

Joana Espiga Macedo¹
Ângela M S Costa^{1,2}
Inês A M Barbosa^{2,3}
Sandra Rebelo^{1,4}
Conceição Souto de Moura^{1,5}
Luís Teixeira da Costa^{2,6}
Venceslau Hespagnol^{1,7}

**Alterações genéticas no cancro do pulmão:
Avaliação das limitações ao seu uso na rotina clínica**

***Genetic alterations in lung cancer:
Assessing limitations in routine clinical use***

Recebido para publicação/received for publication: 06.10.31
Aceite para publicação/accepted for publication: 06.12.12

Resumo

O cancro do pulmão é a causa mais frequente de mortalidade por cancro no mundo, sendo responsável por cerca de 1,1 milhões de mortes por ano. A sobrevivência média dos doentes é geralmente curta, por a doença se encontrar em estádios avançados na altura do diagnóstico, mas também devido à falta de eficácia dos tratamentos disponíveis. O advento da genética molecular dos tumores trouxe consigo a possibilidade de modificar esta situação, quer através do refinamento do diagnóstico, quer da identificação de alvos terapêuticos específicos, quer sobretudo por – pelo menos em teoria – permitir o diagnóstico precoce da doença. No entanto, e apesar de numerosos trabalhos terem já demonstrado a utilidade das técnicas da genética molecular no estudo do cancro do pulmão, o seu uso na rotina clínica em Portugal tem sido limitado.

Abstract

Lung cancer is the most frequent cause of cancer mortality worldwide, responsible for approximately 1.1 million deaths per year. Median survival is short, both as most tumours are diagnosed at an advanced stage and because of the limited efficacy of available treatments. The development of tumour molecular genetics carries the promise of altering this state of affairs, as it should lead to a more precise classification of tumours, identify specific molecular targets for therapy and, above all, allow the development of new methods for early diagnosis. Despite numerous studies demonstrating the usefulness of molecular genetic techniques in the study of lung cancer, its routine clinical use in Portugal has, however, been limited. In this study, we used a p53 mutation screen in multiple clinical samples from a series of lung cancer pa-

¹ Faculdade de Medicina da Universidade do Porto / *University of Porto Faculty of Medicine*

² IPATIMUP

³ Faculdade de Ciências da Universidade do Porto / *University of Porto Faculty of Science*

⁴ Serviço de Histologia, Hospital de S. João / *Hospital de S. João, Histology Unit*

⁵ Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de S. João / *Hospital de S. João, Anatomic Pathology Unit*

⁶ ICAM, Universidade de Évora / *ICAM, University of Évora*

⁷ Serviço de Pneumologia, Hospital de S. João / *Hospital de S. João, Pulmonology Unit*

No presente estudo, utilizou-se a pesquisa de mutações no anti-oncogene p53 em amostras clínicas de doentes com diagnóstico de cancro do pulmão como método para identificar as dificuldades práticas à integração da genética molecular na rotina clínica. Os resultados obtidos sugerem que o principal factor limitante a essa integração é a obtenção de amostras de ADN de qualidade, um problema que pode ser superado pela alteração das práticas correntes de recolha de amostras.

Rev Port Pneumol 2007; XIII (1): 9-34

Palavras-chave: Cancro, pulmão, clínica, genética molecular, mutação, p53.

tients to attempt to identify the main practical limitations to the integration of molecular genetics in routine clinical practice. Our results suggest that the main limiting factor is the availability of samples with good quality DNA; a problem that could be overcome by alterations in common sample collection and storage procedures.

Rev Port Pneumol 2007; XIII (1): 9-34

Key-words: Cancer, lung, clinical, molecular genetics, mutation, p53.

A sobrevivência média global destes doentes aos 5 anos é de cerca de 15%

Introdução

O cancro do pulmão é actualmente a neoplasia mais comum em todo o mundo, representando por si só cerca de 13% dos novos casos de cancro^{1,2}. É também a principal causa de morte por cancro, sendo responsável por aproximadamente um quinto dos óbitos, ou cerca de 1,1 milhões de mortes anuais³. Esta situação torna-se ainda mais preocupante se considerarmos que os avanços terapêuticos dos últimos 20 anos tiveram uma reduzida repercussão na sobrevivência dos doentes com cancro do pulmão. Actualmente, a sobrevivência média global destes doentes aos 5 anos é de cerca de 15%⁴. No entanto, e tal como para outras neoplasias, o prognóstico depende muito do estadiamento à data do diagnóstico: para os estádios precoces, submetidos a cirurgia (que representam apenas 15% dos casos), a sobrevivência aos 5 anos é de cerca de 80%, mas para a maioria dos casos que são diagnosticados em estádios avançados ela é muito inferior (por exemplo, 5% para um doente com carcinoma não de pequenas células em estágio IIIB ou 1%

Introduction

Lung cancer is currently the most common form of cancer the world over, in itself responsible for around 13% of new cancer cases^{1,2}. In parallel it is also the main cause of cancer death, responsible for approximately one fifth of all cancer deaths, or around 1.1 million deaths per year³. This state of play becomes even more worrying if we consider that the advances in treatment of the last 20 years have had a reduced impact on lung cancer patient survival. The current mean global 5-year survival rate of these patients is around 15%⁴. Just as with other forms of cancer, the prognosis depends greatly on the stage at the date of diagnosis. While for early stages undergoing surgery (only about 15% of cases), the 5-year survival rate is approximately 80%, for the greater part of cases, diagnosed in advanced stages, the rate is much lower; 5% for a non-small cell carcinoma patient in stage IIIB and 1% in stage

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO: AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

em estágio IV)⁵. Estes números demonstram claramente que, ao nível do tratamento, a redução da taxa de mortalidade depende de melhorias significativas, quer dos métodos de diagnóstico, quer da eficácia das terapias.

O estudo da genética molecular dos tumores permite-nos, hoje em dia, uma expectativa razoável de se poderem atingir esses dois objetivos, por várias razões. Em primeiro lugar, resulta do facto de os tumores serem processos evolutivos⁶ que as alterações genéticas determinantes para o seu desenvolvimento formam a base do melhor sistema de classificação possível para os tumores: um sistema filogenético. É claro que, dadas as limitações actuais dos nossos conhecimentos, um tal sistema ainda não é viável. Contudo, à medida que o espectro de alterações moleculares dos tumores for sendo mais bem conhecido, deverá ser possível usar esses dados para obter um diagnóstico mais preciso e prever com maior exactidão do que actualmente o comportamento da doença – incluindo a resposta às terapias. Segundo, as alterações genéticas presentes nos tumores originam directamente alvos terapêuticos específicos que podem permitir o desenvolvimento e aplicação racionais de terapias altamente eficazes – como demonstrado pelos exemplos do inibidor de bcr-abl (imatinib) para leucemia mieloide crónica e dos inibidores do EGFR (erlotinib e gefitinib) em casos específicos de cancro do pulmão. Finalmente, a natureza multietápica da evolução tumoral⁶⁻⁸ implica que a identificação das alterações responsáveis pelos passos iniciais da oncogénese pode revolucionar o diagnóstico precoce das neoplasias. Com todo este potencial, e os numerosos estudos já publicados demonstrando a utilidade das técnicas da genética molecular como métodos auxiliares de diagnóstico, é algo surpreendente que ainda não se tenha generalizado o

IV)⁵. These numbers clearly show that at treatment level, reducing the mortality rate depends on significant improvements both in diagnostic methods and in the efficacy of treatment.

The study of tumour molecular genetics allows us reasonable expectations today of meeting those twin goals. There are several reasons for this. One of these reasons is the fact that tumours are evolving processes⁶ in which the genetic alterations determining their development form the base of the best classification system possible for tumours; a phylogenetic system. Obviously, given the current limits to our knowledge, such a system is not yet viable but as the spectrum of molecular alterations of tumours becomes better known, it should be possible to use these data to obtain a more precise diagnosis and map the disease's behaviour – including response to treatment – more minutely than at present.

A second reason for hope is that the genetic alterations present in tumours give direct rise to specific therapeutic targets which could allow the well thought-out development and application of highly effective treatments. Examples of this are the bcr-abl inhibitor (Imatinib) for chronic myeloid leukaemia and the EGFR inhibitors (Erlotinib and Gefitinib) used in specific cases of lung cancer. Finally, the multistage nature of tumoral development⁶⁻⁸ means that pinpointing the alterations causing the first traces of oncogenesis could revolutionise the early diagnosis of cancers. With all this potential, and in the face of many published studies showing the usefulness of molecular genetic techniques as auxiliary diagnostic tools, it is somewhat surprising that the latter are not in general use in

A identificação das alterações responsáveis pelos passos iniciais da oncogénese pode revolucionar o diagnóstico precoce das neoplasias

seu uso na rotina clínica em Portugal. O estudo ora apresentado, inserido no nosso plano de, a médio prazo, estabelecer e implementar protocolos que permitam a transposição dos conhecimentos e das técnicas da genética molecular da bancada para a clínica, visou primariamente a identificação dos principais entraves de ordem prática a essa implementação. Para tanto, decidimos concentrar-nos na análise de mutações do anti-oncogene p53 em amostras clínicas de doentes com diagnóstico de cancro do pulmão, uma escolha motivada pelo facto de o p53 ser o alvo mais frequente de mutações em cancro do pulmão e de haver indícios de que essas mutações têm valor prognóstico.

Material e métodos

Seleção e avaliação clínica de doentes

Foram admitidos neste estudo doentes com cancro do pulmão, caracterizado cito e histologicamente, em seguimento na consulta de Pneumologia Oncológica do Hospital de São João, entre Maio de 2004 e Junho de 2005. Todos os doentes seleccionados assinaram consentimento informado. Em caso de suspeita de neoplasia do pulmão, foram obtidas história clínica pormenorizada e história de hábitos tabágicos (por consulta de processos clínicos ou entrevista). Seguidamente, foram efectuados exame físico e exames auxiliares de diagnóstico, incluindo exames laboratoriais, radiografia e TAC (tomografia axial computadorizada) torácicos e provas funcionais respiratórias. Perante evidência clínica e imagiológica sugestiva de cancro do pulmão, os doentes foram submetidos a exames de diagnóstico invasivos, como broncofibroscopia ou biópsia aspirativa transtorácica (BAT), consoante a localização do tumor. As broncofibroscopias, efectuadas com introdução transnasal de broncoscópio Olympus P30, P40 ou broncovideos-

routine clinical practice in Portugal. This study is part of our plan to establish and implement in the medium-term protocols for transposing molecular genetic knowledge and techniques from bench to clinical practice. Our first aim is to identify the main practical barriers to implementing molecular genetic techniques. In order to do that, we focussed on analysing the anti-oncogene p53 mutations in clinical samples of patients diagnosed with lung cancer. This choice was occasioned by p53 being the most common target of mutations in lung cancer and by the fact that there are indications of these mutations having prognostic value.

Material and methods

The selection and clinical evaluation of patients

We studied lung cancer patients whose cancer had been characterised cytologically and histologically following oncological pulmonology consultations at the Hospital de São João between May 2004-June 2005. All patients selected gave their written informed consent to the study. A detailed clinical history and smoking habits history were obtained whenever lung cancer was suspected, by consulting case files or conducting interviews. The next step was a physical examination and auxiliary diagnostic exams. These included laboratory investigation, chest X-ray and CT (computerised tomography) scan and lung function tests. When clinical and imaging findings suggested lung cancer, patients underwent invasive diagnostic procedures such as bronchofibroscopy or transthoracic aspiration biopsy (TAB) depending on the location of the tumour. The bronchoscopies were performed with the transnasal introduction of the Olympus P30 or P40 bron-

cópio, permitiram obter amostras das lesões suspeitas (lavado brônquico, escovagem brônquica, biópsia brônquica). Os procedimentos intrabronquiais foram realizados de acordo com a estratégia diagnóstica mais adequada para cada doente (lavagem brônquica com 10 ml de solução salina estéril, escovado brônquico e biópsia brônquica nos locais onde existiam sinais directos ou indirectos de envolvimento neoplásico). A BAT permitiu obter citologia aspirativa das lesões. O diagnóstico anatomopatológico foi efectuado de acordo com a classificação da OMS em vigor e o estadiamento clínico dos doentes foi feito de acordo com a Revisão do Sistema Internacional de Estadiamento do Cancro do Pulmão^{5,9}.

Obtenção de material para estudo molecular

Amostras de expectoração por emissão, obtidas antes da intervenção endoscópica, foram armazenadas em tubos “cónicos” de 50 ml numa solução de 2% carbowax/50% etanol (fixador de Saccomanno)^{10,11}. A fracção do lavado brônquico não utilizada para diagnóstico foi transferida para tubos “cónicos” de 15 ml, submetida a centrifugação durante 5 minutos a 10 000 rpm à temperatura ambiente, e após rejeição do sobrenadante armazenada a -80°C, em etanol a 95%^{12,13}. A extremidade da escova resultante da escovagem brônquica foi colocada em tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml com etanol a 70% e armazenada a 4°C¹⁴. Fracções das biópsias brônquicas da massa tumoral não utilizadas para fins de diagnóstico foram armazenadas a -80°C, sem fixação^{12,15}.

Isolamento e purificação de ADN das amostras clínicas

O ADN genómico de cada uma das amostras foi isolado e extraído com o *kit* de isolamento de DNA Puregene, da Gentra Systems. Em re-

choscope or bronchovideoscope, allowing collection of suspect lesion samples (bronchial lavage, bronchial brushing, bronchial biopsy). The intrabronchial proceedings were carried out in accordance with the most appropriate diagnostic strategy for each patient (bronchial lavage with 10ml of sterile saline solution and bronchial brushing and bronchial biopsy at the locales having direct or indirect signs of cancerous involvement). TAB was used to obtain aspiration cytology of the lesions. The prevailing WHO classifications were used to make an anatomic pathology diagnosis and patients' clinical staging was classified in accordance with the Revisions in the International Systems for Staging Lung Cancer^{5,9}.

Obtaining material for molecular study

Expectoration samples, taken before the endoscopy procedure was carried out, were stored in 50ml conical tubes in a 2% Carbowax/50% ethanol solution (Sacomanno Fixative)^{10,11}. The portion of the bronchial lavage not used in diagnosis was transferred to 15ml conical tubes, centrifuged for 5 minutes at 10 000 rpm at room temperature and the fluid which had risen to the surface was then discarded from it. The portion was then stored in 95% ethanol at -80°C^{12,13}. The tip of the brush used in the bronchial brushing was placed in 1.5ml Eppendorf-type tubes with 70% ethanol and stored at 4°C¹⁴. Portions of the tumoral mass resulting from the bronchial biopsies not used for diagnosis were stored at -80°C with no fixing^{12,15}.

Isolation and purification of the DNA of the clinical samples

The genomic DNA of each sample was isolated and extracted with the Gentra Systems Puregene DNA isolation kit. The samples

sumo, após centrifugação das amostras e rejeição dos sobrenadantes, adicionaram-se 30 µl de solução de *lyse* e 0,15 µl de solução de proteinase K (20 mg/ml), por cada miligrama de amostra. O lisado foi incubado durante 4-5 horas a 65°C e, após digestão, centrifugação e arrefecimento a uma temperatura próxima da temperatura ambiente, procedeu-se à precipitação proteica. O material sobrenadante, contendo o ADN, foi retirado para um novo tubo contendo isopropanol a 100% e misturado suavemente até precipitação do ADN. Após centrifugação a 13 000-16 000g durante 3 minutos, o sobrenadante foi rejeitado e o precipitado lavado com 150 µl de etanol a 70%. Após remoção do excesso de etanol e secagem, o ADN foi reidratado num volume de água bidestilada autoclavada. As amostras foram submetidas a avaliação de qualidade por electroforese de uma aliquota em gel de agarose e armazenadas a -80°C até uso posterior.

Amplificação do ADN genómico

Dois fragmentos de ADN genómico, contendo os exões 5 a 9 do p53, foram amplificados por *polymerase chain reaction* (PCR), usando os pares de oligómeros indicados no Quadro I. As reacções de amplificação foram efectuadas num volume total de 25 µl, contendo 350ng de cada oligómero, 1,5mM de MgCl₂ (Fermentas), 1,25 unidades de Taq DNA polimerase, 0,25 mM de cada nucleótido (QBiogene) e 1 µl de ADN genómico, num tampão de reacção adequado, com (NH₄)₂SO₄ (Fermentas). O protocolo de amplificação incluiu um passo inicial de 3 mn a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30s a 95°C, 1mn a 58°C e 1mn a 72°C, de um período de 3mn a 72°C e de arrefecimento a 4°C.

Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação de ADN genómico foram separados em gel de agarose a 1%

were centrifuged and that rising to the surface discarded, then 30µl of lysis solution and 0.15µl of Proteinase K solution (20mg/ml) for each milligram of sample were added. This was incubated for 4-5 hours at 65°C and protein precipitation was made after digestion, centrifuging and cooling to near room temperature. DNA-bearing material rising to the surface was collected into a new tube containing 100% isopropyl alcohol and carefully shaken until DNA precipitation occurred. After centrifugation at 13 000-16 000g for 3 minutes, the material rising to the surface was discarded and the precipitation lavaged with 150µl of 70% ethanol. After removing the excess ethanol and drying, the DNA was rehydrated in twice distilled autoclaved water. The samples' quality was evaluated using Agarose gel electrophoresis and stored at -80°C for later use.

Amplification of genomic

DNA Two fragments of genomic DNA containing p53 exons 5-9 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the oligomer pairs stated in Table I. The amplification reactions were made in a total volume of 25µl containing 350ng of each oligomer, 1.5mM of MgCl₂ (Fermentas), 1.25 units of Taq DNA polymerase, 0.25mM of each nucleotide (QBiogene) and 1µl of genomic DNA in a suitable reaction solution with (NH₄)₂SO₄ (Fermentas). The amplification protocol included an initial step of 3mn at 94°C, followed by 40 30sec cycles at 95°C, 1min at 58°C and 1min at 72°C, then 3min at 72°C and cooling at 4°C.

Purification of the PCR products

The products of genomic DNA amplification were separated in 1% Agarose gel and

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO: AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

Quadro I – Oligómeros de ADN utilizados neste trabalho e suas aplicações

Designação	Localização	Cadeia	Sequência	Aplicação
LTC04-038	Intrão 4	Directa	AGC TCC TGA GGT GTA GAC G	Amplificação de exões 5 e 6
LTC04-040	Intrão 6	Complementar	CCC GGA GGG CCA CTG AC	Amplificação de exões 5 e 6
LTC04-041	Intrão 6	Directa	CCC TGC TTG CCA CAG GTC	Amplificação de exões 7 a 9 Apoiar amplificação específica de M09
LTC04-039	Intrão 9	Complementar	GAA ACT TTC CAC TTG ATA AGA G	Amplificação de exões 7 a 9 Apoiar amplificação específica de M09
LTC04-056	Intrão 4	Directa	GCT ACA CAT GTT TGT TTC TTT G	Sequenciação de exões 5 e 6
LTC04-055	Intrão 7	Complementar	TAG TAT GGA AGA AAT CGG TAA G	Sequenciação de exão 7
LTC04-042	Intrão 7	Directa	ATG GGA CAG GTA GGA CCT G	Sequenciação de exões 8 e 9
LTC05-151	Exão 7	Directa	GGG CGG CAT GAA CCG GAT	Amplificação específica de M09
LTC05-152	Exão 7	Complementar	TGA TGG TGA GGA TGG GCA	Amplificação específica de M09

Table I – DNA Oligomers used in this study and their applications

Designation	Location	Chain	Sequence	Application
LTC04-038	Intron 4	Direct	AGC TCC TGA GGT GTA GAC G	Amplification of exons 5 and 6
LTC04-040	Intron 6	Complementary	CCC GGA GGG CCA CTG AC	Amplification of exons 5 and 6
LTC04-041	Intron 6	Direct	CCC TGC TTG CCA CAG GTC	Amplification of exons 7-9 Specific support amplification of M09
LTC04-039	Intron 9	Complementary	GAA ACT TTC CAC TTG ATA AGA G	Amplification of exons 7-9 Specific support amplification of M09
LTC04-056	Intron 4	Direct	GCT ACA CAT GTT TGT TTC TTT G	Sequentionation of exons 5 and 6
LTC04-055	Intron 7	Complementary	TAG TAT GGA AGA AAT CGG TAA G	Sequentionation of exon 7
LTC04-042	Intron 7	Direct	ATG GGA CAG GTA GGA CCT G	Sequentionation of exons 8 and 9
LTC05-151	Exon 7	Direct	GGG CGG CAT GAA CCG GAT	Specific amplification of M09
LTC05-152	Exon 7	Complementary	TGA TGG TGA GGA TGG GCA	Specific amplification of M09

e os fragmentos de tamanho esperado isolados e purificados por filtração por coluna de Sephadex-G50Fine (Amersham) e precipitação com etanol. Os precipitados foram lavados uma vez com uma solução de 70% etanol e ressuspendidos em 20 µl de uma solução de I₀TE (3 mM Tris.HCl, pH 7,5 e 0,2 mM EDTA).

fragments of the desired size isolated and purified by filtration by Sephadex-G50Fine column (Amersham) and precipitation with ethanol. The precipitations were lavaged once with a 70% ethanol solution and resuspended in 20µl of I₀TE (3mM Tris.HCl, pH 7.5 and 0.2mM EDTA).

Pesquisa de mutações

A pesquisa de mutações foi efectuada por sequenciação dos produtos de PCR com o *kit* BigDye v3.1, da Applied BioSystems, usando 1µl de produto de PCR e 50ng do oligómero adequado (indicado no Quadro I) num volume total de 5 µl, com o seguinte protocolo: Incubação inicial a 96°C durante 1 minuto, seguida de 35 ciclos de 15s a 96°C, 15s a 54°C e 2mn a 60°C, de uma incubação final de 4mn a de 60°C e de arrefecimento a 4°C. Os produtos de reacção foram purificados por filtração por coluna de Sephadex-G50Fine, misturados com 10 µl de formamida (Applied BioSystems) e analisados num sequenciador ABI prism 3100. As sequências obtidas foram analisadas por inspecção visual dos electroforetogramas e com o programa DNASIS v5.0-Demo (Hitachi). Nos casos em que foram detectadas mutações, estas foram confirmadas por repetição integral dos procedimentos de amplificação e sequenciação.

Clonagem de sequências mutantes

A clonagem de produtos de PCR onde haviam sido identificadas mutações foi feita por "clonagem T:A", usando o pTA4, um vector desenvolvido no laboratório para o efeito. Aproximadamente 30 ng de produto foram ligados a 10 ng de pTA4, previamente cortado com Eam1105I (Fermentas) e purificado por separação em gel e coluna de Sephadex. A reacção de ligação foi efectuada por incubação com 5 unidades de T4DNA ligase (Fermentas), num tampão adequado (Fermentas), num volume de 20 ml, a 16°C, por um período de 12-16h. Os produtos de ligação foram purificados por extracção com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol¹⁶. Após lavagem com etanol a 70%, os precipitados foram ressuspensos em 15 µl de uma solução

Research into mutations

Research into the mutations was done by sequentiation of PCR products with the BigDye v3.1 kit (Applied BioSystems), using 1µl of PCR product and 50ng of suitable oligomer (shown in Table I) in a total volume of 5µl, with the protocol as follows: initial incubation at 96°C for 1 minute followed by 35 15sec cycles at 96°C, 15sec at 54°C and 2min at 60°C with a final incubation of 4min at 60°C and cooling at 4°C. The reaction products were purified by filtration by Sephadex-G50Fine column, mixed with 10µl de formamide (Applied BioSystems) and analysed in ABI prism 3100 DNA sequencer. The sequences obtained were analysed by visual inspection of the electrophoretogram and using the DNASIS v5.0-Demo (Hitachi) program. Where mutations were detected, they were confirmed by repetition *in toto* of the amplification and sequentiation processes.

Cloning of the mutant sequences

Cloning of the PCR products wherein mutants were identified was achieved by T/A-based subcloning using TA4, a vector developed in the laboratory for that end. Approximately 30ng of the product were bound to 10ng of pTA4, previously cut with Eam1105I (Fermentas) and purified by separation in Sephadex gel and column. The ligation reaction was effected by incubation with 5 units of T4 DNA ligase (Fermentas) in a suitable solution (Fermentas) in a volume of 20ml at 16°C for a 12-16h period. The ligation products were purified by **extraction** with **phenol-chloroform** and precipitation with ethanol¹⁶. The precipitations were lavaged with a 70% ethanol solution and resuspended in 15µl of loTE. A third

de loTE. Um terço deste volume foi utilizado para transformar *E.coli* electrocompetentes (preparadas no laboratório) com um electroporador MicroPulser (Biorad). Após electroporação, as bactérias foram misturadas com 1 ml de LB (Pronadisa) contendo 100 mg/ml de ampicilina (Eurobio) e plaqueadas em LB-agar (Pronadisa) com igual concentração de ampicilina e incubadas a 37°C por 12-16h. Múltiplas colónias resultantes de cada transformação foram inoculadas em LB e incubadas a 37°C por 12-16h. O ADN plasmídico de cada uma foi isolado pelo método da *lyse* alcalina¹⁶ e utilizado em reacções de sequenciação com o oligómero LTC04-055, para identificar os clones contendo sequências mutantes. Foram feitos *stocks* de um clone contendo cada uma destas e de um clone com a sequência normal: após centrifugação de uma fracção das respectivas culturas e rejeição do sobrenadante, as bactérias foram ressuspendidas numa mistura 3:1 de LB (contendo ampicilina) e glicerol esterilizado e armazenadas a -80°C até utilização posterior.

Amplificação de ADN plasmídico

Foram feitos riscados dos clones armazenados a -80°C em placas de LB com ampicilina. O ADN plasmídico correspondente ao fragmento de p53 foi amplificado com os respectivos oligómeros (LTC04-041 e LTC04-039) directamente a partir de uma colónia “repicada” para uma mistura contendo todos os reagentes necessários à amplificação, em quantidades proporcionais às indicadas para as amplificações de ADN genómico, mas num volume final de 10 ml. As reacções de PCR foram feitas com o mesmo perfil de temperaturas das amplificações de ADN genómico, mas com apenas 35 ciclos de temperatura.

of this volume was used to transform electrocompetent *E.coli* cells (prepared in the laboratory) with a MicroPulser electroporator (Bio-rad Laboratories). After electroporation, the bacteria were mixed with 1ml of LB (Pronadisa, Spain) containing 100mg/ml of ampicillin (Eurobio) and LB-agar plates (Pronadisa, Spain) with an equal concentration of ampicillin and incubated at 37°C for 12-16h. The multiple colonies resulting from each transformation were inoculated in LB and incubated at 37°C for 12-16h. The plasmidic DNA from each one was isolated by the alkaline lysis method¹⁶ and used in sequencing reactions with the oligomer LTC04-055 to identify the clones containing mutant sequences. Stocks were harvested of a clone containing each one of these and of a clone with a normal sequence. After centrifugation of a portion of the respective cultures and discarding that rising to the surface, the bacteria were resuspended in a 3:1 LB mixture (containing ampicillin) and sterilised glycerol and stored at -80°C for later use.

Amplification of the plasmidic DNA

The clones stored at -80°C were streaked onto LB plates with ampicillin. The plasmidic DNA corresponding to a fragment of p53 was amplified with the respective oligomers (LTC04-041 and LTC04-039) straight from a transplanted colony to a mixture containing all the reagents necessary for amplification, in quantities proportional to those indicated for genomic DNA amplifications, but in a final volume of 10ml. The PCR reactions were made with the same profile as the temperatures of the amplifications of genomic DNA but with only 35 cycles of temperature.

Amplificação específica de ADN contendo mutações

A amplificação específica de sequências mutantes foi feita num volume de reacção de 25 ml, a partir de cerca de 15 ng de produtos de PCR de DNA plasmídico, em condições semelhantes às acima descritas, com as seguintes alterações: a) A concentração de cada nucleótido foi apenas de 0,125 mM; b) Foram usados apenas 20 ciclos de temperatura; c) O protocolo de termociclagem foi “assimptótico”, isto, é incluiu temperaturas de hibridação decrescentes – 5 x 64°C, 5 x 62°C e 10 x 60°C.

Resultados

No período de selecção de doentes para este estudo (Maio de 2004 a Junho de 2005), foi possível recolher, para estudo molecular, um total de 29 amostras clínicas, provenientes de 15 doentes com cancro do pulmão. As amostras obtidas e os resultados das extracções de ADN a partir delas estão discriminados no Quadro II. Como pode constatar-se pela análise do quadro, em 6 casos não foi possível obter ADN a partir da amostra, e noutros 3 o ADN obtido não apresentou qualidade suficiente para permitir a amplificação dos fragmentos desejados, o que reduziu o total de amostras passíveis de análise molecular para 20 (4 biópsias brônquicas, 6 lavados brônquicos, 5 escovados brônquicos e 5 amostras de expectoração), provenientes de 12 doentes. Para testar a possibilidade de análise molecular das amostras de ADN obtidas, procedemos a uma pesquisa de mutações no antioncogene p53, uma vez que este gene é o mais frequente alvo de mutações conhecido em cancro do pulmão e que há dados que indicam terem essas mutações valor prognóstico^{17,18,19}. A pesquisa de mutações cingiu-se aos exões 5 a 9 do p53, que codificam a zona central – funcionalmen-

Specific amplification of mutation-containing DNA

The specific amplification of mutant sequences was made in a reaction volume of 25ml, from around 15ng of PCR product of plasmidic DNA in conditions similar to those described above, with the following alterations: a) the concentration of each nucleotide was only of 0.125mM; b) Only 20 cycles of temperature were used; c) The thermocycling protocol was ‘asymptotic’ in that it included descending hybridization temperatures – 5 x 64°C, 5 x 62°C and 10 x 60°C.

Results

During the May 2004-June 2005 selection period of patients for this study it was possible to collect a total of 29 clinical samples from 15 lung cancer patients for molecular study. Table II details the samples obtained and the results of the DNA extraction from these. An analysis of the table shows that it was not possible to obtain DNA from the sample in 6 cases while in another 3 the DNA obtained was not of sufficient quality for an amplification of the desired fragments. This cut the total number of the samples suitable for molecular analysis to 20 (4 bronchial biopsies, 6 bronchial lavages, 5 bronchial brushings and 5 expectoration samples) which came from 12 patients.

We researched the mutations in the anti-oncogene p53 in order to test the possibility of a molecular analysis of the DNA samples obtained as this gene is the most common target of mutations known in lung cancer and data indicate these mutations have prognostic value^{17,18,19}. Research into mutations centres on exons 5-9 of p53. These codify the central zone of the corresponding protein. This zone is

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO:
 AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

Quadro II – Amostras clínicas para diagnóstico molecular e resultados das extracções de ADN

Doente	Anatomia patológica	Amostra			
		BB	LB	EB	Ex
D 01	CPNPC	sADN	sQld		sADN
D 02	CPNPC			sADN	
D 03	Adenocarcinoma			3E	
D 04	Adenocarcinoma			4E	
D 05	Adenocarcinoma			5E	
D 06	Adenocarcinoma			sADN	
D 07	Adenocarcinoma		7L		7X
D 08	CPNPC		8L		
D 09	CPPC	9B		9E	9X
D 10	Adenocarcinoma		sADN	sQld	10X
D 11	CPNPC		11L	sQld	
D 12	CPNPC	sADN			12X
D 13	CPPC	13B	13L		13X
D 14	Carcinoma epidermóide	14B	14L		
D 15	Adenocarcinoma	15B	15L	15E	

Abreviaturas: **CPNPC** – Carcinoma do pulmão não de pequenas células; **CPPC** – Carcinoma do pulmão de pequenas células; **sADN** – Extracção não forneceu ADN; **sQld** – ADN extraído não tinha qualidade para amplificação. Amostras designadas de acordo com o número do doente e o tipo (**BB** – biópsia brônquica; **LB** – lavado brônquico; **EB** – escovado brônquico; **Ex** – Expectoração).

Table II – Clinical samples for molecular diagnosis and results of the DNA extractions

Patient	Anatomic pathology	Sample			
		BB	BL	BBr	Ex
D 01	NSCLC	sDNA	sQld		sDNA
D 02	NSCLC			sDNA	
D 03	Adenocarcinoma			3Br	
D 04	Adenocarcinoma			4Br	
D 05	Adenocarcinoma			5Br	
D 06	Adenocarcinoma			sDNA	
D 07	Adenocarcinoma		7L		7Ex
D 08	NSCLC		8L		
D 09	SCLC	9B		9Br	9Ex
D 10	Adenocarcinoma		sDNA	sQld	10Ex
D 11	NSCLC		11L	sQld	
D 12	NSCLC	sDNA			12Ex
D 13	SCLC	13B	13L		13Ex
D 14	Epidermoid carcinoma	14B	14L		
D 15	Adenocarcinoma	15B	15L	15Br	

Abbreviations: **NSCLC** – Non-small cell lung cancer; **SCLC** – Small cell lung cancer; **sDNA** – Extraction did not supply DNA; **sQld** – DNA extracted was not of suitable quality for amplification. Samples designated in accordance with the number and type of patient (**BB** – bronchial biopsy; **BL** – bronchial lavage; **BBr** – bronchial brushing; **Ex** – Expectoration).

te mais importante – da correspondente proteína e onde se concentram 80% das mutações no p53²⁰. Foram testados diferentes protocolos de amplificação, por PCR, das sequências correspondentes aos cinco exões indicados, tendo-se finalmente optado por proceder a uma amplificação em dois segmentos, o primeiro contendo os exões 5 e 6 e o segundo os exões 7 a 9, de acordo com as condições indicadas (material e método). Seguidamente, compararam-se diferentes métodos de purificação dos produtos de PCR, tendo-se optado pela combinação electroforese em gel de agarose/filtração por coluna de Sephadex/precipitação com etanol, por proporcionar os melhores resultados na sequenciação dos produtos.

Os protocolos de amplificação, purificação e sequenciação estabelecidos foram então utilizados na análise dos ADN extraídos das amostras clínicas, tendo-se obtido os resultados indicados na Fig. 1 e nos Quadros III e IV – onde, para comparação, se incluem igualmente os resultados da avaliação anatomopatológica das amostras. Como pode verificar-se, foram detectadas mutações no p53 em 6 amostras de 4 doentes diferentes: 4 biópsias brônquicas, 1 lavado brônquico e 1 escovado brônquico. Em todos estes casos, a sequenciação detectou simultaneamente a sequência normal e uma sequência mutante, o que pode dever-se, quer ao facto de apenas um alelo do p53 estar afectado nos tumores, quer à presença de uma fracção importante de células não neoplásicas nas amostras. Esta segunda explicação parece mais provável, já que, nos casos em que as mutações foram detectadas em duas amostras do mesmo doente, as sequências normal e mutante estavam presentes em diferentes proporções. Estes resultados confirmam a possibilidade de realização de estudos de genética molecular em amostras clínicas de rotina de cancro de pulmão.

functionally the most important, and the one in which 80% of the p53 mutations concentrate²⁰. Different PCR amplification protocols were tested of the sequences corresponding to the five exons in question. The protocol finally selected was an amplification in two segments. The first segment contained the exons 5 and 6 and the second exons 7-9, in accordance with that described in the Material and Methods section above. Next different purification methods of the PCR products were compared and the one selected was an agarose gel electrophoresis/filtration by Sephadex column/precipitation with ethanol combination to obtain the best results in sequentiation of the products.

The established amplification, purification and sequentiation protocols were then used in the analysis of the DNA extracted from the clinical samples. The results gleaned are given in Fig. 1 and in Tables III and IV, which also include the findings of the anatomic pathology examination for purposes of comparison. It can be seen that p53 mutations were detected in 6 samples, from 4 different patients; 4 bronchial biopsies, 1 bronchial lavage and 1 bronchial brushing. In every case, the sequentiation detected the normal sequence and the mutant sequence simultaneously. This could be due to either the fact that only one p53 allele is affected by the tumours, or the presence of a significant portion of non-cancerous cells in the samples. This second explanation seems the more likely seeing as in the cases in which mutations were detected in two samples from the same patient, the normal and mutant sequences were present in different proportions. These results confirm the possibility of carrying out molecular genetic studies in routine clinical lung cancer samples.

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO:
 AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

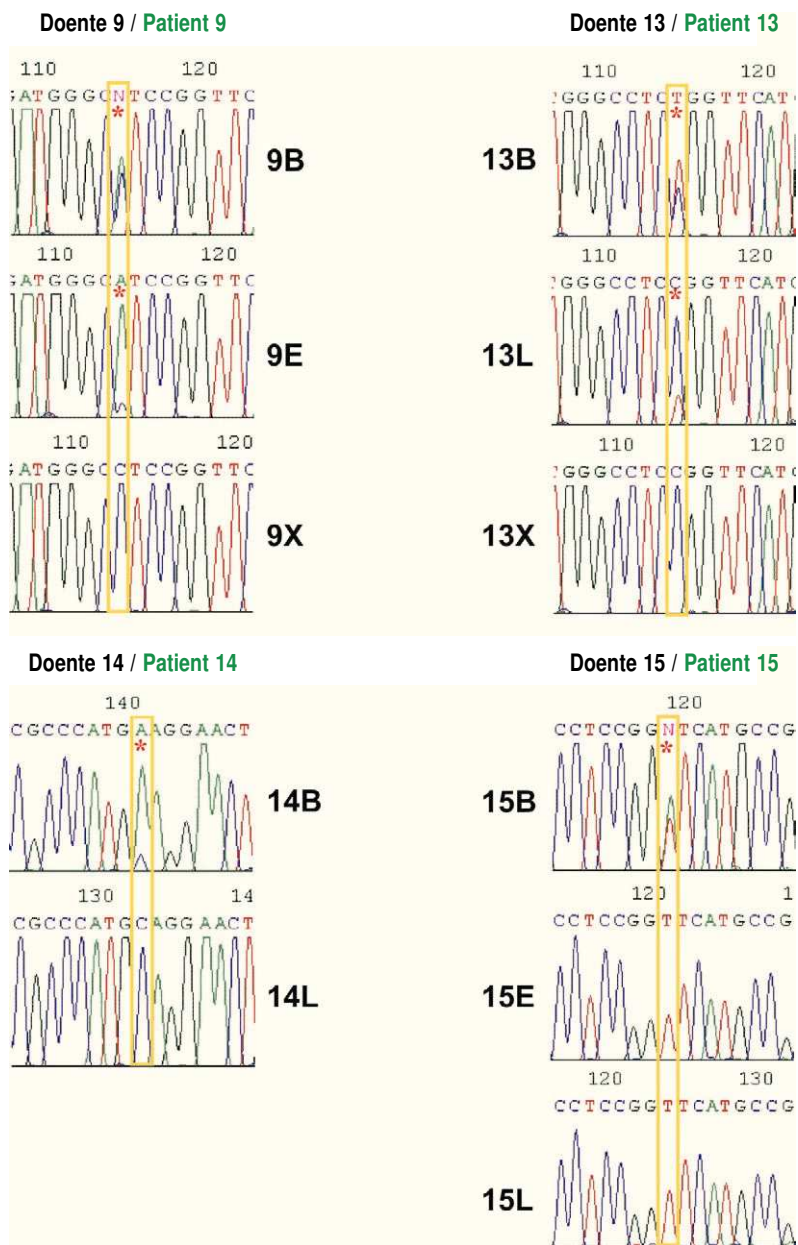


Fig . 1 – Identificação de mutações em amostras clínicas de cancro do pulmão. Pormenores dos electroforetogramas correspondentes à sequenciação do exão 7 de diversas amostras com o oligómero LTC04-055, mostrando a presença (*), ou não, de mutações. Amostras designadas de acordo com o número do doente e o tipo (**B** – biópsia brônquica; **L** – lavado brônquico; **E** – escovado brônquico; **X** – Expectoração).

Fig. 1 – Identification of the mutations in clinical lung cancer samples. Details of the electrophoretograms corresponding to sequentiation of exon 7 of various samples with the oligomer LTC04-055, showing the presence (*), or not, of mutations. Samples designated in accordance with patient number and type (**B** – Bronchial biopsy; **L** – Bronchial lavage; **E** – Bronchial brushing; **X** – Expectoration).

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO:
 AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

Quadro III – Resultados das análises anatomopatológica e molecular

Doente	Amostra e análise							
	BB		LB		EB		Ex	
	AP	Mol	AP	Mol	AP	Mol	AP	Mol
D 01	CPNPC		nAval		nAval		nAval	
D 02			NEG		CPNPC			
D 03			NEG		NEG	NEG		
D 04			NEG		NEG	NEG		
D 05			NEG		NEG	NEG		
D 06								
D 07			AdeCa	NEG			nAval	NEG
D 08			nAval	NEG				
D 09	CPPC	M09			CPPC	M09	nAval	NEG
D 10					AdeCa		NEG	NEG
D 11	CPNPC		CPNPC	NEG				
D 12	CPNPC						NEG	NEG
D 13	CPPC	M13	nAval	M13			nAval	NEG
D 14	CaEpi	M14	nAval	NEG				
D 15	AdeCa	M15	nAval	NEG	NEG	NEG		

Abreviaturas: **BB** – Biópsia brônquica; **LB** – Lavado brônquico; **EB** – Escovado brônquico; **Ex** – Expectoração; **AP** – Anatomopatológica; **Mol** – Molecular; **CPNPC** – Carcinoma do pulmão não de pequenas células; **CPPC** – Carcinoma do pulmão de pequenas células; **CaEpi** – Carcinoma epidermóide; **nAval** – Amostra não avaliada; **NEG** – Resultado negativo; **M** – Mutação detectada (indexada com o número do doente); **AdeCa** – Adenocarcinoma.

Table III – Anatomic pathology and molecular analysis results

Patient	Sample and Analysis							
	BB		BL		BBr		Ex	
	AP	Mol	AP	Mol	AP	Mol	AP	Mol
D 01	NSCLC		nEval		nEval		nEval	
D 02			NEG		NSCLC			
D 03			NEG		NEG	NEG		
D 04			NEG		NEG	NEG		
D 05			NEG		NEG	NEG		
D 06								
D 07			AdeCa	NEG			nEval	NEG
D 08			nEval	NEG				
D 09	SCLC	M09			SCLC	M09	nEval	NEG
D 10					AdeCa		NEG	NEG
D 11	NSCLC		NSCLC	NEG				
D 12	NSCLC						NEG	NEG
D 13	SCLC	M13	nEval	M13			nEval	NEG
D 14	EpiCa	M14	nEval	NEG				
D 15	AdeCa	M15	nEval	NEG	NEG	NEG		

Abbreviations: **BB** – Bronchial biopsy; **BL** – Bronchial lavage; **BBr** – Bronchial brushing; **Ex** – Expectoration; **AP** – Anatomic pathology; **Mol** – Molecular; **NSCLC** – Non-small cell lung cancer; **SCLC** – Small cell lung cancer; **EpiCa** – Epidermoid Carcinoma; **nEval** – sample not evaluated; **NEG** – Negative result; **M** – Mutation detected (indexed with the patient number); **AdeCa** – Adenocarcinoma.

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO: AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

Quadro IV – Características das mutações identificadas

Mutação	BB	LB	EB	Ex	Exão	Bases	Aminoácido	Códão
M09	+	ND	+	-	7	G:C → T:A	Arg → Met	249
M13	+	+	ND	-	7	G:C → A:T	Arg → Gln	242
M14	+	-	ND	ND	7	G:C → T:A	Cys → Phe	248
M15	+	-	-	ND	7	A:T → T:A	Asn → Ile	247

Abreviaturas: **BB** – Biópsia brônquica; **LB** – Lavado brônquico; **EB** – Escovado brônquico; **Ex** – Expectoração; **M** – Mutação detectada (indexada com o número do doente) **ND** – Amostra não disponível; abreviaturas dos aminoácidos de acordo com as convenções

Table IV – Characteristics of the mutations identified

Mutation	BB	BL	BBr	Ex	Exon	Bases	Amino-acid	Codon
M09	+	ND	+	-	7	G:C → T:A	Arg → Met	249
M13	+	+	ND	-	7	G:C → A:T	Arg → Gln	242
M14	+	-	ND	ND	7	G:C → T:A	Cys → Phe	248
M15	+	-	-	ND	7	A:T → T:A	Asn → Ile	247

Abbreviations: **BB** – Bronchial biopsy; **BL** – Bronchial lavage; **BBr** – Bronchial brushing; **Ex** – Expectoration; **M** – Mutation detected (indexed with the patient number) **ND** – No sample available; amino-acids abbreviated in accordance with the conventions

Por outro lado, como indicado nos Quadros III e IV, embora em dois casos as mutações tenham sido detectadas em duas amostras diferentes, em todos os casos com mutações pelo menos uma amostra proveniente do mesmo doente deu um resultado negativo na análise molecular. Em teoria, estes resultados poderiam ser devidos, quer à ausência de células tumorais nas respectivas amostras, quer a uma baixa sensibilidade do método de pesquisa de mutações utilizado. Para tentar distinguir entre estas duas possibilidades, começámos por avaliar a percentagem de ADN mutante que poderia ser detectada com segurança. Em primeiro lugar, clonaram-se, num vector adequado, os fragmentos de ADN contendo cada uma das sequências mutantes e também a sequência normal, gerando-se assim fontes de “sequências puras” dos diferentes tipos. O ADN plasmídico foi depois utilizado para obter produtos de PCR (amplificados com os mesmos oligómeros

On the other hand, Tables III and IV show that although in two cases the mutations were detected in two different samples, in every case with mutations at least one sample coming from the same patient gave a negative result in molecular analysis. In theory, these results may be attributed to either the absence of cancerous cells in the respective samples or to the low sensitivity of the method used to investigate the mutations. In order to distinguish between these two possibilities, we began by assessing the percentage of mutant DNA which can safely be detected. Firstly we cloned in a suitable vector the DNA fragments containing each of the mutant sequences and also a normal sequence, thus creating sources of ‘pure sequences’ of the different types. The plasmidic DNA was then used to obtain PCR products (amplified with the same oligomers used for the genomic DNA) with the various sequences.

usados para o ADN genómico) com as várias sequências. A sequenciação de diferentes misturas de produto normal e mutante – Fig. 2 – sugere que percentagens de ADN tumoral inferiores a 10% poderiam originar falsos negativos na análise molecular. Para melhorar esta sensibilidade, decidimos desenhar oligómeros capazes de discriminar entre as sequências normal e mutantes, de forma a tentar amplificar estas especificamente. A Fig. 3 exemplifica o tipo de resultado obtido: para a mutação M09, foi possível obter condições de amplificação capazes de detectar especificamente a sequência mutante numa mistura contendo mais de 99% de ADN normal.

The sequentiation of the different mixtures of the normal and mutant product – Fig. 2 – suggests that percentages of tumoral DNA lower than 10% can give rise to false negatives in molecular analysis. To raise this sensitivity, we decided to design oligomers capable of distinguishing between the normal and mutant sequences so as to specifically try to amplify these. Fig. 3 shows the type of result obtained; for the M09 mutation, it was possible to obtain amplification conditions capable of specifically detecting the mutant sequence in a mixture containing over 99% of normal DNA.

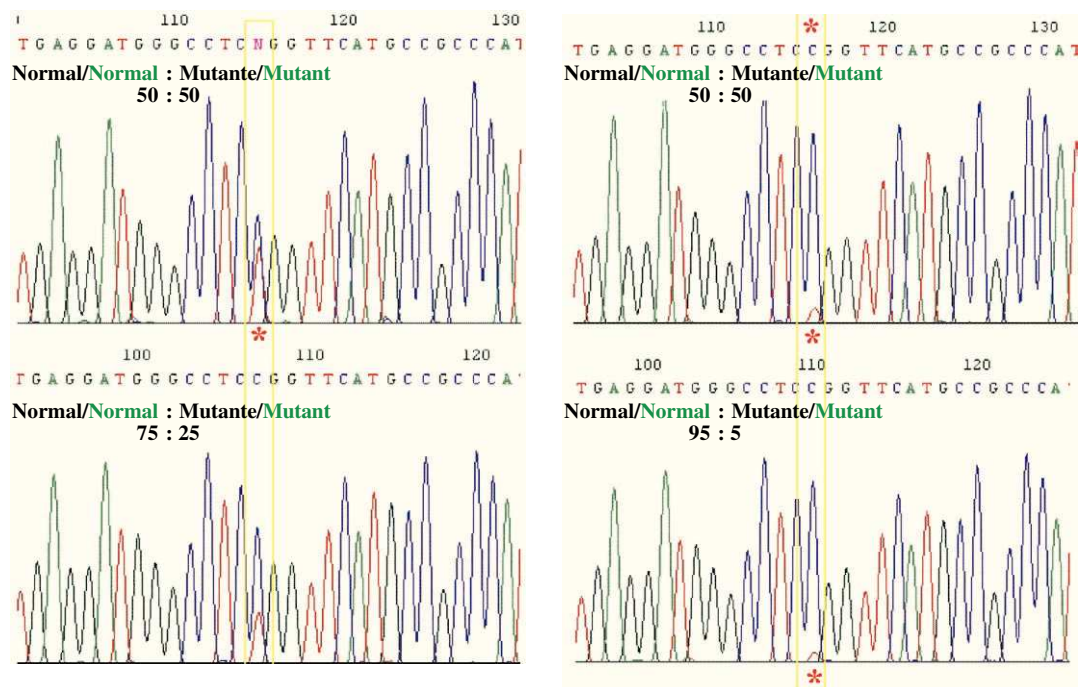


Fig. 2 – Avaliação da sensibilidade do método de detecção de mutações. Pormenores dos electroforetogramas correspondentes à sequenciação do exão 7 de diferentes misturas de produtos de PCR com sequências normal e mutante (M13). Para percentagens de ADN normal superiores a 90%, a identificação da mutação é pouco fiável.

Fig. 2 – Evaluation of the sensitivity of the mutation detection method. Details of the electropherograms corresponding to sequentiation of exon 7 of different mixtures of the PCR products with normal and mutant sequences (M13). Identification of mutation is not very reliable for percentages of normal DNA above 90%.

Diluições de M09 em NL (1 : n) / Dilutions of M09 in NL (1 : N)

Fig. 3 – Detecção de mutações específicas em amostras contendo pequenas fracções de ADN mutante. **A** – Teste de pares de oligómeros para amplificação específica de ADN mutante. As bandas de tamanhos correspondentes aos produtos de amplificação específicos da sequência mutante do p53 estão assinaladas com um asterisco. As reacções de PCR originam ainda outros produtos (pontas de seta). **B** – Amplificação específica da sequência mutante, a partir de diluições sucessivas de ADN mutante (M09) em ADN normal (NL), usando o par de oligos LTC04-041/LTC05-152 (155pb). A sequência mutante (*) é detectável até uma diluição de 1:128. É visível como, paralelamente à redução de produto específico, se dá um aumento na quantidade de produto inespecífico (ponta de seta).

Fig. 3 – Detection of specific mutations in samples containing small fractions of mutant DNA. **A** – Oligomer pairs test for specific amplification of mutant DNA. The bands with sizes corresponding to the specific amplification products of the mutant p53 sequence are marked with an asterisk. The PCR reactions give rise to yet more products (arrowheads). **B** – Specific amplification of mutant sequence, from the successive dilutions of mutant DNA (M09) in normal DNA (NL), using oligo pair LTC04-041/LTC05-152 (155pb). The mutant sequence (*) is detectable up to a dilution of 1:128. It is visible when, in parallel with reduction of specific product, the quantity of nonspecific product is increased (arrowhead).

Discussão e conclusões

O cancro do pulmão é um grave problema de saúde pública que afecta cerca de um milhão e duzentas mil e mata um milhão e cem mil pes-

Discussion and conclusions

Lung cancer is a serious public health problem affecting around one million, two hundred thousand people and killing one million,

soas por ano a nível mundial²¹. Uma vez que, na sua esmagadora maioria (85-90%), estes casos estão associados ao consumo do tabaco, a alteração radical dos hábitos tabágicos seria, em abstracto, a medida com maior impacto nestes números²². No entanto, dada a dificuldade em alterar os comportamentos humanos, e ainda o facto de o cancro do pulmão ser uma doença que se desenvolve durante um longo período de tempo, não parece provável conseguir, através apenas de medidas preventivas, uma redução drástica na incidência e mortalidade por cancro de pulmão nas próximas décadas. Do lado da terapia, constata-se – aliás como para outros tipos de tumores – que a ablação cirúrgica representa de longe a melhor opção, indicando que é fundamental melhorar, por um lado, o diagnóstico e, por outro, os tratamentos não cirúrgicos. Em teoria, o progresso da genética molecular dos tumores deve abrir novas possibilidades em ambos os domínios, já que permitirá: 1) Uma classificação mais precisa dos tumores, com as consequentes vantagens ao nível do prognóstico e da escolha das abordagens terapêuticas; 2) A identificação de alvos terapêuticos, contribuindo assim para o desenvolvimento e aplicação de novos fármacos mais específicos e eficazes; 3) A identificação de grupos de indivíduos com risco acrescido de desenvolvimento da doença; 4) A detecção precoce – potencialmente por métodos não invasivos – dos tumores; 5) O estabelecimento de métodos mais sensíveis de acompanhamento de doentes para avaliação da evolução da doença, incluindo detecção “precoce” de recidivas; 6) Melhorar a sensibilidade na avaliação de amostras clínicas, como margens cirúrgicas ou biópsias ganglionares, com as consequentes melhorias no estadiamento e tratamento da doença. Embora algumas destas aplicações não sejam ainda possíveis, em particular no cancro

one hundred thousand people per year worldwide²¹. Seeing as the overwhelming majority (85-90%) of these cases is associated to smoking, a sweeping change in smoking habits would in theory be the measure to have the greatest impact on these numbers²². This said, given the difficulty in changing human behaviour, and also given the fact that lung cancer is a disease which develops over a long period of time, it does not seem likely that a drastic reduction in the incidence and mortality rate of lung cancer will be achieved through preventative measures only over the coming decades. In terms of treatment, it is felt – just as it is for other types of tumours – that surgical excision is by far the best option, meaning that it is fundamental to improve both the diagnostic process and the non-surgical treatments. In theory, progress in the molecular genetics of tumours should open up new possibilities in both domains, as it allows: 1) A more precise classification of tumours, which has advantages for prognosis and choice of treatment option; 2) The identification of therapeutic targets, adding to the development and application of new, more specific and efficacious pharmaceutical products; 3) The identification of groups of individuals with a higher risk of developing the disease; 4) The early detection of tumours, potentially through non-invasive methods; 5) The establishing of more sensitive methods of monitoring patients to evaluate progression of the disease, including early detection of reoccurrences; 6) Improved sensitivity in the evaluation of clinical samples, such as surgical margins or ganglia biopsies, which brings better prospects for the disease’s staging and treatment. While some of these applications are not yet possible, particularly in lung cancer, which is less understood at a molecular

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO: AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespanhol

do pulmão, por ser menos compreendido a nível molecular do que outros tumores (como o cancro do cólon e recto), parece-nos que estão já reunidas as condições técnicas para a sua introdução na rotina clínica.

O presente trabalho, inserido no nosso plano de levar a cabo a transposição de técnicas do laboratório de investigação para a prática clínica, teve como objectivo primário identificar as principais dificuldades de ordem prática a essa implementação. Neste sentido, os resultados apresentados no Quadro II são muito esclarecedores. Em primeiro lugar, o número de doentes dos quais foi possível recolher pelo menos uma amostra clínica para análise molecular durante um período de 13 meses foi de apenas 15, ou pouco mais de um por mês, o que é muito inferior ao número de casos diagnosticados no mesmo período. Segundo, em cerca de 20% dos casos não foi possível purificar ADN das amostras e noutros 10% o ADN obtido não era de suficiente qualidade para a análise, o que reduziu o número de doentes efectivamente incluídos no estudo a doze – menos de um por mês. Terceiro, mesmo considerando apenas estes doze doentes, o número total de amostras foi pequeno: 20, de um máximo possível de 48, na maioria dos casos estando apenas uma amostra de cada doente disponível para análise molecular. Todos estes dados mostram que o principal obstáculo à introdução da genética molecular na rotina clínica por nós encontrado foi a dificuldade de obtenção de amostras, em particular com ADN de qualidade. Para tentar resolver este problema, é necessário compreender as suas causas. Nalguns casos, a ausência de amostra será devida às particularidades do exame de diagnóstico: se, por exemplo, não for observada uma área suspeita durante a bron-

level than other tumours (such as cancer of the colon and cancer of the rectum), we feel the applications already meet the technical conditions that will allow them to be introduced into routine clinical practice.

Our study is part of our plan to transpose laboratory investigation techniques into clinical practice. As such, its main aim is to identify the main practical barriers to this implementation. Accordingly, the results shown in Table II bring a great deal to bear here. Firstly, during a 13 month period the number of patients from whom it was possible to collect at least one clinical sample for molecular analysis was only 15. This translates as just over one per month, which is markedly lower than the number of cases diagnosed in the same time period. Secondly, it was not possible to purify the DNA in the samples in approximately 20% of the cases and in a further 10% the DNA obtained was not of sufficient quality to analyse. This cut down the number of patients effectively included in the study to twelve – less than one per month. Thirdly, even considering only these twelve patients, the total number of samples was small; 20 from a possible maximum of 48 and in the majority of cases, only one sample from each patient was available for molecular analysis. All these data evidence that the main barrier we found to the introduction of molecular genetics into clinical routine was the difficulty in obtaining samples, in particular those with quality DNA. It is necessary to understand the causes of this problem to try to solve it. In some cases, the lack of a sample is a result of the characteristics of the diagnostic exam. For example, if a suspect area is not seen during the bronchoscopy, a biopsy is not carried out, or if a patient experiences problems during the ex-

cofibroscopia, não é feita uma biópsia; ou, se o doente tiver problemas durante o exame, este pode ter que ser interrompido antes de se obterem todas as amostras pretendidas. No entanto, este tipo de situação dificilmente pode explicar o baixo número de doentes incluídos no estudo. A explicação mais plausível é que o reduzido número de amostras se deve à não incorporação da colheita na rotina clínica – o que pode igualmente explicar a significativa percentagem de amostras que não fornecem ADN de qualidade (ou o não fornecem de todo); estas resultam provavelmente da secundarização das amostras para análise molecular em relação às usadas para diagnóstico anatomopatológico. Evidentemente, esta secundarização – que tem a sua expressão mais evidente na utilização das amostras inicialmente destinadas a análise molecular para o diagnóstico anatomopatológico, em caso de necessidade – é plenamente justificada do ponto de vista ético, já que é no melhor interesse do doente. Contudo, ela dá origem a uma situação de difícil resolução: a análise molecular é secundarizada porque não é parte do *standard* da rotina (se o fosse não se utilizariam para outros fins amostras a ela destinadas) e essa secundarização é o principal obstáculo à sua introdução na rotina. A resolução do problema deverá passar por uma sensibilização dos clínicos para a utilidade das análises moleculares; deste modo, será possível aumentar gradualmente o número de amostras recolhidas e, conseqüentemente, estabelecer e otimizar protocolos que consolidem a genética molecular como meio auxiliar de diagnóstico.

Os resultados por nós obtidos deverão, esperamos, contribuir para este processo de sensibilização. De facto, mesmo com o protocolo relativamente simples utilizado, foi possível

amination, the examination could be halted before the desired samples are obtained. While these types of troublesome situations may perhaps go a little way towards explaining the low number of patients included in the study, the most plausible explanation is that the reduced number of samples is due to sample collection not being part of clinical routine. This could equally explain the significant percentage of samples which did not yield quality DNA (or any at all); these probably came from secundarisation of the samples for molecular analysis in relation to the samples used for anatomic pathology diagnosis. It is evident that this secundarisation, most strongly expressed when samples originally destined for molecular analysis are used for anatomic pathology diagnosis, should this need arise, is fully justified from an ethical viewpoint in that it is in the patient's best interest. However, it gives rise to a situation that is difficult to resolve; the 'Cinderella' status of molecular analysis is a result of this form of analysis playing no part in standard routine practice. If it did, samples scheduled for molecular analysis would not be used for other purposes. This secundarisation is the biggest barrier to introducing molecular analysis into routine practice. Solving the problem must involve sensitising clinics to the usefulness of molecular analysis. This would make it possible to gradually increase the number of samples collected and consequently establish and optimise protocols which firm up the role of molecular genetics as an auxiliary diagnostic tool.

The results we obtained will, we hope, serve as a contribution to this sensitisation process. On this head, even with the relatively simple protocol used, detecting mutations in the sam-

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CANCRO DO PULMÃO: AVALIAÇÃO DAS LIMITAÇÕES AO SEU USO NA ROTINA CLÍNICA

Joana Espiga Macedo, Ângela M S Costa, Inês A M Barbosa, Sandra Rebelo, Conceição Souto de Moura, Luís Teixeira da Costa, Venceslau Hespagnol

detectar mutações nas amostras de um terço dos doentes (4 em 12). Se, por outro lado, se excluirmos os dois casos em que as únicas amostras disponíveis eram de expectoração – para as quais, por razões técnicas (vide abaixo), é provável que o método utilizado não tenha sensibilidade suficiente – e se tiver em conta que a percentagem de mutação do p53 no cancro do pulmão ronda os 60%, verifica-se que a *aplicação prática* da análise molecular foi muito bem sucedida, com uma eficiência próxima do máximo teórico²³.

Uma análise mais pormenorizada dos resultados apresentados nos Quadros III e IV dá uma ideia mais precisa do que já foi conseguido e do que é importante melhorar na metodologia de análise molecular utilizada. Do lado positivo, constata-se que se detectaram mutações em todas (4/4) as amostras de biópsias; que a fracção de sucesso diagnóstico exclusivamente por análise molecular (4/10, excluindo as expectorações) é comparável às verificadas para análise anatomopatológica de escovados brônquicos (3/7) ou lavados brônquicos (2/6); que em nenhum caso há evidência de se ter falhado a detecção de uma mutação numa amostra em que ela estava presente – já que as duas amostras de escovados brônquicos negativas na análise molecular e positivas na análise anatomopatológica podem corresponder a tumores sem mutações no p53. Por outro lado, estas duas amostras efectivamente indicam a principal limitação da metodologia empregue (e, em certa medida, da análise molecular disponível para o cancro do pulmão): sensibilidade. Quando se consideram apenas as amostras disponíveis tanto para análise anatomopatológica como molecular, esta identificou 4 dos 6 casos diagnosticados por aquela. Se é verdade que a ausência de mutações

was possible. Moreover, if we exclude the two cases in which the only samples available were sputum samples (for which it is probable that the method used for technical reasons did not have the required degree of sensitivity, see below) and bear in mind that the percentage of p53 mutation in lung cancer is around 60%, it can be seen that the practical application of molecular analysis was very successful, showing an efficacy close to that of its theoretical maximum²³.

The more detailed analysis of the results which is given in Tables III and IV conveys a more precise idea of that which was achieved and that which it is important to improve in the molecular analysis methodology used. On a plus note, if mutations were detected in all (4/4) of the biopsy samples, then the success rate for diagnosis exclusively by molecular analysis (4/10, with the sputum samples excluded) is comparable to that seen in the anatomic pathology analysis of bronchial brushings (3/7) or bronchial lavages (2/6). Further, no case bore evidence of a failed detection of a mutation in a sample in which it proved to be present, if we consider that the two bronchial brushing samples which were negative in the molecular analysis and positive in the anatomic pathology analysis could correspond to tumours without p53 mutations. Conversely, these two samples effectively indicate the main limitation of the methodology employed; sensitivity, a limitation to some degree of the molecular analysis available for lung cancer. When we consider only the samples available for both anatomic pathology analysis and molecular analysis, the latter's sensitivity allowed identification in 4/6 cases,

A identificação de alterações moleculares em genes específicos permite, mais do que o diagnóstico, uma classificação mais completa dos tumores

no p53 pode explicar os restantes dois casos, isso implica que a pesquisa de mutações somente no p53 – pelo menos tal como empregue aqui – é menos sensível do que a análise anatomopatológica. Isto, por sua vez, pode parecer sugerir que não há vantagem na utilização presente das técnicas moleculares em cancro do pulmão. Para esclarecer este ponto, devemos, em primeiro lugar, salientar que o p53 foi escolhido apenas como um exemplo, para testar a possibilidade de introdução da genética molecular na rotina clínica. Existem múltiplas alterações genéticas nos tumores do pulmão, e espera-se que a lista de alvos genéticos a testar venha a crescer rapidamente, em particular em resultado de buscas em larga escala⁸. Para além disso, e como foi referido, a identificação de alterações moleculares em genes específicos permite, mais do que o diagnóstico, uma classificação mais completa dos tumores – o que tem implicações no prognóstico e nas decisões terapêuticas. Mesmo no caso do p53, há evidência nesse sentido, embora aparentemente só para tumores em estádios mais precoces, mas no caso do EGFR (e outros deverão seguir-se-lhe) as coisas são muito mais claras, com excelentes respostas à terapia nos casos de tumores com mutações específicas na zona do gene que codifica o domínio catalítico da proteína^{18,24,25}.

Há, no entanto, um segundo problema de sensibilidade que não pode ser resolvido com o estudo de mais alvos moleculares. Como já referido, as discrepâncias observadas nos resultados da análise molecular de diferentes amostras dos mesmos doentes (Quadros III e IV) podem ser devidos a uma baixa sensibilidade do método de pesquisa de mutações utilizado – que estimamos poder produzir falsos negativos para amostras com

as compared with the former's 6/6. If it is correct that the absence of p53 mutations can explain the remaining two cases, this implies that the investigation of p53 mutations only – at least as used here – is less sensitive than anatomic pathology analysis. This in its turn could suggest that there is no advantage in the current use of molecular techniques in lung cancer. To clarify this point, we should firstly underline that the p53 was only chosen as an example, to test the possibility of introducing molecular genetics into clinical routine. There are multiple genetic alterations in lung tumours and it is expected that the list of genetic targets to test will grow rapidly, in particular as a result of large-scale searches⁸. Beyond this, and as mentioned above, the identification of molecular alterations in specific genes allows more than diagnosis; it allows a more complete classification of tumours, which has implications for prognosis and treatment options. While there is evidence of this even in the case of p53, although seemingly only for tumours at early stages, things are much clearer in the case of EGFR (to be followed by others), with excellent responses to treatment in the cases of tumours with specific mutations in the zone of the gene which codifies the catalytic domain of protein^{18,24,25}. There is also a second problem of sensitivity, one which cannot be resolved by the study of more molecular targets. As already stated, the discrepancies seen in the results of the molecular analysis of different samples from the same patients (Tables III and IV) may be due to the low sensitivity of the method of research into the mutations which was used. We estimate this could yield false negatives in

percentagens de ADN mutante inferiores a 10%. Do mesmo modo, não podemos excluir que os dois casos com discrepâncias entre as análises molecular e anatomopatológica sejam devidos a esta limitação de sensibilidade. Finalmente, afigura-se-nos muito provável que as amostras de expectoração contenham uma fracção relativamente pequena de ADN tumoral – e portanto que este possa não ter sido detectado, ainda que contivesse mutações no p53. Isto significa que o protocolo por nós adoptado é adequado para amostras ricas em ADN tumoral – como em geral se espera que sejam as biópsias –, mas a sua sensibilidade pode tornar-se limitante à medida que a fracção de ADN tumoral vai diminuindo. Esta limitação de sensibilidade pode ser superada através de diferentes abordagens – consoante a aplicação pretendida. Uma delas, por nós adoptada neste estudo, consiste em empregar métodos de detectar mutantes *específicos*. Estes métodos, já anteriormente usados em cancro do pulmão²⁶, são actualmente capazes, graças a melhoramentos significativos nos últimos anos, de detectar uma molécula mutante entre dez mil normais^{27,28}. São adequados para aplicações em que a mutação em causa foi previamente identificada, como análises de margens cirúrgicas e gânglios linfáticos, ou detecção e quantificação de doença residual – e, conseqüentemente, de detecção precoce de recidiva –, inclusivamente a partir de amostras não invasivas^{26,29-31}. São menos apropriados para aplicações como a detecção precoce de doença, ou a identificação de subgrupos de risco, a não ser nos raros tumores frequentemente associados a mutações muito específicas³². Para a maior parte dos tumores, como o cancro do pulmão, existem três opções principais: 1) A modifi-

samples with mutant DNA percentages lower than 10%. In the same way, we cannot exclude that the two cases with discrepancies between the molecular and anatomic pathology analysis may be due to this limit in sensitivity. Finally, we deem it very likely that the sputum samples contain a relatively small amount of tumoral DNA, which may not have been detected even if it contained p53 mutations. This means that while the protocol we adopted is suitable for samples rich in tumoral DNA – as biopsies are generally expected to be – its sensitivity could become limiting as the tumoral DNA fraction decreases. This limitation to the sensitivity could be overcome through different approaches used in line with the application desired. One of them, which we adopted in this study, consists of using methods of detecting specific mutants. These methods, already used in lung cancer²⁶, are currently capable of detecting one mutant molecule among ten thousand normal ones, thanks to significant improvements in the last few years^{27,28}. They are suitable for applications in which the mutation in cause has been previously identified, such as analysis of the surgical margins and lymphatic ganglions, or the detection and quantification of the residual disease – and consequently of early detection of reoccurrence – solely from the non-invasive samples^{26,29-31}. They are less suitable for applications such as the early detection of disease, or the identification of risk sub-groups, unless in the rare tumours commonly associated to very specific mutations³². There are three main options for the greater part of tumours, such as lung cancer: 1) The mod-

cação do procedimento de identificação de mutações por nós utilizado por inclusão de um passo de fraccionamento dos produtos amplificados (por exemplo por clonagem), seguida de análise de muitas fracções³³ – uma opção difícil de transpor para a rotina clínica, dada o seu elevado custo em mão-de-obra e recursos materiais. 2) O desenvolvimento de métodos de detecção de mutações baseados em testes de função proteica, em microrganismos ou células de mamíferos – uma abordagem ainda muito experimental que pretendemos explorar a médio prazo. 3) A optimização de métodos de detecção simultânea de múltiplas mutações específicas – que, conjugada com dados estatísticos sobre a ocorrência de mutações²³, deverá permitir a detecção precoce de um número crescente de tumores. Como decorre dos resultados aqui apresentados, os nossos esforços deverão concentrar-se, no futuro próximo, no estabelecimento deste tipo de metodologias e sua aplicação no refinamento do diagnóstico, no seguimento de doentes e na implementação de programas de rastreio de cancro do pulmão com base molecular.

Agradecimentos

Agradecemos aos membros do Serviço de Pneumologia do Hospital de S. João o auxílio prestado na recolha de amostras para este estudo. Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, através do projecto “Análise do Papel do p53 na Instabilidade Cromossómica em Tumores” (POCTI/MGI/48201/ 2002) e da Bolsa de Investigação de Ângela MS Costa (SFRH/BI/11777/2003) e pela Fundação Calouste Gulbenkian, através do projecto “Utilização Clínica dos Alvos Genéticos do Tabaco” (UCAGT/2006).

ification of the mutation identification procedure we used, to include a step of fractioning of the amplification products (by cloning, for example), followed by analysis of the fractions³³ – a option which is difficult to transpose to routine clinical practice given its high costs in terms of manpower and material resources. 2) The development of mutation detection methods based on protein function tests in micro-organisms or mammalian cells – a still very experimental approach which we intend to explore in the medium-term. 3) The refinement of simultaneous detection methods of specific multiple mutations which, taken in conjunction with statistical data on the occurrence of mutations²³ should allow the early detection of an increasing number of tumours. As the results we present show, our efforts should focus in the near future on the establishing of these types of methodologies and their use in refining diagnosis, monitoring patients and the implementation of molecular-based lung cancer tracking programmes.

Acknowledgements

Thanks are due to the members of the Pulmonology Unit at the Hospital de S. João for their help in collecting the samples for this study. This study received financial support from the *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* (Foundation for Science and Technology) through the “Analysing the role of p53 in chromosomal instability in tumours” project (POCTI/MGI/48201/ 2002), Ângela MS Costa’s Research Grant (SFRH/BI/11777/2003) and the Calouste Gulbenkian Foundation, through the “Clinical use of the genetic targets of tobacco” project (UCAGT/2006).

Bibliografia / Bibliography

1. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
2. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, López-Campos JL, Candelera RO, Matutes CR. Joinpoint regression analysis of lung cancer mortality, Andalusia 1975-2000. *Ann Oncol* 2004; 15: 793-796.
3. Boyle P & Dresler C. Preventing the lung cancer epidemic. *Ann Oncol* 2005; 16: 1565-1566.
4. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* 53:5-26
5. Mountain CF. Revisions in the International Systems for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111:1710-1717.
6. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194:23-8.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-67.
8. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314:268-74.
9. American Joint commission for cancer. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven 1998.
10. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:1634-1637.
11. Keohavong P, Gao W-M, Zheng K-C, Mady H, Lan Q, Melhaen M, Mumford J. Detection of K-ras and p53 mutations in sputum samples of lung cancer patients using laser capture microdissection microscope and mutation analysis. *Analyt Biochem* 2004;324:92-99.
12. Ahrendt SA, Chow JT, Li-Hua Xu, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker AP, Jen J, Sidransky D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 1999;91:4: 332-339.
13. Ferretti G, Curigliano G, Pastorino U, Cittadini A, Eflamini G, Grazia M, De Pas CT, Orlando L, Mandala M, Colleoni M, Spaggiari L, Granone PL, Pagliari G, Braud P, Fazio N, Goldhirsch A. Detection by denaturant gradient gel electrophoresis of tumor-specific mutations in biopsies and relative bronchoalveolar lavage fluid from resectable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2393-2400.
14. Powell CA, Klares S, O'Connor G, Brody JS. Loss of Heterozygosity in epithelial cells obtained by bronchial brushing: Clinical utility in lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2025-2034.
15. Sozi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA, Tavecchio L. Analysis and circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61:4675-4678.
16. Joseph Sambrook, David W Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
17. Viktorsson K, Petris LD, Lewensohn R. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:868-880.
18. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Abelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis and angiogenesis and biomarkers in non-small cell lung cancer: A Review. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (11): 3974-3986.
19. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa, Takahashi. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a Meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4055-4063
20. Meyerson M, Franklin WA, Kelly MJ. Molecular classification and molecular genetics of human lung cancer. *Semin Oncol* 2004; 31(1;Suppl 1):4-19.
21. Ferlay J, Bray F, Pisani P *et al.* *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase N° 5, Version 2.0*. Lyon, IARC Press: 2004
22. Borràs JM, Fernandez E, Gonzalez JR, Negri E, Lucchini F, La Vecchia C, Levi F. Lung cancer mortality in European regions (1955-1997). *Ann Oncol* 2003;14:159-161.
23. Hernandez-Boussard TM, Hainaut P. A specific spectrum of p53 Mutations in lung cancer from smokers: Review of mutations Compiled in the IARC p53 database. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106 (7).
24. Eberhard DA, Johnson BE, Ameler LC *et al.* Mutations in the epidermal growth factor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23:5900-5909.
25. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC *et al.* Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Eng J Med* 2005; 353:133-144.
26. Ahrendt SA, Yang SC, Wu L, Roig CM, Russell P, Westra WH, Jen J, Brock MV, Heitmiller RF, Sidransky

- D. Molecular assessment of lymph nodes in patients with resected stage I non-small cell lung cancer: Preliminary results of a prospective study. *J Thorac Cardiovas Surg* 2002; 123:3:466-474.
27. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8817-22.
28. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods* 2006; 3:95-7.
29. Jassem J, Jassem E, Bkiewicz-Banecka JJ, Rzyman W, Badzio A, Dziadziuszko R, Kobierska-Gulida G, Szymanska A, Skrzypski M, Zylicz M. P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;100:1951-1960.
30. Masasyeva BG, Tong BC, Brock MV, Pilkington T, Goldenberg D, Sidransky D, Harden S, Westra WH, Califano J. Molecular margin analysis predicts local recurrence after sublobar resection of lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 113:1022-1025.
31. Dai Y, Morishita Y, Mase K, Sato N, Akaogi E, Mitsui T, Noguchi M. Application of the p53 and K-ras gene mutation patterns for cytologic diagnosis of recurrent lung carcinomas. Combined Analysis with Microdissection and Polymerase Chain Reaction–Single-Strand Conformation Polymorphism. *Cancer* 2000; 90:258-263
32. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, Nikiforov YE, Troncone G, Palombini L, Basolo F, Santoro M. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5175-80.
33. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res*. 1994; 54:3025-33.