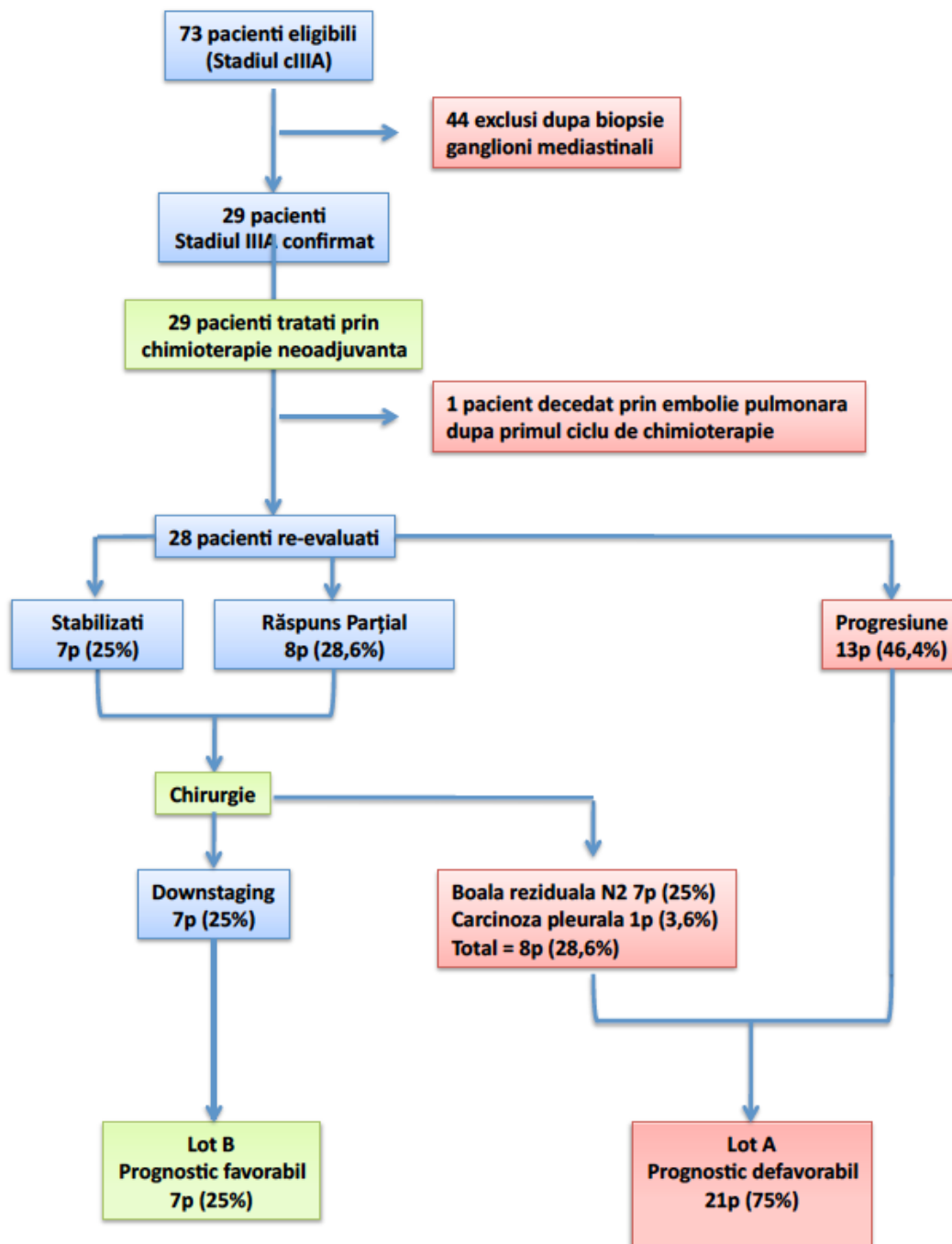


Figura 13. Formarea loturilor prognostice.

### 3.6.6. Profile de expresie microarray și căi de semnalizare

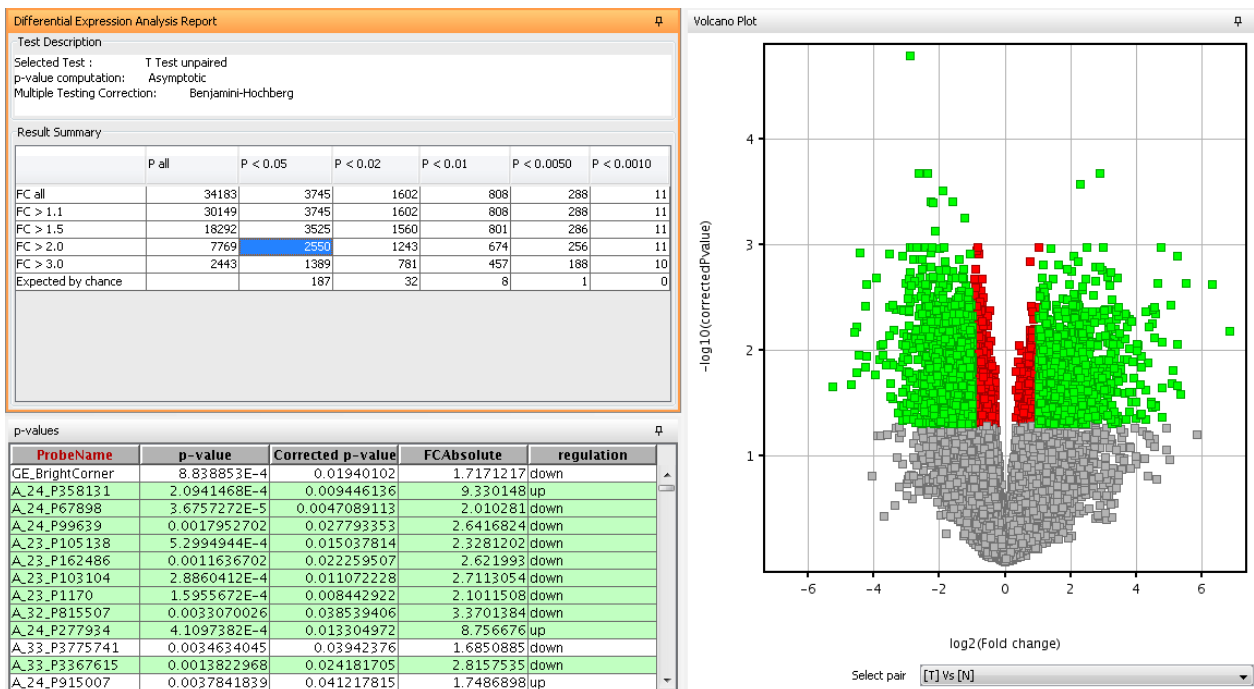
#### 3.6.6.1. Experimentele microarray și analiza bioinformatică

Datele generate de softwareul Feature Expression 9.1 au fost analizate cu softwareul Gene Spring 11.0 (Agilent Tchnologies).

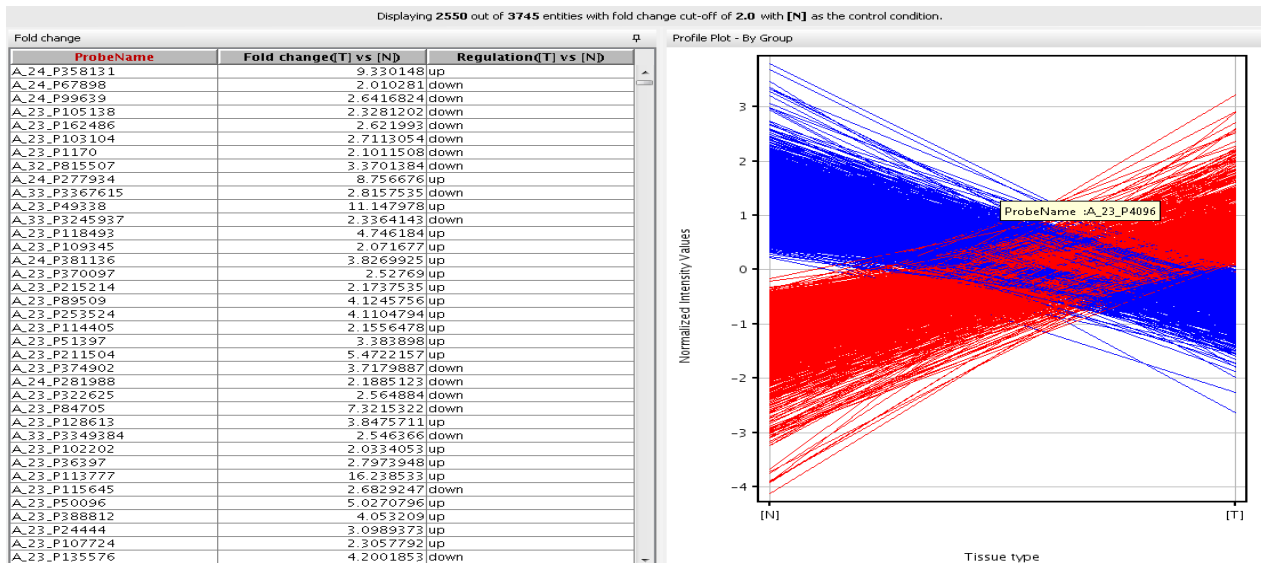
##### 3.6.6.1.a. Analiza diferențială a expresiei între țesutul normal și tumoral

Analiza diferențială a expresiei între țesutul normal și tumoral utilizând un t- test nepereche și un test de corecție Benjamini-Hochberg, cu un p value<0.05 a permis identificarea a 3745 gene dintr-un total de 34 183. Ulterior aplicând un fold change  $\geq 2$  au fost selectate, din cele 3745, 2550 gene cu expresie diferită între țesutul tumoral față de cel normal, reprezentate în [figura 14](#) în verde.

A



B



**Figura 14. 32A: Selecția a 3745 gene cu un p value < 0.05;**

**32B: Selecția a 2550 gene cu un p value < 0.05 și un fold change  $\geq 2$**

Căile de semnalizare identificate în urma analizei sunt: **receptor androgen** (98 gene din cele 2550 identificate), **BCR** (148 gene din cele 2550 identificate), **EGFR1** (181 gene din cele 2550 identificate), **IL2** (72 gene din cele 2550 identificate), **IL5** (39 gene din cele 2550 identificate), **IL7** (16 gene din cele 2550 identificate), **receptor KIT** (70 gene din cele 2550 identificate), **TCR** (140 gene din cele 2550 identificate), **Wnt** (138 gene din cele 2550 identificate).

Analizele bioinformaticale ale datelor de tip one-color microarray au condus la identificarea unei liste de 1127 gene cu expresie modificată în țesutul tumoral comparativ cu cel normal, cu o valoare  $p \leq 0.05$  și a unei liste de 44 gene cu un  $p \leq 0.01$ .

Dintre genele identificate cele cu cele mai mari diferențe de expresie genică identificată între țesutul tumoral față de cel normal sunt COL1A1, INHBA sau TXNIP.

### 3.6.6.1.b. Analiza diferențială a expresiei între *responders versus non-responders*

Datele sunt compuse din două grupuri de pacienți: cei care nu au răspuns la tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă (*non-responders*) și cei care au răspuns la tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă (*responders*). De notat că printre *responders* există doar o singură femeie (nepereche). Unele eşantioane sunt împerecheate la eşantioane de ganglioni non-tumorali de la același pacient, altele nu. Acest tip de date este menționat în literatura de specialitate ca "Parțial împerecheat", și pot fi abordate prin modele liniare cu efecte mixte [24, 25]. Pentru simplificare, am luat în considerare mai întâi datele care sunt împerecheate, și apoi am considerat datele ca un întreg, independent de împerechere.

Analiza GO (ontologia genelor) îmbogățită a arătat că genele de semnalizare transmembranară nu variază de la un pacient la altul, independent de răspunsul la chimioterapia neoadjuvantă. Genele cu mare variabilitate ale pacienților care au răspuns la chimioterapia neoadjuvantă implică keratina și cornificarea (Tabel 2). Învelișul cornificat al celulelor epidermice ale pielii este format din keratină, și este înconjurat de lipide. Acesta este asociat cu disfuncții de barieră și are ca rezultat un semnal de apoptoză [26].

Procese Biologice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diferențierea keratocitelor</li> <li>- Dezvoltarea epitelială</li> <li>- Diferențierea celulelor epidermice</li> <li>- Răspunsul la lipide</li> </ul>
Funcții Moleculare	Constituenți structurali ai citoscheletului
Componente Celulare	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Învelișul keratinizat</li> <li>- Matricea proteică extracelulară</li> <li>- Regiunea extracelulară</li> </ul>

**Tabelul 2. Termeni GO semnificativi pentru seturile de gene de varianță mare la responders.**

Genele cu mare variabilitate ale pacienților care au nu răspuns la chimioterapia neoadjuvantă implică activitatea enzimatică și sensibilitatea hormonală (Tabel 3).

Procese Biologice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Răspuns la stimulul hormonal</li> <li>- Reglarea negativă a activității hidrolazei</li> <li>- Reglarea negativă a activității endopeptidazei</li> <li>- Răspunsul la lipide</li> </ul>
Funcții Moleculare	Inhibitor al activității endopeptidazei
Componente Celulare	Regiunea extracelulară

**Tabelul 3. Termeni GO semnificativi pentru seturi de gene de varianță mare la non-responders.**

### 3.6.6.2. Analiza căilor moleculare

S-au determinat 7 căi moleculare care au fost semnificative (FDR <0,05) în cel puțin unul din subgrupuri (Tabel 4). Toate aceste căi sunt în raport cu sistemul imunitar, una este o cale de semnalizare, iar restul sunt legate de răspunsul imun sau autoimun la țesut străin. Calea de semnalizare a citokinelor este de asemenea legată de bolile autoimune [27]; citokinele sunt implicate în procesul de recrutare al limfocitelor.

	A	B	C	D	E
Căile KEGG	MF Toți 24/11	M toți 9/10	MF tumoral 18/7	M tumoral 7/6	M non-tumoral 2/4
Boala grefon-versus-receptor	<u>0.04</u>	0.08	0.07	0.09	0.06
Poliartrita reumatoidă	<u>0.04</u>	<u>0.05</u>	0.07	0.07	0.06
Rejetul alogrefelor	<u>0.04</u>	0.07	0.07	0.09	0.09
Tiroidita autoimună	<u>0.04</u>	<u>0.05</u>	0.07	0.09	0.06
Lupus eritematos systemic	<u>0.04</u>	0.26	0.13	0.32	0.24
Diabet de tip I	<u>0.05</u>	0.08	0.07	0.10	0.06
Calea de semnalizare citokinelor	0.97	<u>0.05</u>	0.93	0.24	0.96

**Tabelul 4. Valoarea p pentru căile KEGG care sunt semnificative cu un  $p < 0.05$ , pentru cel puțin unul din cele 5 seturi de date de in-put, definite de la A la E. Valorile aflate sub cutoff sunt subliniate. Prima linie a antetului arată sexul pacienților (M=masculin, F=feminin) din subgrup. A doua linie arată tipul ganglionilor limfatici. Ultima linie a antetului arată numărul de *non-responders* și de *responders* (*non-responders/responders*) luați în calcul. De notat că există doar o singură femeie în grupul de *responders*, și prin urmare nu a fost luat în considerare un subgrup numai de femei.**

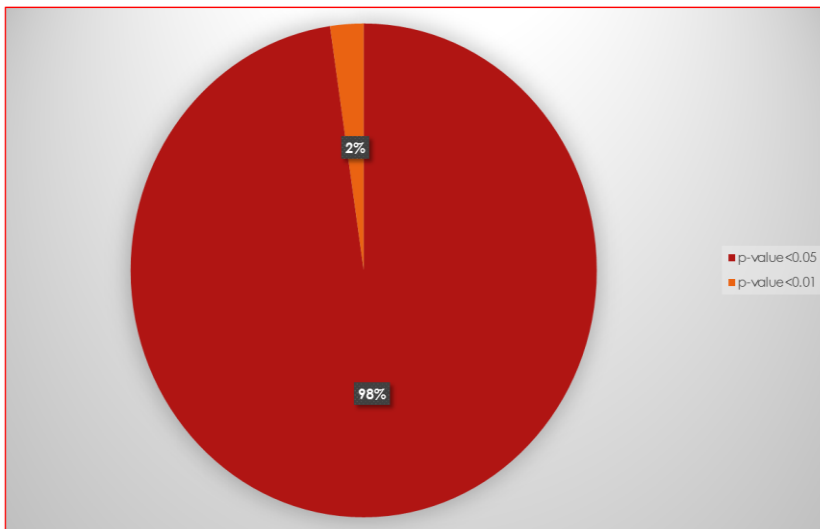
### 3.6.7. Secvențierea exomului (*Whole exome sequencing*)

După analiza eşantioanelor recoltate 15 pacienți au îndeplinit criteriile de calitate.

Pacienții ai căror ganglioni mediastinali tumorali pre-chimioterapie au fost analizabili se împart în:

- i. **Lotul A** - 9 pacienți care nu au răspuns la chimioterapie, au avut răspunsuri minore sau au fost doar stabilizați prin chimioterapie neoadjuvantă.
- j. **Lotul B** - 6 pacienți care au avut un răspuns obiectiv la chimioterapie neoadjuvantă.

S-a identificat un număr de 216 gene cu mutații cu un  $p\text{-value} \leq 0.05$  care sunt asociate cu fenotipul cancerului bronho-pulmonar cu celule non-mici (Figura 15).



**TOTAL = 216 gene**  
*P-value* < 0.05 – 211 gene  
*P-value* < 0.01 – 5 gene

**Figura 15. Genele identificate, cu p value semnificativ statistic, prin whole exome sequencing între loturile de pacienți analizați.**

Selecția genelor cu  $p\text{-value} \leq 0.01$  (Tabel 5), a condus la identificarea SNP-urilor pentru genele *SENP5* (rs63736860 și rs1602), *RGP1* (rs1570248), *NCBP2* (rs553783), *SLFN12L* (rs2304968 și rs9905892) și *GBA2* (rs3833700) care permit identificarea pacienților cu răspuns la tratament chimioterapeutic neoadjuvant *versus* pacienții cu răspuns minor la tratament chimioterapeutic neoadjuvant (Tabel 6).

Mutațiile *SENP5* (rs63736860 și rs1602) și *NCBP2* (rs553783) sunt identificate cu o frecvență mult mai crescută la pacienții cu răspuns minor la tratament, în timp de mutațiile *RGP1* (rs1570248), *SLFN12L* (rs2304968 și rs9905892) și *GBA2* (rs3833700) sunt identificate cu o frecvență mult mai mare la pacienții cu răspuns obiectiv la tratamentul de inducție.

Numărul cromozomului	ID	REF	ALT	LOTA* (Alt_freq)	LOTB** (Alt_freq)	Valoare P***	Simbolul genei	Numele complet al genei
chr3	rs63736860	CT	C	1	0.5	0.0015	<i>SENP5</i>	<i>SUMO1/sentrin specific peptidase 5</i>
chr3	rs1602	G	A	0,95	0,5	0.008	<i>SENP5</i>	
chr9	rs1570248	C	T	0,5	1	0.0040	<i>RGP1</i>	<i>Retrograde Golgi Transport Homolog (S. Cerevisiae)</i>
chr3	rs553783	A	G	0,95	0.5	0.0057	<i>NCBP2</i>	<i>Nuclear Cap Binding Protein Subunit 2</i>
chr17	rs2304968	T	C	0,54	1	0.0058	<i>SLFN12L</i>	<i>Schlafen Family Member 12-Like</i>
chr17	rs9905892	T	A	0,54	1	0.0058	<i>SLFN12L</i>	
chr9	rs3833700	G	GC	0,55	1	0.009	<i>GBA2</i>	<i>Glucosidase, Beta (Bile Acid) 2</i>

\*LOT A- include pacienții cu răspuns minor la tratament

\*\*LOT B- include pacienții cu răspuns la tratament

\*\*\*Valoarea P a fost calculată conform testului Fischer

**Tabelul 5. Gene cu mutații cu un p-value  $\leq 0.01$ .**

ID	dbSNP
rs63736860	GTGCCACTGAAGTGTTCCTGGGACC[-/T]TTTTTTTTGCAGTACTGCAAGTGCC
rs1602	ATAACCTCCAGTGAGACATGGATGA[C/T]ACCCACACTTCACTCTTGATCCCTG
rs1570248	AAACCCTAACCTCTACTCTCATCTC[C/T]GTTCCCTCTCAGCATTACCTCTCCA
rs553783	GGGTAGAGCTGAGAGTGGTAGCTCA[C/T]AAGCGTCCCTGCACTCGTCCCTACG
rs2304968	ACATCATCACCTGTCTCCAGAGTT[A/G]TCCTCTTCGTGAATATATTAACTTC
rs9905892	GAGCCGTTAGAATAGGAGTTAAGCC[A/T]GAGAGACAGCAAATTCTGCATTATG
rs3833700	CTGAGAGTGGCCAGAGCTGGGGGAG[-/C]AGACACAGAAGGGAGGCAGGGAATG

**Tabel 6. Secvența SNPs (Single Nucleotid Polymorphism).**

### 3.7. CONCLUZII

1. Acest studiu ne-a permis să punem în evidență noi semnături de mutații genetice predictive de supraviețuire și de răspuns la diferitele tratamente antitumorale la pacienții bolnavi de cancer pulmonar cu celule non mici și invazia ganglionilor mediastinali. Printr-o abordare originală în care am prelevat țesut ganglionar mediastinal invadat tumoral înainte de orice tratament antitumoral, s-a putut determina un lot de gene ale căror mutații apar a fi asociate fie cu un prognostic prost pentru unele fie cu un prognostic bun pentru celelalte. Pacienții prelevați au fost urmăriți și reevaluați clinic.

2. Analiza căilor moleculare sugerează că diferența dintre *responders* și *non-responders* se găsește în reglarea mecanismelor imunitare. Trei căi de reglare a mecanismelor imunitare au reieșit semnificativ: poliartrita reumatoidă, tiroidita autoimună, și calea de semnalizare a Citokinelor. Căile de semnalizare identificate cu FDR (false discovery rate) < 0.005 includ: căile de semnalizare a citokinelor, adeziune focală sau interacția ECM-receptor. Pe de alta parte, observațiile rezultate din analiza căilor moleculare sugerează că hormonii sexuali și răspunsul la chimioterapie ar putea fi de asemeni interconectați.

3. Mutațiile *RGP1* (rs1570248), *SLFN12L* (rs2304968 și rs9905892) și *GBA2* (rs3833700) sunt identificate cu o frecvență mult mai mare la pacienții cu răspuns obiectiv la tratamentul de inducție. Instituirea acestei semnături genice compuse din trei gene ca un nou model de

estimarea a sensibilității la tratamentul prin chimioterapie neoadjuvantă, asociată semnificativ pacienților care au un răspuns pozitiv la tratamentul chimioterapeutic neoadjuvant pe baza de săruri de platină, ar putea fi un nou pas către realizarea unui tratament individualizat la pacienții cu CPCNM. Rezultatele noastre sugerează ca un pacient cu CPCNM stadiu IIIA, care are un nivel ridicat al indicelui de semnătura a celor trei gene, ar fi un candidat ideal pentru a primi un tratament de inducție prin chimioterapie dublă, asociind cel puțin o sare de platină. Aceste constatări sunt preliminare și doar sugestive în acest moment, și această semnătură de trei gene trebuie să fie validată înainte de a fi utilizată în practica clinică de rutină. Este necesară realizarea unui studiu clinic în scopul de a valida rolul unui tratament personalizat pe baza acestei semnături de trei gene.

4. Profilul de expresie ARN observat prezintă o mare heterogenitate (1127 gene cu expresie modificată în țesutul tumoral comparativ cu țesutul normal -  $p\text{-value} \leq 0.05$ ), însă analiza prin secvențiere a exomului a permis determinarea unui număr restrâns de modificări punctuale SNP asociate cu diferențele de sensibilitate la tratamentele chimioterapice convenționale.

5. Mai mulți factori influențează aceste experimente, inclusiv pierderea de putere în a detecta mutațiile somatice specific tumorale în prezența contaminării stromale și o capacitate limitată de a detecta mutații la un subset de secvențe de codificare. Scăderea costurilor legate de secvențiere a permis lansarea recentă a proiectelor de secvențiere a întregului exom și a întregului genom al cancerului pulmonar, care permite o analiză a mutațiilor într-o manieră complet imparțială. Mai mult decât atât, colectarea datelor rezultate prin metodele de secvențiere next-generation, este "digitală", realizată pentru fiecare moleculă, astfel încât capacitatea de a detecta alelele de slabă abundență, fie din cauza contaminării stromale sau datorită heterogenității tumorii, depinde doar de capacitatea de acoperire.

6. Limita acestui studiu este numărul mic de pacienți analizați. Acest fapt îl explicăm prin diminuarea considerabilă a indicației de prelevare a ganglionilor mediastinali prin mediastinoscopie datorită apariției explorării mediastinale prin tehnici mult mai puțin invazive, sub control ecografic (Endo Bronchial UltraSound - EBUS) chiar în timpul desfășurării perioadei de includere a pacienților. Datorită răspândirii și adopției extrem de rapide a acestei tehnologii, impactul ei asupra proiectului nu a putut fi integrat, proiectul având o perioadă de

desfășurare pre-determinată, iar continuarea realizării sistematice a mediastinoscopiei, metoda mai agresivă, ar fi necesitat aprobări suplimentare.

7. Datorită interesului clinic major pe care o semnătură genică prognostică îl poate reprezenta, credem că acest studiu poate fi continuat prin includerea unui număr mare de pacienți cu CPCNM și invazia ganglionilor mediastinali, la care să se determine statusul mutațional în genele determinate prin GPN2, cu scopul de a valida aceste rezultate. Validarea unei "semnături genice de chimiosensibilitate" ar putea ajuta în luarea deciziei terapeutice și alegerea tipului de chimioterapie.

8. O altă direcție de cercetare ar putea fi determinarea unor markeri biologici sanguini sau urinari prin determinarea proteinelor codate de aceste gene și analiza existenței acestor proteine în plasma sau urina pacienților.

9. Genele implicate în această semnătură, sau căile de semnalizare în care participă, ar putea reprezenta noi ținte terapeutice în tratamentul cancerului pulmonar.

10. O mai bună înțelegere a relației dintre diversitatea histopatologică a tumorilor pulmonare, caracteristicile moleculare și evoluția bolii, va contribui la dezvoltarea patologiei moleculare și a biomarkerilor.

11. Secvențierea exomului cancerului pulmonar a permis înțelegerea mai multor mecanisme ale oncogenezei. Generarea datelor de secvențiere a întregului exom și a întregului genom de la un număr tot mai mare de probe, se va putea realiza o imagine mai globală a mutațiilor somatice în cancerul pulmonar, oferind o imagine de ansamblu a genomului cancerului pulmonar și o orientare adecvată a obiectivelor terapeutice.

### 3.9. BIBLIOGRAFIE

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin. 2010;60:277-300.
2. Sharma SV, Settleman J. *Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy ADN "oncogenic shock."* Biochem Pharmacol. 2010;80:666-73.
3. Weinstein IB. *Cancer. Addiction to onco-genes: the Achilles heal of cancer*. Science. 2002;297:63-4.
4. Ruckdeschel JC. *Combined modality therapy of non-small cell lung cancer*. Semin Oncol 1997;24:429-39.
5. Stinchcombe TE, Fried D, Morris DE, Socinski MA. *Combined modality therapy for stage III non-small cell lung cancer*. Oncologist 2006;11:809-23.
6. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT III, Shepherd FA, Smith C et al. *Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III rADNomised controlled trial*. Lancet 2009;374:379-86.
7. Roth JA, Fossella F, Komaki R, Ryan MB, Putnam JB Jr, Lee JS et al. *A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst 1994;86:673-80.
8. Albain KS, Rusch VW, Crowley JJ, Rice TW, Turrisi AT III, Weick JK et al. *Concurrent cisplatin/etoposide plus chest radiotherapy followed by surgery for stages IIIA (N2) and IIIB non small cell lung cancer: mature results of Southwest Oncology Group Phase II Study 8805*. J Clin Oncol 1995;13:1880-92.
9. Rosell R, Gómez-Codina J, Camps C, Maestre J, Padille J, Cantó A et al. *A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med 1994;330:153-8.
10. Strauss GM, Langer MP, Elias AD, Skarin AT, Sugarbaker DJ. *Multimodality treatment of stage IIIA non-small-cell lung carcinoma: a critical review of the literature and strategies for future research*. J Clin Oncol 1992;10: 829-38.
11. Albain KS. *Induction chemotherapy with/without radiation followed by surgery in stage III non-small-cell lung cancer*. Oncology 1997;11:51-7.
12. Rosell R, Gómez-Codina J, Camps C, Javier Sánchez J, Maestre J, Padilla J et al. *Preresectional chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer: a 7-year assessment of a randomized controlled trial*. Lung Cancer 1999;26:7-14.
13. Martini N, Kris MG, Flehinger BJ, Gralla RJ, Bains MS, Burt ME et al. *Preoperative chemotherapy for stage IIIa (N2) lung cancer: the Sloan-Kettering experience with 136 patients*. Ann Thorac Surg 1993;55: 1365-73.
14. Goldberg M, Burkes RL. *Induction chemotherapy for stage IIIA unresect- able non-small cell lung cancer: the Toronto experience ADN an overview*. Semin Surg Oncol 1993;9:108-13.
15. Stefani A, Alifano M, Bobbio A, Grigoroiu M, Jouni R, Magdeleinat P, Regnard JF. *Which patients should be operated on after induction chemotherapy for N2 non-small cell lung cancer? Analysis of a 7-year experience in 175 patients*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010 Aug;140(2):356-63.
16. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. *Lung cancer*. Cancer. 1995;75:191-202. *A multicenter phase II study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res. 2013 Jun 1;19(11):3068-77.
17. Morandi U, Casali C et Rossi G. *Bronchial typical carcinoid tumors*. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery 2006;18(3):191-198.
18. B Etienne-Mastroianni, L. Falchero, L. Chalabreysse et al. *Primary sarcomas of the lung: a clinicopathologic study of 12 cases*. Lung Cancer 2002 Dec; 38(3):283-289.

19. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. *Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer : clinical implications. Thorax*, BMJ Publishing Group Ltd. 2003 Oct; 58(10):892–900.
20. Gandhi J, Zhang J, Xie Y, et al. *Alterations in genes of the EGFR signaling pathway AND their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. PLoS ONE.* 2009;4:e4576.
21. Sun Y, Ren Y, Fang Z, et al. *Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. J Clin Oncol.* 2010;28:4616-20.
22. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
23. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al. *Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. Clin Cancer Res.* 2013 May 1;19(9):2584-91.
24. Johan L, Jayoun K, Sangcheol K, Donghyeon Y, Kyunga K, Byung Soo K. *Detection of differentially expressed gene sets in a partially paired microarray data set. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 11(3), 2012.
25. Yi S, Park T. *Integrated analysis of the heterogeneous microarray data. BMC bioinformatics*, 12(Suppl 5):S3, 2011.
26. Candi E, Schmidt R, Melino G. *The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nature reviews Molecular cell biology*, 6(4):328–340, 2005.
27. Godessart N, Kunkel SL. *Chemokines in autoimmune disease. Current opinion in immunology*, 13(6):670–675, 2001.
28. West H, Albain KS. *Current standards and ongoing controversies in the management of locally advanced non-small cell lung cancer. Semin Oncol* 2005;32:284–92.
29. Feld R, Rubinstein LV, Weisenberger TH. *Sites of recurrence in resected stage I non-small-cell lung cancer: a guide for future studies. J Clin Oncol* 1984;2:1352–8.
30. Immerman SC, Vanecko RM, Fry WA, Head LR, Shields TW. *Site of recurrence in patients with stages I and II carcinoma of the lung resected for cure. Ann Thorac Surg* 1981;32:23–7.
31. Felip E, Pavlidis N, Stahel RA. ESMO Guidelines Task Force. *ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of non-small cell lung cancer (NSCLC). Ann Oncol* 2005;16:28–31.
32. Song WA, Zhou NK, Wang W, Chu XY, Liang CY, Tian XD et al. *Survival benefit of neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: an updated meta-analysis of 13 randomized control trials. J Thorac Oncol* 2010;5:510–6.
31. Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, et al. *Non-small cell lung cancer. J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2012, 10, 1236-1271.
32. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, et al. *Small cell lung cancer. J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2013, 11, 78-98.
33. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. *Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 13790-13795.
34. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. *Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nat. Med.* 2002, 8, 816-824.
35. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. *Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 13784-13789.
36. Hayes DN, Monti S, Parmigiani G, et al. *Gene expression profiling reveals reproducible human lung adenocarcinoma subtypes in multiple independent patient cohorts. J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 5079-5090.

37. Park YY, Park ES, Kim SB, et al. *Development and validation of a prognostic gene-expression signature for lung adenocarcinoma*. PLoS One 2012, 7,
38. Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, et al. *Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors*. J. Clin. Oncol. 2006, 24, 1679-1688.
39. Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, et al. *Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization*. Oncogene 2005, 24, 7105-7113.
40. Raponi M, Zhang Y, Yu J, et al. *Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung*. Cancer Res. 2006, 66, 7466-7472.
41. Wilkerson MD, Yin X, Hoadley KA, et al. *Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types*. Clin. Cancer Res. 2010, 16, 4864-4875.
42. *The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature 2012, 489, 519-525.
43. Rodriguez-Lara V, Peña-Mirabal E, Baez-Saldana R, et al. *Estrogen receptor beta and cxcr4/cxcl12 expression: Differences by sex and hormonal status in lung adenocarcinoma*. Archives of Medical Research, 2014.
44. Szymanowska-Narloch A, Jassem E, Skrzypski M, et al. *Molecular profiles of non-small cell lung cancers in cigarette smoking and never-smoking patients*. Advances in medical sciences, pages 1–11, 2014.
45. Betticher DC, Hsu Schmitz SF, Tötsch M, Hansen E, Joss C, von Briel C et al. *Prognostic factors affecting long term outcomes in patients with resected stage IIIA pN2 non-small-cell lung cancer: 5-year follow-up of a phase II study*. Br J Cancer 2006;94:1099–106.
46. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, et al: *A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med 2007, 356:11–20.
47. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, Bowman RV, Hayward NK, Fong KM: *Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res 2007, 13:2946–2954.
48. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Forbes J, Mallon EA, Salter J, Quinn E, Dunbier A, Baum M, Buzdar A, et al: *Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study*. J Clin Oncol 2010, 28:1829–1834.
49. Marx V. *Next-generation sequencing: The genome jigsaw*. Nature 2013;501:263-8.
50. Green ED, Guyer MS, *National Human Genome Research Institute. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside*. Nature 2011;470:204-13.
51. Leary RJ, Sausen M, Diaz LA Jr, et al. *Cancer detection using whole- genome sequencing of cell free DNA*. Oncotarget 2013;4:1119-20.