

Renato José da Silva Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PREDITIVOS DA RESPOSTA ÀS TERAPIAS
ANTI-EGFR EM TUMORES SÓLIDOS: ÊNFASE EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientador: Prof. Dr. André L. Carvalho

Barretos, SP
2016

Renato José da Silva Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PREDITIVOS DA RESPOSTA ÀS TERAPIAS
ANTI-EGFR EM TUMORES SÓLIDOS: ÊNFASE EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientador: Prof. Dr. André L. Carvalho

Barretos, SP
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renato José da Silva Oliveira

Identificação de novos biomarcadores preditivos da resposta às terapias anti-EGFR em tumores sólidos: ênfase em tumores de cabeça e pescoço

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 02/06/2016

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Elizabete Silva

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Biologia - UNESP

Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola

Instituição: Instituto Nacional de Câncer, Divisão de Biologia Celular - INCA

Prof. Dr. Roger Chammas

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia - USP

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Prof.^a Dra. Céline Marques Pinheiro

Presidente da Banca

“Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.”

Dedico este trabalho a minha mãe,
avó e meu irmão que souberam
compreender minha ausência.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Célia Martins** e todos os meus familiares, que sempre compreenderam as minhas faltas e as inúmeras ocasiões onde o trabalho exigiu um pouco mais da minha atenção. Mãe obrigado pelos esforços para garantir que eu continuasse a trilhar meu caminho nos estudos. Sem dúvida foram estes esforços que não me deixaram desistir.

Ao professor **Dr. Rui Reis**, meu orientador, pelo incentivo e por acreditar em meu trabalho. Obrigado pela confiança e paciência com um aluno e funcionário que sonhava um dia em fazer ciência. Serei sempre grato por permitir que eu explorasse novos caminhos do conhecimento que me levaram ao crescimento profissional.

Ao meu co-orientador **Dr. André Lopes Carvalho**, pela ajuda e disponibilidade em auxiliar nas fases deste trabalho.

Ao professor **Dr. Roger Chammas**, pela atenção e disponibilidade na condução das bancas de acompanhamento.

À amiga, professora e **Dra. Olga Martinho** por todo apoio científico e inspiração. Obrigado por me alimentar de esperança, nas inúmeras vezes que pensei estar trilhando por caminhos errados. Sou eternamente agradecido pela mudança profunda que provocou na minha vida profissional, me ensinando o real sentido da investigação científica, e pessoal, quando dizia que eu seria capaz.

À uma grande amiga e incentivadora **Dra. Rosy Iara**, pelas conversas, desabafos, confiança e pela parceria que começou na graduação com um lindo projeto de iniciação científica.

À grande amiga **Adriana Cruvinel**, pela disponibilidade e incansável vontade de me ajudar sempre que preciso, pelos ensinamentos e experimentos. Obrigado por dividir momentos de angustias, felicidade e fazer parte da minha história.

À **Dra. Viviane Aline**, pela parceria, consideração e amizade. Gostaria de agradecer por me fazer enxergar outro ponto de vista sempre que o desespero me deixava sem ação.

Aos amigos de bancada **Karina Pepineli, Weder Menezes**; à minha amiga e aluna preferida **Fernanda Cury**, pelas risadas e boa vontade em ajudar sempre. À recém chegada a bancada, **Izabela Faria**, muito obrigado pelo apoio. Obrigado a todos pelo carinho e os bons momentos em nosso espaço compartilhado. À **Cintia Perin**, pelo carinho e vibrações positivas recebidas nos momentos mais difíceis.

Aos amigos, **Matias Melendez, Adriane Feijó, Macela Nunes, Flávia Escremim, Dr. Luciano Viana** e **Giovanna Longato**, pela atenção e colaboração nas inúmeras fases deste trabalho.

Aos amigos os quais considero a minha família Barretense: **Luiz Viana, Flávia Eguchi, Natália Campacci, Thiago Camargo, Maicon Zanon, Marcio Saito, Carol Laus, Abel Queiroz, Cleyton Zanardo, Letícia Yamane** e **Marco Antonio**. Barretos não teria o mesmo sentido se eu não tivesse a oportunidade de conhecer o melhor de cada um de vocês. Os momentos de descontração que vivemos juntos fizeram a diferença nesta jornada.

Ao **CPOM** (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular), **EPIT** (Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica) e **Departamento de Pós-Graduação**, pelo excelente trabalho prestado pelos funcionários à frente de cada setor, são vocês que fazem do Hospital de Câncer de Barretos um lugar incrível.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com meu trabalho e crescimento profissional, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

**“A ciência nunca resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez”**

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer	1
1.2	Câncer de cabeça e pescoço	3
1.2	Receptores tirosina quinases (RTK)	5
1.3	Família ErbB	6
1.4	Ativação do receptor ErbB1 (EGFR)	8
1.5	O papel do EGFR no desenvolvimento tumoral	9
1.5.1	Fatores parácrinos/autócrinos	10
1.5.2	Amplificação do gene <i>EGFR</i>	12
1.5.3	Mutações do gene <i>EGFR</i>	12
1.5.4	Translocação nuclear do EGFR	14
1.5.5	Transativação do EGFR mediada por GPCRs	14
1.6	EGFR como terapia alvo: Inibidores de proteínas tirosina quinases	15
1.6.1	Anticorpos monoclonais anti-EGFR	16
1.6.1.1	Cetuximabe	16
1.6.1.2	Panitumumabe	18
1.6.1.3	Nimotuzumabe	18
1.6.1.4	Zalutumumabe	19
1.6.2	Pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinases (TKI)	19
1.6.3	Inibidores irreversíveis de EGFR	21
1.7	Mecanismos de resistência à terapia alvo anti-EGFR	22
1.8	Mecanismos de resistência adquirida ou secundária.	24
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVO GERAL	27

3.1	Objetivo específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	Fármacos	28
4.2	Linhagens celulares tumorais	29
4.3	Manutenção e passagens das linhagens celulares	31
4.4	Estocagem das células por longos períodos	31
4.5	Contagem de células	32
4.6	Viabilidade celular	32
4.7	Determinação do IC ₅₀ e GI (inibição do crescimento)	32
4.8	Modelo de resistência ao Cetuximabe	33
4.9	Determinação da Viabilidade Citotoxicidade e Caspase clivada	34
4.10	Western Blotting	34
4.11	Anticorpos	35
4.12	Transfecção das linhagens celulares com siRNA	35
4.13	Sequenciamento direto dos genes <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i>	36
4.14	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	37
4.15	Criação de uma linhagem estável mutante para <i>KRAS</i> .	38
4.16	Análise do exoma por sequenciamento de nova geração	38
4.17	Análise da expressão génica (array de expressão)	38
4.18	Análises estatísticas	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Avaliação dos biomarcadores de resposta à cetuximabe em modelos <i>in vitro</i> de cabeça e pescoço	41
5.1.1	Caracterização de sensibilidade ao cetuximabe	41
5.1.2	Seleção das linhagens do modelo de resistência ao cetuximabe	42
5.1.3	Validação do modelo de resistência ao cetuximabe	44

5.1.4	Alterações morfológicas após resistência	45
5.1.5	Análise de mutações da linhagem Fadu-C10 resistente ao cetuximabe	48
5.1.6	Análise do perfil de expressão génica da linhagem Fadu-C10	49
5.2	Estudo comparativo do efeito citotóxico dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib em linhagens de CCECP	53
5.2.1	Caracterização molecular e genética do painel de linhagens de CCECP	53
5.2.2	Comparação da eficiência entre cetuximabe e afatinib e allitinib no painel de linhagens de CCECP	55
5.2.3	Efeito do cetuximabe, afatinib e allitinib no EGFR e nas vias intracelulares.	57
5.2.4.	Inibição farmacológica da via do AKT	58
5.2.5	O silenciamento do gene <i>AKT1</i> aumenta a citotoxicidade aos inibidores irreversíveis	60
5.2.6	Análise <i>in silico</i> dos níveis de fosforilação dos receptores ErbB, isoformas de AKT e mTOR em pacientes com CCECP	62
5.3	Citotoxicidade do allitinib em um extenso painel de linhagens celulares tumorais	64
5.3.1	Caracterização da sensibilidade, citotoxicidade do inibidor irreversível allitinib	64
5.3.2	Citotoxicidade do allitinib no painel de linhagens celulares	65
5.3.3	Caracterização das mutações nos genes preditivos de resposta à inibidores de EGFR	70
5.3.4	Transfecção estável da linhagem H292 mutante para <i>KRAS</i> (pG12D e pG12S)	71
5.3.5	Mutações em <i>KRAS</i> como preditoras da resposta ao allitinib	73
6	DISCUSSÃO	75
6.1	Identificação <i>in vitro</i> dos mecanismos de resistência adquirida ao cetuximabe em um modelo de linhagem de CCECP.	75
6.2	Potencial citotóxico dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib em linhagens de CCECP é influenciado ativação AKT	80

6.3	Avaliação do efeito antineoplásico do inibidor allitinib em tumores sólidos: <i>KRAS</i> como biomarcador preditivo de resposta.	84
7.	CONCLUSÃO	88
8.	PERSPECTIVAS	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	105
	ANEXO A	106
	ANEXO B	107
	ANEXO C	122
	ANEXO D	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência de novos casos de câncer e mortalidade no ano de 2012.	1
Figura 2 - Capacidades adquiridas das células neoplásicas.	2
Figura 3 - Receptores tirosina quinase.	5
Figura 4 - Dimerização do EGFR.	6
Figura 5 - Ativação dos receptores da família ERbB.	9
Figura 6 - Mutações no domínio tirosina quinase do EGFR.	13
Figura 7 - Mecanismos de transativação entre GPCRs e EGFR.	15
Figura 8 - Mecanismo de ação do cetuximabe.	17
Figura 9 - Mecanismo de ação dos inibidores tirosina quinases (TKI).	20
Figura 10 - Resposta clínica ao cetuximabe.	24
Figura 11 - Esquema do modelo de resistência incremental ao cetuximabe.	33
Figura 12 - Caracterização do padrão de sensibilidade da linhagem A431.	42
Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular das linhagens resistentes ao cetuximabe.	44
Figura 14 - Western blotting das linhagens parentais e clones resistentes.	45
Figura 15 - Alterações morfológicas dos clones resistentes ao cetuximabe.	46
Figura 16 - Análise da viabilidade e citotoxicidade dos clones resistentes à cetuximabe.	47
Figura 17 - Cetuximabe e combinação de terapias anti-ERK e anti-AKT.	47
Figura 18 - Matriz de expressão da via de sinalização de EGFR.	50
Figura 19 - Matriz de expressão da via de sinalização de MAPK.	50
Figura 20 - Matriz de expressão da via de sinalização de mTOR.	51
Figura 21 - Matriz de expressão da via de sinalização de Wnt.	52
Figura 22 - Expressão dos receptores ErbB e análise do número de cópias de EGFR.	54
Figura 23 - Comparação de sensibilidade aos inibidores de EGFR.	56
Figura 24 - Modulação e inibição das vias intracelulares.	57
Figura 25 - Viabilidade celular das combinações com inibidores intracelulares.	59

Figura 26 - Anti-EGFR combinado às terapias intracelulares, allitinib e afatinib.	60
Figura 27 - Padronização dos siRNA AKT1 na linhagem celular HN13.	61
Figura 28 - Validação do silenciamento de AKT1 e teste de viabilidade (MTS).	61
Figura 29 - Ensaio de viabilidade, citotoxicidade e ativação de caspase 3/7.	62
Figura 30 - Análise <i>in silico</i> de dados provenientes de 279 pacientes a partir do TCGA.	63
Figura 31 - Viabilidade e eficiência do fármaco allitinib na linhagem tumoral A431.	65
Figura 32 - Classificação de GI de 76 linhagens celulares tumorais expostas ao allitinib.	68
Figura 33 - Validação da transfecção da linhagem H292.	72
Figura 34 - Detecção de intensidade da fluorescência da linhagem H292 transfectada.	72
Figura 35 - Eletroferograma do sequenciamento de <i>KRAS</i> das transfectadas.	73
Figura 36 - Alterações de viabilidade e citotoxicidade das linhagens H292 transfectadas.	74
Figura 37 - Modelo da ativação de AKT mediado pelas mutações em <i>KRAS</i> .	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Receptores e ligantes da família ErbB.	7
Tabela 2 - Expressão dos ligantes da família EbbB em pacientes com CCECP.	11
Tabela 3 - Anticorpos monoclonais utilizados na terapia anti-EGFR.	16
Tabela 4 - Inibidores irreversíveis de EGFR.	21
Tabela 5 - Inibidores moAb (anticorpos monoclonais) e tirosina quinase (TKI) utilizados neste estudo.	28
Tabela 6 - Linhagens celulares utilizadas neste estudo.	29
Tabela 7 - Anticorpos utilizados neste estudo.	35
Tabela 8 - Sequência dos duplex usados como siRNA.	36
Tabela 9 - Perfil mutacional dos genes <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> e <i>PTEN</i> .	42
Tabela 10 - Concentração de cetuximabe e tempo de exposição dos clones resistentes ao cetuximabe.	43
Tabela 11 - Alterações genéticas SNVs, detectadas na linhagem Fadu-C10.	48
Tabela 12 - Genes com SNVs e frequência de alterações genéticas em pacientes com CCECP, obtidas a partir do TCGA.	49
Tabela 13 - Caracterização molecular das linhagens celulares de CCECP.	55
Tabela 14 - Resposta citotóxica do painel de linhagens de CCEPC aos inibidores cetuximabe e afatinib e allitinib.	55
Tabela 15 - Eficácia do inibidor allitinib e mutações genéticas do painel de 76 linhagens celulares tumorais.	65
Tabela 16 - Classificação do GI no painel de linhagens tumorais expostas ao allitinib.	69
Tabela 17 - Correlação entre as mutações nos genes preditivos e a resposta ao allitinib.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	Fluorouracila
AKT	Proteína quinase B (ou PKB)
AR	Anfiregulina
AREG	Aregulina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
AXL	Receptor tirosina quinase AXL
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BSA	Albumina bovina
BTC	Betacelulina
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CDK4	Ciclina dependente de quinase 4
c-MET	Receptor do fator de crescimento hepatócito (ou HGFR)
CPNPC	Carcinoma de não-pequenas células de pulmão
COL3A1	Colágeno tipo III alfa 1
COSMIC	<i>Catalogue of somatic mutation in cancer</i>
CRCm	Carcinoma de colorretal metastático
CRK	<i>V-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DSMZ	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i>
<i>E2F1</i>	Fator de transcrição E2F1
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Fator de crescimento epitelial
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
EGFR vII	EGFR variante III
EGFRwt	Forma selvagem do gene <i>EGFR</i>
EPR	Epiregulina
ErbB2/HER2	Receptor do fator de crescimento epitelial 2
ErbB3/HER3	Receptor do fator de crescimento epitelial 3
ErbB4/HER4	Receptor do fator de crescimento epitelial 4
EREG	Epiregulina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDGPET	<i>Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography</i>
FERMT1	<i>Fermitin family homolog 1</i>

<i>FERMT1</i>	<i>Fermitin family homolog 1</i>
FRIP	<i>Interleukin-Four Receptor Interacting Protein</i>
GAB1	<i>GRB2-Associated Binding Protein 1</i>
GI	Inibição do crescimento
GPCR	Receptor Metabotrópico acoplado à Proteína G
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HB-EGF	Fator de crescimento epitelial ligado a hemoglobina
HDAC	Histona deacetilases
HPV	Papiloma vírus humano
HRG	<i>Histidine-rich glycoprotein</i>
HSPG2	<i>Heparan sulfate proteoglycan 2</i>
IGg1	Imunoglobulina G1
IGg2	Imunoglobulina G2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK	Proteína Janus kinase
kDa	Kilo-dalton
KEEG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MINK1	<i>Misshapen like kinase 1</i>
MoAb	Anticorpos monoclonais
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTS	3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
NLS	Sequências de localização nuclear
NPC	Proteínas do complexo do poro nuclear
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NRG1-4	Neuroregulina 1 - 4
OAS3	<i>Oligoadenylate synthetase 3</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P/S	Solução de penicilina e estreptomicina
p16	proteína p16
p27	Proteína 27
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE4DIP	Fosfodiesterase 4D
PIK3CA	Fosfoinosítideo 3-quinase ou fosfatidilinositol 3-quinases
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonylfluoride</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Radioterapia

RTKs	Receptores tirosina quinase
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil-sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFK	Quinases da família Src
SHC1	<i>Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNVs	<i>Single nucleotide variants</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
STAB2	Stabilin-2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa
TKI	Inibidores tirosina quinase
TRAF3	Receptor de TNF associado ao fator 3
UGT2B4	<i>Glucuronosyltransferase family 2 member B4</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	Micromolar
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
\geq	Maior que
\leq	Menor que
M	Molaridade

RESUMO

INTRODUÇÃO: O fator de crescimento epidermal (EGFR) é uma importante proteína da família ErbB cuja ativação leva à sinalização de vias intracelulares como RAS/RAF/ERK e PI3CA/AKT que atuam diretamente na proliferação e sobrevivência celular. A superexpressão do EGFR é comum em tumores sólidos, incluindo colorretal, pulmão, gliomas e tumores de cabeça e pescoço. Devido à importância da superexpressão no desenvolvimento tumoral, vários fármacos foram desenvolvidos para o tratamento oncológico. O cetuximabe é um anticorpo monoclonal anti-EGFR, aprovado para o tratamento de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) e colorretal metastático (CCRM). Em pacientes com CCRM, a resposta está associada ao *status* mutacional do gene *KRAS* para pacientes com CCECP não existem biomarcadores de resposta ao cetuximabe, impossibilitando a seleção de pacientes que melhor se beneficiarão deste agente. Nos últimos anos, uma nova geração de inibidores de EGFR nomeadamente inibidores de largo espectro (pan-ErbB) e de forma irreversível, como afatinib e allitinib, demonstraram efetiva ação antineoplásica em modelos pré-clínicos, no entanto, são ainda desconhecidos os biomarcadores de resposta destas terapias. **OBJETIVOS:** Neste estudo pretendemos: i) identificar biomarcadores de resistência ao cetuximabe em linhagens celulares de CCECP; ii) avaliar e comparar o efeito antineoplásico dos novos inibidores, afatinib e allitinib com cetuximabe, em linhagens celulares de CCECP e; iii) avaliar o efeito do allitinib em um extenso painel de linhagens tumorais para identificar potenciais biomarcadores de resposta a esta nova terapia. **MÉTODOS:** Foi constituído um modelo de resistência ao cetuximabe com a linhagem Fadu. As alterações genéticas entre a linhagem parental e resistente foram analisadas através de sequenciamento completo do exoma seguida da análise da expressão gênica das linhagens. A comparação entre o efeito do cetuximabe, afatinib e allatinib, foi avaliada em um painel de 9 linhagens de CCECP e o silenciamento do gene *AKT1* foi realizado na linhagem resistente aos inibidores irreversíveis. Adicionalmente, o potencial terapêutico do allitinib foi avaliado em um painel de 76 diferentes linhagens celulares tumorais e a citotoxicidade foi comparada com o perfil de mutações dos genes *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* e *PIK3CA* e *PTEN*. Na linhagem de câncer de pulmão H292, foi realizada a clonagem estável de *KRAS* selvagem e mutantes *KRAS-G12D* e

KRAS-G12S. **RESULTADOS:** O modelo de resistência foi estabelecido após 7 meses, e posteriormente validado, sendo a linhagem parental Fadu comparada a linhagem resistente FADU-C10. Foi detectado um conjunto de mutações em genes com importantes funções biológicas. A análise de expressão revelou ativação de vias como EGFR, MAPK, mTOR na linhagem resistente. Os testes com afatinib e principalmente com allitinib revelaram eficientes taxas de resposta citotóxica no painel de linhagens de CCECP, e observamos que a ativação de AKT se associava a um fenótipo de resistência. Para validar estes achados, ensaios de inibição da expressão de AKT1, evidenciaram a restauração da sensibilidade aos inibidores irreversíveis. Por último, como o efeito do allitinib está pouco esclarecido, realizamos uma ampla análise de citotoxicidade em 76 linhagens celulares tumorais, representando 11 tipos tumorais, que evidenciou uma resposta efetiva para os tipos tumorais de cabeça e pescoço, esôfago, melanoma e pulmão. Ainda, verificamos que o fenótipo de resistência ao allitinib foi associado à presença de mutações no gene *KRAS*. Para validar estes resultados, a linhagem H292 (*KRAS* selvagem) foi transfectada com as mutações (G12D e G12S) que induziu a transformação de um fenótipo resistente ao allitinib.

CONCLUSÃO: A resistência ao cetuximabe desenvolvida em linhagens de CCECP, representa uma ferramenta importante para a identificação de biomarcadores para medicina de precisão nestes pacientes. Os resultados preliminares deste trabalho sugere que vias de sinalização intracelulares estão associadas a essa resistência, antevendo que a combinação terapêutica seja a estratégia interessante para esta doença. Em linhagens de cabeça e pescoço observamos que os inibidores irreversíveis se destacaram, quando comparados ao cetuximabe, tendo como biomarcador de resposta a ativação de AKT. Finalmente, concluímos que o inibidor allitinib apresenta bons resultados nas linhagens tumorais de cabeça e pescoço, esôfago e melanoma e que as mutações em *KRAS* são preditoras de resposta a este novo inibidor.

PALAVRAS-CHAVE: Cetuximabe; Resistência a Medicamentos; Neoplasias de Cabeça e Pescoço; Receptores Proteína Tirosina Quinases; Inibidores de Proteínas Quinases.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The epidermal growth factor receptor (EGFR) is member of the ErbB family that upon activation leads to stimulation of intracellular signaling pathways such as RAS/RAF/ERK and PI3CA/AKT leading to cell proliferation and survival. EGFR overexpression is common in solid tumors, including colorectal, lung, glioma and head and neck. Several EGFR inhibitors have been developed for cancer treatment. Cetuximab is an anti-EGFR monoclonal antibody approved for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and metastatic colorectal (mCRC) patients. Cetuximab response is associated with the *KRAS* mutational status in mCRC patients. In HNSCC patients, no biomarker of cetuximab response is known and used for the selection of patients. Recently, a new generation of EGFR inhibitors (pan-ErbB) with irreversible action, such as afatinib and allitinib, demonstrate effective antineoplastic activity in preclinical models, however, the biomarkers of response are currently unknown. **AIM:** The aim of our study was: i) to identify cetuximab resistance biomarkers in HNSCC; ii) to evaluate and compare the antineoplastic effects of new inhibitors, afatinib and allitinib with cetuximab in HNSCC cell lines and; iii) to evaluate the effect of allitinib in an extensive panel of tumor cell lines to identify potential biomarkers response to this new therapy. **METHODS:** We created a cetuximab resistant model with FADU cell line. Genetic changes between the parental and resistant cell lines were determined by whole exome sequencing and gene expression microarray. Comparative studies of cetuximab, afatinib and allitinib were conducted in a panel of 9 HNSCC cell lines and *AKT1* gene silencing was performed on the resistant cell line HN13. Additionally, the therapeutic potential of allitinib was evaluated in a panel of 76 different tumor cell lines and cytotoxicity was compared to the mutational profile of the genes *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA* and *PTEN*. The lung cancer-derived cell line H292 was used to generate *KRAS* (p.G12D and p.G12S) mutant and wild type cell line. **RESULTS:** The cetuximab resistant model was established after 7 months and validated. Fadu parental and resistant cell line Fadu-C10 were compared. Were indentified a set of mutations in genes with important biological functions. Expression analysis revealed activation pathways such as EGFR, MAPK, mTOR in the resistant cell line. Cytotoxicity analyses of afatinib and especially allitinib proved high levels of cytotoxic response in HNSCC cell lines, and the AKT activation was associated

with a phenotype of resistance. To validate these findings, Akt1 inhibition assays showed restoration of sensitivity to the irreversible inhibitors. Finally, we conducted a comprehensive analysis of allitinib cytotoxicity in 76 tumor cell lines, representing 11 tumor types, which showed an effective response to the head and neck, esophagus, lung and melanoma tumor types. We find that the allitinib resistant phenotype was associated with presence of *KRAS* mutations. To validate these results, H292 (*KRAS* wild-type) was transfected with the mutations (G12S, and G12D) that showed a resistant phenotype to allitinib. **CONCLUSION:** The present cetuximab resistant model developed in HNSCC cell lines is an important tool for the identification of biomarkers for these patients. Preliminary result, suggest that intracellular signaling pathways are associated with this resistance, envisioning that combination therapy could be an interesting strategy for this disease. In HNSCC cell lines we observed that the irreversible inhibitors are more effective when compared to cetuximab. Also, AKT activation is a biomarker to allitinib response. Finally, we conclude that the allitinib exhibit good results in tumor cell lines of head and neck, esophagus and melanoma and that *KRAS* mutations are predictive biomarkers of response to this new inhibitor.

KEYWORDS: Cetuximab; Drug Resistance; Head and neck squamous cell carcinoma; Receptor tyrosine kinase; protein kinase inhibitor.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

De acordo com a organização mundial de saúde (OMS), o câncer é um extenso grupo de desordens malignas com características neoplásicas. Em definição, estas anormalidades são caracterizadas pelo rápido crescimento celular e a capacidade de invadir outros órgãos diferentes de sua origem primária. Segundo as estimativas do GLOBOCAN 2012, foram estimados 14 milhões de novos casos de câncer no mundo e 8.2 milhões de mortes ocasionados pela doença no ano de 2012.

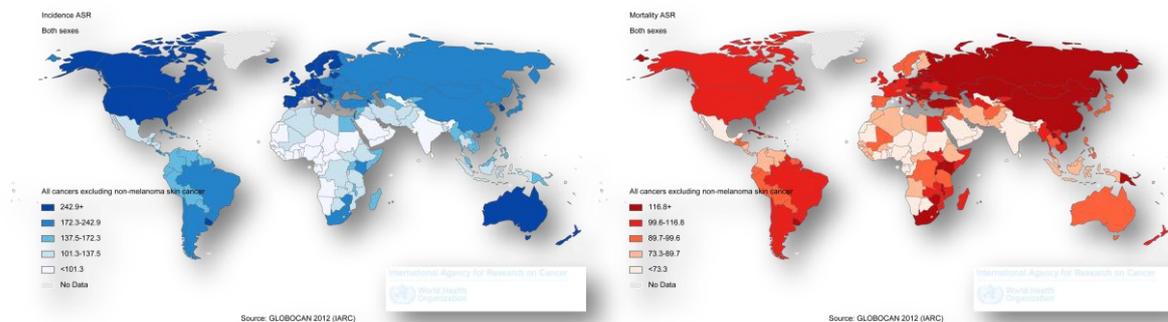


Figura 1 - Incidência de novos casos de câncer e mortalidade no ano de 2012.

À direita distribuição de incidência de novos casos e esquerda mortalidade por câncer no mundo para cada 100.000 indivíduos de todas as idades e ambos os sexos (excluindo câncer de pele não melanoma)^{1, 2}.

Segundo as estimativas da base nacional do INCA, no Brasil, a distribuição proporcional dos cinco tipos de câncer mais incidentes por 100 mil habitantes estimados para 2016 em homens serão de 61.200 casos de câncer de próstata, 17.330 casos de câncer de traqueia, brônquio e pulmão, 16.660 casos de câncer colorretal, 7.950 casos de câncer de esôfago e 11.140 casos de câncer da cavidade oral. Para mulheres os 5 tipos de câncer mais incidentes serão de 57.960 novos casos de câncer de mama, 17.620 casos de câncer colorretal, 6.950 casos de câncer de colo de útero, 10.890 casos de câncer de traqueia, brônquio e pulmão e 7.600 novos casos de câncer de estômago³.

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na transformação neoplásica nas células deste tecido, destacamos danos ao DNA que geram células com capacidade clonal. Estas alterações no DNA são precursoras da malignidade do tecido e progressão de outras alterações genéticas⁴. Os avanços tecnológicos e científicos no último quarto de século revelaram detalhes do genoma do câncer de forma abrangente e individual⁵. Depois dos grandes avanços moleculares da última década, um raciocínio lógico sobre as capacidades adquiridas das células neoplásicas ficaram conhecidos como os marcadores do câncer⁶. Estes eventos consistem na autossuficiência da sinalização de proliferação; insensibilidade a fatores antiproliferativos; escape dos mecanismos apoptóticos; ilimitado potencial replicativo e, por final, prevalência dos mecanismos angiogênicos⁶. Mais recentemente, outros 2 elementos foram incluídos como chave das capacidades adaptativas das células tumorais. O primeiro se refere à capacidade de modulação e reprogramação do metabolismo celular e o segundo, ao escape da proteção imunológica (Figura 2)⁷.



Figura 2 - Capacidades adquiridas das células neoplásicas (Adaptada de Hanahan, 2012).

A capacidade adquirida do aumento na sinalização proliferativa pode ocorrer devido à produção autócrina de fatores de crescimento, responsáveis por desencadear a proliferação celular, ou estimular células estromáticas normais a produzirem fatores de

crescimento utilizados em benefício da célula neoplásica⁸. Concomitante a esta estimulação, os receptores de superfície, responsáveis pela estimulação das vias intracelulares, também se encontram desregulados devido a alterações estruturais como no caso dos receptores tirosina quinases⁷.

1.2 Câncer de cabeça e pescoço

O termo “câncer de cabeça e pescoço” é uma forma coletiva de se referir a uma variedade de tumores malignos com localizações anatômicas e topográficas bem definidas, que acometem o trato aerodigestivo superior, sendo considerado pela OMS o 6º tipo tumoral mais comum no mundo, com uma incidência global de aproximadamente 600.000 novos casos por ano, e uma taxa de mortalidade anual de aproximadamente 300.000 casos^{9, 10}.

No Brasil, este tipo tumoral ocupa o 5º lugar em homens. As estimativas apontam o surgimento de 11.140 novos casos em homens e 4.350 em mulheres no ano de 2016. A elevada taxa de mortalidade faz desta neoplasia um significativo problema de saúde pública. Geralmente, os pacientes portadores de CCECP tem uma taxa de sobrevida de 50% em cinco anos após diagnóstico¹¹.

O tipo histológico mais frequente é o carcinoma de células escamosas (CCECP), que compreende cerca de 90% dos casos¹². O diagnóstico baseia-se na avaliação física dos sintomas em conjunto com exames laboratoriais, que são de extrema importância na conduta terapêutica¹³. A abordagem multidisciplinar terapêutica depende de alguns fatores como, sítio primário, estágio da doença e preservação do órgão atingido. Ambos os critérios são baseados em diretrizes internacionais como ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), que avaliam o impacto da doença e do tratamento nas habilidades do paciente¹³. Pacientes classificados em estágios iniciais da doença (I e II) são potencialmente tratados com cirurgia ou radiação, entretanto, pacientes em estágios avançados (III e IV) requerem uma elaborada multimodalidade terapêutica que consiste na combinação entre cirurgia, quimioterapia e radioterapia¹³. Embora observamos um avanço nas condutas terapêuticas dos pacientes portadores de CCECP, a taxa de recorrência local da doença é de aproximadamente 20-30%. Medidas preventivas para controlar a recorrência local ou à distância, envolvem a ressecção do tumor primário e linfonodos cervicais que podem

impactar de forma direta na qualidade de vida dos pacientes, causando consequências estéticas². O principal tratamento de pacientes com CCECP consiste na combinação de agentes quimioterápicos associados à radioterapia. A dupla quimioterapia de indução, baseada em platina e taxanos representa o tratamento padrão para CCECP localmente avançado. Além disso, o esquema TFP (docetaxel, cisplatina e 5-fluoruracil) vem sendo testado em ensaios clínicos como abordagem neoadjuvante e apresentando resultados consideráveis^{2, 14}. A associação com cetuximabe possui ação direta contra o receptor de crescimento epidérmico (EGFR), com menor toxicidade e eficácia comprovada, e tem demonstrado benefícios na sobrevida global (49 meses), quando comparados ao grupo tratado apenas com radioterapia (29,3 meses)¹⁵. Os mecanismos de ação e benefícios da utilização do cetuximabe serão abordados de forma específica ao longo deste trabalho.

O uso de tabaco, ingestão de álcool e infecções virais, especialmente com papiloma vírus humano (HPV) subtipos 16 e 18, são os fatores de risco mais comuns no desenvolvimento do CCECP, sendo o HPV encontrado em 23-55% das biópsias. Indivíduos fumantes tem o risco aumentado (5 - 25 %) de desenvolverem CCECP¹⁶, e a associação com o consumo de álcool pode atuar sinergicamente aumentando os efeitos causado pelo tabagismo¹⁷.

HPV tem sido reportado como o principal agente no desenvolvimento do câncer de orofaringe, detectado em 45-90% das biópsias, com a prevalência do subtipo HPV-16. Recentemente, uma integrada e completa análise genômica de pacientes portadores de CCECP mostrou que, dos 33 pacientes com câncer de orofaringe, 64% (21/33) foram positivos para HPV, além de classificá-los quanto a diferentes alterações moleculares. Entre as alterações foram destacadas a perda de expressão do gene *TRAF3* (receptor de TNF associado ao fator 3), mutações ativantes no gene *PIK3CA* e amplificação do *E2F1* (fator de transcrição1 E2F) que importantemente podem auxiliar na tomada de decisão da conduta terapêutica do paciente¹⁸.

As alterações moleculares responsáveis pela transformação neoplásica nos CCECP têm sido exploradas na última década, sendo o *EGFR* a principal molécula envolvida neste processo, a qual se encontra superexpresso em mais de 90% dos pacientes¹⁹, além de estar associada a um pior prognóstico²⁰. Diante deste cenário, o *EGFR* se tornou um promissor alvo terapêutico para os CCECP e outros tumores sólidos com expressão aumentada deste

gene, que codifica uma proteína de mesmo nome, e que faz parte de uma família de receptores de membrana chamados de receptores tirosina quinases (RTK).

1.2 Receptores tirosina quinases (RTK)

A comunicação celular é mediada por alguns mecanismos, como a secreção de moléculas específicas, proteínas sinalizadoras ou até mesmo pela comunicação célula-célula²¹. Todos estes processos são realizados com o objetivo de controlar ações isoladas de um grupo de células, ou até mesmo de todo o órgão. Os receptores tirosina quinases (RTKs) são moléculas presentes na superfície das células e correspondem a uma família de proteínas altamente conservadas no processo evolutivo, descritas como chave regulatória de processos celulares como proliferação, migração e ciclo celular^{22, 23}. Até o momento, foram isolados 58 tipos diferentes de receptores tirosina quinase, que se assemelham estruturalmente nos humanos e são classificados em 20 grandes famílias. Estes receptores possuem uma estrutura básica, onde se destaca um domínio N-terminal na região extramembrana, com alta afinidade a ligantes específicos; uma simples hélice de ancoragem transmembranica e, por final, uma região intracelular que possuem resíduos tirosina quinases na porção C-terminal da proteína (Figura 3)²⁴.

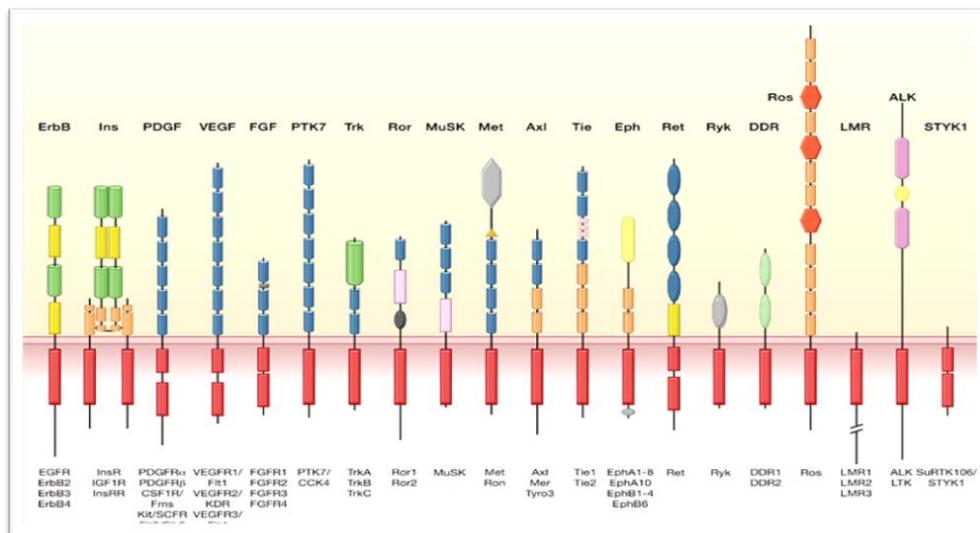


Figura 3 - Receptores tirosina quinase.

Esquema representativo dos 58 tipos diferentes de receptores tirosina quinase, classificados em 20 famílias. Ancorados na membrana, estes receptores se assemelham estruturalmente mantendo-se

bem conservado ao longo da evolução e desempenham um papel fundamental na manutenção e controle do ciclo celular²⁴

Ancorados na membrana citoplasmática, todos os RTK se encontram na forma de monômeros, ou seja, individualizados. Entretanto, existe uma exceção, no qual o receptor de insulina já se encontra no estado dimerizado e inativo²⁵. A dimerização destes receptores acontece por meio da estimulação de ligantes específicos, capazes de alterar o estado conformacional da proteína receptora, além de autofosforilar os resíduos intracelulares. Estes resíduos ativam uma cascata de sinalização de proteínas quinases intracelulares responsáveis por importantes processos biológicos, entre eles, a proliferação celular²⁶.

1.3 Família ErbB

A família ErbB de proteínas tirosina quinases é composta por quatro membros que incluem o EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), ErbB2/Neu/Her, ErbB3/Her3 e ErbB4/Her4. A região extracelular dos receptores desta família apresenta quatro domínios, sendo que os domínios I e III possuem aproximadamente 160 aminoácidos e os domínios II e IV são regiões ricas em cisteínas, constituídas por aproximadamente 150 aminoácidos. A dimerização de receptores ErbB é inteiramente mediada pelo ligante e provoca simultaneamente a ligação do receptor em dois locais (domínio I e domínio III) dentro da mesma molécula. Este fato promove mudanças conformacionais no receptor que libera a região do domínio II, anteriormente bloqueada, promovendo a dimerização de dois receptores na membrana citoplasmática (Figura 4)²⁷.

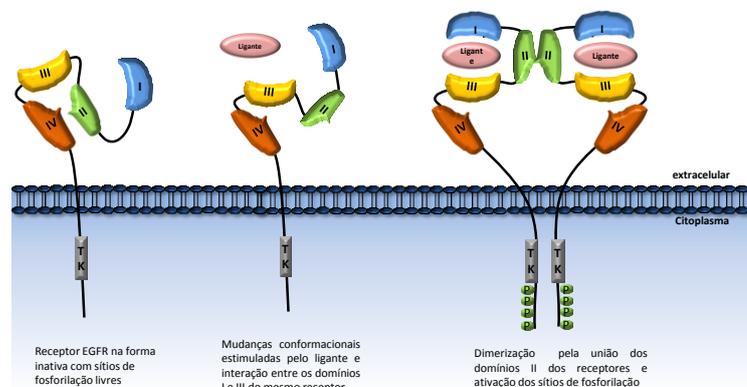


Figura 4 - Dimerização do EGFR.

O estímulo de um ligante específico ativa o receptor através de mudanças conformacionais em sua estrutura, permitindo a ligação e ativação desta proteína.

A ativação dos receptores da família ErbB é modulada pela produção, secreção e ligação de proteínas ligantes naturais (Tabela 1), que induzem a ativação de quinases intrínsecas. Esta ligação mediada por ligantes tais como: anfiregulinas (AR), betacelulina (BTC), fator de crescimento epidermal (EGF), epiregulina (EPR), neuroregulina (NEU1-4), EGF ligado à heparina (HB-EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF-alfa) e epigenina^{28, 29}. Este mecanismo de fosforilação pode recrutar proteínas adaptadoras específicas levando a modulação de vias intracelulares³⁰.

Os quatro receptores membros desta família podem formar 10 possíveis combinações de dímeros, sendo 4 homodímeros e 6 heterodímeros. Cada combinação formada de receptores tem afinidade específica nos sinalizadores efetivos de vias intracelulares³¹. De acordo com um estudo realizado com linhagens celulares, transfectadas com diferentes combinações heterodímicas dos receptores da família ErbB, existem algumas combinações que favorecem o aumento da proliferação celular, como no caso das combinações entre ErbB1/ErbB2, ErbB2/ErbB e ErbB1/ErbB3³².

Tabela 1 - Receptores e ligantes da família ErbB.

Receptor	Ligantes
EGFR	EGF, HB-EGF, AREG, TGF α , BCT e ERG
ErbB2	nenhum
ErbB3	Neu 1, Neu 2
ErbB4	Neu 3, Neu 4 e HB-EGF

EGF: fator de crescimento endotelial; HB-EGF - fator ligante de heparina semelhante ao EGF; AREG- aregulina; BCT – betacelulina; NEU – neuroregulina.

Devido à diversidade de combinações e a íntima associação com regulações de vias intracelulares, o fenótipo celular pode ser influenciado pela diferença de expressão destes receptores, como acontece nas células neoplásicas de mama na qual encontramos uma expressão alterada de ErbB2, que possui configurações estruturalmente favoráveis que expõem suas regiões de dimerização. O gene *ErBB2*, neste caso, assume o papel de um oncogene, quando ocorrem alterações de expressão causadas por amplificação³³.

A heterodimerização ErbB1/ErbB2, foi alvo de vários estudos na última década, que comprovaram o papel cooperativo destes receptores na tumorigênese. Estes estudos demonstraram um mecanismo de desligamento dos receptores após estimulação e dimerização, seguida da endocitose do receptor EGFR por vesículas mediadas por clatrina³⁴,³⁵. A taxa de endocitose dos outros membros da família ErbB é baixa, em contrapartida, as taxas de reciclagem e nova ancoragem citoplasmática são maiores quando comparadas ao EGFR. Sendo assim, estes estudos observaram uma redução das taxas de endocitose e degradação e aumento da reciclagem de ErbB1 na associação ErbB1/ErbB2^{35, 36}.

1.4 Ativação do receptor ErbB1 (EGFR)

O gene *EGFR* está localizado no cromossomo 7 e codifica uma proteína madura que possui 170 kDa, formada por 1186 aminoácidos. O domínio intracelular do EGFR contém um resíduo de serina (Ser-1142), um resíduo de trionina (Thr-654) e um total de sete resíduos de tirosina (Try-845, 992, 1045, 1068, 1086, 1148, 1173). Estes resíduos de tirosina podem ser fosforilados de acordo com o estímulo indutor³⁷. O domínio intracelular do EGFR pode ativar várias vias intracelulares incluindo PI3K, MAPK, STAT e AKT (Figura 5). Detalhadamente, o EGFR ativa PI3KCA com o auxílio de uma proteína adaptadora chamada GRB2, que recruta outro adaptador chave conhecido como GAB1, sendo que ambas as proteínas são capazes de ativar a cascata de sinalização mediada pela ativação de PI3KCA. Diferentemente, o receptor ErbB2 pode ativar a via MAPK, com auxílio da proteína adaptadora GRB2, SHC1, DOK-R e CRK³⁷. Além disso, a fosforilação de EGFR pode ativar um grupo de proteínas da família Src que atuam como proteínas oncogênicas, podendo desencadear um aumento da proliferação celular através da ativação da via das MAPK³⁸.

A via intracelular STAT é constituída por proteínas que atuam como fatores de transcrição de genes alvos e codificam proteínas envolvidas em eventos de proliferação, diferenciação e sobrevivência como as ciclinas D1-D3 e a proteína p27. Os eventos descritos acima sofrem a influência da fosforilação de EGFR³⁹. O papel desempenhado pela ativação da via JAK mediada pela fosforilação de EGFR está vinculada a um maior recrutamento e uma ativação preferencial do braço de sinalização intracelular das proteínas da família STAT. Este fato foi comprovado experimentalmente *in vitro*, quando se inibiu a via JAK e notou-se a redução parcial da ativação de STAT em linhagens tumorais de mama⁴⁰.

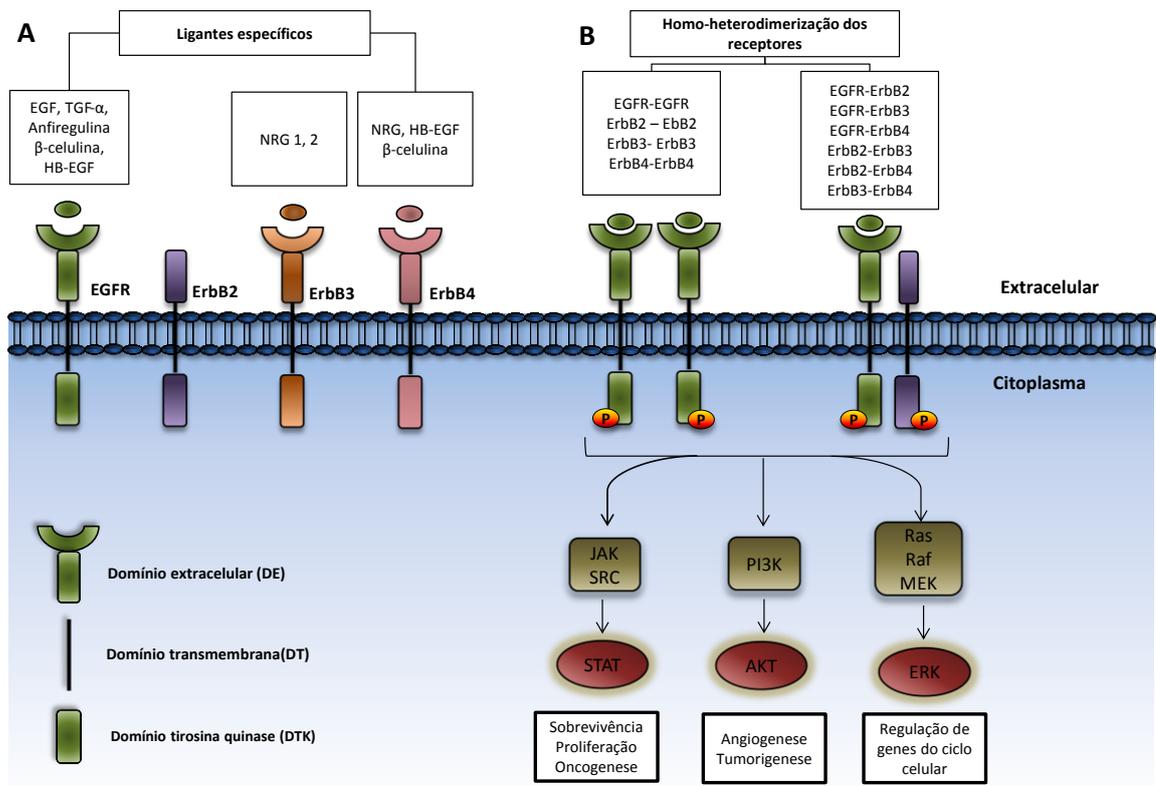


Figura 5 - Ativação dos receptores da família ErbB.

1.5 O papel do EGFR no desenvolvimento tumoral

Devido à sua importância em processos regulatórios da proliferação celular, o equilíbrio da expressão e/ou ativação do EGFR deve ser mantido para garantir níveis controlados de proliferação celular. Este controle é mediado por uma variedade de mecanismos, incluindo o número de cópias do próprio gene, polimorfismos, *splicing* alternativo, disponibilidade dos ligantes e até mesmo dos outros membros da família ErbB⁴¹. De forma geral o EGFR tem expressão alterada em vários tipos tumorais, destacando os CCECP (30 -95%)⁴²⁻⁴⁴; câncer de pulmão de não pequenas células (40-80%)^{45, 46}; câncer de esôfago (60-70 %)^{47, 48}; glioblastomas (40-60%)⁴⁹ e carcinomas pancreáticos (40-90%)^{50, 51}. No CCECP, assim com em outros tumores sólidos, a desregulação do EGFR pode ser ocasionada pelos seguintes mecanismos: fatores parácrinos/autócrinos, amplificação do gene, mutações genéticas e

translocação nuclear do EGFR. Todas estas alterações levam à superexpressão ou ativação constitutiva das vias de sinalização mediadas pelo EGFR.

1.5.1 Fatores parácrinos/autócrinos

A transformação neoplásica de um tecido pode ser mediada por mecanismos autócrinos e/ou parácrinos dos ligantes específicos de EGFR, proporcionando o aumento da proliferação celular, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase. Em pacientes portadores de CCECP, a expressão de EGFR detectada por imunohistoquímica, pode variar de 43-100% dos casos⁴⁴. Esta discrepância entre as taxas de expressão pode ser resultado da variedade de anticorpos, fixadores, tempo de armazenamento da amostra e, por final, variações da técnica. No entanto, o papel biológico da superexpressão de EGFR em CCECP é inquestionavelmente significativo. Curiosamente, uma recente meta-análise avaliou o papel prognóstico da expressão de EGFR e encontrou uma correlação com a redução da sobrevida global destes pacientes⁵².

A superexpressão de EGFR, juntamente com a expressão endócrina dos seus respectivos ligantes, promove múltiplas vantagens que contribuem para a proliferação celular, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase⁵³. Uma década atrás, foi comprovado que a co-expressão de EGFR com seus ligantes no microambiente tumoral poderia exercer um importante papel na carcinogênese e progressão nos pacientes com CCECP⁵⁴. Atualmente, uma abordagem do *Cancer Genome Atlas* (TCGA) permitiu avaliar a expressão dos ligantes da família ErbB¹⁸ (Tabela 2). Os níveis de mRNA dos ligantes HRG, NRG4 e NRG1, estão superexpressos em 15, 7 e 6% dos casos, respectivamente, ao passo que os níveis de expressão dos ligantes EGF, AREG, NRG3, HBEGF e EREG foram detectados em 4% dos casos.

A família de genes *TNF*, embora tenha baixos níveis de expressão neste tipo tumoral (2%), foi associada a um aumento da proliferação em linhagens de CCECP⁵⁵, além disso, pacientes com aumento da expressão de TNF apresentaram uma sobrevida global de 12,98 meses, em comparação a 21,85 meses dos pacientes com a expressão normal (Tabela 2).

A superexpressão do ligante anfirregulina (AREG) está associada a um risco aumentado de desenvolver câncer de mama⁵⁶, pulmão, colorretal, ovário e próstata⁵⁷. Nos pacientes portadores de CCECP, a expressão de AREG foi detectada em 4% (12/279) dos pacientes e associada a uma sobrevida global média de 28,29 meses em comparação com 21,75 meses

para os pacientes com expressão normal (Tabela 2). O fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HBEGF) é um EGF produzido principalmente pelos macrófagos e monócitos⁵⁸. Alguns estudos têm associado a expressão de HBEGF com o desenvolvimento de tumores sólidos com fenótipos agressivos e mecanismos metastáticos em carcinomas de mama^{59, 60}. O HBEGF é regulado positivamente em tumores de mama, ovário, gástricos, melanoma e pâncreas⁶¹⁻⁶³. Em pacientes portadores de CCECP, a expressão HBEGF está alterada em 4% (11/279) dos casos (Tabela 2). A Heregulina (HRG) é o ligante mais expresso nestes pacientes, representado por 15% (46/279) dos casos (Tabela 2). Embora não significativo, os pacientes com superexpressão de HRG possuem uma maior sobrevida global (42,32 meses) em comparação com pacientes com níveis normais de expressão (21,85 meses) (Tabela 2).

Tabela 2 - Expressão dos ligantes da família ErbB em pacientes com CCECP.

Ligantes da família ErbB % (n/279)	Expressão (mRNA)	Total de casos (n)	Mortes (n)	Sobrevida media (meses)	Teste de Logrank p-valor
TNF 2% (5/279)	mRNA (+)	3	1	12,98	0,461
	mRNA (-)	156	68	21,85	
EGF 4% (12/279)	mRNA (+)	7	2	n.a.	0,441
	mRNA (-)	152	67	21,49	
HBEGF 4% (12/279)	mRNA (+)	6	0	n.a.	0,276
	mRNA (-)	153	69	21,75	
AREG 4% (12/279)	mRNA (+)	11	4	28,29	0,778
	mRNA (-)	148	65	21,75	
EREG 4% (12/279)	mRNA (+)	8	5	13,04	0,020
	mRNA (-)	151	64	26,41	
HRG 15% (41/279)	mRNA (+)	26	13	42,32	0,349
	mRNA (-)	133	56	21,85	
NRG1 6% (17/279)	mRNA (+)	10	3	19,19	0,841
	mRNA (-)	149	6	21,85	
NRG2 2% (5/279)	mRNA (+)	3	2	18,00	0,652
	mRNA (-)	156	67	26,41	
NRG3 4% (12/279)	mRNA (+)	8	2	52,27	0,163
	mRNA (-)	151	67	20,50	

NRG4	mRNA (+)	12	7	10,97	
7% (20/279)	mRNA (-)	147	62	21,85	0,118

mRNA : RNA mensageiro ; (+) superexpressão; (-) sem alterações na expressão; TNF: Fator de necrose tumoral; EGF: Fator de crescimento tumoral; HBEGF: EGFR ligado a heparina; AREG: anfirregulina; EREG: epiregulina; HRG: heregulina; NRG1: neuregulina 1; NRG2: neuregulina 2; NRG3: neuregulina 3 and NRG4: neuregulina 4; n.a: não avaliado.

1.5.2 Amplificação do gene *EGFR*

A amplificação gênica do *EGFR* desempenha um papel fundamental na carcinogênese, pois acumula receptores na membrana celular promovendo o aumento da dimerização e fosforilação deste receptor⁶⁴ em tumores de esôfago, pâncreas, mama e colorretal^{50, 65-67}. Em um revisão, recentemente publicada pelo grupo, detectamos um aumento de 7,8 – 58% no número total de cópias de *EGFR* em paciente portadores de CCECP⁴⁴. O recente estudo do TCGA conduzido em 279 pacientes mostrou que a frequência de amplificação do gene *EGFR* foi de 11%. Além disso, neste trabalho, os autores associam a amplificação com uma pior sobrevida global (17,5 meses) em comparação com pacientes sem amplificação de *EGFR* (26,41 meses)¹⁸. Estes dados comprovam o efeito patogênico da amplificação de *EGFR* nos pacientes portadores de CCECP.

1.5.3 Mutações do gene *EGFR*

A maior parte das mutações somáticas descritas no *EGFR* encontram se no domínio intracelular, o qual acomoda os resíduos de fosforilação e a porção tirosina quinase deste receptor. Estas regiões, mais frequentemente mutadas são designadas de hot spots mutacionais. Irmer e colaboradores mostraram, em estudos *in vivo* e *in vitro*, a ocorrência de mais de 15 mutações nos domínios tirosina quinase do *EGFR*. O domínio tirosina quinase que compreende os exons 18-24, foi mapeado neste estudo e algumas destas mutações foram intimamente associadas à resistência direta ao tratamento com inibidores tirosina quinases em pacientes portadores de carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) (Figura 7)⁶⁸.

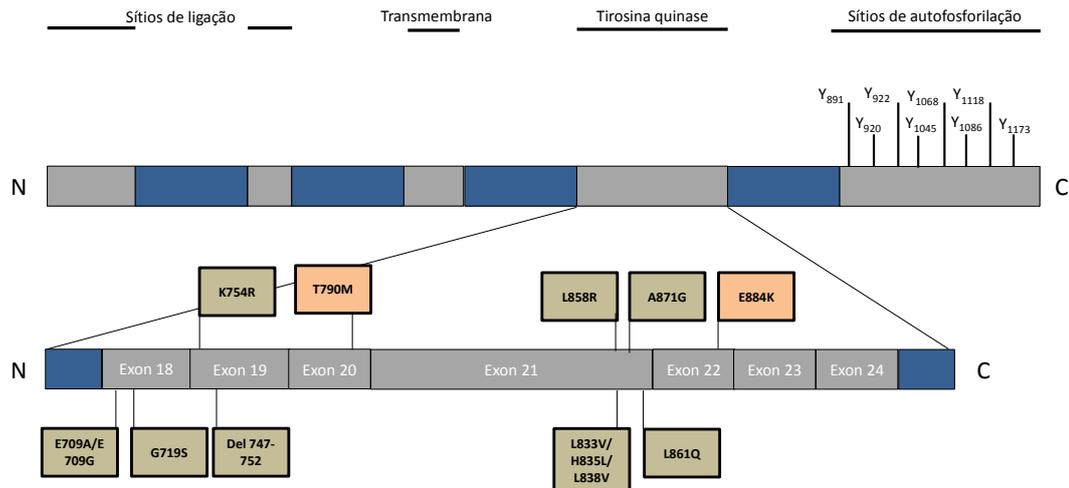


Figura 6 - Mutações no domínio tirosina quinase do *EGFR*.

Mutações no domínio tirosina quinase do *EGFR*. As mutações listadas são encontradas em pacientes portadores de carcinoma de pulmão de não pequenas células. As mutações destacadas nas caixas de laranja conferem e modulam a resposta terapêutica ao gefitinib nestes pacientes. Adaptado de Irmer, 2007 .

As informações correspondentes a mutações somáticas do *EGFR* em pacientes de CCECP são limitadas devido à baixa frequência mutacional neste tipo tumoral. A disparidade nos resultados pode ser consequência da técnica de detecção empregada além da qualidade do material utilizado. Nagalakshmi e colaboradores encontraram uma frequência de 81,4 % de mutações no gene *EGFR* utilizando a técnica de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP, do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*). Contrariamente, estudos mais recentes como o TCGA, mostraram que mutações no *EGFR* são eventos raros, presente em menos de 10% dos casos^{18, 43}.

A mutação EGFRvIII recebe uma atenção especial, por se tratar da deleção de 267 aminoácidos do domínio extracelular, resultando na perda dos éxons 2 ao 7, ocasionando uma instabilidade extracelular⁶⁹. O EGFRvIII é incapaz de receber estímulos extracelulares, entretanto seu sítio de fosforilação intracelular está constitutivamente ativo, promovendo uma sinalização quantitativamente maior de vias intracelulares, quando comparadas a sinalização mediada pela ativação do EGFRwt (selvagem)⁷⁰. Esta mutação foi detectada pela primeira vez em glioblastomas⁷¹, e estudos posteriores relataram a sua presença em CCECP. Um estudo conduzido por Sok e colaboradores, detectou uma frequência de 40% da mutação EGFRvIII por imunohistoquímica em pacientes com CCECP⁷². Adicionalmente, em

nossa revisão, listamos uma variação da frequência de EGFRvIII entre 0,3 a 42% em pacientes com CCECP⁴⁴, embora estudos mais recentes como o TCGA, que utiliza métodos mais sensíveis (PCRq e RNA seq.), confirmam a ausência da forma truncada em pacientes com CCECP^{18, 73, 74}.

1.5.4 Translocação nuclear do EGFR

O mecanismo de translocação nuclear do EGFR deve ser considerado parte dos eventos responsável pela transformação neoplásica mediada pela sinalização de EGFR. As primeiras evidências do tráfego desta molécula foram relatadas em estudos de regeneração de hepatócitos nas últimas décadas^{75, 76}. O mecanismo clássico adotado para explicar a translocação do EGFR para o núcleo está relacionado à presença de sequências de localização nuclear (NLS) que interagem com uma proteína chamada importantina α/β . Esta interação favorece o reconhecimento da proteína nos complexos do poro nuclear (NPC)⁷⁷. A translocação do EGFR para o núcleo está associada com o aumento da proliferação celular, suportada pelo fato que o EGFR atua como fator de transcrição sobre os genes que codificam proteínas envolvidas no ciclo celular como a ciclina D1⁷⁸. Além do papel na transformação neoplásica, o aumento de EGFR nuclear já foi associado a um pior prognóstico em alguns tumores sólidos como carcinoma de pulmão de não pequenas células⁷⁹, câncer de mama⁸⁰ e também associado pré-clinicamente a resistência ao tratamento com cetuximabe⁸¹. Nos CCECP especificamente, a translocação do EGFR tem sido sugerida em alguns estudos como fator determinante para desenvolvimento de resistência ao cetuximabe⁸². Estudos in vitro, demonstraram que o aumento do EGFR nuclear é mediado pelas proteínas Yes e Lyn que pertencem à família das proteínas quinases Src⁸³.

1.5.5 Transativação do EGFR mediada por GPCRs

Outra hipótese de transformação neoplásica mediada por EGFR, menos comum, inclui a transativação deste receptor por GPCRs (receptores acoplados a proteína G). Nas últimas décadas, não existiam evidências de associações de outras moléculas com potencial estimulatório dos receptores tirosina quinases da família ErbB. Entretanto, nos últimos anos,

algumas pesquisas demonstraram que a estimulação das proteínas GPCRs por agonistas é capaz de aumentar a produção de ligantes de receptores tirosina quinase como o EGF (Figura 6) e promover a proliferação e sobrevivência celular^{84, 85}.

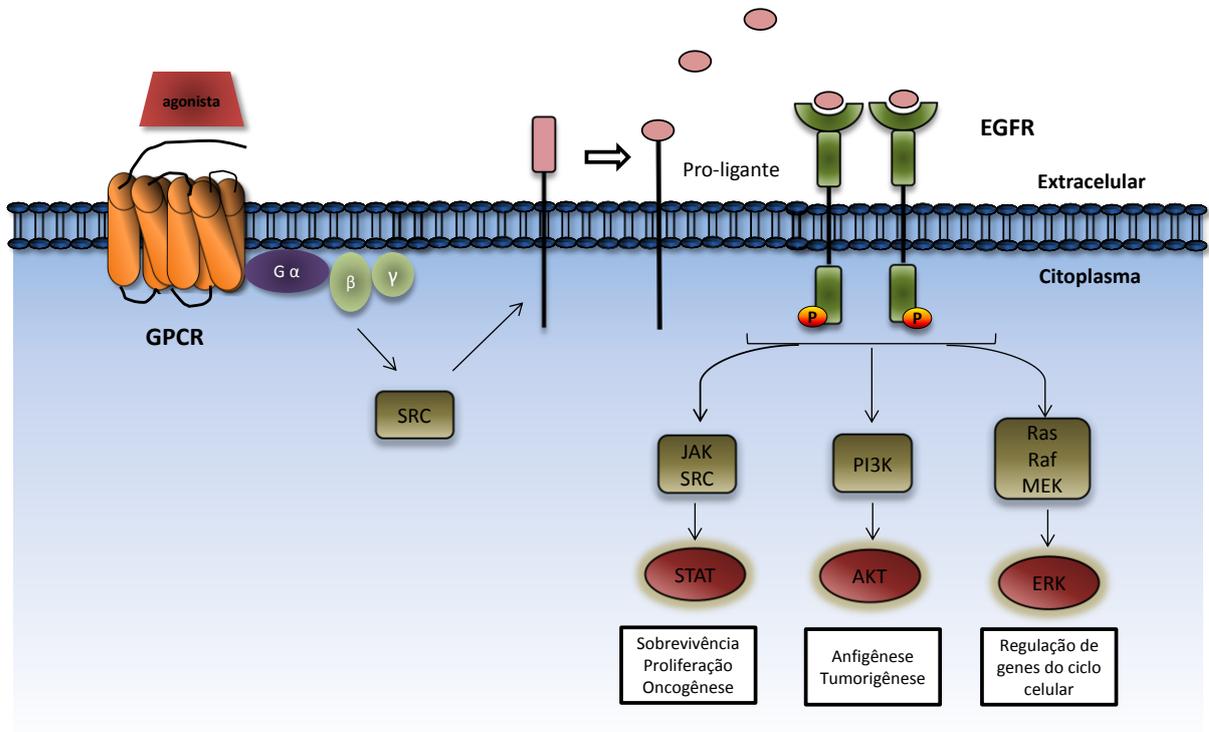


Figura 7 - Mecanismos de transativação entre GPCRs e EGFR.

A estimulação de alguns agonistas de GPCR resulta na produção de ligantes de EGFR, promovendo a proliferação celular. Adaptado de Liebmann, 2006.^{84, 86}

1.6 EGFR como terapia alvo: Inibidores de proteínas tirosina quinases

Devido ao grande relevo dos RTK no desenvolvimento tumoral, nas últimas décadas, a comunidade científica e farmacêutica desenvolveu várias estratégias terapêuticas para inibir estas moléculas. Os inibidores das proteínas tirosina quinases podem ser classificados em dois grandes grupos, de acordo com os mecanismos farmacológicos que eles desempenham em contato com o alvo para o qual foram desenvolvidos. A abordagem que utiliza anticorpos monoclonais contra EGFR (MoAb) classifica um grupo destas terapias e outro grupo é representado por pequenas moléculas inibidoras de receptores tirosina quinase (TKI). Estes

por sua vez, penetram na membrana celular, inibindo a fosforilação de resíduos específicos no domínio tirosina quinase de cada receptor.

1.6.1 Anticorpos monoclonais anti-EGFR

Quando comparados aos inibidores tirosina quinase, os anticorpos monoclonais possuem ação inibitória diferente, pois competem diretamente com os ligantes dos receptores por uma ligação ao domínio extracelular destas proteínas. Atualmente 3 anticorpos monoclonais são utilizados na prática clínica: cetuximabe, nimotuzumabe e panitumumabe. Entretanto, nos últimos anos, novos anticorpos monoclonais foram criados, com a promessa de uma ação inibitória eficiente com menores efeitos adversos. Descreveremos a utilização dos anticorpos monoclonais e as perspectivas utilizações, baseadas nos ensaios clínicos em alguns tumores sólidos, principalmente nos pacientes portadores de CCECP (Tabela 3).

Tabela 3 - Anticorpos monoclonais utilizados na terapia anti-EGFR.

Anticorpo	Fabricante	Alvos	Ensaio clínico	Identificação
Cetuximabe	Bristol-Myers Squibb	EGFR	Aprovado	n.a
Panitumumab	Amgen Oncology	EGFR	Aprovado	n.a
Nimotuzumab	CIMYM Bioscience	EGFR	II e III	NCT01425736, NCT00910117, NCT00702481
Zalutumumab	Genmab	EGFR	III	NCT00496652
MEHD7945A	Roche	EGFR, HER3	I e II	NCT01577173
RO5083945	Roche	EGFR	I	NCT01046266
Sym004	Merck KGaA	EGFR	II	NCT01417936

n.a: não se aplica; I,II,III: fase do ensaio clínico que se encontra o anticorpo monoclonal.

1.6.1.1 Cetuximabe

Em Fevereiro de 2004, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o medicamento com ação antineoplásica cetuximabe (Erbix[®], fabricado pela Imclone Systems, Inc.), como uma terapia alvo dirigida contra o EGFR. O cetuximabe foi aprovado para uso, em combinação com irinotecano, no tratamento de CCRm refratários à quimioterapia baseada em irinotecano. O Cetuximabe é o primeiro anticorpo monoclonal anti-EGFR, possui 152

kDa, tem revelado um salto na qualidade do tratamento do câncer, por melhorar significativamente a evolução clínica dos pacientes tratados. Este fármaco atua por competição, inibindo a interação de ligantes naturais ao EGFR. Esta inibição leva ao bloqueio das vias intracelulares receptor-dependente, resultando em parada do ciclo celular, inibição da metástase, indução de apoptose, degradação e regulação negativa do EGFR (Figura 8)⁸⁷.

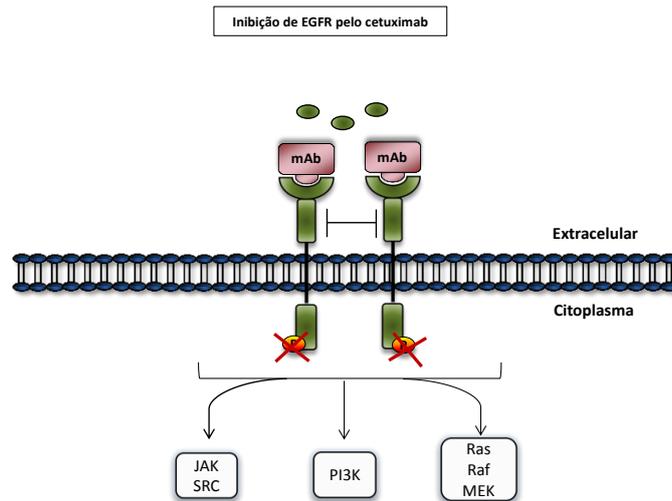


Figura 8 - Mecanismo de ação do cetuximabe.

O anticorpo cetuximabe compete pelo sítio de ligação do ligante, impedindo a dimerização e sinalização de vias intracelulares. Este fato promove a redução da viabilidade e da metástase, assim como um aumento significativo dos níveis de apoptose celular.

Um estudo recente demonstrou um aumento da sobrevida global de pacientes que receberam o cetuximabe associado com radioterapia (49 meses de sobrevida vs. 29,3 meses de sobrevida para o grupo de pacientes tratados apenas com radioterapia)¹⁵. Pacientes portadores de CCRm sem mutações no gene *KRAS*, demonstraram resposta positiva ao tratamento com cetuximabe⁸⁸. Neste contexto, os estudos confirmaram que a detecção das mutações em *KRAS* pode ser utilizada como um marcador preditivo de resistência ao cetuximabe. Estes achados foram importantes para a compreensão do mecanismo de resistência intrínseca ao cetuximabe e úteis na identificação de um biomarcador de resistência otimizando a terapia personalizada⁸⁹.

Após a eficiência comprovada no tratamento de pacientes portadores de CCRm, em março de 2006, o FDA concedeu à aprovação do cetuximabe em combinação com radioterapia (RT) ou monoterapia para tratamento de pacientes com CCECP recorrente ou

metastático, nos quais terapias prévias, baseadas em platina, tenha falhado⁹⁰. Esta aprovação foi baseada em uma melhoria estatisticamente significativa na sobrevida global destes pacientes. A evidência da segurança e a eficácia do cetuximabe também é suportada pela demonstração de resposta tumoral duradoura, quando administrada como um agente único no tratamento de segunda ou terceira linha de CCECP avançado⁹¹. A eficácia da utilização do cetuximabe em conjunto com RT, foi demonstrada em um estudo de fase III randomizado de 424 pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe, hipofaringe ou laringe que não tinham realizado tratamento prévio, distribuídos randomicamente em um grupo que recebeu cetuximabe mais radioterapia (211 pacientes) ou outro grupo que recebeu apenas radioterapia isoladamente (213 pacientes)⁹⁰.

1.6.1.2 Panitumumabe

Em setembro de 2006, foi aprovado pelo FDA o fármaco panitumumabe (Vectibix, Amgen), que consiste em um anticorpo monoclonal humanizado de isótipo IgG2, diferentemente do cetuximabe (IgG1). O tratamento é direcionado a pacientes portadores de CCRm. A aprovação foi baseada em um estudo simples, multicêntrico, randomizado, onde um grupo recebeu a dose de 6 mg/Kg de forma intravenosa, apresentando resultados significativos na sobrevida e controle da doença⁹². Da mesma forma que o cetuximabe, as mutações ativantes do gene *KRAS* representam uma forma de triagem destes pacientes, nos quais a terapia não será eficiente, mantendo as mutações em *KRAS* preditoras de resposta⁹³. Um recente estudo clínico foi realizado em 657 pacientes com diagnóstico de CCECP metastático ou recorrente, tratados ou não com panitumumabe concomitantemente a cisplatina/5-FU. Entre os achados deste estudo, destaca-se um aumento da sobrevida global dos pacientes p16(-) em comparação com pacientes p16(+) (11,7 e 8,6 meses, respectivamente), sugerindo que o p16 possa ser um indicador de resposta a esta terapia⁹⁴.

1.6.1.3 Nimotuzumabe

O nimotuzumabe (CIMAher, CIMYM Bioscience) também é um anticorpo monoclonal humanizado com aproximadamente 95% de sequência humana, o que contribui para os menores efeitos colaterais e toleráveis graus de citotoxicidade. O mecanismo de ação é similar

ao cetuximabe, de forma a bloquear e/ou impedir o acoplamento de um ligante específico ao EGFR. Em um ensaio clínico de fase II, foi comprovado que a associação do nimotuzumabe com a radioterapia manteve níveis estáveis de toxicidade, sendo bem toleráveis em pacientes de carcinoma esofágico, bem como o aumento da sobrevida global dos mesmos⁹⁵.

1.6.1.4 Zalutumumabe

O Zalutumumabe (HuMax-EGFr, Genmab Inc.) é um anticorpo monoclonal inteiramente humanizado contra o EGFR. Os testes iniciais mostraram efeitos adversos toleráveis, além de uma taxa de resposta de 7,1% em pacientes com CCECP recorrente ou metastático⁹⁶. Um estudo mais abrangente, envolvendo 286 pacientes com CCECP, refratários a quimioterapia baseada em platina, demonstrou benefícios ainda maiores quanto ao uso deste anticorpo. O tratamento com este anticorpo aumentou significativamente a sobrevida livre de progressão para 6,7 meses, comparado 5,2 meses do grupo controle⁹⁷. Com resultados promissores, outro ensaio clínico fase III vem sendo conduzido em pacientes com CCECP, em busca da aprovação clínica (NCT00496652).

1.6.2 Pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinases (TKI)

Este grupo de moléculas é caracterizado pela capacidade de penetrar na membrana celular e ligar-se a resíduos específicos onde se encontram sítios de ligação do ATP, impedindo a fosforilação daquela região (Figura 9)⁹⁸. Além de terem tamanho reduzido e fácil penetrância nas células tumorais a sua ação é eficiente e rápida.

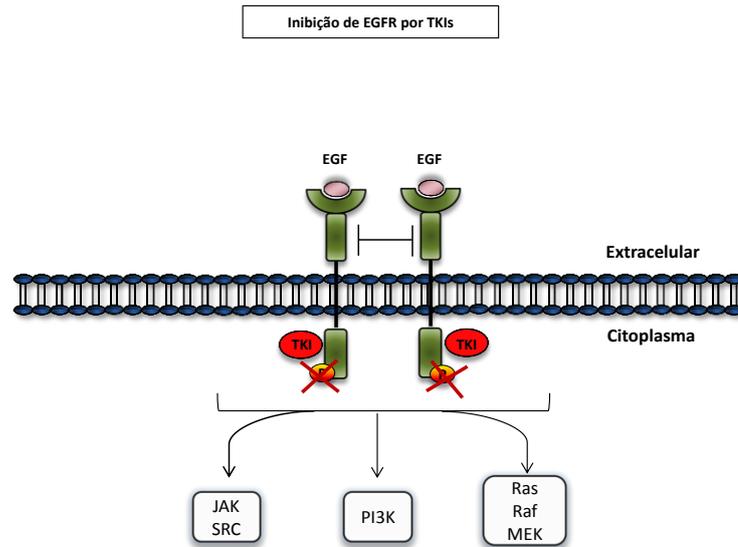


Figura 9 - Mecanismo de ação dos inibidores tirosina quinases (TKI).

Inibição do domínio tirosina quinase confere um mecanismo rápido e eficiente de inibição dos sítios de fosforilação do EGFR.

Inicialmente, dois TKIs com ação direta contra o EGFR foram aprovados pelo FDA e incorporados na prática clínica para tratamento de pacientes portadores de carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC), refratários ao tratamento com agentes quimioterápicos padrão (platina/docetaxel)⁹⁹. Estes inibidores são conhecidos como gefitinib (Iressa, AstraZeneca) e erlotinib (Tarcerva, Roche). O uso de ambos foi aprovado em maio de 2003, com base em ensaios clínicos, nos quais 1.692 pacientes portadores de CPNPC receberam de forma oral estes inibidores e apresentaram eficientes taxas de resposta, além de um considerável aumento da sobrevida global^{100, 101}.

Com bases nos promissores resultados encontrados na monoterapia e/ou em combinação com outros agentes quimioterápicos, alguns estudos foram realizados em pacientes portadores de outros tipos tumorais. Um ensaio clínico de fase III, foi conduzido em pacientes com CCECP, no intuito de avaliar a dose máxima tolerável de docetaxel quando combinado à administração semanal de cisplatina e diária de gefitinib em conjunto com a radioterapia. Neste estudo foi detectada uma dose aceitável, com baixo perfil de toxicidade hematológica e uma possível associação entre os agentes¹⁰². Por outro lado, o efeito da monoterapia foi testado em portadores com câncer de esôfago metastático, no qual 58 pacientes receberam gefitinib (250 mg, diariamente, por no mínimo 8 meses). Os resultados

mostraram uma tolerância consistente ao tratamento e uma eficácia limitada nestes pacientes com uma sobrevida média de 6,5 meses¹⁰³.

O lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline) é um inibidor reversível com efetiva ação sobre dois membros da família ErbB que são: EGFR e HER2. Em maio de 2007, esta terapia foi aprovada pelo FDA para a utilização concomitantemente com a capecitabina (precursora de 5-FU) no tratamento de câncer de mama com recidiva após tratamento com o anticorpo monoclonal transtuzumabe^{104, 105}.

1.6.3 Inibidores irreversíveis de EGFR

Na última década, foram desenvolvidas novas moléculas (TKIs) inibidoras de EGFR com ação irreversível. Estas moléculas encontram-se em fases iniciais de testes *in vitro* e *in vivo*, ou até mesmo em fases clínicas avançadas (Tabela 4), e serão descritos a seguir.

Tabela 4 - Inibidores irreversíveis de EGFR.

Inibidor	Fabricante	Alvos	Ensaio Clínico	Identificação
Afatinib	Boehringer, Inc.	EGFR, EGFR ^{L858R, E746_A750, L858R/T790M} e HER2	II e III	NCT01538381, NCT01721525, NCT01345682
Allitinib	Allist, Inc.	EFGR, EFGR ^{T790M/L858R} HER2 e HER4	II	ChiCTR-ONC-10000893
AZD9291	AstraZeneca. Inc.	EGFR ^{WT, L858R/T790M}	n.a	n.a
CNX-2006	Clovis Oncology, Inc.	EGFR ^{L858R, L858R/T790M}	n.a	n.a
CO-1686	Clovis Oncology, Inc.	EGFR ^{WT, L858R/T790M}		n.a
CUDC-101	Curis, Inc.	EGFR, HER 2 e HDAC	I	NCT01384799
Dacomitinib	Pfizer, Inc.	EGFR, HER2 e HER4	II	NCT01737008
Pelitinib	Wyeth Inc.	EGFR, HER2, Src, MEK/ERK, Raf, c-Met, CDK4	I	NCT00098501

Esta nova geração de inibidores anti-EGFR não possui apenas a capacidade de inibir alvos moleculares com mutações responsáveis por algum tipo de resistência, como também podem ter múltiplos alvos moleculares.

O inibidor afatinib (Gilotrif, Boehringer) foi especialmente desenvolvido para inibir a mutação secundária do *EGFR* (L858R/T790M), além de ter como alvo os seguintes membros

da família ErbB: EGFR (selvagem), HER2 e HER4¹⁰⁶. Recentemente, o FDA aprovou o afatinib como primeira linha de tratamento de pacientes com CPNPC, que possuem as mutações no *EGFR* (L858R ou deleção do exon 19)¹⁰⁷. O ensaio clínico LUXHead&Neck 1, avaliou o efeito do afatinib como segunda linha de tratamento de 483 pacientes portadores de CCECP metastático. Neste estudo, o afatinib demonstrou um significativo aumento na sobrevida livre de progressão, comparado ao tratamento com metotrexato¹⁰⁸. Um ensaio clínico multicêntrico fase III (LUX-Head&Neck III), conduzido em pacientes com CCECP, avalia a eficiência e segurança do afatinib com terapia adjuvante em pacientes refratários a regimes terapêuticos baseados em cisplatina e radioterapia (NCT01538381). Além disso, resultados preliminares de um ensaio clínico fase II, demonstrou que o uso do afatinib neoadjuvante reduziu significativamente o volume tumoral, acessado por FDGPET (*18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography*) em pacientes com CCECP.

O inibidor allitinib (AST1306, Allist Pharmaceuticals Inc.) é um inibidor irreversível contra o EGFR, HER2 e HER4, que apresenta uma potente ação inibitória *in vitro* e *in vivo* do EGFR, além de ter potencial inibitório contra a mutação secundária de resistência (L858R/T790M)¹⁰⁹. Um recente estudo clínico (ChiCTR-ONC-10000893) conduzido com pacientes portadores de tumores sólidos demonstrou benefícios preliminares na estabilidade da doença (6 meses). Embora, exibindo um potente efeito na inibição de EGFR *in vitro* em tumores sólidos como mama, ovário e pulmão, nenhum ensaio pré-clínico ou clínico foi conduzido com pacientes portadores de CCECP.

Outro inibidor irreversível do EGFR, AZD9291 (Osimertinib, AstraZeneca) tem uma potente ação comprovada para as mutações L858R/T790M do *EGFR*. Inicialmente, os ensaios clínicos demonstraram o benefício clínico do AZD9291 em pacientes portadores de CNCP refratário a primeira geração de anti-EGFR¹¹⁰ e, logo em seguida, foi aprovado para tratamento destes pacientes¹¹¹. Embora nenhum ensaio tenha sido conduzido com pacientes portadores de CCECP, o inibidor AZD9291 representa uma promissora estratégia para estes pacientes.

1.7 Mecanismos de resistência à terapia alvo anti-EGFR

A resistência aos agentes quimioterápicos pode ocorrer devido à diminuição da atividade farmacológica do mesmo, sendo classificada em resistência primária (indolente ao

tratamento inicial) ou adquirida (desenvolvida durante o tratamento). Primária ou adquirida, estas duas formas de resistência a quimioterápicos são fatores críticos que limitam o tratamento destes pacientes¹¹². Um exemplo clássico da modulação de resposta aos TKIs acontece em pacientes portadores de carcinoma de pulmão de não pequenas células, na qual as mutações do gene *EGFR* são comuns. Neste caso 75% dos tumores com mutação respondem positivamente aos TKIs e 25% apresentam resistência primária ao gefitinib¹¹³.

Um trabalho extensivo baseado em uma revisão sistemática da literatura teve como objetivo determinar os valores preditivos dos testes mutacionais de *KRAS* em pacientes com carcinoma de CCRm ou refratários à quimioterapia, que foram posteriormente tratados com anticorpos monoclonais anti-EGFR: cetuximabe ou panitumumabe. Os autores reforçam a evidência de que o estado mutacional de *KRAS* é uma ferramenta preditiva de resposta à monoterapia ou associada aos anticorpos¹¹⁴.

Além do gene *KRAS*, outros membros da família Ras, vêm sendo associados aos mecanismos intrínsecos de resistência aos agentes quimioterápicos anti-EGFR, como é o caso das mutações no gene *NRAS*, que foram associadas a um pior prognóstico de pacientes com CCRm¹¹⁵. Neste mesmo estudo, os pesquisadores também associam o estado mutacional de outros genes como *BRAF* e *PIK3CA*, a uma baixa taxa de resposta a este tratamento¹¹⁵.

A resistência adquirida ao cetuximabe ocorre frequentemente de forma progressiva durante o tratamento. É o que exemplifica um estudo realizado em uma coorte de 100 pacientes com CCRm, da qual uma grande faixa de pacientes apresenta características favoráveis ao tratamento com cetuximabe (40%), pois não possuem mutações relacionadas à resistência ao cetuximabe/panitumumabe. Entretanto, aproximadamente 20% destes pacientes, previamente selecionados, não respondem ao tratamento desenvolvendo uma resistência adquirida (Figura 10)¹¹⁶. Embora aprovado para o tratamento de pacientes com CCECP, a terapia anti-EGFR realizada com anticorpos monoclonais não apresenta um biomarcador específico de resistência primária utilizado na prática clínica.

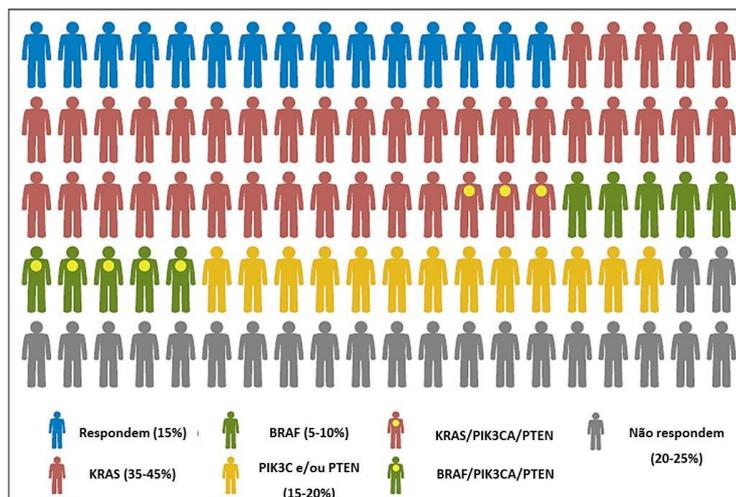


Figura 10 - Resposta clínica ao cetuximabe.

Mecanismos de resistência são adquiridos durante o tratamento em pacientes com mutações nos genes preditivos de resposta e sem marcadores de resistência primária¹¹⁶.

1.8 Mecanismos de resistência adquirida ou secundária

Várias hipóteses vêm sendo sugeridas como causa da resistência adquirida em pacientes submetidos a tratamento com anticorpos monoclonais contra o EGFR. Inicialmente, este fenômeno foi associado com o aumento da expressão do receptor. Entretanto, nenhum estudo conseguiu demonstrar correlação entre a expressão por imunohistoquímica do EGFR e a resposta a esta terapia em portadores de carcinoma de pulmão de não pequenas células¹¹⁷ e CCRm¹¹⁸. Sabendo que o aumento do número de cópias do *EGFR* pode favorecer a maior ativação e sinalização das vias intracelulares responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular, alguns estudos sugeriram que o aumento do número de cópias do *EGFR* poderia ser um potencial biomarcador preditivo da resposta ao cetuximabe. Um estudo *in vitro* realizado com um painel de 25 linhagens tumorais de cabeça e pescoço, mostra que o número de cópias do *EGFR* interfere na radiosensibilidade e na resposta terapêutica ao cetuximabe e cisplatina¹¹⁹.

As mutações de *KRAS* são praticamente ausentes (<1%), ao passo que as mutações em *EGFR* estão presentes em 5% dos casos de CCECP¹⁸. Nos pacientes portadores de CCECP, estas alterações não estão associadas à resposta ao cetuximabe. Alguns estudos chamam atenção para outras alterações associadas à resposta a inibidores de EGFR, como o aumento da expressão dos ligantes amfiregulina¹²⁰, heregulina¹²¹ e TGF- α ¹²². Finalmente, a

translocação nuclear do EGFR e a superexpressão dos ligantes EGF, ARG e HB-EFG também foram associados a um fenótipo resistente em estudos pré-clínicos, que usaram linhagens celulares resistente ao cetuximabe ⁸¹.

Outras hipótese tem sido abordadas experimentalmente, como a deleção *in-frame* deste receptor ocasionando a forma truncada EGFRvIII de 150 kDa¹²³ e a ativação de outros receptores tirosina quinases que podem atuar como oncogenes: c-MET(receptor do fator de crescimento do hepatócito)¹²⁴, e AXL (receptor tirosina quinase AXL)¹²⁵.

2 JUSTIFICATIVA

O produto do oncogene *EGFR* é um importante alvo oncológico devido ao seu papel central na carcinogênese de tumores sólidos em geral. O anticorpo monoclonal anti-EGFR, cetuximabe, foi aprovado para o tratamento de pacientes com CCECP e CCRm. Esta promissora terapia alvo demonstrou eficácia em somente um grupo de pacientes e por tempo limitado, em consequência da resistência natural ou adquirida pelas células tumorais. Neste contexto, uma nova geração dos inibidores de EGFR, como o afatinib e allitinib, foi desenvolvida.

Para um tratamento eficaz, é necessário identificar quais os biomarcadores de resposta, de forma a selecionar os pacientes que irão se beneficiar das terapias moleculares.

As mutações no gene *KRAS* são os únicos biomarcadores preditivos de resistência ao cetuximabe em pacientes com câncer colorretal. No entanto, não existe um biomarcador preditivo de resposta às terapias anti-EGFR, associado à resistência em pacientes com CCECP.

3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os biomarcadores preditivos de resposta a diferentes terapias anti-EGFR em tumores sólidos, com especial destaque para tumores de cabeça e pescoço.

3.1 Objetivo específicos

3.1.1 Avaliar os mecanismos de resistência adquirida ao cetuximabe em linhagens de CCECP

- Criar um modelo *in vitro* de resistência ao cetuximabe.
- Avaliar as consequências fenotípicas da resistência adquirida ao cetuximabe através de ensaios biológicos *in vitro*.
- Avaliar as alterações genéticas presentes na linhagem de CCECP resistente ao cetuximabe.

3.1.2 Comparar o efeito citotóxico dos inibidores irreversíveis de EGFR em linhagens de CCECP

- Comparar a atividade antineoplásica dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib com o anticorpo monoclonal cetuximabe em um painel de linhagens de CCECP.
- Identificar os biomarcadores de resposta a esta nova geração de inibidores irreversíveis de EGFR.
- Validar os biomarcadores de resistência primária, através de análises funcionais de linhagens celulares e *in silico* de pacientes portadores de CCECP.

3.1.3 Avaliação do efeito antineoplásico do inibidor allitinib em tumores sólidos

- Avaliar a atividade antineoplásica do inibidor irreversível allitinib em um extenso painel de linhagens tumorais.
- Identificar os biomarcadores primários de resposta ao allitinib.
- Validar os biomarcadores de resposta ao allitinib, através de ensaios funcionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fármacos

O anticorpo monoclonal cetuximabe (Bristol-Myers Squibb), utilizado neste trabalho foi obtido a partir de suspensão industrialmente diluída na concentração de 5mg/mL e acondicionado a 4°C. As concentrações de cetuximabe utilizadas neste trabalho foram: 20, 30, 50, 100, 200 e 250 µg/mL. O erlotinib (Selleck Chemicals – cod. S1023) foi diluído em DMSO, para obtenção do estoque na concentração de 10 mM e acondicionado a -20°C. O allitinib (AST1306) (Selleck Chemicals – cod. S2185) foi diluído em DMSO, para obtenção do estoque na concentração de 10 mM, acondicionado a -20°C. O lapatinib (Selleck Chemicals – cod. S2111) foi diluído em DMSO, para obtenção do estoque na concentração de 10 mM, acondicionado a -20°C. O afatinib (Selleck Chemicals – cod. S1011) foi diluído em DMSO, para obtenção do estoque na concentração de 10 mM, acondicionado a -20°C. O inibidor MK-2206 (Selleck Chemicals – cod. S1078) foi diluído em DMSO, para obtenção do estoque na concentração de 10 mM, acondicionado a -20°C. O everolimus (Sigma aldrich – cod. 07741) foi diluído em DMSO, para obtenção do estoque na concentração de 10 nM, acondicionado a -20°C. O nome comercial de cada inibidor e seus respectivos alvos estão reunidos na Tabela 5.

As concentrações de erlotinib, allitinib, lapatinib e afatinib utilizadas neste trabalho consistem de uma curva de doses crescentes de concentração de cada inibidor.

Tabela 5 - Inibidores moAb (anticorpos monoclonais) e tirosina quinase (TKI) utilizados neste estudo.

Inibidor	Tipo	Alvo	Fornecedor
Cetuximabe	moAb	EGFR	Merck
AST-1306	moAb	EGFR, EGFR ^{T790M/L858R} HER2 e HER4	Selleck chem.
Erlotinib	TKI	EGFR	Selleck chem.
Lapatinib	TKI	EGFR , HER2	Selleck chem.
Afatinib	TKI	EGFR ^{wt,(L858R), (L858+T790M)} ; HER2	Selleck chem.
MK-2206	TKI	Akt1/2/3	Selleck chem.
Everolimus	-	mTOR	Sigma Aldrich

4.2 Linhagens celulares tumorais

Os detalhes como a origem e as condições de cultura das linhagens celulares tumorais utilizadas neste estudos estão reunidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Linhagens celulares utilizadas neste estudo.

Tipo tumoral	Linhagem celular	Origem	Condições de cultura
Câncer de Bexiga	5637	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	MCR	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	HT1376	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	T24	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
Câncer de Mama	MDA468	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	MDA231	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	MCF7	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	BT20	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	T47-D	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	HS578T	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
Câncer Cervical	HeLa	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SiHa	Gentilmente cedida pela Dra. Luisa Villa	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	Caski	Gentilmente cedida pela Dra. Luisa Villa	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	C33A	Gentilmente cedida pela Dra. Luisa Villa	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
Câncer de colorretal	SW620	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	LOVO	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	SK-CO10	Gentilmente cedida pelo Dr. Wilson da Silva Junior	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	CACO-2	BCRJ	DMEM + 20% SFB + 1% P/S
	SW480	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	Co115	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	DLD1	Gentilmente cedida pelo Dr. Wilson da Silva Junior	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	HCT15	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
Câncer Esofágico	Kyse 70	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	Kyse 30	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	Kyse 270	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	Kyse 410	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
Gliomas	GAMG	DSMZ	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SW1783	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SW1088	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SNB19	DSMZ	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	U251	Gentilmente cedida pelo Dr. Joseph Costello	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	U373	Gentilmente cedida pelo Dr. Joseph Costello	DMEM + 10% SFB + 1% P/S

continua na próxima página...

	U87MG	ATCC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SF188	Gentilmente cedida pelo Dr. Chris Jones	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	Res259	Gentilmente cedida pelo Dr. Chris Jones	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	Res186	Gentilmente cedida pelo Dr. Chris Jones	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	UW479	Gentilmente cedida pelo Dr. Chris Jones	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	KNS52	Gentilmente cedida pelo Dr. Chris Jones	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
CCECP	SCC-25	BCRJ	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SCC4	BCRJ	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	HN13	Gentilmente cedida pelo Dr. Marco da Silva	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	FADU	Gentilmente cedida pelo Dr. Wilson S. Junior	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	JHU28	Gentilmente cedida pelo Dr. Joseph Califano	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	JHU12	Gentilmente cedida pelo Dr Joseph Califano	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	JHU13	Gentilmente cedida pelo Dr Joseph Califano	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
Câncer de Pulmão	A549	ECACC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	SK-MES-1	ECACC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	H292	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	H1975	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	H827	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	PC9	BCRJ	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	LUDLU-1	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	COR-L105	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	H2228	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	COR-L23	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	H332	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	H358	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	H727	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	Calu-3	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
SK-LU-1	ECACC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S	
Melanoma	Colo858	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	WM9	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	A375	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	WM1617	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	WM852	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	WM793	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	Colo679	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	SK-MEL	Gentilmente cedida pela Dr. Enilza Espreafico	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	GRM	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
Câncer Pancreático	BXPC-3	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
	PSN1	ECACC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	PANC1	ECACC	DMEM + 10% SFB + 1% P/S
	MiaPaCa2	ECACC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
Câncer de Próstata	PNT2	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S

continua na próxima página...

LNCap	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S
PC3	ATCC	RPMI + 10% SFB + 1% P/S

CCECP – carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; CEP* – carcinoma epidermóide de pele (controle); SFB: soro fetal bovino; P/S: penicilina/estreptomicina; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; RPM I: RPMI-1640 medium; ATCC: American Type Culture Collection; ECACC: European Collection of Cell Cultures; DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro.

Todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho, foram suplementadas com soro fetal bovino (SFB) (Gibco – cod. 12657-029) e penicilina/estreptomicina (Sigma – cod. P4333). As linhagens foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada. A autenticação das linhagens celulares foram realizadas pela análise de STR (*short tandem repeat*) de acordo com a padronização de referência internacional para autenticação de linhagens celulares, usando um painel de 8 *primers* fluorescentes (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX e CSF1P0)¹²⁶ no Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

4.3 Manutenção e passagens das linhagens celulares

As células foram cultivadas em frascos de cultura celular T25 contendo 25 cm² (TPP, Suíça) com seu meio específico, até obterem 80% de confluência. Em seguida foram trispsinizadas com a incubação de 500 uL de Tryple express (Gibco – cod. 12604021) por 5 minutos a 37° C. Aproximadamente 5 mL de meio de cultura completo foram usados na inativação da tripsina. Após inativação as células, em suspensão, foram transferidas para novos frascos de cultura (T25) na proporção de 1:2. As células utilizadas em todos os testes se encontravam em 3ª passagem ou superior para garantir os padrões celulares estáveis após descongelamento.

4.4 Estocagem das células por longos períodos

Após realização dos experimentos as linhagens foram trispsinizadas, inativadas, centrifugadas e ressuspendidas em solução de congelamento (SFB + 5% DMSO) e imediatamente colocadas em tubos de criopreservação. Em seguida foram acondicionadas por uma hora a -20° C e logo em seguida por 24 horas -80° C e finalmente estocadas por um longo período de tempo em nitrogênio líquido.

4.5 Contagem de células

Após a tripsinização e inativação, as células foram contadas com auxílio do contador de células automatizado Countess (Invitrogen – cod. C10311), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade necessária de células viáveis para cada experimento foram separadas e semeadas em suas respectivas placas ou frascos de cultura.

4.6 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi conduzido com o kit comercial Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega – cod. G3581). Este ensaio consiste em um método colorimétrico para determinar indiretamente o número de células viáveis nos ensaios de proliferação ou citotoxicidade. O método é baseado no composto tetrazólio [3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS] usado como um reagente de acoplamento de elétrons (fenazina ethosulfate; PES). O PES possui uma estabilidade química melhorada, o que lhe permite ser combinado com MTS para formar uma solução estável colorida. Ao medir a absorvância das diferentes amostras, pode-se inferir o número de células viáveis em cada condição estabelecida. Utilizamos neste ensaio, 3 a 5 x10³ células, as quais foram imediatamente semeadas em placas de 96 poços, em triplicatas. Após 24 horas, foram acrescentados em cada triplicata pontos de concentrações crescentes de cada fármaco testado. Após 72 horas de incubação, foi adicionado o MTS e sua absorvância foi medida em leitor de placa de ELISA (Varioskan Flash-Thermo scientific) a 490 nm, após 1 hora de incubação. Os dados brutos obtidos foram normalizados em relação à sobrevivência média das amostras tratadas apenas com DMSO ou veículo de diluição específico para cada fármaco (controle). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

4.7 Determinação do IC₅₀ e GI (inibição do crescimento)

O IC₅₀ é o cálculo da concentração necessária de uma substância capaz de reduzir 50% da viabilidade celular. Em nosso estudo, os resultados dos valores de absorvância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular no qual as células em presença do

veículo (DMSO) foram utilizadas como controle, correspondendo a 100% de sobrevivência. A análise da regressão não linear foi realizada pelo programa Graphpad versão 5. Após determinação do IC_{50} das linhagens celulares, utilizamos uma classificação de sensibilidade baseada no GI (inibição do crescimento), que permite avaliar, em uma concentrações fixa, as médias de inibição categorizando a resposta à terapia em 3 grandes grupos: altamente sensíveis - AS (GI>60%), moderada sensibilidade - MS (GI 40 – 60%) e resistentes - R (GI<40%)¹²⁷.

4.8 Modelo de resistência ao Cetuximabe

As linhagens A431 (carcinoma epidermóide), Fadu (CCECP), SCC25 (CCECP), foram escolhidas com base em pesquisas no banco de dados COSMIC, para assegurar que ambas possuem *status* selvagem para os genes *EGFR*, *KRAS* e *BRAF*, sendo posteriormente testadas quanto à presença das mutações descritas. Inicialmente, as linhagens celulares A431 e Fadu envolvidas neste estudo foram classificadas quanto à resposta ao cetuximabe, através do ensaio de citotoxicidade (MTS). Em seguida, as linhagens celulares escolhidas para o modelo de resistência foram colocadas por um longo período de exposição a doses crescentes de cetuximabe, intervaladas por períodos de recuperação para repovoamento da cultura celular (Figura 11). As condições da cultura celular foram avaliadas diariamente, e se necessário, as concentrações de cetuximabe eram repostas após 72 horas, para evitar a inativação do fármaco devido a altas temperaturas. As doses iniciais de cada cultura foram determinadas individualmente de acordo com a sensibilidade de cada linhagem.

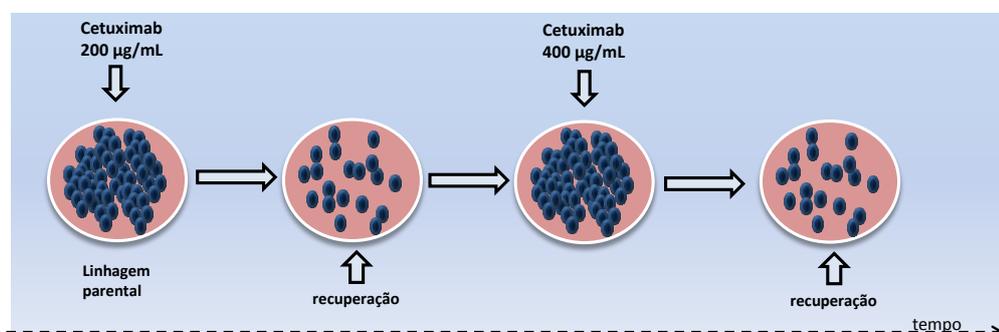


Figura 11 - Esquema do modelo de resistência incremental ao cetuximabe.

As linhagens foram submetidas a doses crescentes de Cetuximabe, seguido de períodos de recuperação.

Ao longo do tempo os clones representativos das doses incrementais foram retirados da cultura e selecionados mais uma vez, com a última dose incremental de cetuximabe. Estes clones foram utilizados nas abordagens posteriores, para verificar as alterações que ocorreram provenientes da resistência adquirida ao cetuximabe.

4.9 Determinação da Viabilidade, citotoxicidade e caspase clivada

A viabilidade, citotoxicidade e presença de caspases 3 e 7 clivadas foram detectadas pelo kit comercial ApotoxiGlo-Triple assay (Promega – cod. G6321). Esta metodologia permite mensurar simultaneamente 3 parâmetros em um único ensaio. Neste ensaio as células foram semeadas (5×10^3) em placas de 96 poços com laterais opacas. Em seguida foram expostas aos fármacos propostos neste estudo. Após 72 horas, foram realizadas as leituras das placas em leitor com capacidade de detecção de quimioluminescências (Varioskan Flash-Thermo scientific). As leituras relativas de fluorescência (RFU), indicadoras de citotoxicidade-viabilidade, e a leitura relativa de luminescência (RLU), indicadora de apoptose, foram utilizadas na análise e interpretação dos resultados.

4.10 Western Blotting

As linhagens celulares foram homogeneizadas em tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM benzamidina, 0,2 mM PMSF, 0,1 M aprotinina, 20 μ g/mL leupeptina e 0.1 mM pefabloc. Todo o procedimento foi realizado em contato com gelo, para evitar a degradação das proteínas. O homogeneizado foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 15 minutos a $4^\circ C$. O sobrenadante foi utilizado nas análises em gel SDS-PAGE para avaliação do perfil proteico das amostras. A concentração de proteína total foi estimada através de uma curva padrão de BSA utilizando o reagente de Bradford (Sigma-cod. B6916), e as leituras da absorbância foram determinadas a 595nm em leitura de placas (Varioskan Flash-Thermo scientific). Em seguida, 20 μ g de proteína foram preparadas em tampão desnaturante Laemmli. As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose, sondadas com anticorpos específicos. A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada no sistema de fotodocumentação Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare – cod. 28-9558-13) e, posteriormente, as bandas marcadas foram

analisadas e quantificadas utilizando o software Image J, obtendo o índice de densidade óptica das bandas.

4.11 Anticorpos

Todos os anticorpos foram diluídos segundo as recomendações dos seus fabricantes e estocados a -20° C. Os anticorpos utilizados neste trabalho estão listados acima com as respectivas informações e diluições utilizadas.

Tabela 7 - Anticorpos utilizados.

Anticorpos	Diluição	Condição	Fabricante/código
Anti-EGFR (total)	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #4267
Anti-EGFR (fosforilado)	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #3777
Anti-ERK 1/2 (total)	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #4695
Anti-ERK 1/2 (fosforilado)	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #4370
Anti-AKT (total)	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #4691
Anti-AKT (fosforilado)	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #4060
Anti- α actina	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #4967
Anti- β tubulina	1:1000	TA – 1 hora	Millipore/ 05-661
Anti-AKT1 isoforma	1:1000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #2938
Anti-mouse IgG HPR	1:3000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #7076
Anti-rabbit IgG HPR	1:5000	TA – 1 hora	Cell signaling/ #7074

TA – temperatura ambiente.

4.12 Transfecção das linhagens celulares com siRNA

O silenciamento do gene *AKT1* foi conduzido com o kit comercial TriFECTa-RNAi (IDT, EUA) constituído por um duplex controle negativo, 3 diferentes duplex contra *AKT1* e um duplex para controle da eficiência da transfecção (TYE 536). As sequências e detalhes de todos os duplex estão listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Sequência dos duplex usados como siRNA.

Duplex	Sequência	Peso molecular (Anidro)
TYE 563	5' - /5TYE563/T*CCUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUG*A - 3'	8,767.5
	3'- A*GGAAGGGGAAAGAGAGGGAACAC*T/5TYE563/ - 5'	9,404.2
Duplex I (AKT1)	5' - CCCUCAGAACAAUCCGAUUCACGTA - 3'	7,866.8
	3' - UCGGGAGUCUUGUUAGGCUAAGUGCAU - 5'	8,667.2
Duplex II (AKT1)	5' - AGAGGAGCAAGGUUUAAAUUUGUTA - 3'	8,053.9
	3' - UGUCUCCUCGUUCCAAAUUAAACAAU - 5'	8,460.1
Duplex III (AKT1)	5' - GGCUGACGGCCUCAAGAAGCAGGAG - 3'	8,106.0
	3' - CACCGACUGCCGGAGUUCUUCGUCCUC - 5'	8,497.1
Controle (-) (irrelevante)	5' - CGUUAUUCGCGUAUAAUACGCGUAT - 3'	7,925.8
	3' - CAGCAAUUAGCGCAUUAUUAUGCGCAUA - 5'	8,601.2

A transfecção foi realizada em placas de cultura de 6 poços com aproximadamente 70-80% de confluência. Como agente transfectante, foi utilizada Lipofectamina 2000 (Life Technologies), de acordo com as especificações de uso sugeridas pelo fabricante. Diferentes concentrações dos 3 duplex foram utilizadas para otimização da técnica e a seleção do duplex mais eficiente. Após 72 horas da transfecção, os níveis de expressão da proteína AKT1 foram avaliados por Western blotting. Os ensaios de citotoxicidade dos inibidores de EGFR foram novamente conduzidos nas células transfectadas.

4.13 Sequenciamento direto dos genes *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*

O DNA obtido a partir das linhagens celulares utilizadas neste estudo foi extraído com TRizol® Reagent (Life Technologies). Foi adicionado 1 mL do reagente em garrafa de cultura (T25) confluenta para completa lise celular e exposição do material genético. Em seguida, foi realizada a separação das fases aquosas, intermediária e orgânica com a adição de 200 µL de clorofórmio. A precipitação do DNA remanescente das fases intermediária e orgânica foi realizada com adição de 300 µL de etanol absoluto (MERCK). Após a centrifugação à 3000 rpm por 5 minutos, o DNA extraído passou por uma série de 3 lavagens com citrato de sódio 10% em ETOH (0,1M), e 2 lavagens com etanol 70%. O DNA extraído foi deixado em

temperatura ambiente para evaporação e ressuspenso com 30 µL de água ultrapura e quantificado no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific).

O DNA extraído das linhagens celulares foi amplificado por PCR, no qual a reação final foi padronizada com um volume final de 15 µL. O mix de reagentes usados foi composto de 1X tampão incompleto, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,3 µM de cada primer de interesse e 0,5 U de polimerase (Platinum Taq DNA Polimerase), juntamente com 50 ng/µL do DNA de cada amostra avaliada. Os parâmetros de ciclagem usados foram uma denaturação inicial a 96° C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos de 96° C por 45 segundos e 58° C por 45 segundos para *EGFR*; 55,5° C por 45 segundos para os genes *BRAF* e *PIK3CA*; 72° por 45 segundos para *NRAS* e 52° C por 45 segundos para *PTEN*. Para todos os genes foi utilizada a temperatura de 72° C para extensão final.

Os produtos do PCR de cada gene foram purificados com a enzima EXOSAP-IT (Affymetrix, USB) e submetidas a sequenciamento direto usando o kit de sequenciamento ABI PRISM BigDye XTerminator e BigDye XTerminator purification kit (Applied Biosystems). As análises das mutações foram analisadas nos softwares Genetic Analyzer ABI PRISM 3500 e SeqScape version 2,7 (Applied Biosystems).

4.14 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Para avaliar as alterações do número de cópias do *EGFR*, foi realizado uma hibridização fluorescente *in situ*, utilizando a sonda comercial EGFR ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe (ZytoVision). As células foram cultivadas em frascos T25 até atingirem 85% de confluência. Em seguida foram desaderidas com auxílio de acutase (Accutase® Cell Dissociation Reagent – Gibco) por 5 minutos. As amostras foram semeadas em lâminas histológicas e fixadas em uma solução metanol/ácido acético (3:1). Posteriormente as lâminas foram lavadas em solução 2X SCC a 37° C, tratadas, desidratadas em uma bateria de etanol (70, 85 e 100%) e colocadas para secar em temperatura ambiente. A hibridização das sondas foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante. A remoção de ligações inespecíficas foi realizada em tampão contendo Igepal. As análises de 30 células foram usadas para a classificação quanto ao aumento do número de cópia do *EGFR*. A razão entre o EGFR:CEN7 foi calculada entre o número de cópia encontrado para *EGFR* e centrômero como descrita previamente no trabalho de Chung e colaboradores²⁰.

4.15 Criação de uma linhagem estável mutante para *KRAS*.

Para a criação de uma linhagem estável com mutações ativantes no gene *KRAS* (p.G12D e p.G12S), foi utilizada a linhagem H292 de CPNPC, que apresenta o genótipo selvagem para este gene. A linhagem H292 foi transfectada com os plasmídeos comerciais pEGFP.C1.KRAS_wt; pEGFP.C1.KRAS_G12D e pEGFP.C1.KRAS_G12S (Reniguard Life Science Inc.). Para este objetivo, $2,5 \times 10^5$ células foram semeadas em placas de 6 poços e transfectadas com Fugene HD (Promega – cod. E2311) de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 horas de transfecção, as células foram selecionadas em um meio de cultura contendo neomicina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante duas semanas. Após esta seleção, cada linhagem celular transfectada foi submetida a uma separação por citometria de fluxo (BD FACS Aria II), para o enriquecimento das populações celulares (EGFP positivas). Após o enriquecimento, foi realizado a confirmação das mutações inseridas na linhagem H292 por sequenciamento direto do gene *KRAS*, utilizando os *primers*: hCMV_F: AGCAGAGCTGGTTTAGTGAAC e KRAS_R: CCAAGAGACAGGTTTCTCCATCA. Em seguida foram avaliadas as alterações decorrentes das mutações p.G12D e p.G12S do gene *KRAS*, na resposta a inibidores de EGFR.

4.16 Análise do exoma por sequenciamento de nova geração

As linhagens celulares Fadu (parental) e Fadu resistente (clone 10), foram encaminhadas a um serviço de genética (Mendelics análise genômica S.A) onde foi realizado o sequenciamento do exoma por tecnologia de nova geração. Uma alíquota de DNA na concentração de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ foi encaminhada ao prestador de serviços, que utilizou a plataforma de sequenciamento de nova geração Illumina HiSeq2500. A porcentagem de bases cobertas pelo sequenciamento foi de 87% na linhagem celular Fadu (parental) e 57% na linhagem celular Fadu (clone 10). Após a geração e alinhamento das sequências de interesse, os dados foram analisados na ferramenta de bioinformática Variscan2, a fim de se encontrar significativas alterações genéticas e seu efeito biológico na linhagem resistente.

4.17 Análise da expressão génica (*array* de expressão)

Para a validação do perfil de expressão de mRNA da linhagem Fadu (parental e clone resistente), foram utilizadas lâminas de *microarray Gene Expression Microarray*, 4x44K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) em metodologia *dual-color* (Cy3 e Cy5), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração e quantificação do RNA das linhagens, 500 ng de RNA total com adição de RNA controle (*spike in*), foram conduzidas a transcrição reversa com auxílio da enzima MMLV-RT (*Maloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase*) para a construção do cDNA dupla fita a partir de *primers* adaptados a um promotor T7 na região 5' da fita de cDNA. Posteriormente, foi adicionado à enzima T7 polimerase com nucleotídeos marcados com os fluorocromos cianina 3 (Cy3) ao cDNA das linhagem Fadu parental, chamada nesta abordagem de controle, e cianina 5 (Cy5) ao cDNA da linhagem Fadu resistentes, chamada nesta abordagem de Clone C10. Esta etapa consistiu na amplificação de RNAs complementares *anti-sense* (cRNA). Os respectivos cDNAs foram purificados com colunas comerciais, e posteriormente hibridizados nas lâminas por 17 horas na temperatura constante de 65° C em forno de hibridização (Agilent Technologies). Finalmente, as lâminas hibridizadas foram lavadas nos tampões *Wash Buffer 1* e *Wash Buffer 2*, de acordo com as instruções do fabricante. Após as sucessivas lavagens, as lâminas foram escaneadas a 550 nM (espectro verde – Cy3) e 640 nM (espectro vermelho – Cy5) no equipamento *Agilent Scanner SureScan* (Agilent Technologies). A extração dos dados e controle de qualidade foi realizado pelo software *Feature Extraction*, versão 10.7 (Agilent Technologies), que realiza o posicionamento automatizado das *grids*, baseado em regiões marginais, fornecendo os gráficos de controle de qualidade da reação de hibridização. Os oligonucleotídeos, foram identificados pelo protocolo customizado *GE2_107_Sep09*. Após a quantificação, foram selecionadas as médias dos dados brutos (gMeanSignal), além da médias do *background* (gBGMeanSignal) utilizadas para as futuras análises.

Os dados de expressão foram analisados em ambiente R, versão 2.11.0. Para a inclusão dos dados, identificação das *flags* e geração das matrizes de expressão, foi utilizado o pacote *limArray* para retirada dos controles positivos e negativos, valores que sobrepuseram o *background*, e conversão de dados em escala logarítmica. Em seguida, os dados foram normalizados pela metodologia *quantile* para futura aplicação estatística.

4.18 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com auxílio do softwar Graph Prism versão 5.0 (Graph Prism Software, San Diego, USA) e SPSS versão 9.0 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS, Chicago, USA). A associação entre as taxas de resposta ao allitinib e as mutações nos genes encontradas foi realizada usando o teste do qui-quadrado, e o nível de significância foi considerado como $p < 0,05$. Nos ensaios celulares a comparação entre os grupos foi feita pelo teste One Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

A análise estatística dos dados de expressão foi realizada pelo *rank products*, utilizando o pacote RankProd na plataforma R (Rstudio versão 2.11.0). Neste trabalho, os genes foram considerados significativos com valores de $p \leq 0.005$. Os agrupamentos de genes corregudados foram submetidos à análise funcional usando o banco de dados DAVID (*Database for Annotation, Vizualization and Integrated Discovery*), versão 6.7. Nesta abordagem, foram identificados os processos biológicos e vias dos genes diferencialmente expressos entre as duas linhagens testadas: Fadu parental e Fadu resistente. Foi considerada significativa a categoria que apresentou no mínimo 3 genes e um classificação $p \leq 0,05$, após correção de Benjamini-Hochberg. Os bancos de dados analisados foram: Biocarta, KEEG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e Reactome. Os *heat maps* foram construídos utilizando o pacote de dados ComplexHeatmaps versão 1.6.0 na plataforma R (Rstudio versão 2.11.0).

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em três etapas, com a finalidade de responder aos objetivos específicos descritos no item 3.1 desta tese.

5.1 Avaliação dos biomarcadores de resposta a cetuximabe em modelos *in vitro* de cabeça e pescoço

O primeiro objetivo deste estudo consiste na busca por biomarcadores da resposta ao cetuximabe, utilizando um modelo *in vitro*. Nesta abordagem é proposto um modelo de resistência incremental a partir do qual foram selecionados clones resistentes desta terapia. Os resultados a seguir descrevem a avaliação do modelo de resistência, quanto à perda de eficiência do cetuximabe e às alterações genéticas associadas a este mecanismo.

5.1.1 Caracterização de sensibilidade ao cetuximabe

Como parâmetro da resposta ao cetuximabe, foi utilizado como controle para todos os experimentos, a linhagem A431. Os ensaios de viabilidade (MTS) demonstraram uma redução de aproximadamente 60% da viabilidade celular na última dose testada de cetuximabe (250 µg/mL), com cálculo de IC₅₀ de 120 µg/mL (Figura 12A). A caracterização do potencial inibitório também foi verificado por Western blotting. Logo após um período de 2 horas em meio livre de soro, as células foram expostas 2 horas em duas concentrações de cetuximabe 50 e 100 µg/mL. Em seguida a estimulação de EGFR foi realizada com EGF (10 ng/mL), a fim de constatar o efeito inibitório do fármaco nas vias efetoras intracelulares. O cetuximabe na dose de 50 µg/mL foi capaz de reduzir a fosforilação de EGFR quando esta via foi estimulada com EGF. Além disso, na mesma dose, houve a redução total da fosforilação de ERK1/2, juntamente com os níveis de fosforilação de AKT (Figura 12B).

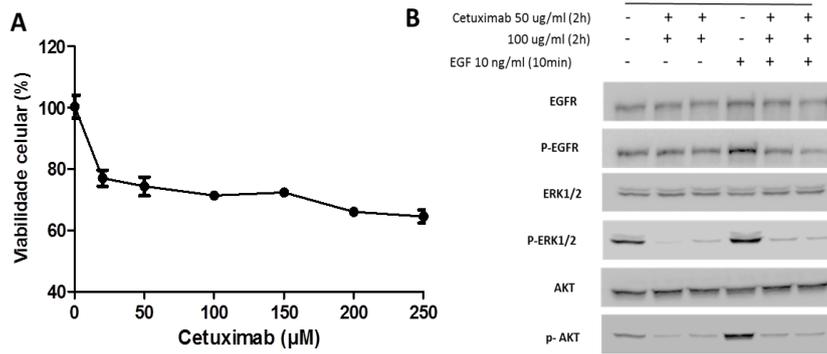


Figura 12 - Caracterização do padrão de sensibilidade da linhagem A431.

A – Viabilidade da linhagem A431, exposta às concentrações variáveis (0 – 250 µg/mL) de cetuximabe. B- western blotting do lisado de células A431 e imunomarcação de proteínas intracelulares.

5.1.2 Seleção das linhagens do modelo de resistência ao cetuximabe

Com base nos resultados anteriores da sensibilidade das linhagens tumorais, as linhagens A431 (controle) SCC25 e Fadu foram escolhidas para compor o modelo de resistência ao cetuximabe. As linhagens escolhidas possuem estado selvagem para os genes *EGFR*, *KRAS* e *BRAF*, segundo pesquisa realizada no banco de dados COSMIC. O perfil mutacionais foi confirmado através de sequenciamento direto dos seguintes genes: *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* e *PTEN* (Tabela 9).

Tabela 9 - Perfil mutacional dos genes *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA* e *PTEN*.

Linhagem celular	<i>BRAF</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>KRAS</i>	<i>EGFR</i>	<i>PTEN</i>
A431	WT	WT	WT	WT	WT
SCC25	WT	WT	WT	WT	WT
Fadu	WT	WT	WT	WT	WT

WT- selvagem.

As concentrações utilizadas no modelo de resistência foram baseadas em teste de tolerância, juntamente com os dados de IC₅₀ de cada linhagem. As informações quanto à

quantidade e clones foram reunidas na Tabela 10, para melhor compreensão e análise do comportamento de cada uma das linhagens. O tempo de exposição ao cetuximabe variou individualmente em cada linhagem, onde linhagens mais sensíveis como a A431 e SCC25 necessitaram de um tempo maior de recuperação entre as doses incrementais. A linhagem Fadu parental, inicialmente, possuía uma resposta intermediária. Esta característica auxiliou no processo de recuperação e restabelecimento da confluência destas linhagens. No total, os ensaios foram realizados em aproximadamente 32-34 semanas.

Tabela 10 - Concentração de cetuximabe e tempo de exposição dos clones resistentes ao cetuximabe.

Linhagem celular	Clones	Doses (cetuximabe)	Tempo (≅ semana)
A431	C1	400 µg/mL	3
	C2	800 µg/mL	9
	C5	1600 µg/mL	12
	C6	1600 µg/mL	15
	C7	1600 µg/mL	16
	C9	3200 µg/mL	23
	C10	3200 µg/mL	22
SCC25	C1	200 µg/mL	5
	C2	400 µg/mL	9
	C3	800 µg/mL	12
	C4	1600 µg/mL	16
	C5	1600 µg/mL	17
	C6	1600 µg/mL	19
	C7	1600 µg/mL	19
	C8	3200 µg/mL	29
	C9	3200 µg/mL	31
Fadu	C1	600 µg/mL	4
	C2	800 µg/mL	6
	C5	1600 µg/mL	9
	C6	1600 µg/mL	10
	C7	1600 µg/mL	10
	C8	3200 µg/mL	16
	C9	3200 µg/mL	15
C10	3200 µg/mL	18	

5.1.3 Validação do modelo de resistência ao cetuximabe

Após a seleção dos clones, um novo teste de sensibilidade foi realizado, para conferir as modificações na taxa de resposta ao cetuximabe. Para isso, todas os clones após atingirem a 3ª passagem foram semeados em placas de 96 poços e expostos as mesmas concentrações de cetuximabe iniciais. Paralelamente as respectivas linhagens parentais também foram analisadas.

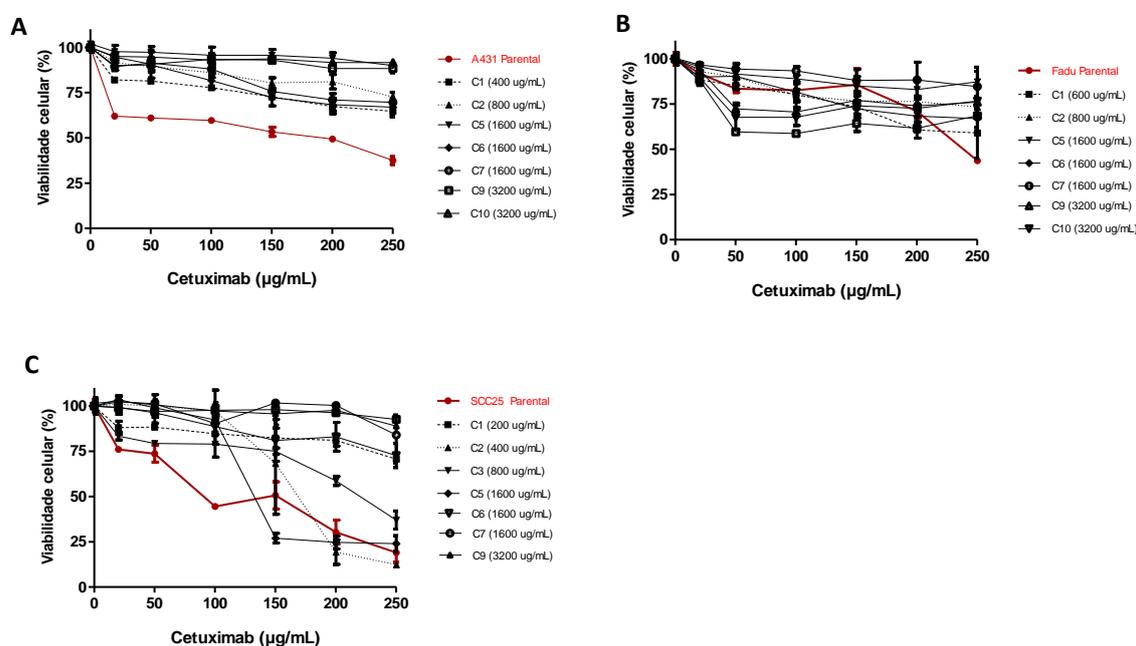


Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular das linhagens resistentes ao cetuximabe.

As linhagens parentais (P) e seus respectivos clones (C) foram expostos a uma curva incremental de cetuximabe (0 – 250 µg/mL) por 72 horas e reveladas com MTS.

Seguimos com uma análise mais aprofundada das linhagens A431 e Fadu parental e clones resistentes, para avaliar as alterações ocasionadas pelo modelo de resistência proposto. A primeira análise foi avaliar por Western blotting as alterações na inibição das vias intracelulares. O conteúdo proteico das linhagens celulares parental e resistentes foram imunodetectados com os anticorpos: anti-EGFR, anti-ERK 1/2 e anti-AKT total e fosforilado. Entre as alterações encontradas verificou-se que, na linhagem A431, os níveis de fosforilação de EGFR não se alteram na presença do inibidor na linhagem A431-C5. A inibição da via das MAP quinases, representada pela detecção do anticorpo anti-ERK 1/2 foi comprometida

juntamente com a fosforilação de AKT. Estes resultados indicam que o inibidor se tornou ineficiente neste clone. O mesmo aumento da fosforilação foi detectado na linhagem Fadu-C10 que partiu da linhagem parental Fadu (Figura 14). Além disso, detectou-se um aumento dos níveis de AKT fosforilado a medida que os clones se tornavam resistentes ao cetuximabe (Figura 14 B).

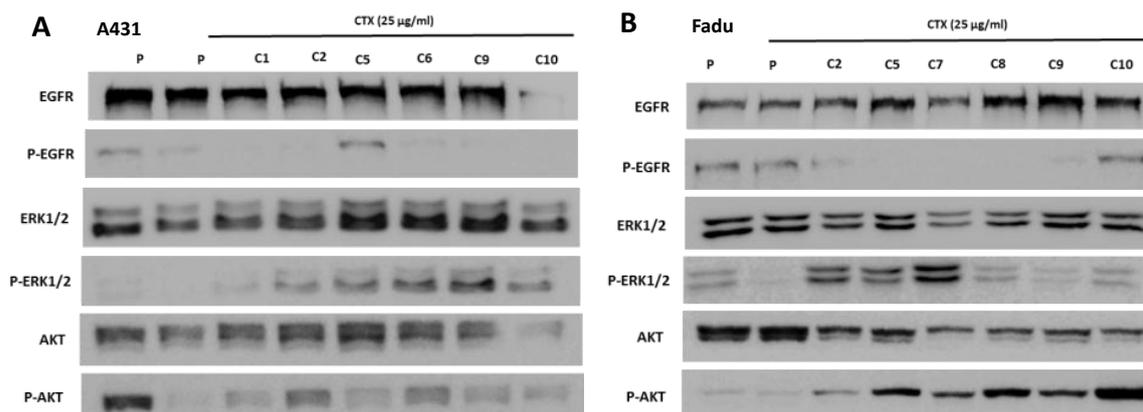


Figura 14 - Western blotting das linhagens parentais e clones resistentes.

Imunoblottig contra anticorpos anti-EGFR, anti-EKR 1/2 e anti-AKT total e fosforilado, expostos a 25 µg/mL, durante 2 horas. P- parental, C- clone, CTX – cetuximabe.

5.1.4 Alterações morfológicas após resistência

À medida que as linhagens foram expostas a concentrações incrementais de cetuximabe, algumas alterações morfológicas foram observadas em baixa confluência. A linhagem utilizada como controle, A431 manteve uma semelhança morfológica bem conservada, como observado na Figura 16. Estas células, sob baixa confluência, crescem em ilhas isoladas com bordas regulares e possuem um formato arredondado. À medida que os clones foram retirados ao longo do tempo de exposição ao cetuximabe notou-se que a distância entre as ilhas foi aumentada. A morfologia da linhagem Fadu foi bastante alterada no modelo de resistência proposto. Inicialmente, a linhagem celular parental apresentava uma morfologia arredondada com projeções citoplasmáticas evidentes em todas as ilhas em crescimento. Entretanto, observou-se uma alteração morfológica nos clones resistentes ao cetuximabe, que apresentam um formato fusiforme e as projeções citoplasmáticas mais

evidentes. Quanto ao padrão de crescimento em ilhas, notou-se que este também foi alterado (Figura 16).

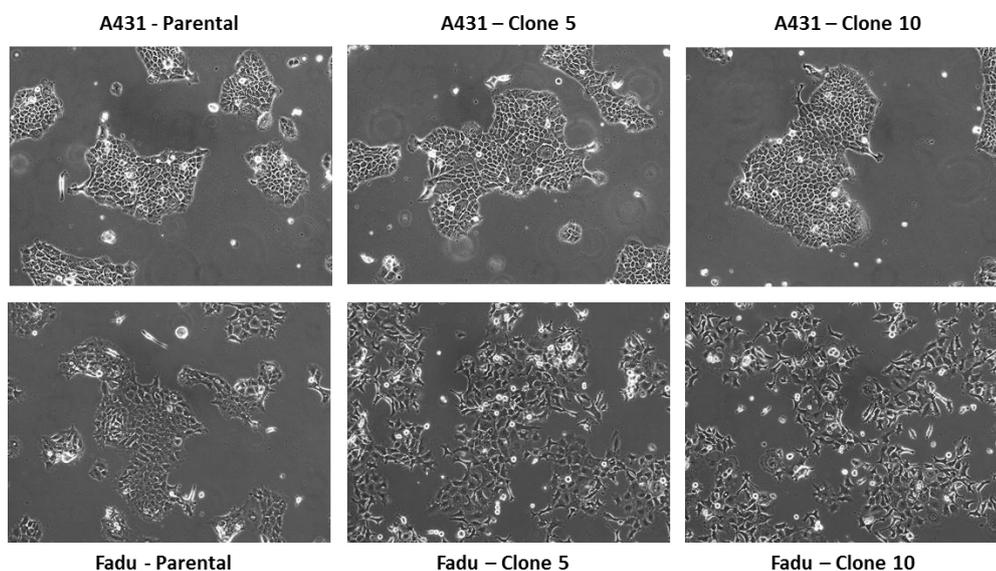


Figura 15 - Alterações morfológicas dos clones resistentes ao cetuximabe.

Os clones selecionados foram avaliados quanto à viabilidade e citotoxicidade, utilizando o kit comercial ApotoxiGlo, que se trata de um método direto não dependente do metabolismo celular. O ensaio é capaz de avaliar a presença de proteases de células vivas, para quantificar a viabilidade celular e também avaliar a citotoxicidade, pela detecção de proteases presente no meio extracelular proveniente de algum dano à integridade da membrana celular. Constatamos que as linhagens parentais A431 e Fadu apresentaram uma redução na viabilidade celular, frente ao incremento da dose de cetuximabe. A relação de citotoxicidade foi inversamente proporcional aos valores de viabilidade detectados. Diante disso pode-se notar o aumento da citotoxicidade nas maiores doses, em ambas as linhagens parentais. Os clones testados de ambas as linhagens celulares mostraram uma diminuição da sensibilidade ao cetuximabe quando comparado às suas respectivas linhagens parentais. O mesmo foi observado quando ao parâmetro de citotoxicidade, no qual as linhagens resistentes apresentam uma diminuição da sensibilidade ao cetuximabe (Figura 16).

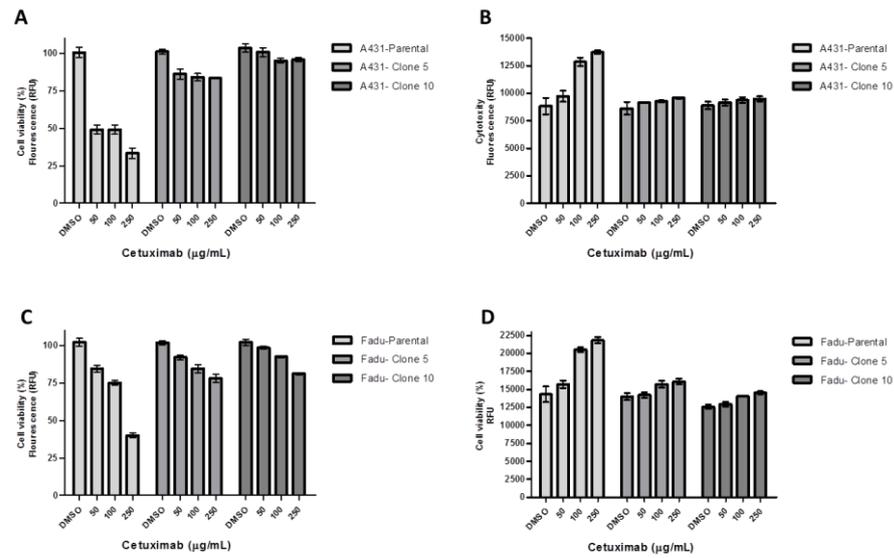


Figura 16 - Análise da viabilidade e citotoxicidade dos clones resistentes à cetuximabe.

O ensaio foi realizado com kit comercial ApotoxiGlo (promega). As linhagens celulares foram expostas a diferentes doses de cetuximabe (50, 100 e 250 µg/mL) por 24 horas. A e B – Viabilidade e citotoxicidade das linhagens A431 parental, clone 5 e 10. C e D – Viabilidade e citotoxicidade das linhagens Fadu parental, clone 5 e 10.

Para avaliar a influência das vias intracelulares no mecanismo de resistência ao cetuximabe as linhagens A431 e Fadu, parentais e seus respectivos clones, foram expostas novamente ao cetuximabe (250 µg/mL) em combinação com os inibidores das vias intracelulares, AKT (MK2206) e ERK (Selumetinib) na concentração de 2.5 µM, por 72 horas. Nesta abordagem, foi detectada uma significativa redução da viabilidade da linhagem A431-C5 resistente, quando exposta a ambos os inibidores. O mesmo foi observado na linhagem Fadu-C10, entretanto foi detectada maior redução da viabilidade da linhagem resistente, após exposição ao inibidor MK2206 (Figura 17).

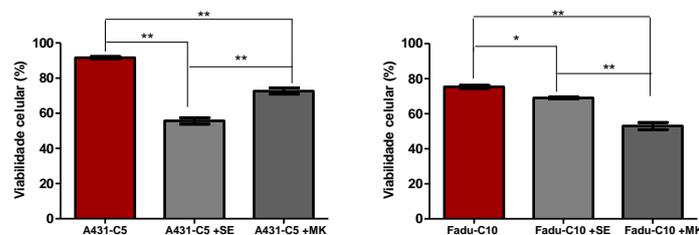


Figura 17 - Cetuximabe e combinação de terapias anti-ERK e anti-AKT.

As linhagens A431-C5 e Fadu-C10, e seus respectivos clones foram expostos a concentrações fixas de cetuximabe (250 µg/mL) combinados com inibidores anti- AKT (MK2206) e ERK (Selumetinib).

5.1.5 Análise de mutações da linhagem Fadu-C10 resistente ao cetuximabe

Após o sequenciamento do exoma das linhagens Fadu (parental) e Fadu-C10 (clone 10), foi realizada uma análise comparativa para detecção de mutações adicionais, ocasionados em decorrência da resistência ao cetuximabe. Inicialmente, através da ferramenta de análise VarScan2, foi possível destacar 18 SNVs, com valores significativos ($p < 0.005$) (Tabela 11), sendo 8 mutações com efeito biológico modificador e 10 com moderado efeito biológico.

Tabela 11 - Alterações genéticas SNVs, detectadas na linhagem Fadu-C10.

Cromossomo	Nucleotídeo		Gene	Efeito biológico	Mutação
	Referência	Variante			
chr1_17087521	G	A	<i>CROCC</i>	Modificador	n.54C>T
chr1_22186113	T	G	<i>HSPG2</i>	Moderado	p.Thr1747Pro
chr1_144912233	C	T	<i>PDE4DIP</i>	Moderado	p.Arg818His
chr1_146250915	A	G	<i>W12-3658N16.1</i>	Modificador	n.370T>C
chr1_204978533	A	G	<i>NFASC</i>	Modificador	c.3611-152A>G
chr2_100628013	T	C	<i>AFF3</i>	Moderado	p.Gln25Arg
chr2_189870953	C	A	<i>COL3A1</i>	Moderado	p.Leu1021Ile
chr4_70346458	G	A	<i>UGT2B4</i>	Moderado	p.Thr494Ile
chr6_32549525	C	G	<i>HLA-DRB1</i>	Moderado	p.Gly154Ala
chr10_99240048	C	T	<i>AL355490.2</i>	Modificador	c.262+651G>A
chr12_104153004	C	G	<i>STAB2</i>	Moderado	p.Leu2401Val
chr12_113386779	C	G	<i>OAS3</i>	Moderado	p.Ser381Arg
chr12_114793297	T	C	<i>TBX5</i>	Modificador	c.*40A>G
chr17_4789466	C	T	<i>MINK1</i>	Moderado	p.Pro249Leu
chr19_53418555	A	G	<i>ZNF888</i>	Modificador	n.445T>C
chr20_6065729	C	T	<i>FERMT1</i>	Moderado	p.Arg526Lys
chr20_30777860	A	G	<i>PLAGL2</i>	Modificador	n.304T>C
chrX_24329685	C	T	<i>SUPT20HL2</i>	Modificador	n.1748G>A

A: adenina. C: citosina, G: guanina e T: timina

De acordo com a classificação do efeito biológico atribuído a cada uma das variantes encontradas, destacam-se os valores comparativos mais significativos para prosseguir uma análise inicial, quanto à presença de alterações nestes genes em pacientes portadores de CCECP. O total de 10 genes foram selecionados (Tabela 12) e, em seguida, analisados quanto à presença de mutações, expressão e número de cópias, utilizando os dados do TCGA de pacientes portadores de CCECP disponíveis no CbioPortal

(<http://www.cbioportal.org/>). Com base nesta análise preliminar, foi encontrada uma baixa frequência de mutações e ampliações dos genes selecionados. Entretanto, 8% (22/279) possuem uma superexpressão do gene *HLA-DRB1* e 11% (30/279) do gene *FERMT1* (Tabela 12).

Tabela 12 – Genes com SNVs e frequência de alterações genéticas em pacientes com CCECP, obtidas a partir do TCGA.

Genes	Mutações (%)	Superexpressão (%)	CNV (%)
<i>HSPG2</i>	0	4	4
<i>PDE4DIP</i>	2	4	1
<i>AFF3</i>	1	4	2
<i>COL3A1</i>	3	4	3
<i>UGT2B4</i>	1	3	2
<i>HLA-DRB1</i>	2	0	8
<i>STAB2</i>	0	3	3
<i>OAS3</i>	0	0	5
<i>MINK1</i>	0	0	5
<i>FERMT1</i>	1	0	11

5.1.6 Análise do perfil de expressão gênica da linhagem Fadu-C10

Após a análise da expressão gênica e enriquecimento funcional como descrito na seção de métodos, os genes foram agrupados em categorias de vias de sinalização, considerando no mínimo 3 genes diferencialmente expressos nas linhagens Fadu-C10 resistentes ao cetuximabe comparadas à linhagem parental. Inicialmente, foi encontrada a superexpressão dos genes *EGFR*, *MAP2K2*, *UBA52*, *SHC1*, *CLTA* e *EPN1*, envolvidos na sinalização mediada pela ativação do EGFR na linhagem resistente ao cetuximabe. Esta análise demonstrou que a expressão destes genes é maior na linhagem resistente (Fadu-C10) quando comparados à linhagem Fadu parental, sensível ao cetuximabe (Figura 18).

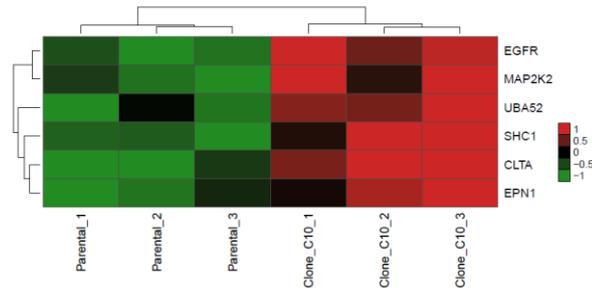


Figura 18 - Matriz de expressão da via de sinalização de EGFR.

O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. Vermelho indução da expressão, verde repressão e preto nenhuma modulação.

A análise funcional realizada no banco de dados KEEG, revelou que 21 genes, pertencentes à sinalização de MAPK, estão diferencialmente expressos na linhagem resistentes ao cetuximabe ($p=0,04$). Os genes *EGFR*, *FGF5*, *MAP2K2*, *RELA*, *NF1*, *GNA12*, *MAPKAPK3*, *HSPA1B*, *FGF21*, *DUSP4*, *TNFRSF1A*, *JMJD7-PLA2G4B*, *ARRB2*, *RPS6KA2*, *ELK4*, *JUND*, *IL1B*, *PLA2G2C*, *PRKACA*, *MAP3K14*, *MAP2K7* encontram-se superexpressos, na linhagem Fadu-C10, comparados à linhagem Fadu parental (Figura 19).

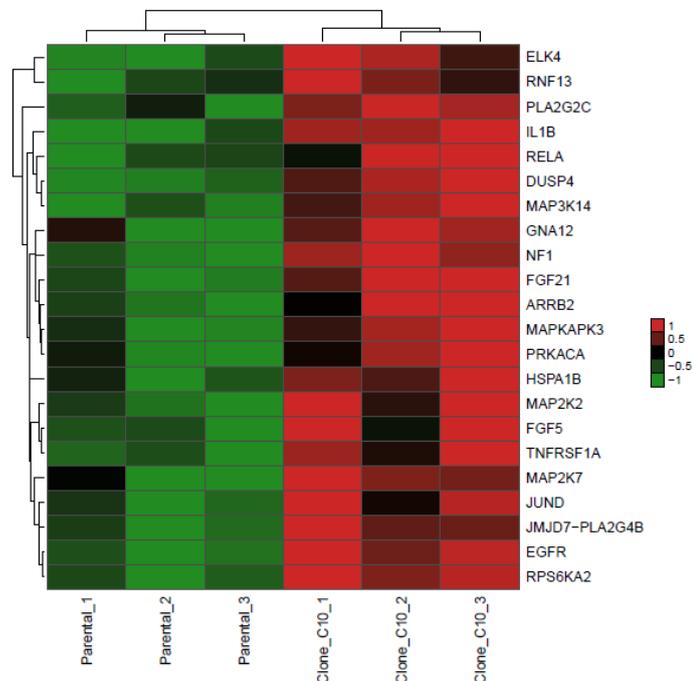


Figura 19 - Matriz de expressão da via de sinalização de MAPK. O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. Vermelho indução da expressão, verde repressão e preto nenhuma modulação.

Pode observar-se que os genes envolvidos na sinalização mediada por mTOR, estão diferencialmente expressos na linhagem resistente ao cetuximabe. Os genes *EIF4EBP1*, *RPS6KA2*, *ULK1*, *VEGFA*, *TSC2*, *STRADA*, *PRKAA1* encontram-se induzidos com diferença significativa ($p=0.043$), quando comparados aos níveis de expressão da linhagem Fadu parental (Figura 20).

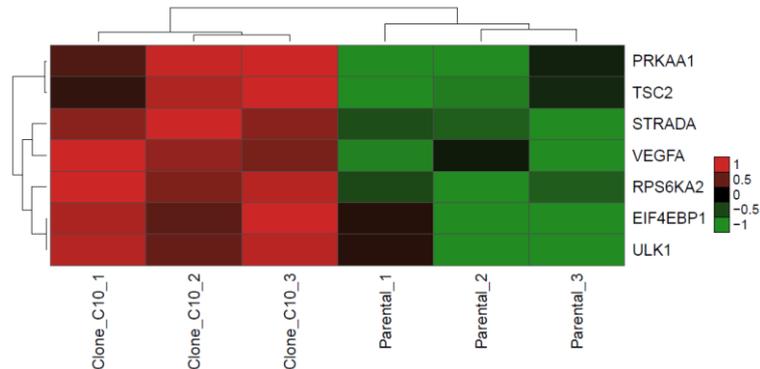


Figura 20 - Matriz de expressão da via de sinalização de mTOR.

O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. Vermelho indução da expressão, verde repressão e preto nenhuma modulação.

A sinalização de Wnt está envolvida no desenvolvimento de alguns tumores sólidos. Neste estudo observou-se que a diminuição da expressão de 13 genes (*PSMA2*, *CSNK1A1*, *PPP2R1B*, *PSMA1*, *PSMD14*, *PSMB1*, *PSMB3*, *PPP2CA*, *PSMD10*, *PSMD1*, *SKP1*, *PSMD6* e *PSMD7*) envolvidos sinalização mediada por Wnt. A repressão destes genes foi detectada na linhagem celular resistente ao cetuximabe Fadu-C10, em comparação com a linhagem Fadu parental (Figura 21).

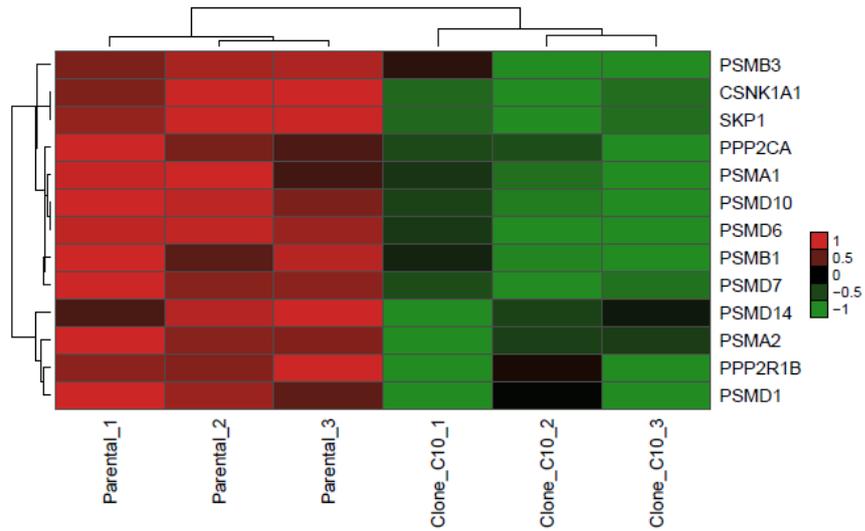


Figura 21 - Matriz de expressão da via de sinalização de Wnt.

O dendrograma superior horizontal mostra o agrupamento das amostras e o vertical o agrupamento dos genes. Vermelho indução da expressão, verde repressão e preto nenhuma modulação.

Estes resultados são preliminares e análises bioinformáticas posteriores, envolvendo outras ferramentas e *pipe-lines*, assim como a análise de *copy number variations* (CNV) e posterior validação através de sequenciamento Sanger e estudos funcionais são fundamentais para esclarecer o papel destes achados.

5.2 Estudo comparativo do efeito citotóxico dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib em linhagens de CCECP

Baseado nas evidências de diferentes padrões de resposta ao cetuximabe para paciente com CCECP, uma nova geração de inibidores emergiu no cenário terapêutico nos últimos anos. Os inibidores irreversíveis de EGFR, como afatinib e allitinib, representam a esperança de uma terapia anti-EGFR mais eficiente. Os resultados descritos a seguir relatam as abordagens comparativas da eficiência terapêutica de cada inibidor, bem como os possíveis biomarcadores associados a esta nova geração de inibidores de EGFR.

5.2.1 Caracterização molecular e genética do painel de linhagens de CCECP

O perfil de expressão das proteínas da família ErbB foi avaliado por Western blotting e revelou diferentes níveis dos receptores. Em condições basais (sem estimulação com EGF) todas as linhagens expressaram, em diferentes níveis o receptor EGFR na sua forma total, entretanto somente as linhagens celulares HN13, SCC25 e JHU28 exibiram níveis de fosforilação de EGFR. Nenhum das linhagens testadas apresentou fosforilação do receptor HER2, no entanto foi detectada a presença de fosforilação do receptor HER4 nas linhagens SCC25 e Fadu (Figura 22A). A análise das atividade das vias intracelulares, mostrou que a maioria das linhagens celulares expressaram a forma fosforilada de ERK1/2, com exceção da linhagem JHU12. As linhagens celulares HN13, SCC4 e JHU12 apresentaram os maiores níveis de fosforilação de AKT. Além disso, a proteína PTEN está ausente em 3 das 8 linhagens celulares avaliadas (Figure 22A). Nossos resultados mostraram que somente a linhagem HN13 possui uma amplificação génica, devido o aumento do número de cópias de EGFR (Figure 22B).

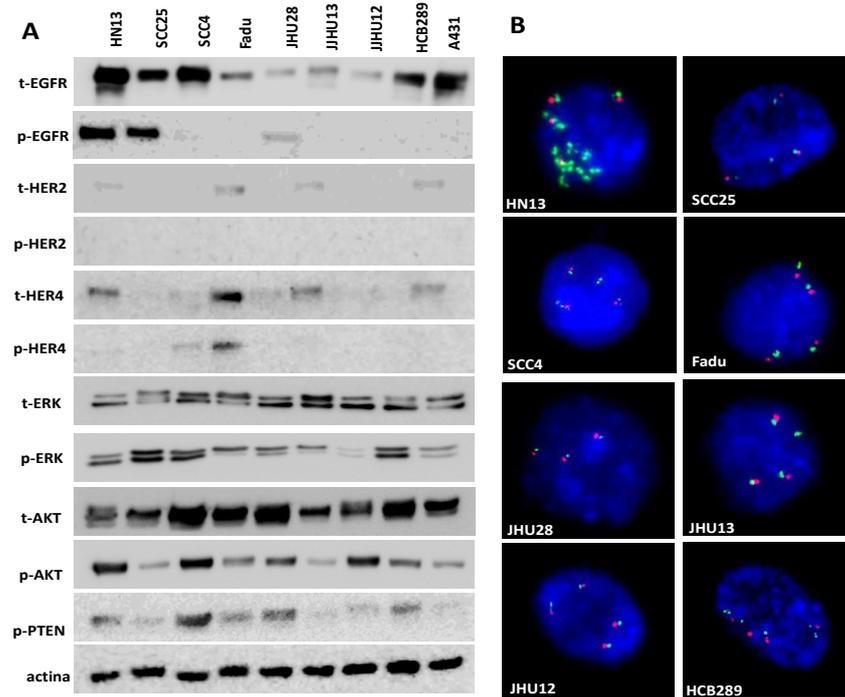


Figura 22 - Expressão dos receptores ErbB e análise do número de cópias de EGFR.

(A). Perfil de proteínas totais e fosforilados e ativação das vias intracelulares AKT, ERK; (B). FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) do *EGFR*. EGFR (verde) e DNA centromérico (vermelho) e núcleos corados com DAPI (azul). Amplificação de 100X.

O perfil molecular foi caracterizado quanto aos genes preditivos do painel de 7 linhagens celulares de CCECP comerciais, representando diferentes sítios primários de localização e uma linhagem primária, proveniente de paciente portador de CCECP, estabelecida pelo nosso grupo e denominada HCB289. As linhagens celulares foram classificadas quanto ao estado mutacional de alguns genes relacionados à resistência primária a terapias anti-EGFR (*BRAF*, *PIK3CA*, *KRAS*, *EGFR* e *PTEN*). O material genético foi extraído com trizol –clorofórmio, ressuspenso, quantificado e sequenciado como descrito na seção de métodos deste estudo.

O sequenciamento revelou apenas uma mutação em *EGFR* presente na linhagem HN13 (His773Tyr) e uma mutação no gene *KRAS* (p.G12S) presente na linhagem JHU28. As demais linhagens de CCECP e também o controle possuem *status* selvagem para todos os genes testados (Tabela 13).

Tabela 13 - Caracterização molecular das linhagens celulares de CCECP.

Linhagem	Sítio anatômico	Mutações nos genes preditivos					
		<i>EGFR</i>	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>
HN13	Língua	p.H773Y	WT	WT	WT	WT	WT
JHU12	Cavidade Oral	WT	WT	WT	WT	WT	WT
JHU28	n.a	WT	WT	p.G12S	WT	WT	WT
JHU13	n.a	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FADU	Hipofaringe	WT	WT	WT	WT	WT	WT
SCC25	Cavidade Oral	WT	WT	WT	WT	WT	WT
SCC4	Cavidade Oral	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB289	Cavidade Oral	WT	WT	WT	WT	WT	WT
A431	Pele	WT	WT	WT	WT	WT	WT

WT – wild type (selvagem); n.a- não apresentado

5.2.2 Comparação da eficiência entre cetuximabe e afatinib e allitinib no painel de linhagens de CCECP

Neste estudo, foi avaliada a citotoxicidade de três terapias (cetuximabe e afatinib e allitinib) e comparamos o potencial inibitório de cada fármaco, através do ensaio MTS (Tabela 14).

Tabela 14 - Resposta citotóxica do painel de linhagens de CCEPC aos inibidores cetuximabe e afatinib e allitinib.

Linhagens celulares	Resposta aos anti-EGFR (IC ₅₀)		
	<i>Cetuximabe</i> (µg/mL)	<i>Afatinib</i> (nM)	<i>Allitinib</i> (nM)
HN13	> 250	>1000	>1000
JHU12	> 250	>1000	>1000
JHU28	> 250	>1000	>1000
JHU13	> 250	472,6 ± 10,6	388,9 ± 15,4
FADU	> 250	774,4 ± 11,7	384,0 ± 19,0
SCC25	216,8 ± 15,4	224,7 ± 18,4	207,2 ± 11,6
SCC4	> 250	115,3 ± 9,5	217,6 ± 16,1
HCB289	> 250	>1000	845,3 ± 11,5
A431	128,0 ± 2,64	156,9 ± 17,3	121,3 ± 3,2

nM: nanomolar, µg: micrograma; mL: mililitro.

A linhagem celular utilizada como controle de sensibilidade A431, apresentou os menores valores de IC₅₀ para ambas as drogas testadas (Tabela 14). Apenas a linhagem

celular SCC25 apresentou sensibilidade ao cetuximabe com IC_{50} de $216,85 \pm 15,4$ $\mu\text{g/mL}$ e as demais linhagens apresentaram valores de IC_{50} acima do proposto no estudo (>250 $\mu\text{g/mL}$). Não foi possível estabelecer valores de IC_{50} para a linhagem primária recém-estabelecida pelo nosso grupo, que demonstrou um fenótipo resistente ao cetuximabe (Tabela 14 e Figura 23A).

O tratamento com afatinib evidenciou baixos valores de IC_{50} para a linhagem celular SCC4 ($115,32 \pm 9,5$ nM) e SCC25 ($224,70 \pm 18,4$ nM). Entretanto, o IC_{50} calculado para a linhagem primária HCB289 foi maior que 1000 nM. O mesmo fenótipo resistente foi detectado para as linhagens celulares HN13, JHU28 e JHU12 (Tabela 14 e Figura 23B). O tratamento com allitinib apresentou valores ainda menores de IC_{50} para a linhagem JHU13 ($388,94 \pm 15,4$ nM), Fadu ($384,07 \pm 19,0$ nM) e SCC25 ($207,29 \pm 11,6$ nM). O tratamento com allitinib foi mais eficiente na linhagem primária HCB289 exibindo um IC_{50} de $845,32 \pm 11,5$. Semelhantemente ao afatinib, não foi possível calcular valores de IC_{50} para as linhagens HN13, JHU28 e JHU12 tratadas com afatinib nas concentrações propostas (Tabela 14 e Figura 23C).

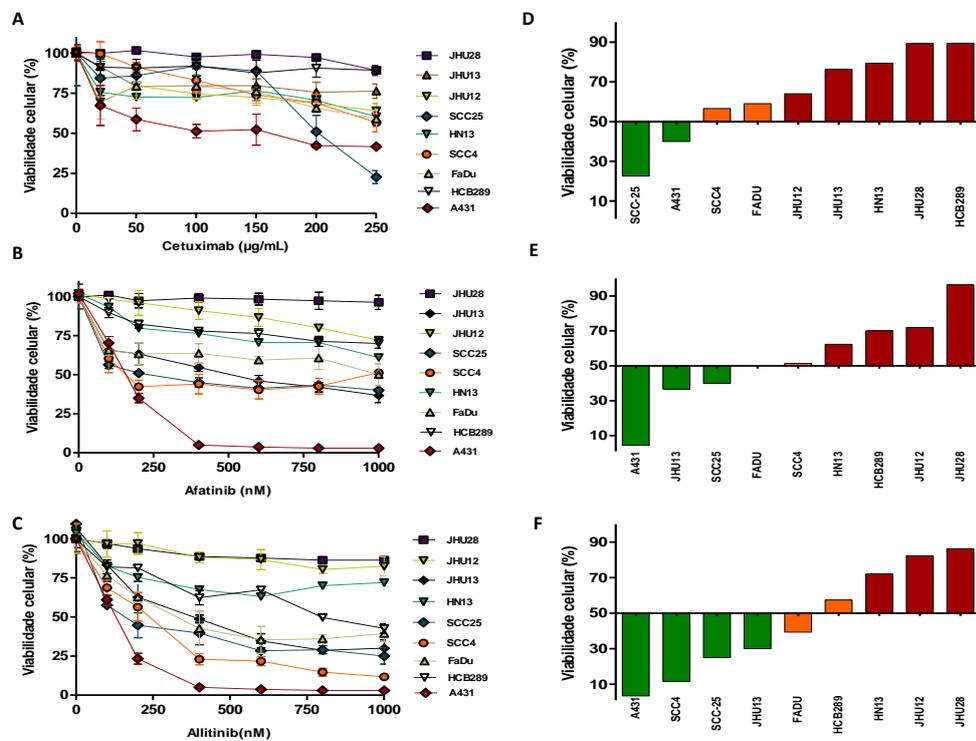


Figura 23 - Comparação de sensibilidade aos inibidores de EGFR.

Exposição em concentrações crescentes de inibidores de EGFR. (A), allitinib (B) and afatinib (C). Classificação de GI para cetuximabe (D) na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$; allitinib (E) and afatinib (D)

na concentração de 1000 nM. Altamente sensíveis (barras verdes); moderada sensibilidade (barras laranja) e resistentes (barras vermelho).

Foi utilizada a classificação de GI, a qual classifica as linhagens celulares em um fenótipo de altamente sensíveis (GI>60%), média sensibilidade (GI 40 – 60%) e resistentes (GI<40%). Com base nesta classificação, a exposição ao cetuximabe classificou apenas a linhagem SCC25 como altamente sensível (AS), SCC4 e Fadu com moderada sensibilidade (MS) e as demais foram resistentes a esta terapia (R) (Figura 23D). Entretanto, as linhagens JHU13 e SCC5 foram classificadas com altamente sensíveis (AS), Fadu e SCC4 moderada (MS) e as quatro restantes como resistentes (R) para o inibidor afatinib (Figura 23E). Relativamente ao inibidor allitinib, 3 linhagens celulares apresentaram um perfil altamente sensível (SCC4, SCC25 e JHU13), 2 com moderada sensibilidade (FaDu e HCB289) e 3 resistentes (HN13, JHU12 e JHU28) (Figura 23F).

5.2.3 Efeito do cetuximabe, afatinib e allitinib na ativação de EGFR e nas vias intracelulares.

A eficiência da terapia alvo foi avaliada de acordo com a capacidade de modular (inibir ou ativar) proteínas efetoras da sinalização mediada por EGFR. A imuno detecção por western blot foi realizada a partir do lisado das linhagens SCC25 (sensível) HN13 (resistente) após a incubação com as doses de 50 e 100 ug/mL de cetuximabe e 10 e 100 nM de afatinib ou allitinib (Figura 25).

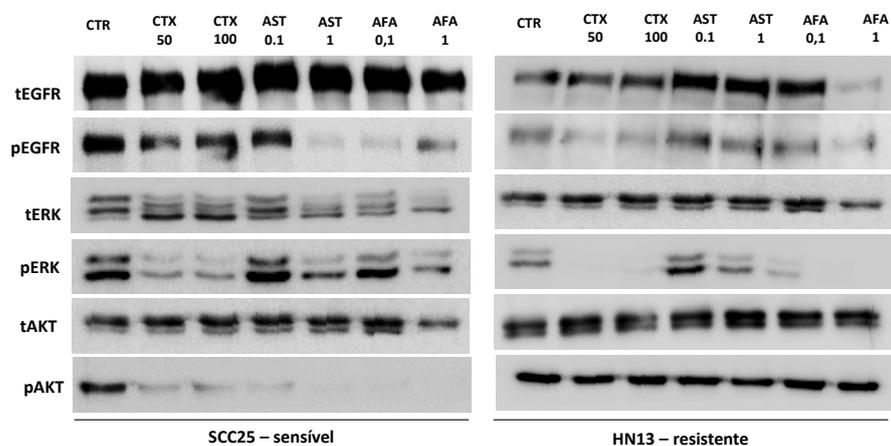


Figura 24 - Modulação e inibição das vias intracelulares.

Western blotting de lisados celulares: SCC25 (sensível); HN13 (resistente) expostas aos diferentes inibidores por 2 horas. CTX – cetuximabe (50 e 100 µg/mL); AFA - afatinib e AST – allitinib (0,01 e 0,1 µM) e CTR – controle (DMSO).

Para determinar o efeito dos inibidores de EGFR nas vias intracelulares, foram utilizados a linhagem sensível SCC25 e resistente HN13 (Figura 24). A linhagem SCC25 exibiu uma redução total do alvo EGFR quando exposta aos dois inibidores irreversíveis afatinib e allitinib. Nesta linhagem, foi observada redução dos níveis de fosforilação de ERK e AKT, para todos os inibidores testados. Entretanto a redução total da fosforilação foi detectada apenas quando exposta aos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib nas concentrações de 0.1 de 1 µM (Figura 24).

De forma oposta, ao analisar a linhagem resistente HN13, não se observou redução total do alvo EGFR em nenhum dos inibidores utilizados. Além disso, observou-se a redução total dos níveis de fosforilação de ERK após a exposição a cetuximabe e afatinib. Curiosamente os níveis de fosforilação de AKT mantiveram-se permanentes em todos os tratamentos (Figura 24). Os resultados encontrados geraram a hipótese de que a modulação da resposta à terapias anti-EGFR pode estar relacionada com capacidade de inibir vias intracelulares como a via AKT.

5.2.4. Inibição farmacológica da via do AKT

Os resultados anteriores, sugerem a persistente ativação da fosforilação de AKT em linhagens resistentes às terapias anti-EGFR e, para confirmar estes achados, foi realizado um experimento de combinação com inibidores de vias intracelulares.

Para este fim, foi realizada a combinação das terapias anti-EGFR (cetuximabe, afatinib e allitinib) com os inibidores de AKT (MK2206) e mTOR (everolimus). As linhagens SCC25 (sensível) e HN13 (resistente) foram expostas as combinações, para avaliar as alterações no padrão de viabilidade celular de cada combinação (Figura 25A e B).

A combinação não revelou diferença na viabilidade celular da linhagem SCC25. Entretanto, na linhagem resistente HN13, foi detectada uma redução significativa da viabilidade celular, apenas combinando o MK2206 com os inibidores

irreversíveis afatinib e allitinib (Figura 25A). Inesperadamente foi detectado um aumento da viabilidade celular da linhagem SCC25, quando os inibidores de EGFR foram combinados com inibidor de mTOR. Nenhum efeito similar foi observado na linhagem HN13, exposta ao inibidor de mTOR. Desta forma, não encontramos redução da viabilidade entre as combinações com everolimus (Figura 25A e B).

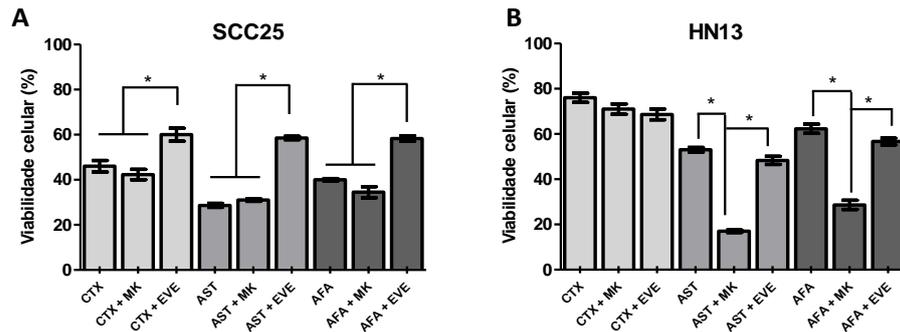


Figura 25 - Viabilidade celular das combinações com inibidores intracelulares.

(A) linhagem celular SCC25 (sensível) e (B) linhagem celular HN13 (resistente) foram expostas ao cetuximabe (250 µg/mL) ou afatinib e allitinib (2.5 µM) por 72 horas. CTR: controle; AFA: afatinib; AST: allitinib, MK: MK2206 e EVO: everolimus.

Adicionalmente, o potencial de inibição das vias intracelulares foi investigado, através de Western blotting (Figura 26). A combinação dos inibidores de EGFR com o inibidor MK2206 inibiu totalmente a forma fosforilada de AKT na linhagem SCC25. Entretanto a redução total da fosforilação de AKT, na linhagem resistente HN13, somente foi detectada em combinação com os inibidores irreversíveis afatinib e allitinib, embora tenha diminuído nas combinações com cetuximabe (Figura 26B). Também se observou que a combinação com everolimus não alterou o padrão fosforilação de AKT em nenhuma das linhagens (Figura 26A e B).

Interessantemente, a exposição de MK2206 e everolimus não foi capaz de reduzir totalmente os níveis de AKT fosforilado na linhagem HN13 (Figura 26B).

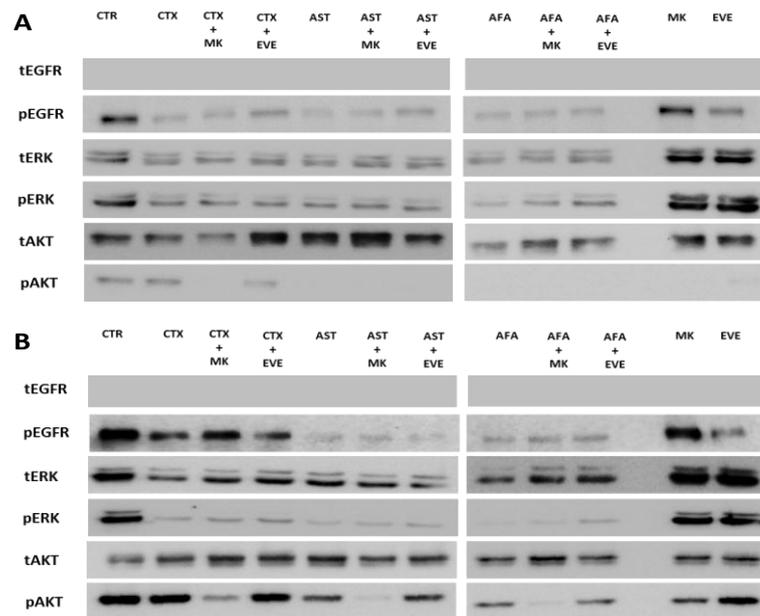


Figura 26 - Anti-EGFR combinado às terapias intracelulares, allitinib e afatinib.

Análise do perfil de total e fosforilado de EGFR, ERK e AKT na linhagem SCC25 (**A**) e HN13 (**B**). As linhagens foram expostas ao inibidor MK2206 (MK) e everolimus (EVE) na concentração de 2,5 μ M. CRT: controle; CTX: cetuximabe; AFA: afatinib; AST: allitinib.

5.2.5 O silenciamento do gene *AKT1* aumenta a citotoxicidade aos inibidores irreversíveis

Para validar o papel do AKT na respostas aos inibidores de EGFR, a linhagem comercial HN13 e a primária HCB289 foram utilizadas. Experimentos prévios de controle e padronização da transfecção foram realizados para determinar a quantidade necessária de agente de transfecção (Lipofectamina) capaz de transfectar 90% das células (Figura 27). Esta abordagem foi realizada para evitar interações inespecíficas no silenciamento e garantir a eficiência do método. Foram usados uma combinação de 3 diferentes doses de cada duplex (0,1; 1 e 10 nM) e 3 doses de lipofectamina (Figura 27). Com esta padronização, consideramos a dose de 1 μ L de lipofectamina e a concentração de 10 nM como eficientes para prosseguir os experimentos.

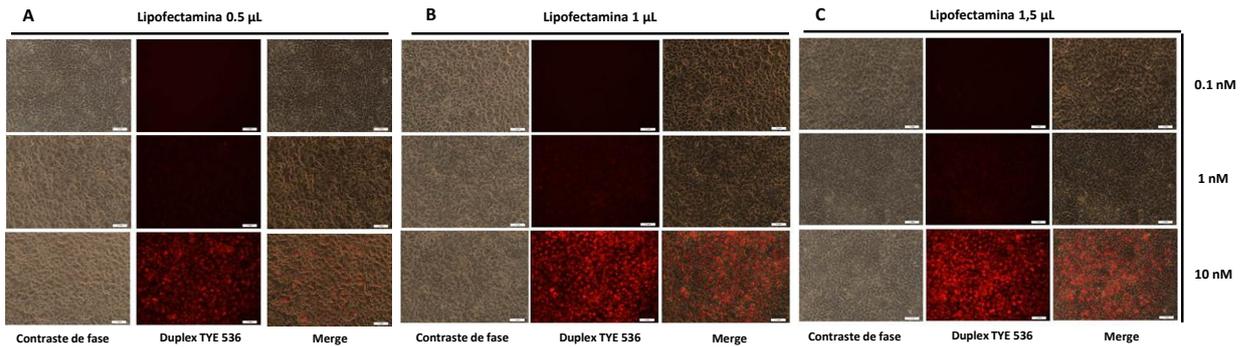


Figura 27 - Padronização dos siRNA AKT1 na linhagem celular HN13.

A- Dose de 0,5 µL; B- 1 µL e C- 1,5 µL por 9,6 cm² de superfície, correspondente a uma placa de 6 poços.

As células foram transfectadas transientemente com siRNA contra a isoforma AKT1 e expostas aos inibidores cetuximabe (250 µg/mL), afatinib e allitinib (1000 nM) (Figura 28). Foi observada uma redução significativa da porcentagem de células viáveis tratadas apenas com os inibidores irreversíveis afatinib e allitinib ($p < 0.005$). Nenhuma alteração na viabilidade foi detectada quando as células foram tratadas com o anticorpo cetuximabe. Esta evidência corrobora os resultados obtidos com o inibidor de AKT (MK2206) (Figura 28B e D).

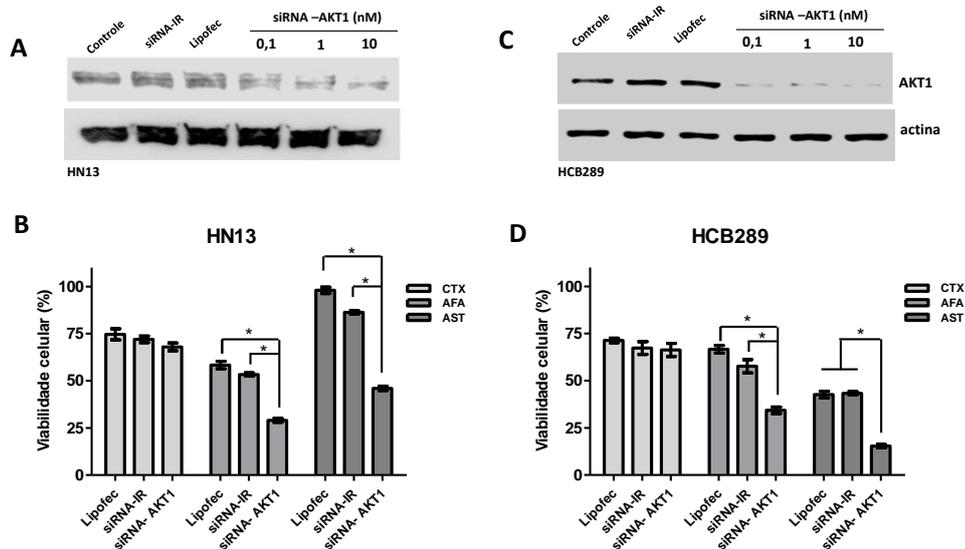


Figura 28 - Validação do silenciamento de AKT1 e teste de viabilidade (MTS).

Western blotting contra AKT1 (A e C). As linhagens HN13 (B) e HCB289 (D) com AKT1 silenciado, foram expostas aos inibidores de EGFR cetuximabe (250 µg/mL) e afatinib ou allitinib (1000 nM) por 72 horas. siRNA-IR: duplex de silenciamento irrelevante e siRNA: duplex de silenciamento de AKT1.

Para avaliar as alterações citotóxicas dos agentes anti-EGFR diante do silenciamento da isoforma AKT1 nas linhagens HN13 e HCB289, foi conduzido um ensaio triplo capaz de mensurar a viabilidade, citotoxicidade e a presença de caspase 3 e 7 clivada. Como esperado, o tratamento com cetuximabe não alterou nenhum dos parâmetros testados (Figura 29A e B). Entretanto, os inibidores afatinib e allitinib diminuíram significativamente a viabilidade celular e aumentaram a citotoxicidade em ambas as linhagens celulares com AKT1 silenciado (Figura 29A e B). Conseqüentemente, também foi observado um aumento de caspase 3/7 clivada em ambas as linhagens expostas aos inibidores irreversíveis (Figura 29A e B). Estes resultados validam o papel chave que o AKT desempenha na resposta às novas terapias irreversíveis anti-EGFR.

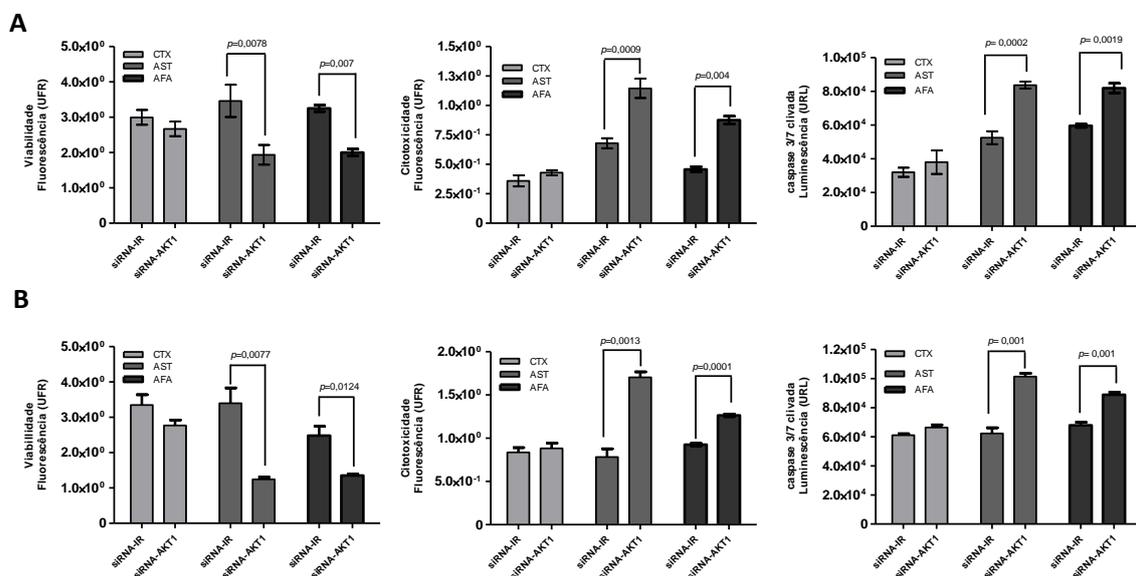


Figura 29 - Ensaio de viabilidade, citotoxicidade e ativação de caspase 3/7.

As linhagens HN13 (A) e HCB289 (B) com AKT1 silenciado foram expostas aos inibidores de EGFR cetuximabe (250 µg/mL) e afatinib ou allitinib (1000 nM) por 24 horas. siRNA-IR: duplex de silenciamento irrelevante e siRNA: duplex de silenciamento de AKT1. URF: unidade relativa de fluorescência e URL: unidade relativa de luminescência.

5.2.6 Análise *in silico* dos níveis de fosforilação dos receptores ErbB, isoformas de AKT e mTOR em pacientes com CCECP

Para avaliar o impacto clínico dos níveis de fosforilação dos membros da família ErbB, das isoformas de AKT e mTOR, foram coletados os dados de 279 pacientes portadores de CCECP disponíveis no TCGA (Figura 30), no qual se destaca que 17% (47/279) pacientes

possuem uma alta expressão do receptor EGFR. Outros membros da família ErbB foram avaliados, entretanto apresentaram menores níveis de expressão como 5% (15/279) para ErbB2 e 3% (8/279) para ErbB4, ambos alvos dos inibidores de nova geração como o allitinib. A expressão das 3 isoformas de AKT foi investigada, e observou-se que uma maior expressão para a isoforma AKT1 que está presente em 14,7% dos pacientes (41/279). Além disso, destaca-se baixos níveis de expressão de mTOR totalizando 6% (16/279) dos pacientes analisados (Figura 30A).

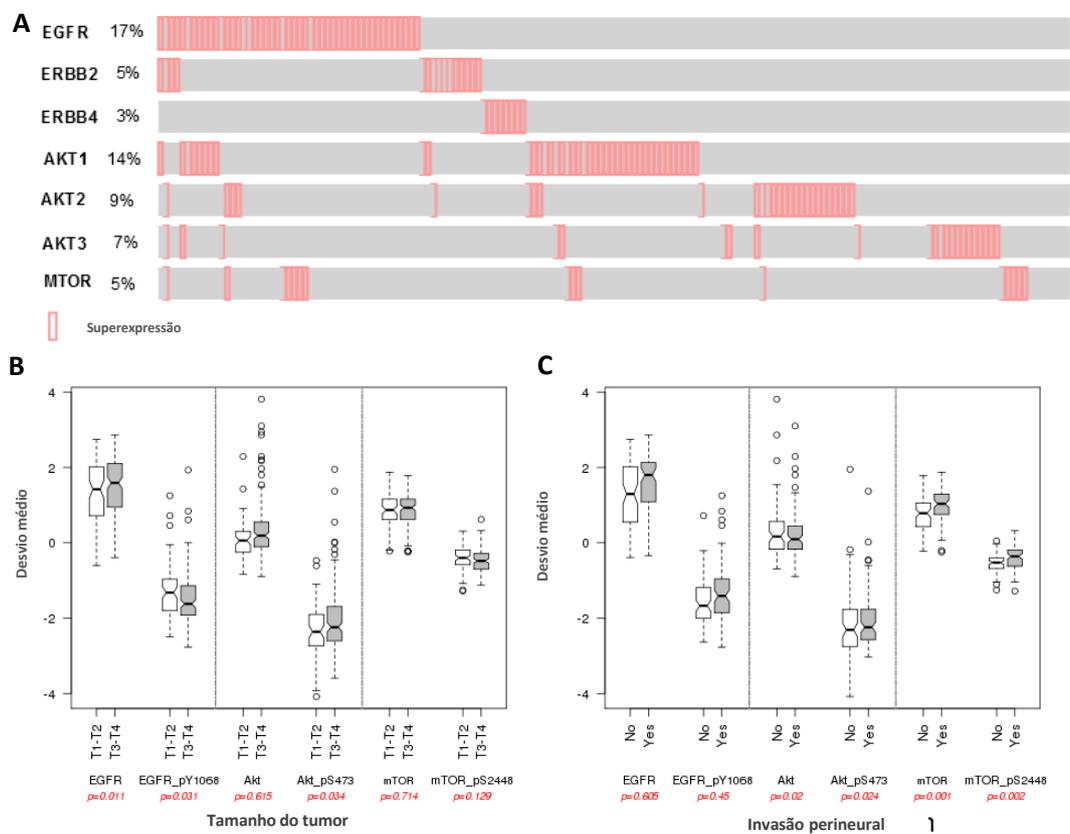


Figura 30 - Análise *in silico* de dados provenientes de 279 pacientes a partir do TCGA.

(A) expressão de mRNA. Níveis de fosforilação obtidos a partir de do TCGA e suas correlações com o tamanho tumoral (B) e invasão perineural (C) em pacientes portadores de CCECP.

Em seguida, foi encontrada uma correlação significativa entre os níveis de fosforilação de EGFR e o tamanho do tumor, em estágios avançados da doença (T3 – T4) ($p=0,01$). Além disso, elevados níveis de fosforilação de AKT foram associados ao tamanho do tumor em estágios avançados ($p=0,034$) (Figura 30B). Nenhuma associação significativa com o tamanho tumoral foi detectada em relação aos níveis de fosforilação de mTOR. A

invasão perineural foi associada significativamente aos níveis aumentados de fosforilação de AKT ($p=0,02$). Entretanto, os níveis totais e fosforilados de mTOR foram significativamente correlacionados com a invasão perineural nestes pacientes (Figura 30C).

5.3 Citotoxicidade do allitinib em um extenso painel de linhagens celulares tumorais

O efeito citotóxico positivo do allitinib em linhagens de CCECP foi descrito no item anterior. Diante disso, foi ampliado a investigação do potencial citotóxico em outros tumores sólido. Os resultados apresentados descrevem os principais tipos tumorais sensíveis ao allitinib, além de reportar as mutações no gene *KRAS*, como preditoras de resposta a esta terapia.

5.3.1 Caracterização da sensibilidade, citotoxicidade do inibidor irreversível allitinib

A linhagem A431 foi utilizada como controle de sensibilidade da ação do inibidor allitinib. De forma comparativa, a dose de 50 nM de cetuximabe foi capaz de inibir totalmente a fosforilação de ERK e, além disso, os níveis de fosforilação de AKT também sofreram ação deste fármaco, sendo totalmente inibida na mesma concentração. Diferentemente do anticorpo monoclonal cetuximabe, o allitinib inibiu totalmente a fosforilação conjunta de todas as proteínas avaliadas (EGFR, ERK e AKT). Este inibidor desempenha uma potente ação inibitória de vias intracelulares que atuam em processos chave da proliferação celular. Em uma concentração de 1000 nM deste fármaco notou-se uma redução total da viabilidade celular, que foi utilizada como padrão de sensibilidade ao longo deste estudo (Figura 31).

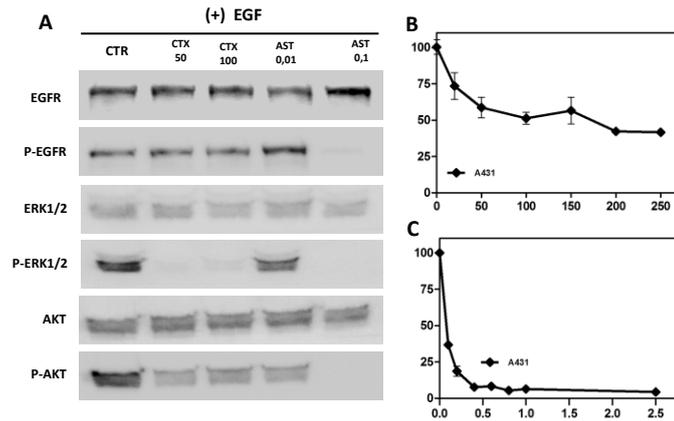


Figura 31 – Efeito do fármaco na viabilidade e via de sinalização.

A- Western blotting do lisado de células A431 expostas a concentrações de 50 e 100 ug/mL e 10 e 100 nM de allitinib. B e C - Ensaio de MTS. As linhagens foram expostas a uma curva de concentração de cetuximabe (0 – 250 ug/mL) e allitinib (0 – 2500 nM), por 72 horas.

5.3.2 Citotoxicidade do allitinib no painel de linhagens celulares

Um extenso painel de linhagens celulares, representado por 11 tipos diferentes de tumores, foi exposto a uma curva de concentrações (100; 200; 400; 600; 800 e 1000 nM) do inibidor allitinib, totalizando 76 linhagens testadas. Foi utilizado uma dose fixa de 1000 nM para avaliar a sensibilidade encontrada em cada linhagem através do cálculo da inibição do crescimento (100- % de células viáveis).

Tabela 15 - Eficácia do inibidor allitinib e mutações genéticas do painel de 76 linhagens celulares tumorais.

Tumor	Célula	IC50 média ± DP (nM)*	Média ± DP GI1	GI	Mutações nos genes preditivos de resposta às terapias anti-EGFR					
					KRAS	EGFR	NRAS	PIK3CA	PTEN	BRAF
Bexiga	5637	221,23 ± 9,17	84,4 ± 1,5	AS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	MCR	923,21 ± 1,45	57,2 ± 2,5	MS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	HT1376	533,73 ± 11,07	66,7 ± 1,5	AS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	T24	>1000	7,4 ± 1,5	R	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
Mama	MDA-MB 231	710,40 ± 4,5	54,2 ± 8,6	MS	p.G13D	WT	WT	WT	WT	p.G464V
	MDA-MB 468	723,43 ± 4,0	57,3 ± 3,8	MS	WT	WT	WT	p.E545A	p.L70fs*7	WT
	BT20	934,62 ± 6,5	40,0 ± 6,3	MS	WT	WT	WT	p.P539R, p.H1047R	WT	WT
	T47-D	>1000	41,7 ± 3,3	MS	WT	WT	WT	p.H1047R	WT	WT

continua na próxima página...

	MCF7	>1000	47,4 ± 3,7	MS	p.G12R	WT	WT	p.E542K	WT	WT
	AS578T	>1000	29,0 ± 1,0	R	WT	WT	WT	WT	N.R	WT
Cervical	Caski	24,01 ± 2,41	98,4 ± 0,43	AS	WT	WT	WT	p.E545K	WT	WT
	C33A	101,13 ± 9,87	75,5 ± 1,9	AS	WT	WT	WT	p.R88Q	p.R130*, p.R233*	WT
	HeLa	>1000	3,7 ± 1,7	R	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SiHa	>1000	9,7 ± 4,6	R	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Cólon	LOVO	100,98 ± 9,9	70,5 ± 6,3	AS	p.G13D	WT	WT	WT	WT	p.G70G
	CACO-2	488,54 ± 13,3	52,9 ± 2,3	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SK-CO10	906,00 ± 4,4	54,4 ± 3,7	MS	p.G13D	WT	WT	N.R	N.R	NR
	SW480	>1000	37,7 ± 2,0	R	p.G12V	WT	WT	N.R	N.R	WT
	CO115	>1000	44,5 ± 6,3	MS	WT	WT	WT	WT	WT	p.V600E
	SW620	>1000	7,4 ± 2,0	R	p.G12V	WT	WT	WT	WT	WT
	DLD1	>1000	4,0 ± 6,5	R	p.G13D	WT	WT	N.R	N.R	NR
HCT15	>1000	9,1 ± 3,6	R	p.G13D	WT	WT	p.E545K, p.D549N	WT	WT	
Esôfago	Kyse 30	386,97 ± 3,5	83,0 ± 8,5	AS	WT	WT	WT	WT	N.R	NR
	Kyse 70	418,21 ± 2,7	67,7 ± 1,8	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	Kyse 270	469,67 ± 14,5	65,0 ± 21	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	Kyse 410	472,58 ± 7,4	65,0 ± 3,0	AS	p.G12C	WT	WT	WT	WT	NR
Glioma	Res259	335,89 ± 4,8	70,2 ± 6,3	AS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	SF188	419,44 ± 7,8	75,7 ± 5,6	AS	WT	WT	WT	N.R	WT	NR
	GAMG	763,38 ± 9,16	51,0 ± 7,5	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SNB19	864,95 ± 12,3	55,7 ± 4,7	MS	WT	WT	WT	WT	p.E242fs*15	WT
	UW479	931,02 ± 3,7	48,7 ± 3,7	MS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	SW1088	963,66 ± 11,9	59,4 ± 4,1	MS	WT	WT	WT	WT	p.R55fs*1	NR
	SW1783	983,25 ± 6,18	50,4 ± 6,0	MS	WT	WT	WT	WT	p.R233*	NR
	Res186	>1000	20,7 ± 8,2	R	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	U251	>1000	8,4 ± 6,0	R	WT	WT	WT	WT	p.E242fs*15	NR
	U87MG	>1000	1,0 ± 3,2	R	WT	WT	WT	WT	p.V54fs*29	NR
U373	>1000	4,0 ± 1,7	R	WT	WT	WT	N.R	p.E242fs*15	WT	
KNS42	>1000	13,5 ± 4,0	R	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR	
Cabeça e Pescoço	SCC-25	207,29 ± 11,6	75,0 ± 5,1	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SCC-4	217,68 ± 16,1	88,4 ± 1,1	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	FADU	384,07 ± 19,0	60,7 ± 4,9	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	JHU13	388,94 ± 15,4	70,0 ± 5,2	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	JHU28	>1000	13,7 ± 1,1	R	p.G12S	WT	WT	WT	WT	NR
	JHU12	>1000	17,7 ± 6,1	R	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	HN13	>1000	28,0 ± 5,2	R	WT	p.H773Y	WT	WT	WT	NR
Pulmão	NCI-H1975	215,01 ± 12,51	81,9 ± 1,54	AS	WT	L858R+T790M	WT	p.G118D	NR	WT
	NCI-H827	310,00 ± 0,70	89,9 ± 0,79	AS	WT	del 19	WT	WT	WT	WT
	PC9	290,00 ± 0,03	86,6 ± 0,38	AS	WT	del 19	WT	WT	WT	WT
	SK-MES-1	960,13 ± 10,45	40,0 ± 3,5	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	H292	732,02 ± 2,41	70,3 ± 1,56	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	LUDLU-1	737,5 ± 1,26	84,0 ± 4,35	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR

continua na próxima página...

	COR-L105	980,21 ± 0,16	77,3 ± 1,15	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H2228	958,00 ± 0,23	70,5 ± 2,12	AS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SK-LU-1	<1000	33,7 ± 4,1	R	p.G12D	WT	WT	N.R	N.R	NR
	A549	>1000	9,7 ± 6,8	R	p.G12S	WT	WT	WT	WT	NR
	COR-L23	>1000	20,0 ± 2,56	R	p.G12V	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H322	>1000	38,3 ± 3,05	R	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H358	>1000	56,6 ± 4,50	MS	p.G12C	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H727	>1000	33,3 ± 3,78	R	p.G12V	WT	WT	WT	WT	NR
	Calu-3	>1000	45,1 ± 2,81	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
Melanoma	WM9	105,35 ± 10,8	69,4 ± 3,4	AS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	A375	488,46 ± 9,9	67,7 ± 3,5	AS	WT	WT	WT	N.R	N.R	p.V600E
	WM852	551,48 ± 14,3	69,5 ± 6,5	AS	WT	WT	p.Q61R	WT	N.R	NR
	WM793	583,37 ± 8,5	68,9 ± 8,0	AS	WT	WT	WT	WT	N.R	p.V600E
	WM1617	649,07 ± 6,8	69,2 ± 4,9	AS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	Colo858	902,48 ± 6,6	47,5 ± 2,1	MS	WT	WT	p.Q61H	N.R	N.R	NR
	Colo679	>1000	34,7 ± 4,1	R	WT	WT	WT	WT	WT	p.V600E
	SK-MEL37	>1000	14,9 ± 9,3	R	WT	WT	WT	WT	WT	p.V600E
	GRM	>1000	10,4 ± 6,0	R	p.G12R	WT	WT	N.R	N.R	WT
Pâncreas	BXPC-3	164,08 ± 9,2	89,0 ± 3,6	AS	WT	WT	WT	WT	WT	p.V487_P492>A
	PSN1	>1000	24,0 ± 3,4	R	p.G12R	WT	N.R	N.R	N.R	NR
	PANC1	>1000	34,4 ± 1,5	R	p.G12D	WT	N.R	N.R	N.R	NR
	MiaPaCa2	>1000	20,0 ± 6,0	R	p.G12C	WT	WT	WT	WT	WT
Próstata	PNT2	754,45 ± 6,5	53,0 ± 4,8	MS	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR
	LNCCap	>1000	36,5 ± 2,8	R	p.G12V	WT	WT	N.R	p.K6fs*4	NR
	PC3	>1000	32,2 ± 7,2	R	WT	WT	WT	N.R	N.R	NR

*Média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. ¹Classificação de sensibilidade determinada pelos valores da inibição do crescimento (GI) na dose de 1000 nM é definida como: AS - altamente sensíveis com GI>60%; MS - moderada sensibilidade GI 40-60% e R - resistentes GI<40%; NR: mutações não reportadas; Caracteres em negrito representam as mutações pesquisadas neste estudo; Caracteres normais mutações descritas sob consulta ao banco de dados RCGDB- The Roche Cancer Genome Database Mutations.

No total, 76 linhagens celulares de 11 tipos tumorais distintos foram avaliadas quando à sensibilidade ao inibidor allitinib. Identificamos intervalos de valores de IC₅₀ na ordem de nanomolares que variaram de 24,01 ± 2,41 nM à 983,25 ± 6,18 nM. Nesta abordagem 44 linhagens celulares tumorais apresentaram IC₅₀ abaixo de 1000 nM. Entretanto, em 32 linhagens não foi possível detectar valores estimados de IC₅₀, pois a máxima concentração avaliada não foi capaz de reduzir 50% da viabilidade celular (Tabela 15).

De forma descritiva no painel de linhagens tumorais de bexiga, foi observado valores mínimos de IC_{50} na ordem de $221,23 \pm 9,17$ nM para a linhagem 5637, valores intermediários de $532,41 \pm 9,87$ e $533,73 \pm 11,07$ nM para as linhagens MCR e HT1376 respectivamente e um valor acima de 1000 nM para a linhagem T24 (Tabela 15).

As linhagens tumorais de cabeça e pescoço avaliadas neste estudo apresentaram um perfil heterogêneo de resposta ao allitinib, apresentando intervalo de valores de IC_{50} entre $207,29 \pm 11,6$ nM a $388,94 \pm 15,4$ nM para as linhagem SCC25 e JHU13 respectivamente. As linhagens HN13, JHU28 e JHU12 apresentaram um fenótipo resistente ao allitinib, com valores superiores a 1000 nM. Entre as linhagens tumorais de cervicais avaliadas encontramos valores de IC_{50} apenas para duas linhagens celulares Caski ($24,01 \pm 2,41$ nM) e C33A ($101,13 \pm 9,87$ nM). O painel de linhagens tumorais de Cólon foi composto por 8 linhagens, em apenas 3 delas foi possível detectar valores de IC_{50} que se encontram entre o intervalo de $100,98 \pm 9,9$ a $906,00 \pm 4,40$ nM. As demais linhagens celulares apresentam valores acima de 1000 nM (Tabela 15). As linhagens tumorais de esôfago apresentam valores similares de IC_{50} que variaram entre o intervalo de $386,97 \pm 3,5$ a $472,58 \pm 7,4$ nM.

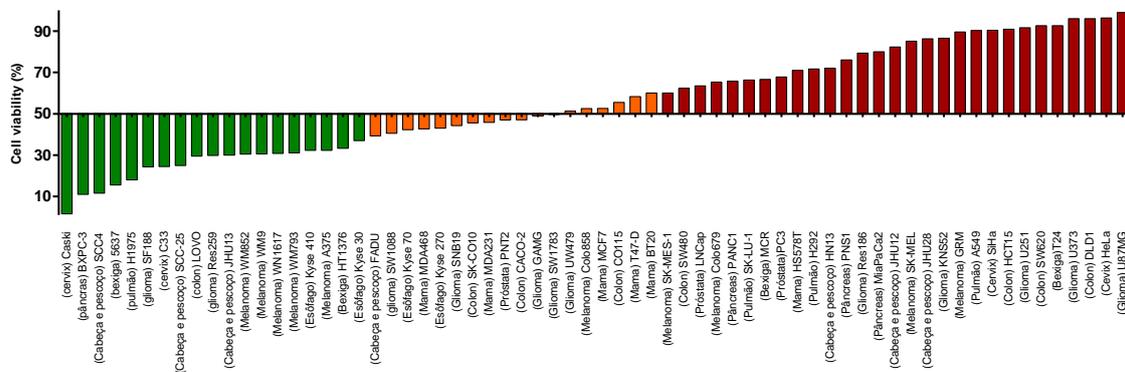


Figura 32 - Classificação de GI de 76 linhagens celulares tumorais expostas ao allitinib.

Barras representam a viabilidade celular na concentração de 1000 nM do inibidor. Barras verdes (AS - alta sensibilidade); laranja (MS - moderada sensibilidade) e vermelho (R - resistentes).

As linhagens celulares de glioma foram amplamente representados por um painel contendo 12 diferentes tipos de linhagens tumorais. Os resultados mostraram um intervalo de valores de IC_{50} entre $335,89 \pm 4,8$ à $983,25 \pm 6,18$ nM. Entretanto para este tipo tumoral 4 linhagens (U251, U87MG, U373 e KNS52) apresentaram valores acima de 1000 nM. A

avaliação do potencial citotóxico do allitinib no painel de linhagens tumorais de mama, revelou valores de IC₅₀ entre o intervalo de 710,40 ± 4,5 e 934,62 ± 6,5 para as linhagens MDA231, MDA468 e BT20. Foi detectado valores de IC₅₀ acima de 1000 nM para as linhagens tumorais de mama T47-D, MCF7 e HS578T (Tabela 15). Entre as linhagens de melanoma avaliadas, foi detectado valores de IC₅₀ entre 105,35 ± 10,8 à 902,48 ± 6,6 nM em 6 das 9 linhagens testadas neste estudo. No amplo painel de linhagens tumorais de pulmão testadas, foi detectado valores de IC₅₀ entre o intervalo de 215,01 ± 12,51 a 980,21 ± 0,16 nM, sendo que 7 das 15 linhagens testadas apresentaram valores maiores que 1000 nM. Apenas uma das 4 linhagens tumorais de pâncreas (BXPC-3) apresentou valor de IC₅₀ menor de 1000 nM (164,08 ± 9,2 nM), foi destacado o mesmo perfil nas linhagens de próstata avaliadas onde apenas a linhagem PNT2 apresentou um valor de IC₅₀ de 754,45 ± 6,5 nM.

Tabela 16 - Classificação do GI no painel de linhagens tumorais expostas ao allitinib.

Tipo tumoral	N	Sensibilidade		
		Alta sensibilidade (AS)	Moderada sensibilidade (MS)	Resistente (R)
		N (%)	N (%)	N(%)
Bexiga	4	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)
Cabeça e Pescoço	7	4 (57,1)	0 (0,0)	3 (42,9)
Cervical	4	4 (100,0)	0(0,0)	2 (50,0)
Colon	8	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50,0)
Esôfago	4	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Glioma	12	2 (16,7)	5 (41,7)	5 (41,7)
Mama	6	0 (0,0)	5 (83,3)	1 (16,7)
Melanoma	9	5 (55,6)	1 (11,1)	3 (33,3)
Pâncreas	4	1 (25,0)	0 (0,0)	3 (75,0)
Pulmão	15	7 (46,6)	3 (20,0)	5 (33,3)
Próstata	3	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)
Total	76	28 (36,8)	19 (25,0)	29 (38,1)

N: número de linhagens celulares avaliadas

Classificadas quanto a sensibilidade pelo cálculo de GI, as linhagens celulares tumorais apresentaram 38.1 % (29/76) fenótipo resistente (R), 25.0 % (19/76) possuem o fenótipo de moderada sensibilidade (MS) e 36.8 % (28/76) foram classificadas com alta

sensibilidade (AS) ao allitinib. Quando agrupamos os grupos sensíveis (AS e MS), constatamos que 61.84 % (47/76) apresentaram uma resposta sensível ao allitinib (Tabela 16) (Figura 32).

Analisando particularmente cada tipo tumoral, foi observado alta sensibilidade (AS) nas linhagens tumorais de esôfago 100% (4/4), cabeça e pescoço 57,1% (4/7), melanoma 55,6% (5/9), cervical 50,0 % (2/4), bexiga 50,0 % (2/4) e pulmão 47% (7/15). A classificação do GI também revelou uma moderada sensibilidade (MS) nas linhagens tumorais de mama 83,3% (5/6) (Tabela 16).

5.3.3 Caracterização das mutações nos genes preditivos de resposta à inibidores de EGFR

Foi realizado, análise das mutações nos principais genes envolvidos na resistência primária de tumores sólidos aos inibidores de EGFR. Apenas 4 mutações no gene *EGFR*, nas linhagens celulares HN13 (p.H773Y), H1975 (L858R+T790M), PC9 e NCI-H827 (del 19) (Tabela 17).

Foram analisadas 52 linhagens celulares quanto à presença de mutações no gene *PIK3CA*, encontramos 44 linhagens selvagens e 8 mutantes, sendo que 87,5% (7/8) das mutações estão presentes em linhagens com fenótipo sensível e 12.5% (1/8) pertencem a linhagens com fenótipo resistente ao allitinib, embora nenhuma correlação estatística quanto a resposta foi detectada ($p=0.448$).

As mutações nos exons de 1 a 9 do gene *PTEN* foram avaliadas em 39 linhagens celulares. Foram encontradas 9 linhagens mutadas sendo que 55,6 % (5/9) apresentaram fenótipo sensível e 44,4% (4/9) possuem fenótipo resistente ao allitinib. Na análise de correlações não encontramos nenhuma relação significativa entre as mutações neste gene e a resposta ao inibidor em estudo ($p=0.674$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Correlação entre as mutações nos genes preditivos e a resposta ao allitinib.

Gene Mutação	N	Grupo sensível AS+MS (%)	Grupo resistente R (%)	<i>p</i>
KRAS				
WT	55	39 (70.9)	16 (29.1)	0.001
Mutante	20	6 (30)	14 (70)	
NRAS				

WT	73	43 (58.9)	30 (41.1)	0.218
Mutante	2	2 (100)	0 (0)	
EGFR				
WT	72	43 (59.7)	29 (40.3)	0.543
Mutante	4	3 (75)	1 (25)	
PIK3CA				
WT	44	27 (61.4)	17 (38.6)	0.448
Mutante	8	7 (87.5)	1 (12.5)	
PTEN				
WT	30	19 (63.3)	11 (36.7)	0.674
Mutante	9	5 (55.6)	4 (44.4)	
BRAF				
WT	25	9 (36)	16 (64)	0.095
Mutante	7	5 (71.4)	2 (28.6)	

N: número de linhagens celulares avaliadas; WT: selvagem; p: valor de person χ^2 ;

Ao analisar as mutações nos códons 12, 13 e 61, dos genes *KRAS* e *NRAS*, foi encontrado apenas duas mutações no gene *NRAS* e 20 mutações no gene *KRAS*. As mutações encontradas foram correlacionadas com a resposta ao allitinib, e observado uma significativa relação, na qual 70 % (14/20) das células mutadas apresentavam fenótipo resistente a este inibidor ($p=0,001$). Nenhuma correlação foi detectada quando comparada a presença de outras mutações nos genes analisados neste estudo (Tabela 17).

5.3.4 Transfecção estável da linhagem H292 mutante para *KRAS* (pG12D e pG12S)

Para validar os achados anteriores da associação de mutações de *KRAS* com a resistência ao allitinib, foi transfectado uma linhagem sensível e *KRAS* selvagem (H292) com as principais mutações identificadas nas nossas linhagens. Os plasmídeos pEGFP.C1.KRAS_wt; pEGFP.C1.KRAS_G12D e pEGFP.C1.KRAS_G12S foram transformados por alteração térmica em *Escherichia coli DH5 α* (New England Biolabs) e semeados em meio LB-agar (Canamicina). O DNA plasmidial foi purificado com kit Maxiprep de acordo com as instruções do fabricante. Tratando-se de plasmídeos adquiridos comercialmente, a etapa de validação dos clones foi feita por análise de eletroforese de fragmentos digeridos com a enzima de restrição NcoI (New England Biolabs) (Figura 33A e B).

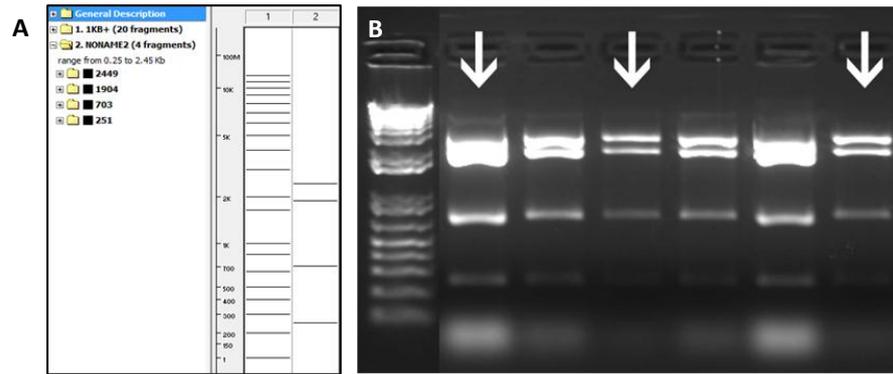


Figura 33 - Validação da transfecção da linhagem H292.

(A) simulação de eletroforese com o programa Vector NTI (Thermo Scientific); (B) eletroforese do perfil de restrição com a enzima NcoI. Setas indicam os clones selecionados para as futuras transfecções.

O material genético foi quantificado e obtido as seguintes concentrações: 1813,5 ng/ μ L do plasmídeo pEGFP.C1.KRAS_wt; 1768,3 ng/ μ L do plasmídeo pEGFP.C1.KRAS_G12D e 444,5 ng/ μ L do plasmídeo pEGFP.C1.KRAS_G12S.

Para avaliar o papel das mutações no gene *KRAS* (pG12D e pG12S), a linhagem H292 foi transfectada como os seus respectivos plasmídeos como descrito na seção de métodos. A primeira validação, quanto à eficiência das transfecções, foi realizada pela observação da fluorescência adquirida após transfecção, através da produção da proteína verde fluorescente (EGFP) (Figura 34), na qual observou-se que, após 72 horas aproximadamente 80% das células de cada campo analisado possuía células que expressavam a proteína GFP. Cada linhagem celular foi enriquecida, através de seleção por citometria de fluxo (BD FACS Aria II) e selecionada com neomicina (250 μ g/mL).

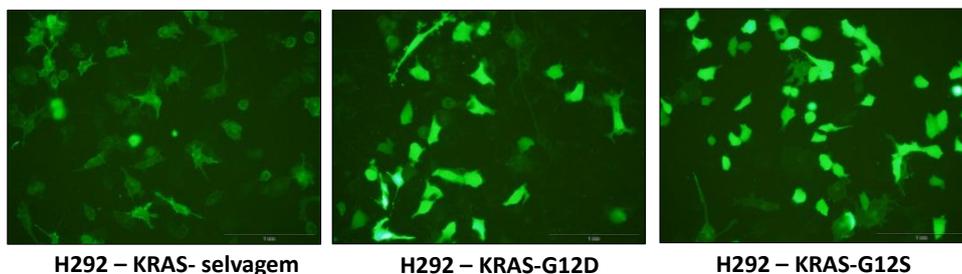


Figura 34 - Detecção de intensidade da fluorescência da linhagem H292 transfectada.

Em seguida, o DNA de cada linhagem celular transfectada foi extraído, por método de trizol clorofórmio. Para confirmar a presença das mutações inseridas, foi realizado o sequenciamento direto. Como observado na Figura 35, as mutações propostas no estudo foram detectadas, comprovando a criação das linhagens celulares contendo as variantes KRAS_wt, KRAS_G12D e KRAS_G12S, originadas a partir da linhagem H292.

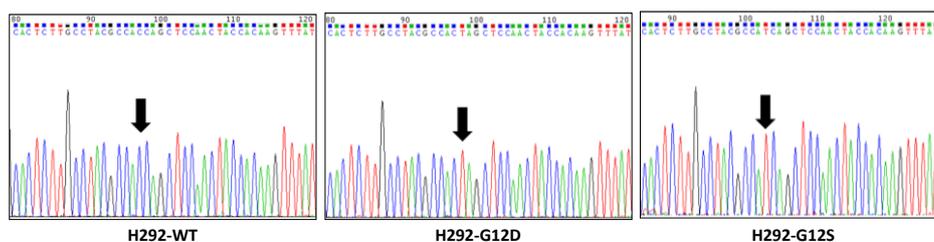


Figura 35 - Eletroferograma do sequenciamento de *KRAS* das transfectadas.

5.3.5 Mutações em *KRAS* como preditoras da resposta ao allitinib

Após a transfecção das mutações de interesse do gene *KRAS*, as linhagens foram expostas novamente a concentrações incrementais do inibidor allitinib, para determinação das diferenças no IC50. Como esperado, os resultados mostraram um aumento do IC50 de aproximadamente seis vezes ($6,56 \pm 0,23 \mu\text{M}$) para linhagem H292-KRAS-G12D e oito vezes para a linhagem H292-KRAS-G12S ($8,47 \pm 0,15 \mu\text{M}$) em comparação com a linhagem transfectada com o plasmídeo selvagem ($0,95 \pm 0,17 \mu\text{M}$) (Figura 36A). Utilizando um ensaio fluorescente não metabólico, foi observado uma diminuição significativa na viabilidade da linhagem portadora de *KRAS* selvagem para ambas as concentrações testadas ($1 \mu\text{M}$ e $6 \mu\text{M}$) comparada com as linhagens portadoras das mutações p.G12D e p.G12S ($p= 0,03$ e $p= 0,003$). O potencial citotóxico das linhagens, avaliados pela integridade da membrana celular, revelou uma diminuição significativa da citotoxicidade do allitinib nas linhagens *KRAS* mutante ($p=0,005$ e $p=0,006$), respectivamente, quando comparadas com a linhagem *KRAS* selvagem nas doses de 1 e $6 \mu\text{M}$ do allitinib (Figura 36B e C).

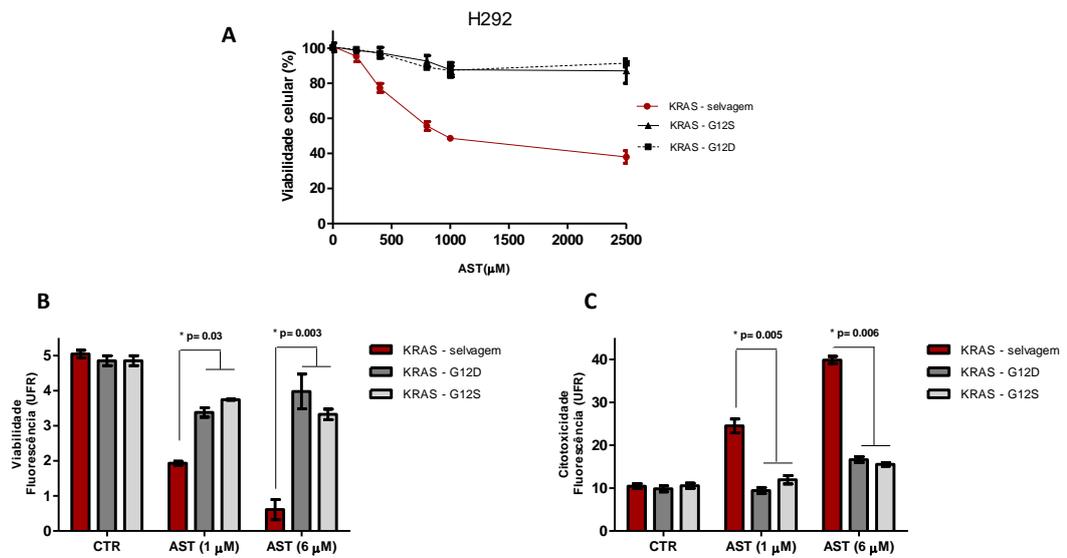


Figura 36 - Alterações de viabilidade e citotoxicidade das linhagens H292 transfetadas.

(A) Ambas as linhagens foram expostas a uma curva incremental do allitinib (0 – 2500 μM) para detecção do IC_{50} . (B e C) Viabilidade e citotoxicidade acessada por fluorescência. CTR: controle; AST: allitinib.

6 DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida em 3 etapas correspondentes aos resultados apresentados no item anterior:

- 1) Identificação *in vitro* dos mecanismos de resistência adquirida ao cetuximab em um modelo de linhagem de CCECP;
- 2) Potencial citotóxico dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib em linhagens de CCECP
- 3) Avaliação do efeito antineoplásico do inibidor allitinib em tumores sólidos: KRAS como biomarcador preditivo de resposta.

6.1 Identificação *in vitro* dos mecanismos de resistência adquirida ao cetuximabe em um modelo de linhagem de CCECP

Utilizamos um modelo *in vitro* para criar uma linhagem celular resistente ao cetuximabe. As linhagens A431 (controle) e Fadu foram expostas a concentrações incrementais do cetuximabe por um longo tempo, até apresentarem um fenótipo de resistência a este quimioterápico. A utilização deste modelo de resistência adquirida representa uma ferramenta de sucesso para compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência secundária a alguns fármacos, entretanto, poucos trabalhos utilizaram linhagens tumorais de CCECP. Benavente e colaboradores foram dos primeiros pesquisadores a demonstrarem a eficiência de um modelo de resistência incremental ao cetuximabe em uma linhagem de CCECP. Neste estudo, a linhagem tumoral SCC-1, foi exposta por 12 meses em concentrações incrementais dos inibidores de EGFR, cetuximabe, gefitinib e erlotinib¹²⁸. O modelo descrito foi semelhante ao adotado em nosso estudo, no qual as linhagens A431 e Fadu ficaram expostas por aproximadamente 7 meses.

A validação do nosso modelo de resistência foi realizado através do monitoramento dos valores de IC₅₀ de cada linhagem celular gerada ao longo do tempo. A linhagem A431 apresentava um IC₅₀ de aproximadamente 130 µg/mL chegando a valores indetectáveis. O mesmo foi observado na linhagem Fadu, que possui um IC₅₀ inicial de aproximadamente 290 µg/mL atingindo valores indetectáveis para os clones resistentes. Em seguida foi destacado uma ineficiência total da inibição da fosforilação de EGFR pelo cetuximabe nos clones

resistentes de ambas as linhagens. Esta mesma incapacidade foi detectada na linhagem SCC-1 (resistente ao cetuximabe) criada por Benvente e colaboradores, entretanto níveis basais de fosforilação ainda permaneceram detectáveis por Western blotting¹²⁸. Recentemente um modelo de resistência ao cetuximabe foi proposto por Boeckx e colaboradores, no qual eles utilizaram as linhagens tumorais SC263, LICR-HN2 e LICR-HN5 que foram expostas a concentrações incrementais de cetuximabe, por até 15 dias¹²⁹.

Além da caracterização das alterações morfológicas provenientes da exposição ao cetuximabe, foram conduzidos ensaios não metabólicos fluorescentes, para avaliar a viabilidade e citotoxicidade dos clones resistentes. Nesta abordagem o padrão de sensibilidade da linhagem A431-C5 (clone 5) e Fadu-C10 (clone 10) e seus respectivos controles (parentais) foram classificados. Alguns estudos utilizam abordagens experimentais alternativas para avaliar a citotoxicidade do cetuximabe em modelos de resistência, como ensaio de formação de colônia, contagem direta de células, apoptose (anexina/PI) ou até mesmo modelos xenográficos^{130, 129, 128}. Todas estas abordagens representam uma estratégia complementar para validar a eficiência do modelo de resistência ao cetuximabe.

Foi monitorado por Western blotting a fosforilação das vias intracelulares ERK e AKT medidas pela ativação de EGFR. Os clones resistentes ao cetuximabe, na linhagem A431, apresentam um aumento da fosforilação de ERK e diminuição da fosforilação de AKT. Diferentemente na linhagem tumoral Fadu-C10, na qual foi encontrado uma redução de ERK e aumento da fosforilação de AKT. Alguns estudos demonstraram o aumento da fosforilação de AKT em linhagens celulares de CCECP resistente ao cetuximabe^{128, 130}. Além das vias reportadas em nosso estudo, a fosforilação de STAT3 e outros membros da família ErbB já foram fenótipos associados a modelos de resistência ao cetuximabe em linhagens de CCECP¹³⁰.

Após a confirmação das alterações nas vias intracelulares, foi conduzido uma análise preliminar do exoma completo da linhagem celular Fadu-C10 comparada com a linhagem parental Fadu. Foram identificadas 18 variantes genéticas significativas na linhagem resistente, entre elas 10 possuem potencial biológico importante: *HSPG2*, *PDE4DIP*, *AFF3*, *COL3A1*, *UGT2B4*, *HLA-DRB1*, *STAB2*, *OAS3*, *MINK1* e *FERMT1*. Os genes identificados nesta análise não foram descritos em modelo de resistência em linhagens de CCECP.

O gene *HSPG2*, também conhecido como percalano, é um constituinte da matriz extracelular, conjuntamente com outras moléculas como fibronectina e laminina¹³¹. Estudos indicam um aumento da expressão de percalano em displasias epiteliais e carcinomas orais. Neste último caso, o percalano é extensivamente depositado no citoplasma e no espaço intra-epitelial, entretanto, nos tumores de CCECP, localiza-se preferencialmente no estroma¹³² o que resulta na redução da coesão celular¹³². Não existem evidências da associação direta do percalano na resposta ao cetuximabe em tumores de CCECP, entretanto, ensaios *in vivo* evidenciam uma diminuição da expressão do percalano associada a uma positiva resposta ao cetuximabe¹³³. O gene *PDE4DIP*, codifica a proteína chamada miomegalina, com localização preferencial no complexo de golgi. Esta proteína desempenha um papel na transdução de sinais nestas organelas, sendo que seus domínios de oligomerização são capazes de ativar o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas- β (PDGFRB)¹³⁴. O gene *AFF3* codifica um fator de transcrição com o nome de LAF4 preferencialmente expresso em tecidos linfoides e, recentemente, foi associado a regulação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em carcinomas adrenocorticais¹³⁵. Conjuntamente com miomegalina não encontramos nenhuma evidência científica de alterações deste gene em pacientes com CCECP.

Em nosso estudo, foi detectado uma mutação com efeito moderado do gene *COL3A1*, que codifica uma proteína colágena do tipo III, responsável pela remodelação extracelular, sendo expressa em vários tecidos como pele, vasos sanguíneos e placenta¹³⁶. Em pacientes com CCECP as taxas de degradação do colágeno tipo III estão associadas à sobrevida destes pacientes¹³⁷. A análise do TCGA reporta uma superexpressão em 4% dos pacientes e um aumento do número de cópias deste gene de 3%. Interessantemente, foi encontrada uma variante no gene *UGT2B4* (p.Thr494Ile), que é responsável pela síntese de uma enzima chave na detoxificação de certos compostos carcinogênicos provenientes do tabaco¹³⁸. O complexo processo de biotransformação é mediado pela família de enzimas UDP-glicuroniltransferase¹³⁹. Um estudo recente avaliou a combinação de polimorfismos genéticos associados às fases de biotransformação e detectou que alterações em genes desta família (*UGT1A1*, *UGT1A6* e *UGT1A7*) estão associados a um risco aumentado de desenvolver CCECP¹⁴⁰.

Foi detectado uma mutação missense no gene *MINK1* (p.Pro249Leu). Este gene codifica uma proteína como o nome *Misshapen-like kinase 1*. Esta proteína possui funções

pouco conhecidas, embora recentemente, o MINK1 foi associado a mecanismos de polaridade celular planar envolvido na ativação da via β -catenina, independente de Wnt¹⁴¹. Em pacientes com CCECP, não evidenciado nenhuma associação com os mecanismos envolvidos na carcinogênese, embora estudos *in vitro* tenham detectado a fosforilação de MINK1 após ativação da via RAS por mecanismos envolvendo espécies reativas de oxigênio¹⁴². A análise *in silico* da expressão desta proteína revelou que 5% dos pacientes possuem o aumento do número de cópias deste gene.

Entre as alterações encontradas, destacamos o gene *FERMT1* que possui duas variantes p.Arg526Lys e n.304T>C, sendo a última localizada em um exon não codificado do gene. O *FERMT1* codifica uma proteína de mesmo nome e alguns estudos descrevem que a superexpressão desta proteína em CNCP, carcinoma de colón¹⁴³, sendo relacionada com mecanismos de invasão em células de carcinoma de mama¹⁴⁴. Além disso, a expressão de *FERMT1* foi associada à invasão e formação de colônias em carcinoma de colorretal, sendo indicado como possível alvo terapêutico para este tipo tumoral¹⁴⁵. A análise *in silico* demonstrou que 11% dos pacientes de CCECP apresentam o aumento do número de cópias deste gene.

Em nossa análise comparativa da expressão gênica entre as linhagens Fadu parental e Fadu-C10 (clone resistente), foram encontrados genes diferencialmente expressos, constituintes de vias de sinalização importantes como: EGFR, MAPK, mTOR, Wnt. Estes achados são semelhantes aos estudos conduzidos por Benavente e colaboradores, que encontraram uma forte associação entre a resistência ao cetuximabe e ativação da via intracelular PI3K/AKT¹²⁸.

Os genes *EGFR*, *MAP2K2*, *UBA52*, *SHC1*, *CLTA* e *EPN1*, mediados pela sinalização de EGFR, encontram-se superexpressos na linhagem Fadu-C10 resistente ao cetuximabe. Com base nestes achados, observou-se resultados na literatura similares que indicam a persistente ativação de EGFR em linhagem resistente a esta terapia¹⁴⁶. Alguns estudos demonstram a ativação e superexpressão de outros membros da família ErbB, como HER3 e HER4¹⁴⁷, entretanto, em nosso estudo, apenas o receptor EGFR se encontra diferencialmente expresso (induzido). Adicionalmente, a resistência à radioterapia está associada aos alterados níveis de expressão e fosforilação de EGFR em pacientes com CCECP¹¹⁹.

A análise do painel de genes envolvidos na via de sinalização de MAPK revelou a maior lista de genes superexpressos sugerindo a superativação desta via. Alguns estudos clínicos já demonstraram o papel da via MAPK na resistência ao cetuximabe. Este estudo foi realizado em 63 pacientes e indicou que a ativação das via MAPK (representada por RAF/MEK/ERK) foi significativamente associada com uma pior sobrevida global de pacientes portadores de CCECP submetidos a tratamento com cetuximabe e radiação¹⁴⁸. A mesma ativação da via de MAPK foi associada à resistência em outros tipos tumores sólidos tratados com cetuximabe¹⁴⁹. Com base nestes achados, um ensaio clínico fase I vem sendo conduzido em pacientes com tumores sólidos metastáticos e refratários a cetuximabe. Este estudo releva uma ação citotóxica tolerável e potencial efeito antineoplásico da combinação de cetuximabe com selumetinib¹⁵⁰. Semelhante à via MAPK, observou-se genes diferencialmente expressos pertencentes a via de sinalização de mTOR. Um estudo *in vivo*, utilizando linhagem celular de CCECP, avaliou o efeito da combinação entre cetuximabe e o inibidor de mTOR em modelos ortotópicos e apresentou completa parada do crescimento tumoral^{151, 152}. Um ensaio clínico fase II, envolvendo 40 pacientes com CCECP, refratários à cisplatina/cetuximabe detectou consideráveis níveis de citotoxicidade na combinação entre temosolamina e cetuximabe, além de demonstrar uma redução tumoral associado, à inibição do eixo PI3K-AKT-mTOR¹⁵³. Estes estudos iniciais indicam que a associação entre estas terapias devem ser consideradas em futuras abordagens clínicas.

Quanto à via de sinalização Wnt, esta é responsável por desencadear mecanismos de proliferação direta, polaridade celular inicialmente detectada nos processos embrionários e homeostase dos tecidos¹⁵⁴. Três vias de sinalização de Wnt são descritas: a via canônica, não canônica de polaridade planar e não canônica Wnt/ cálcio. Ambas as vias são ativas pela ligação de Wnt em receptores Frizzled. As diferenças entre as categorias envolvem a integração da proteína β -catenina que integra a via canônica¹⁵⁵. Alterações na via de sinalização Wnt estão associadas a um pior prognóstico em pacientes CCECP¹⁵⁶. Uma recente revisão reúne informações que comprovam que vários membros da família Wnt estão desempenhando um papel importante na tumorigênese destes pacientes, além de serem regulados por microRNAs como miR-329 e miR-410, que uma, vez inibidos podem a ativar Wnt-7b¹⁵⁷. Utilizando o ensaio de membrana corioalantóica de galinha, pesquisadores avaliaram o efeito do inibidor de Wnt (WNT974), em linhagens de CCECP. Neste estudo, foi demonstrado, uma significativa redução do tamanho tumoral, provando que esta terapia

pode ser utilizada em ensaios clínicos para este tipo tumoral¹⁵⁸. Contradizendo todos estes achados, em nossas análises, 13 genes constituintes desta via estão reprimidos, resultado do modelo de resistência ao cetuximabe proposto. Entretanto, a superativação desta via se faz presente apenas na linhagem parental.

6.2 Potencial citotóxico dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib em linhagens de CCECP é influenciado ativação AKT

Os inibidores de EGFR representam uma das mais promissoras terapias para o tratamento de CCECP⁴⁴, sendo o cetuximabe o primeiro agente anti-EGFR aprovado para o tratamento destes pacientes¹⁵⁹. Entretanto, uma fração destes pacientes demonstra uma resposta parcial ou negativa, por meio de mecanismos ainda pouco descritos¹⁶⁰. Nos últimos anos, uma nova classe de inibidores irreversíveis de EGFR foi desenvolvida, os quais atuam conjuntamente na inibição de outros alvos moleculares. O afatinib e allitinib representam esta nova geração de inibidores de EGFR que apresenta eficiente ação *in vitro* e *in vivo* em alguns tumores sólidos^{109, 161}.

Inicialmente, o afatinib foi aprovado para tratamento de pacientes portadores de CPNPC, refratários a primeira geração de inibidores de EGFR que possuem mutações secundárias neste gene¹⁶². Diante do potencial citotóxico do afatinib, ensaios pré-clínicos foram conduzidas com esta molécula, que comprovaram o efeito antiproliferativo na linhagem celular Fadu, além de exibir benéficos na combinação com radioterapia¹⁶³. Recentemente um ensaio clínico fase III, conduzido em pacientes com CCECP, demonstrou resultados animadores na sobrevida livre de pacientes com CCECP metastáticos¹⁰⁸. Embora em fase pré-clínicas iniciais, o inibidor irreversível allitinib demonstrou um potente efeito antineoplásico em linhagem celulares tumorais de pulmão, mama e ovário¹⁰⁹, demonstrando ser um promissor agente terapêutico.

Diante da grande expectativa, os inibidores irreversíveis representam uma promessa terapêutica para os pacientes de CCECP, contudo, não existem biomarcadores de resposta para esta nova modalidade terapêutica. Em nosso trabalho, comparamos a eficiência dos inibidores cetuximabe, afatinib e allitinib, e identificamos biomarcadores preditivos de resposta em um painel de linhagens celulares de CCEPC.

A comparação entre as terapias revelou uma baixa taxa de resposta ao cetuximabe, quando comparadas às terapias com os inibidores irreversíveis afatinib e allitinib. Além disso, não foi possível detectar valores reais de IC_{50} nas linhagens celulares expostas ao cetuximabe. Um estudo semelhante comparou a eficiência do cetuximabe com os inibidores gefitinib e erlotinib revelando baixa resposta ao tratamento com cetuximabe em linhagens celulares de CCECP¹⁶⁴. O efeito citotóxico do afatinib também foi avaliado em um painel de 10 linhagens tumorais de CCECP, demonstrando superior citotoxicidade comparado ao cetuximabe e gefitinib, com valores de IC_{50} variando de 100 a 8.000 nM. Estes achados corroboram estudos que evidenciaram a redução do volume tumoral em modelos xenográficos para ambos inibidores cetuximabe e afatinib¹⁶⁵. Embora este seja o primeiro ensaio pré-clínico com o inibidor irreversível allitinib que utiliza um painel de linhagens de CCECP, observou-se baixos valores de IC_{50} variando de 121,31 a 388,94 nM. As abordagens iniciais com este inibidor demonstraram variados valores de IC_{50} para diferentes tipos de linhagens celulares tumorais com alta expressão de HER2 (230 à 970 nM) e baixa expressão de HER2 (6.200 to 7.500 nM)¹⁰⁹. Adicionalmente, foi destacado o efeito de ambos os inibidores de EGFR, em uma linhagem celular primária HCB289 estabelecida pelo nosso grupo. As linhagens primárias são consideradas ferramentas fidedignas de investigação citotóxica, pois conservam características funcionais e morfológicas do tumor inicial. No presente trabalho foi demonstrado uma maior citotoxicidade do inibidor allitinib em comparação aos demais testados.

A análise das mutações de genes preditivos de resposta a terapias anti-EGFR detectou uma mutação no gene EGFR (p.H773Y) na linhagem HN13, que também demonstrou presença de amplificação gênica de *EGFR*. Mutações em *EGFR* são raras neste tipo tumoral e esta mutação foi previamente detectada em tumores de CPNPC¹⁶⁶, estando associada à resistência a inibidores como gefitinib¹⁶⁷. A mais recente análise genética integrada conduzida pelo TCGA encontrou uma taxa mutação de 5% e de 11 % (31/279) de amplificação de *EGFR* em pacientes com tumores de cabeça pescoço. Um ensaio clínico que avaliou 312 pacientes portadores de CCECP, sendo que 11% dos pacientes possuem o aumento do número de cópias de *EGFR*, que não foi considerado um biomarcador preditivo da resposta ao tratamento de cetuximab combinado com cisplatina e 5-FU¹⁶⁸.

Também, observou-se que a mutação no gene *KRAS* (p.G12S) na linhagem JHU28, que em nosso estudo já foi associadas a um fenótipo resistente ao allitinib¹⁶⁹.

A linhagem celular SCC25 foi utilizada como padrão de sensibilidade por apresentar os menores valores de IC₅₀ para ambos inibidores e a linhagem HN13 foi utilizada como modelo de resistência por apresentar os valores mais elevados. Ao analisar o efeito da exposição aos inibidores sobre as vias intracelulares estimuladas pela fosforilação de EGFR, foi observado que, a eficiência dos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib está associada à capacidade de modular a fosforilação de ERK e AKT na linhagem SCC25. O mesmo efeito foi encontrado na linhagem de ovário SK-OV-3, utilizada como modelo de sensibilidade ao allitinib¹⁰⁹. Entretanto, na linhagem resistente HN13, foi observado uma persistente ativação de AKT mesmo na presença dos inibidores afatinib e allitinib. Um estudo recente atribui a ativação das vias intracelulares como PI3K/AKT a uma baixa taxa de resposta ao afatinib, contribuindo para um fenótipo transição epitélio-mesenquimal¹⁷⁰. Nós hipotetizamos que a ativação do eixo de sinalização de AKT poderia exercer um papel fundamental na resistência aos inibidores de EGFR em linhagens de CCECP.

Ao inibir farmacologicamente as linhagens SCC25 e HN13 com inibidores das vias intracelulares, AKT (MK2206) e mTOR (everolimus), foi encontrada uma redução na viabilidade e aumento da citotoxicidade da linhagem HN13 que apresentava um fenótipo resistente às terapias anti-EGFR. Entretanto, este benefício foi observado somente entre a combinação dos inibidores irreversíveis e o inibidor de AKT (MK2206). Um ensaio clínico (NCT00848718), conduzido em pacientes com CCECP para avaliar a eficiência da combinação de carboplatina/paclitaxel, docetaxel ou erlotinib conjuntamente ao inibidor de MK2206, demonstrou toleráveis níveis toxicológicos e evidência de atividades antitumoral associada¹⁷¹. Embora um pequeno ensaio clínico fase I, realizado com 20 pacientes de CCECP, mostrou que a combinação de cetuximabe e everolimus teve uma taxa relativa de resposta de 61,5%¹⁷², a resposta negativa da combinação de anti-EGFR com everolimus, reproduz um ensaio clínico fase II em pacientes portadores de CCECP resistentes a cisplatina que foram tratados com a combinação de erlotinib e everolimus e não apresentaram nenhum benefício na sobrevida destes pacientes¹⁷³.

Adicionalmente, foi avaliado a influência do silenciamento de AKT1 nas linhagens HN13 e HCB289., no qual o silenciamento de AKT1 promove a sensibilidade das linhagens apenas aos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib. A via de sinalização mediada pela fosforilação de PIK3CA leva a fosforilação de dois resíduos (Thr308 e Ser473) que contribuem para a regulação do metabolismo e estimulação da proliferação celular¹⁷⁴. A superexpressão

da isoforma AKT1 foi reportada em alguns tumores sólidos como de próstata¹⁷⁴ e gástrico¹⁷⁵. Além disso, mutações somáticas ativantes de AKT foram observadas em carcinomas de mama, ovário e colorretal¹⁷⁶. Estes estudos comprovam o papel da ativação de AKT na manutenção das células tumorais e um recente estudo conduzido com 10 linhagens primárias de CCECP, demonstrou que o silenciamento de AKT1 diminuiu a taxa de crescimento, além de induzir a expressão do gene supressor tumoral CDKN2B e reduzir a expressão do receptor TGFBR1¹⁷⁷. Um estudo *in vivo* utilizando um modelo ortotópico com a linhagem SCC-1 proveniente de CCECP, avaliou o efeito da inibição de AKT e demonstrou eficientes resultados na redução do tumor, assim como o bloqueio do desenvolvimento de metástase nos animais¹⁷⁸. A expressão e o aumento dos níveis de fosforilação de AKT1 (Ser473) estão associadas com a resposta à radioterapia em pacientes com CCECP, sendo considerado um marcador de resposta a esta modalidade terapêutica^{179, 180}.

A expressão dos receptores da família ErbB, das isoformas de AKT e mTOR foram também interrogadas em pacientes portadores de CCECP, através do banco de dados do TCGA. Como esperado encontramos uma predominância de expressão do EGFR e da isoforma AKT1. Adicionalmente os níveis de fosforilação destas proteínas foram associados com dados clínicos patológicos dos pacientes. Embora alguns estudos afirmem que os níveis de expressão do EGFR e o aumento do número de cópias do gene se encontram aumentados nos estágios avançados da doença¹⁸¹. Foi evidenciado que os níveis de fosforilação de EGFR, especificamente do resíduo pY1068, foram maiores em estágios iniciais da doença. Este fato pode ser associado à intervenção quimioterápica com os inibidores de EGFR, uma vez que um estudo avaliou a presença de células tumorais circulantes e comprovou uma redução de células tumorais circulantes marcadas com EGFR fosforilado¹⁸¹.

A análise do TCGA evidenciou níveis aumentados de fosforilação de AKT em estágios avançados da doença. Diante deste fato, sugerimos que a utilização de combinações com inibidor de AKT pode representar uma promissora estratégia para os pacientes com CCECP. Algumas estratégias *in vivo* demonstram os benefícios desta combinação na redução do tamanho tumoral e de metástases cervicais, além de aumentar a sobrevida dos animais testados¹⁷⁸. A invasão perineural é um evento associado ao aumento da recorrência local de metástases regionais em CCECP e aumento da taxa de mortalidade nestes pacientes^{182, 183}. Eventos como a invasão perineural ocorrem com uma incidência de 14% a 63,2% em pacientes portadores de CCECP¹⁷⁸. Em nosso trabalho, foi detectado pela primeira vez uma

correlação significativa entre a invasão perineural e os níveis de AKT fosforilado, indicando que a utilização de terapias anti-AKT podem ser úteis na prevenção deste evento.

6.3 Avaliação do efeito antineoplásico do inibidor allitinib em tumores sólidos: *KRAS* como biomarcador preditivo de resposta.

A nova geração dos inibidores de EGFR tem como principal característica a capacidade de inibir vários alvos celulares, como as proteínas pertencentes à família ErbB e demais alvos intracelulares¹⁸⁴. A eficiência destas novas terapias, representadas neste trabalho pelos inibidores afatinib e allitinib, está associada a concentrações reduzidas e com a efetiva redução da viabilidade celular, comprovada a partir da determinação do IC₅₀ e posterior classificação da inibição do crescimento GI. O nosso estudo representa o primeiro ensaio pré-clínico que avaliou o efeito de uma nova terapia anti-EGFR irreversível, em um extenso painel de linhagens celulares tumorais, com o intuito de conhecer melhor a ação citotóxica deste composto em diferentes tumores.

Embora os ensaios iniciais tenham comprovado a eficiência do allitinib na inibição dos receptores EGFR e HER2 e HER4, incluindo linhagens celulares com as mutações secundárias em EGFR (L858R/T790M)¹⁰⁹, os testes iniciais foram desenvolvidos em uma pequena representatividade tumoral, considerando a expressão aumentada de EGFR e HER2 em alguns tumores sólidos como pulmão¹⁸⁵, esôfago¹⁸⁶ e mama¹⁸⁷.

Esta abordagem investigativa foi estendida a um painel constituído por 76 linhagens celulares tumorais, representando 11 diferentes tipos de neoplasias. Encontramos 38,1 % (29/79) de linhagens resistentes o que indicam que a resposta ao allitinib não é tumor dependente. Entre os tumores testados, destacamos uma eficiente resposta ao allitinib nas linhagens celulares de carcinoma de esôfago (100 %), CCECP (57,1 %), melanoma (55,6 %), e CPNPC (46,6 %), representando perspectivas para novos ensaios clínicos. Até o presente momento, embora tenha demonstrado resultados positivos em ensaios pré-clínicos, o inibidor allitinib encontra-se em fase clínica de recrutamento de pacientes portadores de CPNPC (ChiCTR-ONC-10000893). Além disso, um preliminar estudo clínico fase I, conduzido em pacientes com tumores sólidos avançados, demonstrou toleráveis efeitos adversos e preliminar resposta terapêutica em 7 pacientes¹⁸⁸.

Foram detectadas 4 mutações no gene *EGFR*, entre elas uma mutação pouco frequente (p.H773Y) na linhagem HN13 e as demais são representadas por linhagens de CPNPC, nas quais estas mutações são frequentes. As linhagens PC9 e NCI-H827 possuem a deleção *in frame* do exon 19. A maioria dos adenocarcinomas de pulmão apresentam mutações em regiões codificadoras de domínios tirosina quinase, entretanto estas alterações genéticas (deleção do exon 19 e a mutação pontual L858R) estão associadas a resposta positiva ao gefitinib de pacientes com CPNPC^{189,190}. Em nosso estudo a linhagem com presença da deleção do éxon 19, respondeu positivamente ao allitinib. Estes achados se assemelham aos resultados encontrados no ensaio clínico LUX-Lung 3 e 6, que utilizou o inibidor irreversível afatinib, no tratamento de pacientes portadores de CPNPC obtendo resultados satisfatórios preferencialmente para aqueles pacientes que carregavam a deleção do exon 19 do gene *EGFR*¹⁹¹. Uma das linhagens celulares, NCI-H1975 é portadora da mutação secundária p.L858R/p.T790M, que está associada a um mecanismo de resistência aos inibidores TKIs de primeira geração como gefitinib e erlotinib¹⁹². Em nosso estudo, o inibidor allitinib apresentou uma alta citotoxicidade para esta linhagem, semelhantemente ao relatado por Xie e colaboradores que usaram células NIH3T3 transfectadas com as mutações p.L858R/p.T790M¹⁰⁹.

As mutações mais frequentes do gene *KRAS* ocorrem nos códons 12 ou 13 do exon 2 e favorecem uma constitutiva ativação e estimulação de vias intracelulares como MAPK, resultando em um aumento da proliferação celular, migração e metástase¹⁹³. As mutações no gene *KRAS* são preditoras negativas de resposta às terapias baseadas em anticorpos monoclonais como cetuximabe e panitumumabe, utilizados no tratamento de pacientes com carcinomas colorretais¹¹⁵. Em nosso trabalho, encontramos pela primeira vez uma significativa correlação entre o estado mutacional do gene *KRAS* das linhagens tumorais e a resposta negativa ao inibidor irreversível allitinib. Embora mutações em outros genes como *NRAS* e *BRAF*, já foram associados a uma taxa negativa de resposta ao cetuximabe em pacientes com MCR¹⁹⁴, em nosso estudo não foi observado nenhuma correlação com a resposta ao allitinib. O papel das mutações no gene *KRAS* na resposta a outros inibidores de *EGFR*, como gefitinib e erlotinib, que representam a primeira geração desta terapia, ainda é questionável¹⁹⁵, devido a reduzida sobrevida livre de progressão em estudos recentes¹⁹⁶ ou contrariamente, nenhum efeito na sensibilidade aos anti-*EGFR* em pacientes com CPNPC¹⁹⁷.

Para validar a importante associação entre mutação de *KRAS* e resistência ao allitinib a linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão H292 foi utilizada para caracterizar o papel funcional das mutações em *KRAS* (G12D e G12S). Nesta abordagem foi encontrado uma significativa diminuição da sensibilidade ao inibidor, em comparação com a linhagem transfectada com o vetor *KRAS* selvagem. Além disso, foi detectado, por meio de ensaios alternativos, um significativo aumento da resistência ao allitinib associado a uma diminuição da citotoxicidade nas linhagens com mutações em *KRAS* (G12D e G12S). O estudo de Sunaga e colaboradores, reportou que o silenciamento de *KRAS* tem a capacidade de inibir a proliferação celular, indicando qual sinalização mediada por *KRAS* está intimamente envolvida no processo de carcinogênese¹⁹⁸. De forma similar, uma investigação do impacto das diferentes mutações em *KRAS* comprovou que as mutações G12C, G12S e G12D diminuíram a sensibilidade aos inibidores gefitinib e afatinib, entretanto as mutações G13D e G12A parecem não interferir na resposta a estes agentes¹⁹⁹.

De acordo com nosso resultado, concluímos que a resposta ao allitinib, pode variar entre diferentes tipos tumorais. Em nosso painel de linhagens de CCEPC, o mecanismo de resposta ao allitinib está intimamente associado com a ativação do eixo de sinalização intracelular PI3K/AKT. Entretanto, de forma ampla as mutações no gene *KRAS* estão associadas a uma negativa resposta ao allitinib. Com base nestas observações, concluímos que na ausência de mutações no gene *KRAS*, a via PI3K/AKT contribui para um fenótipo resistente ao allitinib. Entretanto as mutações em *KRAS* podem ativar o eixo paralelo PI3K/AKT, como mostra o esquema abaixo (Figura 37).

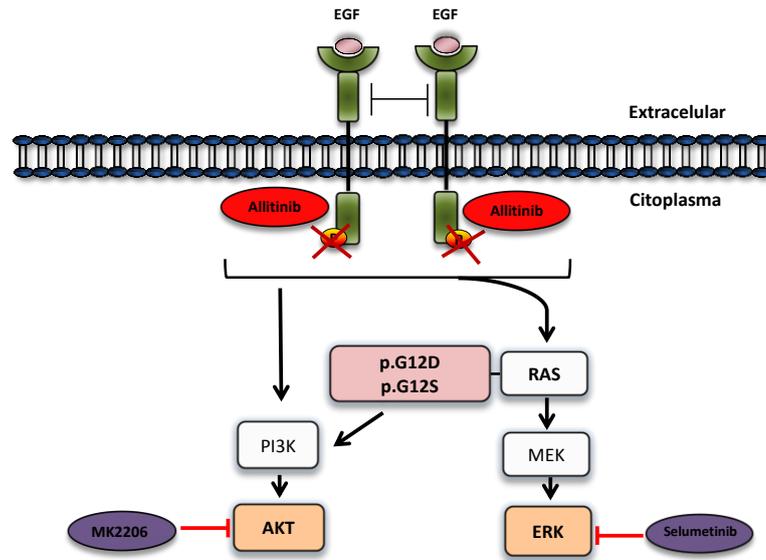


Figura 37 - Modelo da ativação de AKT mediado pelas mutações em *KRAS*.

Recentemente, um estudo demonstrou que as mutações em *KRAS* (G12D e G12C), influenciam diferentes vias de sinalização *downstream*. Este estudo destacou que a mutação G12D pode ativar o eixo PI3K/AKT que regula a expressão de EZH2, diferentemente da mutação G12C, que ativa a expressão do eixo de sinalização MEK/ERK. Ambas as mutações levam diferentemente a mecanismos de regulação de EZH2, que por sua vez aumenta a atividade de STAT3²⁰⁰.

Baseados em nossos resultados acreditamos que as mutações em *KRAS* podem servir de biomarcadores de resposta a esta nova classe de agentes anti-EGFR, selecionando pacientes que poderão se beneficiar em futuros ensaios clínicos. Entretanto, os mecanismos envolvidos na resistência mediada pelas mutações em *KRAS* são etapas sucessivas do nosso trabalho que serão elucidadas.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados neste estudo, e de acordo com os objetivos propostos, podemos concluir que:

- O modelo de resistência adquirida ao cetuximabe que criamos foi validado e representa uma ferramenta *in vitro* para análise de alterações moleculares decorrentes da resistência ao cetuximabe. As análises preliminares revelaram mutações em genes que desempenham importantes funções celulares e alterações na expressão gênica de vias regulatórias dos processos de proliferação invasão e metástase. Estes achados merecem análises aprofundadas e validações em pacientes portadores de CCECP refratários ao cetuximabe.
- A nova geração de inibidores de EGFR, representados neste estudo pelos inibidores irreversíveis afatinib e allitinib, demonstrou uma eficiente ação antineoplásica em um painel de linhagens celulares de CCECP, superando os resultados obtidos pelo cetuximabe. Adicionalmente, encontramos uma associação significativa na resposta a estes inibidores com o eixo de sinalização de AKT. Os níveis de fosforilação de AKT foram associados a eventos metastáticos como a invasão perineural. Diante disso, concluímos que a associação terapêutica entre os inibidores de EGFR e AKT, pode beneficiar os pacientes com CCECP.
- Devido aos poucos ensaios pré-clínicos com o inibidor allitinib, a análise do potencial antineoplásico deste fármaco foram conduzidas em um painel contendo 76 linhagens celulares tumorais. O allitinib demonstrou efeito citotóxico para as linhagens tumorais de melanoma, esôfago, pulmão e cabeça e pescoço. Além disso, a resposta negativa ao allitinib foi associada as mutações ativantes do gene *KRAS*, concluindo que as alterações presentes no gene *KRAS* podem ativar vias intracelulares como PI3K/AKT e devem ser consideradas em futuros ensaios clínicos.

8 PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados deste estudo, as análises preliminares do modelo de resistência ao cetuximab indicaram alterações em gene que candidados a biomarcadores de resistência. Adicionalmente, as mutações encontradas serão validadas, inicialmente a partir do banco de dados do TCGA de pacientes com CCECP que foram tratados com cetuximabe. Seguindo de posterior validação do sequenciamento Sanger. Outras análises como o CNVs (*copy number variation*) serão realizadas utilizando outras ferramentas de bioinformática. O modelo de resistência possibilita novas abordagens experimentais utilizando os inibidores irreversíveis como allitinib.

Diante dos resultados positivos do allitinib em outros tumores sólidos, estão sendo conduzidos neste momento abordagens experimentais com linhagens tumorais de carcinoma de pulmão de não pequenas células, comparando a resposta dessa nova terapia em linhagens EGFR selvagem e mutantes (L858R, del19 e L858R/T790M) com as terapias aprovadas para este tipo tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. **Int J Cancer**. 2010;127(12):2893-917.
2. Posner MR, Haddad RI, Wirth L, Norris CM, Goguen LA, Mahadevan A, et al. *Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the sequential treatment approach*. **Semin Oncol**. 2004;31(6):778-85.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva CGdAE, Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2014 : incidência de câncer no Brasil*. Câncer José Alencar Gomes da Silva CGdAE, Coordenação de Prevenção e Vigilância., editor. **Rio de Janeiro: INCA**; 2014. 124 p.
4. Loeb LA, Harris CC. *Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective*. **Cancer Res**. 2008;68(17):6863-72.
5. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. *The cancer genome*. **Nature**. 2009;458(7239):719-24.
6. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. **Cell**. 2000;100(1):57-70.
7. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
8. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression*. **Nature**. 2004;432(7015):332-7.
9. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. **CA Cancer J Clin**. 2011;61(2):69-90.
10. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. *Global cancer statistics, 2012*. **CA Cancer J Clin**. 2015;65(2):87-108.
11. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. *Cancer statistics, 2010*. **CA Cancer J Clin**. 2010;60(5):277-300.
12. Karia PS, Han J, Schmults CD. *Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012*. **J Am Acad Dermatol**. 2013;68(6):957-66.
13. Haddad R, Annino D, Tishler RB. *Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer*. **Dent Clin North Am**. 2008;52(1):1-17, vii.
14. Budach V. *TPF sequential therapy: when and for whom?* **Oncologist**. 2010;15 Suppl 3:13-8.
15. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival*. **Lancet Oncol**. 2010;11(1):21-8.

16. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck.* **N Engl J Med.** 1995;332(11):712-7.
17. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, et al. *Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study.* **Cancer Causes Control.** 2002;13(10):957-64.
18. Cancer Genome Atlas N. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.* **Nature.** 2015;517(7536):576-82.
19. Egloff AM, Grandis J. *Epidermal growth factor receptor-targeted molecular therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma.* **Expert Opin Ther Targets.** 2006;10(5):639-47.
20. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. *Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas.* **J Clin Oncol.** 2006;24(25):4170-6.
21. Brucher BL, Jamall IS. *Cell-cell communication in the tumor microenvironment, carcinogenesis, and anticancer treatment.* **Cell Physiol Biochem.** 2014;34(2):213-43.
22. Blume-Jensen P, Hunter T. *Oncogenic kinase signalling.* **Nature.** 2001;411(6835):355-65.
23. Ullrich A, Schlessinger J. *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.* **Cell.** 1990;61(2):203-12.
24. Lemmon MA, Schlessinger J. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases.* **Cell.** 2010;141(7):1117-34.
25. Lee J, Pilch PF. *The insulin receptor: structure, function, and signaling.* **Am J Physiol.** 1994;266(2 Pt 1):C319-34.
26. Mendelsohn J. *The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy.* **Endocr Relat Cancer.** 2001;8(1):3-9.
27. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, et al. *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha.* **Cell.** 2002;110(6):763-73.
28. Gullick WJ. *Type I growth factor receptors: current status and future work.* **Biochem Soc Symp.** 1998;63:193-8.
29. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al. *The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview.* **Curr Drug Targets.** 2005;6(3):243-57.
30. Schlessinger J. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases.* **Cell.** 2000;103(2):211-25.
31. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.* **EMBO J.** 2000;19(13):3159-67.

32. Arteaga CL. *The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia*. **J Clin Oncol**. 2001;19(18 Suppl):32S-40S.
33. Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays*. **Nature**. 2006;439(7073):168-74.
34. Goh LK, Huang F, Kim W, Gygi S, Sorkin A. *Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor*. **J Cell Biol**. 2010;189(5):871-83.
35. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired*. **J Biol Chem**. 1996;271(9):5251-7.
36. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, et al. *Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers*. **EMBO J**. 1998;17(12):3385-97.
37. Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2001;2(2):127-37.
38. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE. *ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases*. **J Biol Chem**. 1999;274(24):17209-18.
39. Silva CM. *Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis*. **Oncogene**. 2004;23(48):8017-23.
40. Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, et al. *Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells*. **Oncogene**. 2001;20(20):2499-513.
41. Mehra R, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Jr., Robinson MK, Burtneess B, Golemis EA. *Protein-intrinsic and signaling network-based sources of resistance to EGFR- and ErbB family-targeted therapies in head and neck cancer*. **Drug Resist Updat**. 2011;14(6):260-79.
42. Smilek P, Neuwirthova J, Jarkovsky J, Dusek L, Rottenberg J, Kostica R, et al. *Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas*. **Neoplasma**. 2012;59(5):508-15.
43. Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, et al. *Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma*. **Cancer Sci**. 2008;99(8):1589-94.
44. Oliveira-Silva J, de Carvalho AC, de Souza Viana L, Carvalho AL, Reis RM. *Anti-EGFR therapy: Strategies in head and neck squamous cell carcinoma*. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**. 2016.
45. Bunn PA, Jr., Franklin W. *Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer*. **Semin Oncol**. 2002;29(5 Suppl 14):38-44.
46. Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, et al. *Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely*

resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. **Clin Cancer Res.** 1998;4(1):241-9.

47. Hong L, Han Y, Brain L. *Epidermal growth factor receptor: an important target in esophageal cancer.* **Expert Opin Ther Targets.** 2013;17(10):1179-85.

48. Ayyappan S, Prabhakar D, Sharma N. *Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in esophagogastric cancer.* **Anticancer Res.** 2013;33(10):4139-55.

49. Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Biernat W, Liberski PP. *A comparative study of epidermal growth factor receptor (EGFR) and MDM2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas.* **Pol J Pathol.** 1998;49(3):145-9.

50. Troiani T, Martinelli E, Capasso A, Morgillo F, Orditura M, De Vita F, et al. *Targeting EGFR in pancreatic cancer treatment.* **Curr Drug Targets.** 2012;13(6):802-10.

51. Uegaki K, Nio Y, Inoue Y, Minari Y, Sato Y, Song MM, et al. *Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer.* **Anticancer Res.** 1997;17(5B):3841-7.

52. Keren S, Shoude Z, Lu Z, Beibei Y. *Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis.* **Tumour Biol.** 2014;35(3):2285-95.

53. Singh AB, Harris RC. *Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands.* **Cell Signal.** 2005;17(10):1183-93.

54. P Oc, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. *The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma.* **Oral Oncol.** 2002;38(7):627-40.

55. Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. *Downmodulation of TGF- α protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells.* **J Cell Biochem.** 1998;69(1):55-62.

56. Aupperlee MD, Leipprandt JR, Bennett JM, Schwartz RC, Haslam SZ. *Amphiregulin mediates progesterone-induced mammary ductal development during puberty.* **Breast Cancer Res.** 2013;15(3):R44.

57. Busser B, Sancey L, Brambilla E, Coll JL, Hurbin A. *The multiple roles of amphiregulin in human cancer.* **Biochim Biophys Acta.** 2011;1816(2):119-31.

58. Edwards JP, Zhang X, Mosser DM. *The expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by regulatory macrophages.* **J Immunol.** 2009;182(4):1929-39.

59. Zhou ZN, Sharma VP, Beaty BT, Roh-Johnson M, Peterson EA, Van Rooijen N, et al. *Autocrine HBEGF expression promotes breast cancer intravasation, metastasis and macrophage-independent invasion in vivo.* **Oncogene.** 2014;33(29):3784-93.

60. Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy.* **Cancer Sci.** 2006;97(5):341-7.

61. Ito Y, Higashiyama S, Takeda T, Yamamoto Y, Wakasa KI, Matsuura N. *Expression of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor in Pancreatic Adenocarcinoma*. **Int J Gastrointest Cancer**. 2001;29(1):47-52.
62. Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonneterre J, Peyrat JP. *ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis*. **Ann Oncol**. 2008;19(1):73-80.
63. Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, Oki E, Tsujioka H, Hachisuga T, et al. *Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy*. **Biochem Biophys Res Commun**. 2008;365(3):555-61.
64. Gullick WJ. *Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers*. **Br Med Bull**. 1991;47(1):87-98.
65. Saif MW. *Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway*. **Expert Opin Investig Drugs**. 2010;19(3):357-69.
66. Okines A, Cunningham D, Chau I. *Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2011;8(8):492-503.
67. Rajkumar T, Gullick WJ. *The type I growth factor receptors in human breast cancer*. **Breast Cancer Res Treat**. 1994;29(1):3-9.
68. Irmer D, Funk JO, Blaukat A. *EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy*. **Oncogene**. 2007;26(39):5693-701.
69. Johnson H, Del Rosario AM, Bryson BD, Schroeder MA, Sarkaria JN, White FM. *Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts*. **Mol Cell Proteomics**. 2012;11(12):1724-40.
70. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. *The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy*. **Ann Oncol**. 2001;12(6):745-60.
71. Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, Feramisco JR, et al. *Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway*. **J Biol Chem**. 1996;271(41):25639-45.
72. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. *Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting*. **Clin Cancer Res**. 2006;12(17):5064-73.
73. Melchers LJ, Clausen MJ, Mastik MF, Slagter-Menkema L, Langendijk JA, van der Laan BF, et al. *Head and neck squamous cell carcinomas do not express EGFRvIII*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 2014;90(2):454-62.
74. Khattri A, Zuo Z, Bragelmann J, Keck MK, El Dinali M, Brown CD, et al. *Rare occurrence of EGFRvIII deletion in head and neck squamous cell carcinoma*. **Oral Oncol**. 2015;51(1):53-8.

75. Marti U, Hug M. *Acinar and cellular distribution and mRNA expression of the epidermal growth factor receptor are changed during liver regeneration.* **J Hepatol.** 1995;23(3):318-27.
76. Xu Y, Shao Y, Zhou J, Voorhees JJ, Fisher GJ. *Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes.* **J Cell Biochem.** 2009;107(5):873-80.
77. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. *The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation.* **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2010;11(7):490-501.
78. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. *Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor.* **Nat Cell Biol.** 2001;3(9):802-8.
79. Traynor AM, Weigel TL, Oettel KR, Yang DT, Zhang C, Kim K, et al. *Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer.* **Lung Cancer.** 2013;81(1):138-41.
80. Hadzisejdic I, Mustac E, Jonjic N, Petkovic M, Grahovac B. *Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis.* **Mod Pathol.** 2010;23(3):392-403.
81. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. *Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab.* **Oncogene.** 2009;28(43):3801-13.
82. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. *Nuclear EGFR as a molecular target in cancer.* **Radiother Oncol.** 2013;108(3):370-7.
83. Iida M, Brand TM, Campbell DA, Li C, Wheeler DL. *Yes and Lyn play a role in nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor.* **Oncogene.** 2013;32(6):759-67.
84. Liebmann C. *EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions.* **Mol Cell Endocrinol.** 2011;331(2):222-31.
85. Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. *EGFR signal transactivation in cancer cells.* **Biochem Soc Trans.** 2003;31(Pt 6):1203-8.
86. Drube S, Stirnweiss J, Valkova C, Liebmann C. *Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from beta2-adrenergic receptor signalling.* **Cell Signal.** 2006;18(10):1633-46.
87. Bou-Assaly W, Mukherji S. *Cetuximab (erbitux).* **AJNR Am J Neuroradiol.** 2010;31(4):626-7.
88. Garrett CR, Eng C. *Cetuximab in the treatment of patients with colorectal cancer.* **Expert Opin Biol Ther.** 2011;11(7):937-49.
89. Yen LC, Uen YH, Wu DC, Lu CY, Yu FJ, Wu IC, et al. *Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab.* **Ann Surg.** 2010;251(2):254-60.

90. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. **N Engl J Med**. 2006;354(6):567-78.
91. Bernier J. *Cetuximab in the treatment of head and neck cancer*. **Expert Rev Anticancer Ther**. 2006;6(11):1539-52.
92. Giusti RM, Shastri K, Pilaro AM, Fuchs C, Cordoba-Rodriguez R, Koti K, et al. *U.S. Food and Drug Administration approval: panitumumab for epidermal growth factor receptor-expressing metastatic colorectal carcinoma with progression following fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-containing chemotherapy regimens*. **Clin Cancer Res**. 2008;14(5):1296-302.
93. Kennecke H, Chen L, Blanke CD, Cheung WY, Schaff K, Speers C. *Panitumumab monotherapy compared with cetuximab and irinotecan combination therapy in patients with previously treated KRAS wild-type metastatic colorectal cancer*. **Curr Oncol**. 2013;20(6):326-32.
94. Vermorken JB, Stohlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winkvist E, Villanueva C, et al. *Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial*. **Lancet Oncol**. 2013;14(8):697-710.
95. Liang J, E M, Wu G, Zhao L, Li X, Xiu X, et al. *Nimotuzumab combined with radiotherapy for esophageal cancer: preliminary study of a Phase II clinical trial*. **Oncotargets Ther**. 2013;6:1589-96.
96. Bastholt L, Specht L, Jensen K, Brun E, Loft A, Petersen J, et al. *Phase I/II clinical and pharmacokinetic study evaluating a fully human monoclonal antibody against EGFR (HuMax-EGFR) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. **Radiother Oncol**. 2007;85(1):24-8.
97. Machiels JP, Subramanian S, Ruzsa A, Repassy G, Lifirenko I, Flygare A, et al. *Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2011;12(4):333-43.
98. Janmaat ML, Giaccone G. *The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy*. **Drugs Today (Barc)**. 2003;39 Suppl C:61-80.
99. [Internet] [cited 06/01/2014]; Available from: <http://www.fda.gov/>.
100. Vansteenkiste J. *Gefitinib (Iressa): a novel treatment for non-small cell lung cancer*. **Expert Rev Anticancer Ther**. 2004;4(1):5-17.
101. Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, Chen YF, Williams GM, Duan J, et al. *Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen*. **Clin Cancer Res**. 2005;11(18):6414-21.
102. Eswaran P, Azmi KS. *Concurrent chemoradiation with weekly cisplatin, docetaxel and gefitinib: A study to assess feasibility, toxicity and immediate response*. **J Cancer Res Ther**. 2013;9(3):392-6.

103. Adelstein DJ, Rodriguez CP, Rybicki LA, Ives DI, Rice TW. *A phase II trial of gefitinib for recurrent or metastatic cancer of the esophagus or gastroesophageal junction*. **Invest New Drugs**. 2012;30(4):1684-9.
104. Ryan Q, Ibrahim A, Cohen MH, Johnson J, Ko CW, Sridhara R, et al. *FDA drug approval summary: lapatinib in combination with capecitabine for previously treated metastatic breast cancer that overexpresses HER-2*. **Oncologist**. 2008;13(10):1114-9.
105. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. *Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer*. **N Engl J Med**. 2006;355(26):2733-43.
106. BRUNS A, EICHNER S, Lehmann F, Albrecht W, MAIER A. *Crystalline forms of afatinib dimaleate*. **Google Patents**; 2013.
107. Minkovsky N, Berezov A. *BIBW-2992, a dual receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of solid tumors*. **Curr Opin Investig Drugs**. 2008;9(12):1336-46.
108. Machiels JP, Haddad RI, Fayette J, Licitra LF, Tahara M, Vermorken JB, et al. *Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2015;16(5):583-94.
109. Xie H, Lin L, Tong L, Jiang Y, Zheng M, Chen Z, et al. *AST1306, a novel irreversible inhibitor of the epidermal growth factor receptor 1 and 2, exhibits antitumor activity both in vitro and in vivo*. **PLoS One**. 2011;6(7):e21487.
110. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, et al. *AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer*. **Cancer Discov**. 2014;4(9):1046-61.
111. Greig SL. *Osimertinib: First Global Approval*. **Drugs**. 2016;76(2):263-73.
112. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. **Nat Rev Cancer**. 2002;2(1):48-58.
113. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. *Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR*. **N Engl J Med**. 2010;362(25):2380-8.
114. Health Quality O. *KRAS Testing for Anti-EGFR Therapy in Advanced Colorectal Cancer: An Evidence-Based and Economic Analysis*. **Ont Health Technol Assess Ser**. 2010;10(25):1-49.
115. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis*. **Lancet Oncol**. 2010;11(8):753-62.
116. Bardelli A, Siena S. *Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer*. **J Clin Oncol**. 2010;28(7):1254-61.

117. Mazieres J, Brugger W, Cappuzzo F, Middel P, Frosch A, Bara I, et al. *Evaluation of EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: re-analysis of the SATURN study.* **Lung Cancer.** 2013;82(2):231-7.
118. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. *Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry.* **J Clin Oncol.** 2005;23(9):1803-10.
119. Jedlinski A, Ansell A, Johansson AC, Roberg K. *EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines.* **J Oral Pathol Med.** 2013;42(1):26-36.
120. Yonesaka K, Zejnullahu K, Lindeman N, Homes AJ, Jackman DM, Zhao F, et al. *Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers.* **Clin Cancer Res.** 2008;14(21):6963-73.
121. Shames DS, Carbon J, Walter K, Jubb AM, Kozlowski C, Januario T, et al. *High heregulin expression is associated with activated HER3 and may define an actionable biomarker in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck.* **PLoS One.** 2013;8(2):e56765.
122. Bedi A, Chang X, Noonan K, Pham V, Bedi R, Fertig EJ, et al. *Inhibition of TGF-beta enhances the in vivo antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy.* **Mol Cancer Ther.** 2012;11(11):2429-39.
123. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, Friedman HS, et al. *Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene.* **Cell Growth Differ.** 1995;6(10):1251-9.
124. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling.* **Science.** 2007;316(5827):1039-43.
125. Rho JK, Choi YJ, Kim SY, Kim TW, Choi EK, Yoon SJ, et al. *MET and AXL Inhibitor NPS-1034 Exerts Efficacy against Lung Cancer Cells Resistant to EGFR Kinase Inhibitors Because of MET or AXL Activation.* **Cancer Res.** 2014;74(1):253-62.
126. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IA, Drexler HG. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines.* **ALTEX.** 2005;22(2):103-9.
127. Konecny GE, Glas R, Dering J, Manivong K, Qi J, Finn RS, et al. *Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells.* **Br J Cancer.** 2009;101(10):1699-708.
128. Benavente S, Huang S, Armstrong EA, Chi A, Hsu KT, Wheeler DL, et al. *Establishment and characterization of a model of acquired resistance to epidermal growth factor receptor targeting agents in human cancer cells.* **Clin Cancer Res.** 2009;15(5):1585-92.
129. Boeckx C, Blockx L, de Beeck KO, Limame R, Camp GV, Peeters M, et al. *Establishment and characterization of cetuximab resistant head and neck squamous cell carcinoma cell lines: focus on the contribution of the AP-1 transcription factor.* **Am J Cancer Res.** 2015;5(6):1921-38.

130. Iida M, Brand TM, Starr MM, Huppert EJ, Luthar N, Bahrar H, et al. *Overcoming acquired resistance to cetuximab by dual targeting HER family receptors with antibody-based therapy.* **Mol Cancer.** 2014;13:242.
131. Utsunomiya H, Tilakaratne WM, Oshiro K, Maruyama S, Suzuki M, Ida-Yonemochi H, et al. *Extracellular matrix remodeling in oral submucous fibrosis: its stage-specific modes revealed by immunohistochemistry and in situ hybridization.* **J Oral Pathol Med.** 2005;34(8):498-507.
132. Ikarashi T, Ida-Yonemochi H, Ohshiro K, Cheng J, Saku T. *Intraepithelial expression of perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan reflects dysplastic changes of the oral mucosal epithelium.* **J Oral Pathol Med.** 2004;33(2):87-95.
133. Greening DW, Lee ST, Ji H, Simpson RJ, Rigopoulos A, Murone C, et al. *Molecular profiling of cetuximab and bevacizumab treatment of colorectal tumours reveals perturbations in metabolic and hypoxic response pathways.* **Oncotarget.** 2015;6(35):38166-80.
134. Wilkinson K, Velloso ER, Lopes LF, Lee C, Aster JC, Shipp MA, et al. *Cloning of the t(1;5)(q23;q33) in a myeloproliferative disorder associated with eosinophilia: involvement of PDGFRB and response to imatinib.* **Blood.** 2003;102(12):4187-90.
135. Lefevre L, Omeiri H, Drougat L, Hantel C, Giraud M, Val P, et al. *Combined transcriptome studies identify AFF3 as a mediator of the oncogenic effects of beta-catenin in adrenocortical carcinoma.* **Oncogenesis.** 2015;4:e161.
136. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution.* **Curr Opin Cell Biol.** 2010;22(5):697-706.
137. Nurmenniemi S, Koivula MK, Nyberg P, Tervahartiala T, Sorsa T, Mattila PS, et al. *Type I and III collagen degradation products in serum predict patient survival in head and neck squamous cell carcinoma.* **Oral Oncol.** 2012;48(2):136-40.
138. Hecht SS. *Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer.* **Nat Rev Cancer.** 2003;3(10):733-44.
139. Zheng Z, Fang JL, Lazarus P. *Glucuronidation: an important mechanism for detoxification of benzo[a]pyrene metabolites in aerodigestive tract tissues.* **Drug Metab Dispos.** 2002;30(4):397-403.
140. Lacko M, Roelofs HM, Te Morsche RH, Voogd AC, Ophuis MB, Peters WH, et al. *Genetic polymorphism in the conjugating enzyme UGT1A1 and the risk of head and neck cancer.* **Int J Cancer.** 2010;127(12):2815-21.
141. Daulat AM, Luu O, Sing A, Zhang L, Wrana JL, McNeill H, et al. *Mink1 regulates beta-catenin-independent Wnt signaling via Prickle phosphorylation.* **Mol Cell Biol.** 2012;32(1):173-85.
142. Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, Warne PH, Cowling V, Cook SJ, et al. *Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells.* **Mol Cell.** 2005;20(5):673-85.

143. Weinstein EJ, Bourner M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazarella R. *URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas*. **Biochim Biophys Acta**. 2003;1637(3):207-16.
144. Gozgit JM, Pentecost BT, Marconi SA, Otis CN, Wu C, Arcaro KF. *Use of an aggressive MCF-7 cell line variant, TMX2-28, to study cell invasion in breast cancer*. **Mol Cancer Res**. 2006;4(12):905-13.
145. Kiriya K, Hirohashi Y, Torigoe T, Kubo T, Tamura Y, Kanaseki T, et al. *Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells*. **Anticancer Res**. 2013;33(1):167-73.
146. Hartmann S, Seher A, Brands RC, Linz C, Lessner G, Bohm H, et al. *Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells*. **J Craniomaxillofac Surg**. 2014;42(7):1322-8.
147. Khelwatty SA, Essapen S, Seddon AM, Fan Z, Modjtahedi H. *Acquired resistance to anti-EGFR mAb ICR62 in cancer cells is accompanied by an increased EGFR expression, HER-2/HER-3 signalling and sensitivity to pan HER blockers*. **Br J Cancer**. 2015;113(7):1010-9.
148. Psyrris A, Lee JW, Pectasides E, Vassilakopoulou M, Kosmidis EK, Burtneess BA, et al. *Prognostic biomarkers in phase II trial of cetuximab-containing induction and chemoradiation in resectable HNSCC: Eastern cooperative oncology group E2303*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(11):3023-32.
149. Troiani T, Napolitano S, Vitagliano D, Morgillo F, Capasso A, Sforza V, et al. *Primary and acquired resistance of colorectal cancer cells to anti-EGFR antibodies converge on MEK/ERK pathway activation and can be overcome by combined MEK/EGFR inhibition*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(14):3775-86.
150. Deming DA, Cavalcante LL, Lubner SJ, Mulkerin DL, LoConte NK, Eickhoff JC, et al. *A phase I study of selumetinib (AZD6244/ARRY-142866), a MEK1/2 inhibitor, in combination with cetuximab in refractory solid tumors and KRAS mutant colorectal cancer*. **Invest New Drugs**. 2016;34(2):168-75.
151. Bozec A, Ebran N, Radosevic-Robin N, Sudaka A, Monteverde M, Toussan N, et al. *Combination of mTOR and EGFR targeting in an orthotopic xenograft model of head and neck cancer*. **Laryngoscope**. 2016;126(4):E156-63.
152. Niehr F, Weichert W, Stenzinger A, Budach V, Tinhofer I. *CCI-779 (Temsirolimus) exhibits increased anti-tumor activity in low EGFR expressing HNSCC cell lines and is effective in cells with acquired resistance to cisplatin or cetuximab*. **J Transl Med**. 2015;13:106.
153. Grunwald V, Keilholz U, Boehm A, Guntinas-Lichius O, Hennemann B, Schmoll HJ, et al. *TEMHEAD: a single-arm multicentre phase II study of temsirolimus in platin- and cetuximab refractory recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) of the German SCCHN Group (AIO)*. **Ann Oncol**. 2015;26(3):561-7.
154. Komiya Y, Habas R. *Wnt signal transduction pathways*. **Organogenesis**. 2008;4(2):68-75.
155. MacDonald BT, Tamai K, He X. *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. **Dev Cell**. 2009;17(1):9-26.

156. Shiah SG, Hsiao JR, Chang WM, Chen YW, Jin YT, Wong TY, et al. *Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b.* **Cancer Res.** 2014;74(24):7560-72.
157. Shiah SG, Shieh YS, Chang JY. *The Role of Wnt Signaling in Squamous Cell Carcinoma.* **J Dent Res.** 2016;95(2):129-34.
158. Rudy SF, Brenner JC, Harris JL, Liu J, Che J, Scott MV, et al. *In vivo Wnt pathway inhibition of human squamous cell carcinoma growth and metastasis in the chick chorioallantoic model.* **J Otolaryngol Head Neck Surg.** 2016;45:26.
159. Armstrong JG. *Cetuximab plus radiotherapy for head and neck cancer.* **N Engl J Med.** 2006;354(20):2187; author reply
160. Cooper JB, Cohen EE. *Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors in head and neck cancer.* **Head Neck.** 2009;31(8):1086-94.
161. Xue C, Tian Y, Zhang J, Zhao Y, Zhan J, Fang W, et al. *In vitro and in vivo efficacy of afatinib as a single agent or in combination with gemcitabine for the treatment of nasopharyngeal carcinoma.* **Drug Des Devel Ther.** 2016;10:1299-306.
162. Hirsh V. *Afatinib (BIBW 2992) development in non-small-cell lung cancer.* **Future Oncol.** 2011;7(7):817-25.
163. Schutze C, Dorfler A, Eicheler W, Zips D, Hering S, Solca F, et al. *Combination of EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibition by BIBW 2992 and BIBW 2669 with irradiation in FaDu human squamous cell carcinoma.* **Strahlenther Onkol.** 2007;183(5):256-64.
164. Hartmann S, Neckel N, Seher A, Mutzbauer G, Brands RC, Linz C, et al. *Erlotinib and gefitinib responsiveness in head and neck cancer cell lines—a comparing analysis with cetuximab.* **Clin Oral Investig.** 2016;20(4):759-69.
165. Young NR, Soneru C, Liu J, Grushko TA, Hardeman A, Olopade OI, et al. *Afatinib efficacy against squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines in vitro and in vivo.* **Target Oncol.** 2015;10(4):501-8.
166. Wheler JJ, Falchook GS, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Piha-Paul SA, et al. *Aberrations in the epidermal growth factor receptor gene in 958 patients with diverse advanced tumors: implications for therapy.* **Ann Oncol.** 2013;24(3):838-42.
167. Wu JY, Wu SG, Yang CH, Gow CH, Chang YL, Yu CJ, et al. *Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response.* **Clin Cancer Res.** 2008;14(15):4877-82.
168. Licitra L, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Hitt R, Erfan J, et al. *Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study.* **Ann Oncol.** 2011;22(5):1078-87.

169. Silva-Oliveira RJ, Silva VA, Martinho O, Cruvinel-Carlioni A, Melendez ME, Rosa MN, et al. *Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker.* **Cell Oncol (Dordr)**. 2016.
170. Coco S, Truini A, Alama A, Dal Bello MG, Vene R, Garuti A, et al. *Afatinib resistance in non-small cell lung cancer involves the PI3K/AKT and MAPK/ERK signalling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition.* **Target Oncol**. 2015;10(3):393-404.
171. Molife LR, Yan L, Vitfell-Rasmussen J, Zernhelt AM, Sullivan DM, Cassier PA, et al. *Phase 1 trial of the oral AKT inhibitor MK-2206 plus carboplatin/paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors.* **J Hematol Oncol**. 2014;7:1.
172. Saba NF, Hurwitz SJ, Magliocca K, Kim S, Owonikoko TK, Harvey D, et al. *Phase 1 and pharmacokinetic study of everolimus in combination with cetuximab and carboplatin for recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck.* **Cancer**. 2014;120(24):3940-51.
173. Massarelli E, Lin H, Ginsberg LE, Tran HT, Lee JJ, Canales JR, et al. *Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma.* **Ann Oncol**. 2015;26(7):1476-80.
174. Ayala G, Thompson T, Yang G, Frolov A, Li R, Scardino P, et al. *High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence.* **Clin Cancer Res**. 2004;10(19):6572-8.
175. Staal SP. *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma.* **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1987;84(14):5034-7.
176. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.* **Nature**. 2007;448(7152):439-44.
177. Nakashiro K, Tanaka H, Goda H, Iwamoto K, Tokuzen N, Hara S, et al. *Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma.* **Int J Oncol**. 2015;47(4):1273-81.
178. Knowles JA, Golden B, Yan L, Carroll WR, Helman EE, Rosenthal EL. *Disruption of the AKT pathway inhibits metastasis in an orthotopic model of head and neck squamous cell carcinoma.* **Laryngoscope**. 2011;121(11):2359-65.
179. Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. *Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer.* **Lancet Oncol**. 2008;9(3):288-96.
180. Freudsperger C, Horn D, Weissfuss S, Weichert W, Weber KJ, Saure D, et al. *Phosphorylation of AKT(Ser473) serves as an independent prognostic marker for radiosensitivity in advanced head and neck squamous cell carcinoma.* **Int J Cancer**. 2015;136(12):2775-85.
181. Rossle M, Weber CS, Zullig L, Graf N, Jochum W, Stockli SJ, et al. *EGFR expression and copy number changes in low T-stage oral squamous cell carcinomas.* **Histopathology**. 2013;63(2):271-8.

182. Roh J, Muelleman T, Tawfik O, Thomas SM. *Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review*. **Oral Oncol**. 2015;51(1):16-23.
183. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. *Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck*. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 1998;124(6):637-40.
184. Landi L, Cappuzzo F. *Irreversible EGFR-TKIs: dreaming perfection*. **Transl Lung Cancer Res**. 2013;2(1):40-9.
185. Chang JT, Lee YM, Huang RS. *The impact of the Cancer Genome Atlas on lung cancer*. **Transl Res**. 2015;166(6):568-85.
186. Zhang L, Ma J, Han Y, Liu J, Zhou W, Hong L, et al. *Targeted therapy in esophageal cancer*. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**. 2016;10(5):595-604.
187. Schramm A, De Gregorio N, Widschwendter P, Fink V, Huober J. *Targeted Therapies in HER2-Positive Breast Cancer - a Systematic Review*. **Breast Care (Basel)**. 2015;10(3):173-8.
188. Zhang J, Cao J, Li J, Zhang Y, Chen Z, Peng W, et al. *A phase I study of AST1306, a novel irreversible EGFR and HER2 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors*. **J Hematol Oncol**. 2014;7:22.
189. He M, Capelletti M, Nafa K, Yun CH, Arcila ME, Miller VA, et al. *EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma*. **Clin Cancer Res**. 2012;18(6):1790-7.
190. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. **Science**. 2004;304(5676):1497-500.
191. Yang JC, Wu YL, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, et al. *Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials*. **Lancet Oncol**. 2015;16(2):141-51.
192. Godin-Heymann N, Bryant I, Rivera MN, Ulkus L, Bell DW, Riese DJ, 2nd, et al. *Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation*. **Cancer Res**. 2007;67(15):7319-26.
193. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web*. **Nat Rev Cancer**. 2011;11(11):761-74.
194. Hsu HC, Thiam TK, Lu YJ, Yeh CY, Tsai WS, You JF, et al. *Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients*. **Oncotarget**. 2016.
195. Roberts PJ, Stinchcombe TE. *KRAS mutation: should we test for it, and does it matter?* **J Clin Oncol**. 2013;31(8):1112-21.
196. Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M, Curescu S, Sakalauskas R, Manikhas GM, et al. *Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled*

study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2011;29(31):4113-20.

197. Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, et al. *KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. Lung Cancer.* 2010;69(3):272-8.

198. Sunaga N, Shames DS, Girard L, Peyton M, Larsen JE, Imai H, et al. *Knockdown of oncogenic KRAS in non-small cell lung cancers suppresses tumor growth and sensitizes tumor cells to targeted therapy. Mol Cancer Ther.* 2011;10(2):336-46.

199. Gamba S, Camaj P, Heinemann V, Laubender RP, Wang Y, Zhao Y, et al. *Effect of KRAS exon 2 mutations on antitumor activity of afatinib and gefitinib. Anticancer Drugs.* 2015;26(4):371-8.

200. Riquelme E, Behrens C, Lin HY, Simon G, Papadimitrakopoulou V, Izzo J, et al. *Modulation of EZH2 Expression by MEK-ERK or PI3K-AKT Signaling in Lung Cancer Is Dictated by Different KRAS Oncogene Mutations. Cancer Res.* 2016;76(3):675-85.

ANEXOS

ANEXO A

Carta de ciência do comitê de ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.

**Comitê de Ética em Pesquisa
CEP**

Para: Rui Manuel Vieira Reis

De: Ednise Woyciechowski
Vice Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 06/11/2012

Projeto de pesquisa: **666/2012**

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o projeto de pesquisa intitulado “**Identificação de novos biomarcadores preditivos da resposta à terapias anti-EGFR em tumores sólidos**”, o qual foi cadastrado sob o número **666/2012**.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por utilizar kits de comercializados de cultura estabelecida e não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de aprovação do CEP.

Atenciosamente,

Ednise Woyciechowski
Vice Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

ANEXO B

Artigo publicado em Março de 2016, na revista *Recent Patents on Anti-Cancer Drug*.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2016, 11, 000-000

1

Anti-EGFR Therapy: Strategies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Renato J. Oliveira-Silva¹, Ana Carolina de Carvalho¹, Luciano de Souza Viana^{1,2},
André L. Carvalho^{1,*} and Rui M. Reis^{1,3,4,*}

¹Molecular Oncology Research Center, ²Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil; ³Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, Portugal; ⁴ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

Received: November 19, 2015; Accepted: March 6, 2016; Revised: March 6, 2016



Rui M. Reis

Abstract: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a tyrosine kinase receptor that activates downstream signaling pathways, including the Ras-MEK-Erk and PI3K-AKT pathways, leading to cell proliferation, resistance to apoptosis, angiogenesis and the ability to metastasize. EGFR overexpression is a significant finding in cancer, particularly in head and neck cancer, where it is also associated with a poor prognosis. In recent years, several molecules have been designed to inhibit EGFR activation. Among the many available anti-EGFR drugs, only cetuximab was approved for the treatment of head and neck cancers. However, no predictive biomarkers of cetuximab response are currently known. In the present review, we provide an updated assessment of EGFR biology and its clinical impact in head and neck cancers. A special emphasis is placed on novel patents of EGFR-inhibitors that are anticipated to diversify the anti-EGFR therapies available to treat head and neck cancers. In particular, we outline a new class of irreversible multi-target inhibitors (e.g. afatinib, icotinib, CUDC-101), which may significantly contribute to new head and neck cancer therapies.

Keywords: Anti-EGFR patents, EGFR, EGFR overexpression, head and neck squamous cell carcinoma, tyrosine kinase inhibitors, targeted therapies.

1. INTRODUCTION

Head and neck cancer is the sixth most common cancer worldwide with a global incidence between 400,000 and 600,000 new cases per year and a mortality rate of 300,000 deaths annually [1-3]. It comprises a spectrum of malignancies that, develop primarily within the oral cavity, pharynx, and larynx. Squamous cell carcinoma is the principal histologic subtype of this disease, accounting for more than 90% of all cases [4, 5]. The high incidence and mortality rate make these cancers a significant public health problem [6]. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients have a 50% five year survival rate, which is highly dependent on the stage at diagnosis [7]. Accurate assessment of clinical symptoms, physical examination and laboratory results are of paramount importance to guide diagnostic approaches, staging and choice of therapy [8].

The treatment plan depends upon patient and disease-related factors, such as the site of the primary tumor, the stage of the disease (early-stage vs. advanced-stage), feasibility of organ preservation, the ECOG performance status

(Eastern Cooperative Oncology Group), significant comorbidities and the goal of therapy [8]. Patients harboring early stage disease (stage I and II) are potentially curable with single modality treatments (either surgery or radiation). Advanced disease patients (stage III and IV) require a multidisciplinary and multimodality approach with a combination of surgery, radio- and chemotherapy [8]. Despite recent advances in radio- and chemotherapy, survival rates of HNSCC patients remain poor. Local recurrences are frequent and 20-30% of cases will develop metastatic disease [9].

Extensive surgeries involving the resection of the primary tumor and cervical lymph nodes usually cause functional and aesthetic consequences, having a great impact on a patient's quality of life [8]. The standard treatment for most patients is currently multimodal, and includes combined chemotherapy and radiotherapy. Moreover, the addition of induction chemotherapy (IC) remains an appropriate approach for advanced disease with a high risk of local or distant failure [8]. Platinum and taxane combinations are the backbone of several IC regimens for locally advanced head and neck cancers (LAHNSCC) and the TPF (docetaxel, cisplatin and fluorouracil) regimen is the most accepted induction regimen for LAHNSCC [10].

Tobacco and alcohol use are the most common risk factors for HNSCC and the human papillomavirus (HPV) has been recently established as a cause of oropharyngeal cancer [11, 12]. Tobacco use is the main risk factor for HNSCC

*Address correspondence to these author at the Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Villela, 1331, CEP 14784 400, Barretos, S. Paulo, Brazil; Tel/Fax: +551733216600 - Extension: 7090; E-mail: ruireis.hcb@gmail.com
Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Villela, 1331, CEP 14784 400, Barretos, S. Paulo, Brazil; Tel/Fax: +551733216600 - Extension: 7092; E-mail: carvalhoal@gmail.com

carcinogenesis, with smokers having a 5 to 25 fold risk compared to non-smokers [13], due to the genotoxic effects of carcinogenic substances in tobacco [14]. Alcohol consumption is relevant for HNSCC development for its capacity to synergistically enhance the carcinogenic effects of tobacco [15]. Moreover, the acetaldehyde metabolite forms DNA adducts that interfere with synthesis and repair [16].

HPV is found in 23-35% of all HNSCC biopsies [17] and in 45-90% of oropharyngeal cancers [17-20]. HPV-16 is the most prevalent subtype, occurring in 87-90% of HPV-positive oropharyngeal cancers [21-23]. A recent comprehensive integrative genomic analysis of HNSCC and HPV status was performed by mapping RNA-Seq reads of 279 patients and it was observed that 12% (36/279) were HPV(+). Of 33 oropharyngeal tumours, 64% (21/33) were positive for HPV. The HPV(+) subset of oropharyngeal HNSCCs, exhibited a loss of TRAF3 (TNF Receptor-Associated Factor 3), activating mutation of PIK3CA, and amplification of E2F1 (E2F Transcription Factor 1) involving NF- κ B, activation. In HPV(+) HNSCCs, the most prominent findings were subsets containing amplicons on 11q with CCND1, FADD, BIRC2 and YAP1 and mutually exclusive CASP8 and HRAS mutations. Importantly, these findings in HPV-associated cases may have the potential to be used as tools for treatment decisions [24].

Recently, molecular alterations underlying HNSCC tumorigenesis have been explored [24-29]. One of the pivotal molecules is the EGFR, which is overexpressed in more than 90% of HNSCCs [30, 31]. EGFR is upregulated not only in HNSCC but also in the vast majority of solid tumors, becoming, therefore, a major target for molecular therapies [32, 33].

Based on EGFR expression in HNSCC, cetuximab, a chimeric monoclonal antibody that binds with high affinity to the EGFR, has been used in the United States since 2006 as first-line treatment in combination with radiation therapy for LAHNSCC [34] or as a single agent for patients with metastatic disease and poor responses to platinum-based regimens [35]. In 2011, combinations of cetuximab with other agents were approved by the U.S. Food and Drug Administration for the first line of treatment of HNSCC. Cetuximab combination therapy with cisplatin or carboplatin and 5-fluorouracil was based on a multi-center clinical study involving 442 participants that, demonstrated an improvement in survival [36].

In the present review, we will perform an updated assessment of EGFR biology in HNSCC and its clinical impact, with a special emphasis on novel, multi-target EGFR-inhibitors, which may transform HNSCC therapy.

2. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)

The EGFR was discovered in the 1970s. Cohen and colleagues isolated a protein that caused precocious tooth eruption in neonatal mice, now known as EGF (epidermal growth factor) [37]. A few years later, the same research group identified a high level of radio-labeled EGF bound to the cytoplasmic membrane of A431 squamous carcinoma cell lines. This was the first evidence of a membrane receptor with affinity to EGF, the EGFR [38].

EGFR belongs to the ErbB receptor family (EGFR, ErbB2/Neu/Her2, ErbB3/Her3 and ErbB4/Her4), and the protein is composed of 1210 amino acids with four extracellular domains (ED), a transmembrane domain (TD) and an intracellular tyrosine kinase domain (TKD) (Fig. 1). Its carboxyl-terminal tail contains several phosphorylation sites: one serine residue (Ser-1142), one threonine residue (Thr-654) and seven tyrosine residues (Try-845, 992, 1045, 1068, 1086, 1148, 1173) [39, 40]. EGFR can be activated by several specific ligands: (1) Amphiregulin, (2) Betacellulin, (3) Epregrulin, (4) Neuregulin, (5) Heparin-binding EGF, (6) Transforming growth factor alpha (TGF- α) and (7) EGF (Fig. 1). Under normal physiological conditions, all four ErbB receptors can form 10 possible dimer combinations including 4 homodimers and 6 heterodimers. Each combination has specific affinity for signaling in effective intracellular pathways [40, 41] (Fig. 1).

EGFR ligands cause a conformational change, resulting in domain II interaction and receptor dimerization (Fig. 1) [39]. In addition, EGFR phosphorylation sites can activate downstream protein kinases such as the Src kinase family, protein kinase C and protein kinase A. EGFR itself is also able to phosphorylate other protein residues and target downstream signaling such as the MAPK, STAT and PI3K/AKT pathways, which control cell survival, proliferation, migration, differentiation, and adhesion [42-45].

2.1. EGFR Deregulation in Tumors

Due to its significance in the regulation of multiple cellular mechanisms, EGFR homeostasis is key to normal function. Inasmuch, EGFR activity and regulation is tightly controlled by a plethora of mechanisms including copy number variation, single nucleotide polymorphism (SNP), alternative splicing, phosphorylation, ligand availability, dimerization partner availability, trafficking and degradation [46]. In the pathogenesis of cancer, EGF/EGFR is deregulated at several levels, namely: autocrine/paracrine factors; gene amplification; gene mutations, and protein nuclear translocation. All of these alterations lead to overexpression or constitutive activation of related signaling pathways (Fig. 1).

2.1.1. Autocrine/Paracrine Factors

EGFR-mediated neoplastic transformation may be effected by autocrine/paracrine mechanisms of overexpression of both EGFR and its ligands, providing multiple advantages to tumors through the promotion of cell proliferation, survival, angiogenesis, invasion and metastasis. Most studies that have analyzed EGFR protein in HNSCC patients, used immunohistochemistry (IHC) methodologies on paraffin-embedded tumor samples, and described EGFR overexpression in 43 to 100% of cases (Table 1). These discrepancies between EGFR overexpression rates might be the result of the type of antibodies or fixative used, differences in IHC technique, and storage time of samples. Nevertheless, the biological role of EGFR overexpression in HNSCC is unquestionably significant. Interestingly, a recent meta-analysis evaluated EGFR expression as a prognostic factor in HNSCC [47]. This meta-analysis included 37 studies and found that overall, EGFR overexpression was associated with reduced overall survival (OS) hazard ratio (HR) of 1.694, 95 % confidence interval (CI): 1.432-2.004 [47].

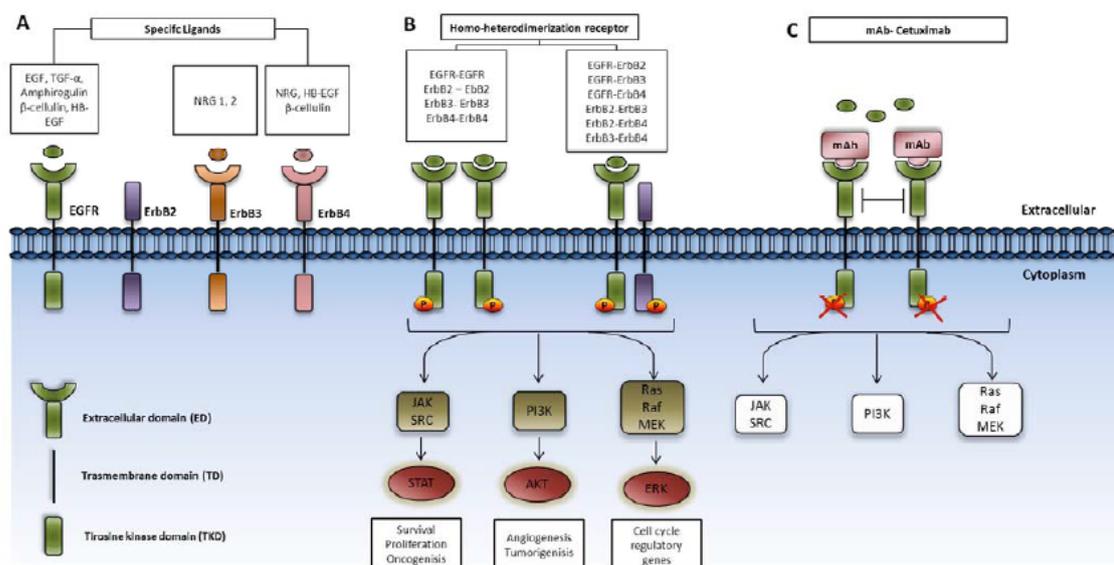


Fig. (1). A- ErbB family receptor: EGFR/HER1, ErbB2/Neu/Her2, ErbB3/Her3 and ErbB4/Her4. All ErbB family receptors, except ErbB2 bind to specific ligands allowing the improvement of receptor dimerization. B- Multiple combinations of homodimers receptor (4) and heterodimers receptor (6). Receptor phosphorylation promotes the activation of intracellular pathways that control proliferation, angiogenesis and metastasis. C- Cetuximab action, the only chemotherapeutic agent against EGFR, approved for use in HNSCC patients. The monoclonal antibody competes with the ligand and blocks dimerization and phosphorylation receptor.

A majority of carcinomas express EGF-like growth factors that contribute to increased signaling mediated by EGFR activation [45, 48]. A decade ago, the co-expression of EGFR and its ligands in the tumor microenvironment was hypothesized to have an important role in carcinogenesis and progression in patients with HNSCC [49]. Recently, The Cancer Genome Atlas (TCGA) offered a comprehensive and extensive landscape of somatic genomic alterations in HNSCC patients, including mRNA expression levels of the ErbB family ligands (supplementary Table 1). In total, HRG, NRG4 and NRG1 mRNA levels, were upregulated in 15, 7 and 6% of cases, respectively, while EGF, AREG and EREG mRNA levels were upregulated in 4% of cases [24].

The *TNF* gene family, although it typically has low mRNA expression levels (2%) [24], is implicated with autocrine neoplastic transformation and increased proliferation in HNSCC cell lines [50]. In the clinical setting, patients with upregulated TNF mRNA expression had an overall survival estimate of 12.98 months compared to patients with normal TNF expression (21.85 months) (supplementary Table 1). Amphiregulin (AREG) overexpression is associated with an increased risk of developing breast cancer [51], lung, colorectal, ovary and prostate carcinomas [52]. AREG overexpression was detected in 4% (12/279) of HNSCC patients and associated with a mean overall survival of 28.29 months compared to 21.75 months for patients with normal expression (supplementary Table 1). Heparin binding-EGF (HB-EGF) is an EGF mainly produced by monocytes and macrophages. Some studies have associated HB-EGF expression with the development of malignant phenotypes including a metastatic mechanism that displays aggressive tumor behav-

ior [53, 54]. HB-EGF is upregulated in human breast carcinomas, ovarian, gastric, melanoma and glioblastoma tumor cell lines [55-57]. In HNSCC, HB-EGF expression is altered in 4% (11/279) of cases (supplementary Table 1). Heregulin (HRG) is the most expressed ligand in HNSCC patients and present in 15% (46/279) of cases (supplementary Table 1). Interestingly, patients with HRG mRNA upregulation have a higher mean overall survival (42.32 months) compared to patients with normal expression levels (21.85 months) (supplementary Table 1).

2.1.2. EGFR Amplification

Gene amplification of the *EGFR* has been observed in distinct tumors, including gliomas, colorectal, esophageal, breast and pancreatic cancers [58-64]. Several studies have detected increased *EGFR* copy number in HNSCC patients ranging from 7.8 to 58% (Table 1). The most comprehensive study was performed by the TCGA and reported a frequency of 11% of *EGFR* gene amplification, which induced EGFR overexpression, therefore demonstrating its pathogenic effect [24]. In addition, the authors showed *EGFR* gene amplification was associated with worse patient outcomes, with overall survival of 17.15 months in *EGFR* amplified cases versus 26.41 months in patients without gene amplification [24].

2.1.3. EGFR Mutation

The majority of the *EGFR* somatic mutations identified in tumors are concentrated in the extracellular and intracellular tyrosine kinase domains, clustered in specific areas, which assumes the role of mutational hot spots. Initial studies in lung cancer showed the importance of mutations involving exons 18, 19, 20 and 21, which encode a portion of

Table 1. Review of *EGFR* Molecular Alterations in HNSCC.

Author	Date	Expression		Amplification		TK Domain Mutations		Other Mutations (<i>EGFRvIII</i>)	
		% (N)	Methods	% (N)	Methods	% (N)	Methods	% (N)	Methods
Chung <i>et al.</i>	2006	-	-	58% (49/86)	FISH	-	-		
Sok J.C. <i>et al.</i>	2006	-	-	-	-	-	-	42% (14/33)/ 21% (7/33)	IHC/RT-PCR
Payne, C. <i>et al.</i> 2006	2006	-	-	-	-	8% (2/24)	HRMAA	-	-
Sheikh Ali. <i>et al.</i>	2008	32% (21/65)	IHC	-	-	0% (0/91)	Sanger	-	-
Al-Swiahb <i>et al.</i>	2010	83.63% (195/220)	IHC	-	-	-	-	-	-
Hong A. <i>et al.</i>	2010	87%(216/249)	IHC	-	-	-	-	-	-
Numico G. <i>et al.</i>	2010	35% (43/122)	IHC	-	-	-	-	-	-
Young R.J. <i>et al.</i>	2011	87% (81/93)	IHC	20% (41/204)	FISH	-	-	-	-
Nakata Y. <i>et al.</i>	2011	82% (73/89)	IHC	36% (32/89)	FISH	-	-	-	-
Pectasides E. <i>et al.</i>	2011	50% (32/64)	IHC	17% (11/64)	FISH	-	-	-	-
Chau. N.G. <i>et al.</i>	2011							42% (22/53)	RT-PCR
Huang S.F. <i>et al.</i>	2012	46.88% (75/160)	IHC	-	-	-	-	-	-
Sweeny. L. <i>et al.</i>	2012	56% (28/50)	IHC	-	-	-	-	-	-
Smilek. P. <i>et al.</i>	2012							20.7% (6/29)	RT-PCR
Maiti G. P. <i>et al.</i>	2013	84% (37/44)	IHC	26.4% (47/178)	DPCR	-	-	-	-
Rossle M. <i>et al.</i>	2013	100% (119)	IHC	7.8% (9/115)	FISH	-	-	-	-
Chang J. Y. <i>et al.</i>	2013	63.9% (69/108)	IHC			-	-	-	-
Gröbe A. <i>et al.</i>	2014	95% (196/206)	IHC	-	-	-	-	-	-
Nagalakshmi K. <i>et al.</i>	2014	-	-	-	-	81.39% (104/129)	SSCP/ Sanger	-	
Melchers. L.J. <i>et al.</i>	2014	-	-	-	-	-	-	8% (42/531)/ 0% (0/97)	IHC/RT-PCR
TCGA	2015	47% (17/279)	RNA Seq.	11% (31/279)	DNA Seq.	4.65% (13/279)	DNA seq.	0.35% (1/279)	
Khattri. A. <i>et al.</i>	2015	-	-	-	-	-	-	0.38% (2/540)	RT-PCR

IHC: Immunohistochemistry; FISH: Fluorescence in situ hybridization; DPCR: differential polymerase chain reaction; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; HRMAA: High-resolution melting amplicon analysis; SSCP: single-strand chain polymorphisms; RNA Seq: RNA Sequencing.

the *EGFR* tyrosine kinases domains [65]. These mutations predict patient responses to anti-*EGFR* drugs, such as erlotinib and gefitinib, and are assessed on a routine basis [65].

In HNSCC, the data available is more limited. Despite a disparity of published research, a low frequency of *EGFR* somatic mutations has also been reported in these tumors (Table 1). Nagalakshmi *et al.*, using SSCP followed by sequencing, observed a mutation frequency of 81.4% in cases. In contrast, other studies and more recently, the TCGA consortium, showed that *EGFR* mutations are rare events, present in less than 10% of cases (Table 1, Supplementary Table 2) [24, 66, 67]. The lack of *EGFR* somatic mutations in

available HNSCC cell lines reinforce the absence of this event in HNSCC tumorigenic process [68].

One mutation in HNSCC that has gained particular attention is the *EGFRvIII*, which is located in the extracellular domain [69]. The *EGFRvIII* is described by an in-frame deletion of 267 amino acids in the extracellular domain, resulting in the loss of exons 2 to 7. The instability in the extracellular domain of *EGFRvIII* results in significant functional changes in the *EGFR* and acquires constitutive tyrosine kinase activity [70]. This mutation was first detected in glioblastomas, and later studies reported its presence and importance in HNSCC (Table 1). The first studies used immunohistochemistry and reverse transcription-PCR, and

Table 2. Anti-EGFR Agents and Multi-Target Action. Recent Clinical Trials for HNSCC

Anti-EGFR Agent	Manufacturer	Target	Patent Number	Phase	Clinical Trial Number
<i>Monoclonal Antibodies</i>					
Cetuximab	Bristol-Myers Squibb	EGFR	US20040170632 A1	Approval	n.a
Panitumumab	Amgen Oncology	EGFR	WO2013181572 A2	Approval	n.a
Nimotuzumab	CIMYM Bioscience	EGFR	--	II and III	NCT01425736, NCT00910117, NCT00702481
Zalutumumab	Genmab	EGFR	--	III	NCT00496652
MEHD7945A	Roche	EGFR, HER3	US20130259867 A1	I and II	NCT01577173
RO5083945	Roche	EGFR	--	I	NCT01046266
Sym004	Merck KGaA	EGFR	US7887805 B2	II	NCT01417936
<i>Reversible Tyrosine Kinase Inhibitors</i>					
Erlotinib	Osi Pharms Inc.	EGFR	RE41065	III	NCT00442455
Lapatinib	GlaxoSmithKline Inc.	EGFR, HER2 and HER4	US8513262 B2	II, II,II	NCI200901492, NCT01711658, NCT00424255
<i>Irreversible Tyrosine Kinase Inhibitors</i>					
Afatinib	Boehringer Ingelheim, Inc.	EGFR, EGFR ^{L858R, E746_A770, L858R/T790M} and HER2	WO2013052157A1	II, II, III	NCT01538381, NCT01721525, NCT01345682
AST-1306	Allist Pharmaceuticals Inc.	EFGR, EFGR ^{T790M/L858R} HER2 and HER4	US 20080300248 A1	II	ChiCTR-ONC-10000893
AZD9291	AstraZeneca Inc.	EGFR ^{WT, L858R/T790M}	WO 2013014448	n.a	n.a
CNX-2006	Clovis Oncology, Inc.	EGFR ^{L858R, L858R/T790M}	WO2013014448	n.a	n.a
CO-1686	Clovis Oncology, Inc.	EGFR ^{WT, L858R/T790M}	-		n.a
CUDC-101	Curis, Inc.	EGFR, HER 2 and HDAC	US7547781 B2	I	NCT01384799
Dacomitinib	Pfizer Inc.	EGFR, HER2 and HER4	CN 103288758 A	II	NCT01737008
Icotinib	Zhejiang Beta Pharma Inc.	EGFR, EGFR ^{L858R, L861Q, T790M}	US20110182882 A1	II	NCT02328261
Pelitinib	Wyeth Inc.	EGFR, HER2, Src, MEK/ERK, Raf, c-Met, CDK4	CN 103275002 A	I	NCT00098501
<i>Other Inhibition Approaches</i>					
EGFR Antisense		EGFR	-		-

n.a: not available.

detected EGFRvIII in approximately 40% of cases. *In vitro* studies were also performed, suggesting a biological role in HNSCC tumorigenesis and (cetuximab) therapy response [71]. The presence of EGFRvIII in HNSCC was also reported by other authors in frequencies varying from 8-42% (Table 1). However, more recent studies (including the TCGA consortium) performed using more accurate methodologies do not confirm these findings and report an absence or very low frequency of EGFRvIII in HNSCC (Table 1) [72-74].

2.1.4. Protein Nuclear Translocation

The first discovery of nuclear translocation was observed in hepatocyte regeneration studies in the last decade [75]. Additionally, EGFR internalization and nuclear translocation has been demonstrated in different healthy tissue types such as the uterus of pregnant mice and mouse embryos [76]. The classic EGFR translocation mechanism occurs in proteins containing nuclear localization sequences (NLS) that interact with importin α/β protein, which mediates interactions with

the nuclear pore complex (NPC) [77]. Subsequently, EGFR nuclear localization is correlated with increased cellular proliferation, supporting the role of EGFR as a transcription factor of cyclin D1 genes [78] that mediate synthesis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which is a DNA polymerase delta cofactor [79]. Over the last decade, several studies have suggested that, nuclear expression of EGFR may be an important molecular determinant of resistance to cetuximab therapy [80]. Specifically, EGFR nuclear translocation was evaluated in a cetuximab-resistant cell line that demonstrated increased nuclear localization of EGFR, mediated by the Yes and Lyn proteins which belong to Src family kinase family [81]. Furthermore, a non-invasive methodology to monitor the response to EGFR-inhibitor treatment has been tested in mice with HNSCC xenografts using [64] Cu-cetuximab-F(ab')₂, an EGFR-directed PET tracer [82] or (111) In-cetuximab-F(ab')₂ [83]. An experimental approach observed that EGFR nuclear translocation is associated with DNA-PKcs in DNA repair after exposure to cisplatin or ionizing radiation (IR), and is required for the repair of DNA damage [84]. The role of EGFR traffic has been associated with HNSCC resistance to multimodal therapy. The use of radiolabeled EGFR-inhibitors may be an efficient tool to monitor clinical response [85].

3. EGFR INHIBITORS

Due to the central role of EGFR in several tumors, the scientific community and pharmaceutical companies designed agents that could specifically inhibit EGFR. Two major strategies were developed: monoclonal antibodies (mAbs) and small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs).

3.1. Monoclonal Antibodies

Cetuximab (Erbix[®], Bristol-Myers Squibb; New York, NY) is a chimeric human-murine monoclonal antibody that binds competitively to EGFR. Cetuximab is 152 kDa, made up of four polypeptide chains: two heavy (lambda) chains (449 amino acids) and two light (kappa) chains (214 amino acids). Both chains contain one and two consensus sequences for N-linked glycosylation [86]. Cetuximab prevents stimulation by EGF and TNF- α endogenous ligands, disrupting intracellular signaling [87]. Blocking this receptor reduces proliferation, metastasis, angiogenesis and increases apoptosis levels [88]. In February 12, 2004, the Food and Drug Administration (FDA) approved cetuximab in combination with irinotecan, for the treatment of metastatic colorectal carcinoma in patients refractory to irinotecan-based chemotherapy [89]. In 2006, cetuximab was approved by the FDA [90] for the treatment of LAHNSCC and is so far the only anti-EGFR agent for its treatment in combination with radiation and chemotherapy, or as a monotherapy for recurrent, metastatic HNSCC that is unresponsive to platinum-based chemotherapy [36].

In the Phase III EXTREME trial, patients with recurrent or metastatic HNSCC were treated with a chemo/cetuximab combination had prolonged overall survival rates compared with patients treated with chemotherapy alone (median 10.1 versus 7.4 months, HR for death 0.80, 95% CI 0.64 to 0.99) [91]. However, in Eastern Cooperative Oncology Group

Study phase III, patients with metastatic or recurrent HNSCC were randomized to cisplatin plus placebo or cisplatin plus cetuximab. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were not significantly improved [92].

Panitumumab (Vectibix[®], Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) is anti-EGFR monoclonal antibody that has been evaluated as an adjuvant therapy to traditional chemotherapy (cisplatin and 5-fluorouracil) in HNSCC patients. However, a Phase III study (SPECTRUM trial) did not show and improvement in OS in patients with recurrent or metastatic HNSCC, but did show an improvement in PFS and had an acceptable toxicity profile [93]. Another study demonstrated that among patients with a positive HPV status, as assessed by p16 immunohistochemistry, showed increased PFS after treatment with cisplatin and fluorouracil plus panitumumab. Therefore, the authors suggested that p16 status might be important considerations in future trials with HNSCC patients [93].

Currently, clinical trials are using the combination of panitumumab in combination with other chemotherapeutic agents. At present, the benefit of combined panitumumab and paclitaxel therapy as a first-line treatment is being conducted in HNSCC patients (NCT01264328).

Nimotuzumab (TheraCIM, CIMYM Bioscience, Ontario, Canada) is another type of humanized chimeric monoclonal antibody. It binds to different epitopes in domain III of the extracellular region of EGFR. Several Phase I, II and III trials have been conducted in patients with HNSCC (NCT01425736, NCT00910117 and NCT00702481). A recent phase II pharmacodynamic trial of nimotuzumab was conducted in 10 unresectable HNSCC patients and demonstrated positive results, and also there was no evidence of skin rashes during 8 weeks of treatment [94]. An advanced approach is being carried to evaluate the association of nimotuzumab in combination with DCF (docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil) in recurrent or metastatic HNSCC (NCT01425736) [95]. An ongoing Phase II trial (NCT00702481) intends to define the response and toxicities associated with the addition of nimotuzumab to chemoradiation based on cisplatin for LAHNSCC. Additionally, Nimotuzumab plus radiotherapy combination therapy was conducted in 106 advanced HNSCC patients, and showed a significant survival improvement for nimotuzumab treated patients [96].

Zalutumumab (Genmab; Copenhagen, Denmark) is a anti-EGFR mAb entirely humanized with high-affinity to EGFR. Twenty eight patients with metastatic/recurrent HNSCC were treated with zalutumumab and showed a response rate of only 7.1% and the most frequently adverse effects (AEs) reported in Phase I/II studies were infusion-related reactions, rash/acne, and dyspnea [97]. Furthermore, 286 HNSCC patients resistant to platinum-based chemotherapy showed a significant improvement in PFS ($p = 0.0012$) when treated with zalutumumab, and a trend in improved OS (6.7 months vs. 5.2 months in zalutumumab vs. control groups, respectively; HR, 0.77; 95% CI, 0.57-1.05; $P = 0.0648$) [98]. Zalutumumab has also failed to show increased loco-regional control and 3-year disease specific or overall survival in another randomized phase III study (NCT00496652). This study was conducted by the Danish Head and Neck Cancer

Consortium (DAHANCA) and aimed to evaluate if concurrent treatment with zalutumumab during RT improved outcomes in patients with HNSCC.

MEHD7945A (Roche, Genentech, South San Francisco, CA), is a mAb against EGFR and HER3 that inhibits the binding of specific ligands dependent on EGFR- and HER3-mediated downstream signaling [99]. This monoclonal antibody has modulated radiation responses in lung and head and HNSCC. Preclinical studies have demonstrated that MEHD7945A in combination with radiation is more cytotoxic in comparison to individual anti-EGFR or anti-HER3 antibodies using xenograft models. The dual EGFR/HER3 targeting action of MEHD7945A merits further investigation and clinical trial evaluation [100].

RO5083945 (Roche, Genentech, South San Francisco, CA) is a glyco-engineered anti-EGFR IgG1 mAb with a high affinity for all FcγRIIIa variants. An antibody-dependent cellular cytotoxicity assay (ADCC) showed increased activity of RO5083945 compared to cetuximab and panitumumab. Preclinical approaches provided steps for the clinical trial recruitment. The pharmacodynamics investigation has been conducted in patients with *KRAS* mutated tumors in an open label multicenter in patients with operable HNSCC (Data not published; NCT01046266).

Sym004 (MerckKGaA) is a novel combination between 992 and 1024 antibodies, directed against different non-overlapping epitopes in the extracellular domain of EGFR, with a superior anticancer efficacy compared with existing mAbs. Additionally, the antibody mixture showed a potent inhibition of cell growth, efficient inhibition of ligand binding and also the internalization and degradation of EGFR [101]. More recently, the efficacy and tolerability of Sym004, was investigated in recurrent and/or metastatic HNSCC patients (NCT01417936). The results showed moderate anti-tumor activity of Sym004 in patients (reduced disease progression at 6 months in 12% of patients). In addition, the safety profile of the Sym004 was comparable to other anti-EGFR mAbs [102]. For this reason, Sym004 represents a promise in treatment of HNSCC patients, mainly those that are cetuximab-refractory.

3.2. Tyrosine Kinase Inhibitors -TKIs

TKIs are small molecules that can bind directly into the adenosine triphosphate (ATP) of the tyrosine kinase domain (TKD), thus inhibiting the intracellular signaling pathways [103]. Currently, there are a variety of multi-targeted small molecule tyrosine kinase inhibitors under investigation in Phase II and III trials in different HNSCC therapeutic settings with the potential to significantly modify the approach to anti-EGFR therapy for HNSCC.

The first TKI approved by the FDA was gefitinib (Iressa®, AstraZeneca, Inc.) for use in non-small-cell lung cancer (NSCLC) [104]. A Phase II study showed a tolerable cytotoxic action rate and a response to neoadjuvant treatment in 18% of 22 HNSCC patients [105]. Furthermore, the response rate (RR) was 10.6%, median OS was 8.1 months, and 1-year OS rate was 29.2% in HNSCC patients ($n = 52$) with metastatic or recurrent disease and tolerable levels of AEs were reported [106].

Erlotinib (Genentech; South San Francisco, CA), also known as Tarceva®, is a TKI FDA-approved as a first-line treatment for NSCLC for patients with exon 19 deletions or exon 21 (L858R) EGFR mutations [107]. A Phase II study conducted recently with 21 HNSCC patients, showed an increase of 63% in overall survival and few adverse events, after treatment with erlotinib, cisplatin and radiotherapy [108]. In recent years, these clinical studies have supported use of erlotinib with other chemotherapeutic agents by displaying an improvement in overall survival and acceptable levels of toxicity [109-111]. The effect of erlotinib monotherapy in combination with radiotherapy has been proposed as a Phase I/II trial (NCT00442455). So far, there is no published data on cytotoxicity and clinical effects of this combination. Everolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTOR), was combined with erlotinib in a clinical trial of patients with metastatic platinum-resistant HNSCC. This approach was based on the frequent activation of the mTOR pathway in HNSCC. Unfortunately, the trial showed little benefit, with a modest influence on immunosuppression and tumor growth [112]. Currently, a Phase II clinical trial is being conducted to evaluate the effect of docetaxel and cisplatin combination with or without erlotinib, and is currently recruiting participants (NCT01064479).

Lapatinib (GlaxoSmithKline Inc.) also known as Tykerb® is a reversible TKI with high affinity for the EGFR and HER2 receptor. Recently, this chemotherapy received FDA approval in combination with letrozole for patients with estrogen receptor and HER2, and in combination with capecitabine (Xeloda®) for patients with advanced breast cancer [113]. Few studies have evaluated lapatinib alone or in combination, which may be explained by the low rate of HER2 receptor expression in HNSCC tumors [114]. However, there is evidence that the use of lapatinib prolongs tumor stabilization of salivary glands tumors at approximately 6 months (36% - 62 patients) [115] and that combination with chemoradiotherapy increased the 6 month complete response rate post-chemoradiotherapy [116]. Currently, there is one Phase II trial (NCT00901492) using the combination of lapatinib with capecitabine. Study objective include the evaluation of OS, PFS response rate, toxicity and quality of life. The THY-HARD (NCT01711658) Phase II trial is recruiting HNSCC patients and evaluating the additive effects of radiotherapy plus cisplatin with or without lapatinib. Although lapatinib was initially considered a promising drug to treat HNSCC, a study testing adjuvant lapatinib in high-risk HNSCC after surgery was terminated early by the sponsor when outcomes between the placebo and lapatinib arms were not observed to be different (data not published; NCT00424255).

4. RECENT PATENTS (NEW GENERATION OF TKIs)

A variety of TKIs have been developed in recent years, and many of them tested in pre-clinical studies that show promising results against various tumor types. However, use is not approved for clinical use yet. Our review draws attention to promising chemotherapeutic agents in the treatment of HNSCC.

CUDC-101 (Curis, Inc.) 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-N-hydroxyheptanamide is a recently discovered reversible TKI that has multiple molecu-

lar targets (EGFR, HER2 and HDAC). A preclinical trial demonstrated increased anti-proliferative activity of CUDC-101 in HNSCC cell lines, when compared to exposure with erlotinib, lapatinib or vorinostat combination [117]. Recently, a Phase I trial, was conducted in twenty-five patients with advanced solid tumors who received incremental doses of CUDC-101. Preliminary evidence of antitumor activity was demonstrated with good tolerance levels [118]. Additionally, a Phase I trial was conducted in HNSCC to investigate the safety and pharmacokinetics of CUDC-101 in combination with cisplatin and radiation (data not published) (NCT01384799).

Icotinib (Zhejiang Beta Pharma Inc.) [1,4,7,10] tetraoxacyclododecino[2,3-g]quinazolin-4-amine, N-(3-ethynylphenyl)-7,8,10,11,13,14-hexahydro targets wild type and mutated EGFR variants (L858R, L861Q, T790M). The *in vitro* approach showed an increased anti-proliferative effect in A431 cell lines, while in *in vivo* studies, an antitumor effect was observed in nude mice of human tumor-derived xenografts [119]. Icotinib clinical trials, conducted in patients with advanced NSCLC, showed positive clinical antitumor activities and acceptable toxicity in monotherapy or in combination [120, 121]. Although there are several clinical trials in other solid tumors such as NSCLC, esophageal and pancreatic cancers, there is only one Phase II clinical trial that is active but not recruiting patients with advanced nasopharyngeal carcinoma to evaluate the icotinib efficacy as a monotherapy (NCT02328261).

Irreversible TKIs covalently bind to a phosphorylation-specific site in the intramembrane portion of their target, blocking the phosphorylation and subsequent activation of intracellular pathways. This class of molecules is known as the second-generation irreversible tyrosine kinase inhibitor and some irreversible TKIs are in advanced stages of clinical and preclinical testing approaches.

Afatinib (Gilotrif®, Boehringer Ingelheim, Inc.) (E)-N-[4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-yl]oxyquinazolin-6-yl]-4-(dimethylamino)but-2-enamide [122] (Fig. 2A) is an irreversible HER family inhibitor that targets EGFR, HER-2, and HER-4. The FDA approved afatinib as a first-line treatment of NSCLC patients with exon 19 deletions or exon 21 (L858R) EGFR mutations [123]. After promising results in NSCLC patients, a Phase III clinical trial (LUX-Head&Neck) is being conducted in HNSCC patients to compare the efficacy and safety of afatinib as an adjuvant therapy for patients who have received definitive, concurrent cisplatin-based chemoradiotherapy. A recent phase II multicenter trial (NCT01538381), evaluated the intervention of the pre-operative activity of afatinib vs. nontreatment in HNSCC. Preliminary results demonstrated a tumor volume reduction assessed by FDG-PET (18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography). The association of afatinib and other chemotherapeutic agents has been evaluated in a clinical trial I/II (NCT01721525) investigating a new chemotherapy regimen based on two oral drugs and two intravenous drugs (Afatinib, Ribavirin and Carboplatin/Paclitaxel). The efficacy and safety of afatinib was recently demonstrated in the LUX-Head&Neck 1 trial. This is a Phase III, randomized, open-label trial (NCT01345682) that evaluated afatinib efficacy

and safety vs. methotrexate in 483 patients with recurrent or metastatic HNSCC after platinum-based therapy. Afatinib showed a significant increase in PFS ($p = 0.030$). Moreover it had a tolerable side effect profile [124].

AST1306 (Alist Pharmaceuticals Inc.), N-[4-[3-chloro-4-[(3-fluorophenyl)methoxy]anilino]quinazolin-6-yl]prop-2-enamide (Fig. 2B), also known as Allitinib®, is a potent anti-EGFR with irreversible action. In addition, it has an affinity for other EGFR family member proteins (HER2 and HER4) and exhibits significant antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo* [125]. A recent clinical trial conducted in patients with solid tumors showed a preliminary anti-tumor effect and stable disease for ≥ 6 months in 7 patients (ChiCTR-ONC-10000893). Despite these promising results, AST1306 has not been tested in head and neck cancer patients.

PF-00299804 (Dacomitinib®, Pfizer Inc.) (E)-N-(4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yl)-4-(piperidin-1-yl)but-2-enamide (Fig. 2C) is an irreversible pan-Her inhibitor with cytotoxicity activity in tumor xenograft models that express HER family members, and efficient inhibition in double EGFR (L858R/T790M) mutation [126]. Recently, a phase II trial showed positive results in metastatic HNSCC, in which 57% of patients (36/69) maintained stable disease and treatment had acceptable toxicity levels (NCT01737008) [127].

EKB-569 (Wyeth Inc.), (E)-N-(4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-3-cyano-7-ethoxyquinolin-6-yl)-4-(dimethylamino)but-2-enamide (Fig. 2D), also known as Pelitinib®, is an irreversible EGFR inhibitor that has shown potential antineoplastic effects in solid tumors [128]. Recently, a Phase I trial was conducted to determine the dosing for acceptable toxicity levels and induced therapy responses of EKB-559 [129]. Pre-clinical studies, using squamous cell carcinoma suggest that EKB-569 increases sensitivity to radiotherapy [130]. At present, no clinical trial has been conducted in HNSCC patients.

CNX-2006 (Clovis Oncology, Inc.) N-[3-[[2-[4-[[1-(2-fluoroethyl)azetidin-3-yl]amino]-2-methoxyanilino]-5-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-yl]amino]phenyl]prop-2-enamide (Fig. 2E) is an irreversible EGFR inhibitor that inhibits activating mutations of EGFR with high affinity as well as cells harboring the T790M mutation [131]. Although, in initial stages few studies have been conducted with CNX-2006 in HNSCC models, we believe that clinical trials will soon follow due to its EGFR inhibitory potential.

AZD9291, (AstraZeneca, Inc.) N-[2-[2-(dimethylamino)ethyl-methylamino]-4-methoxy-5-[[4-(1-methylindol-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl]prop-2-enamide is a potent irreversible mutant-selective EGFR inhibitor also known as Osimertinib (Fig. 2F). Initially clinical trials with this inhibitor demonstrated a clinical benefit in lung cancer patients with a L858R/T790M EGFR mutation [132]. In November 2015, AZD9291 (Tagrisso™) was approved by the FDA for the treatment of patients with metastatic EGFR T790M mutation-positive NSCLC that was resistant to first-generation EGFR TKI therapy [133]. However, our search for this review did not any clinical and preclinical approaches in head and neck cancer. Due to its potent EGFR wild-type inhibi-

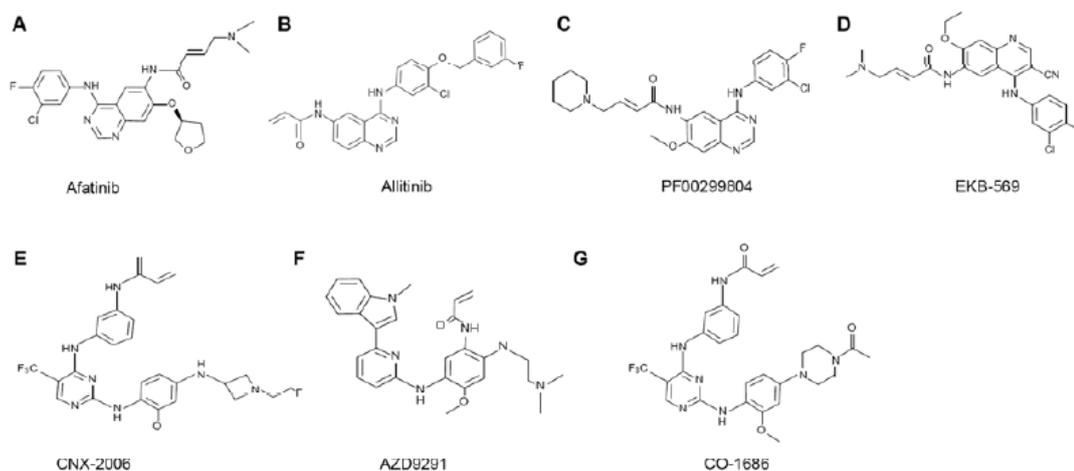


Fig. (2). Irreversible anti-EGFR molecules with therapeutic potential in head and neck cancer. A- Afatinib (Gilotrif® - Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.); B- Allitinib (Allist Pharmaceuticals, Inc.); C- PF-00299804 (Dacomitinib® - Pfizer Inc.); D- EKB-569 (Pelitinib® - Wyeth Inc.); E- CNX-2006 (Clovis Oncology, Inc.); F- AZD9291 (AstraZeneca); G- CO-1686 (Rociletinib® - Clovis Oncology, Inc.)

tory action [134], AZD9291 may be a promising candidate in head neck cancer therapy.

CO-1686 (Clovis Oncology, Inc.) 2-propenamide, N-[3-[[2-[4-(4-acetylpiperazin-1-yl)-2-methoxyanilino]-5-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-yl]amino]phenyl]prop-2-enamide, also known as Rociletinib® (Fig. 2G) is an irreversible inhibitor of EGFRwt and mutant-selective EGFR. The TIGER, I, II and III trials are recruiting patients with EGFR-mutated, advanced NSCLC after failure of at least one previous EGFR-directed TKI. The most recent clinical studies conducted in NSCLC patients treated with CO-1686 showed a positive tumor response and sustained disease control [135]. Although, CO-1686 has been demonstrating promising results in preclinical models, no clinical trial has been conducted in HNSCC.

Finally, EGFR antisense (EGFR AS) has been used in experimental models to evaluate its ability to inhibit the proliferation of HNSCC cell lines [136]. This approach consists of inoculating EGFR antisense that binds to specific mRNAs to interfere with the endogenous expression of EGFR. EGFR antisense results in a dysfunctional, mature protein, thereby reducing the activity of the ligand-binding domain and the kinase domain [136]. In nude mice xenografts, intratumoral plasmids that were injected with antisense EGFR sequences showed reduced tumor volumes when compared with the control group [137]. Subsequently, intralesional injections of EGFR liposomal antisense gene therapy in normal mice showed tolerable toxicity levels [138]. Based on the results, 17 patients with LAHNSCC were treated with intratumoral EGFR AS injections and a favorable clinical response was observed in (5/17) of patients (29%) [139].

5. PREDICTIVE BIOMARKERS TO ANTI-EGFR THERAPY IN HNSCC

Currently, the only anti-EGFR drug approved for HNSCC is cetuximab/panitumumab. A focus of great interest has been on the identification of predictive biomarkers of

clinical response to these drugs [140, 141]. Despite this rationale, a large body of evidence has shown that alteration of EGFR (protein overexpression, gene amplification) were not associated with patient response [141]. Intracellular pathways regulators, particularly, activating mutations of *KRAS* oncogene, were associated with mAbs response [142]. The oncogene *KRAS*, drives signal transduction downstream of transmembrane receptor tyrosine kinases, especially the EGF receptor. However, *KRAS* mutations result in incessant activation of the intracellular RAS/MAPK/PIK3CA pathways, resulting in increased cell proliferation and survival, neoplastic transformation, cell migration and metastasis [143]. Hot-spot *KRAS* activating mutations are recognized as strong predictors of resistance to EGFR-mAbs (cetuximab or panitumumab) in metastatic colorectal cancer (MCC) [142, 144, 145]. In the last few decades, some *in vitro* findings have associated the low response rate to mAbs with an overexpression of the PIK3CA/AKT/mTOR pathway [146]. A seminal retrospective study of MCC showed that *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* exon 20 mutations were significantly associated with a low cetuximab response rate [147].

In HNSCC, no predictive molecular marker of response to anti-EGFR agents is known. *KRAS* mutations are very rare (< 1%), while *EGFR* mutations represent less than 5% of HNSCCs [24]. Thus, the mutational status of *EGFR* and *KRAS* genes are not useful tools for predicting response to mAbs, due to low frequencies [148]. In HNSCC, other alterations may be associated with patient response, such as ligand levels, which have been associated to a few response rates for EGFR therapies. *In vitro* approaches in HNSCC cell lines, showed that the detection of values ≥ 20 pmol/L of amphiregulin are associated with increased efficiency of cetuximab and gefitinib, when compared to cell lines that have low amphiregulin expression [149]. These *in vitro* findings were observed in 47 patients with HNSCC in which high expression of amphiregulin demonstrated significantly shortened OS (HR: 2.2, $p = 0.002$) and PFS (HR 2.2, $p = 0.019$), compared with patients with low expression scores [150]. Other ligands such as HRG, have shown that signifi-

cantly increased levels of expression in HNSCC patients is preferably associated with HER3 activation and defines a biologically distinct subset of patients, with a positive correlation with cetuximab/cisplatin response [151].

TGF- α overexpression, was implicated in cetuximab resistance in cell lines [152]. Interestingly, the whole expression profile of xenograft models using cetuximab-resistant colorectal cancer cell lines showed that phosphorylated MET was detected in resistant cell lines. The authors associate the increase in MET phosphorylation levels with TGF- α overexpression [152]. Regarding HNSCC, TGF- β overexpression is related to *de novo* and acquired resistance to EGFR-targeted mAbs, and supply a rationale for TGF- β combination therapies [153].

Another hypothesis suggests that, EGFR nuclear translocation is mediated by the Src kinase family and overexpression of HER ligands (EGF, ARG, HB-EGF) leads to a cetuximab-resistant phenotype [79]. In HNSCC, EGFR nuclear translocation is associated with cetuximab/radiation therapeutic response. In this study, HNSCC cell lines treated with this combination showed elevated levels of nuclear EGFR and consequently a resistance phenotype, while Dasatinib therapy combination can inhibit EGFR translocation and restore cetuximab sensitivity [154].

5. CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS

EGFR inhibitors represent a class of chemotherapeutic agents with promising results in monotherapy or in combination with other anticancer agents. HNSCC tumors frequently exhibit very high expression of EGFR and anti-EGFR, and Cetuximab is the only targeted therapy approved for HNSCC treatment. However, a subgroup of HNSCC patients demonstrate a response to cetuximab monotherapy, although the underlying mechanisms of this response remain ill-defined and there is no biomarker to predict responders.

The studies reported in this review reveal the potential of the newest generation of tyrosine kinase inhibitors, which are mainly being designed for the effective inhibition of the EGFR and other tyrosine kinase receptors simultaneously. Moreover, the development of multi-targeted therapies and irreversible anti-EGFR inhibitors reveals new perspectives in clinical trials and future treatment regimens. Third-generation EGFR inhibitors, include afatinib, and is currently being tested in HNSCC patients. The multi-modality treatment adopted in HNSCC frequently impacts quality of life due to extensive surgeries and toxicities related to intensive chemo-radiation approaches. Targeted therapies are becoming increasingly adopted for the treatment of various tumor types due to their ability to adopt efficient and selective mechanisms of action, which limits cytotoxicity when compared to conventional chemotherapeutic agents. Thus, the evaluation of new generation tyrosine kinase inhibitors in clinical trials, which includes HNSCC patients, and the search for molecular markers that predict sensitivity to these drugs, are of great importance to successfully improve the treatment of these patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Dr. Laura Mussel for critical revision of the manuscript. André L. Carvalho and Rui M. Reis have a National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and a FINEP (MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-01/2013 - FPIXII-BIOPLAT) scholarship. A.C.C. has a FAPESP (2013/13834-7) scholarship.

REFERENCES

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- [4] Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: Molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1018.
- [5] Wong DT, Todd R, Tsuji T, Donoff RB. Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7(4): 319-28.
- [6] Janmaat ML, Giaccone G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. *Drugs today* 2003; 39 Suppl C: 61-80.
- [7] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5): 277-300.
- [8] Haddad R, Annino D, Tishler RB. Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer. *Dent Clin N Am* 2008; 52(1): 1-17, vii.
- [9] Posner MR, Haddad RI, Wirth L, Norris CM, Goguen LA, Mahadevan A, et al. Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: Evolution of the sequential treatment approach. *Semin Oncol* 2004; 31(6): 778-85.
- [10] Budach V. TPF sequential therapy: when and for whom? *Oncologist* 2010; 15 Suppl 3: 13-8.
- [11] Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48(11): 3282-7.
- [12] D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009; 199(9): 1263-9.
- [13] Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332(11): 712-7.
- [14] Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 49-70.
- [15] Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: A case-control study. *Cancer Causes Control* 2002; 13(10): 957-64.
- [16] Brooks PJ, Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen* 2014; 55(2): 77-91.
- [17] Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(2): 467-75.
- [18] Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011; 29(32): 4294-301.
- [19] Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 709-20.
- [20] Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, et al. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001; 92(11): 2875-84.

- [21] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- [22] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1): 10-29.
- [23] Zur Hausen H. Papilloma viruses in the causation of human cancers - A brief historical account. *Virology* 2009; 384(2): 260-5.
- [24] Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517(7536): 576-82.
- [25] Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, *et al*. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* 2013; 3(7): 761-9.
- [26] Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, *et al*. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011; 333(6046): 1157-60.
- [27] Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettgowda C, Chang K, Li RJ, *et al*. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 2011; 333(6046): 1154-7.
- [28] Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, *et al*. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* 2013; 3(7): 770-81.
- [29] Moutzios G, Rampias T, Psyrri A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: Targetable genetic events and clinical impact. *Ann Oncology* 2014; 25(10): 1889-900.
- [30] Egloff AM, Grandis J. Epidermal growth factor receptor-targeted molecular therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10(5): 639-47.
- [31] Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, *et al*. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24(25): 4170-6.
- [32] Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; 511(7511): 543-50.
- [33] Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407): 330-7.
- [34] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, *et al*. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med* 2006; 354(6): 567-78.
- [35] Vermorken JB, Trigo J, Hitt R, Koralewski P, Diaz-Rubio E, Rolland F, *et al*. Open-label, uncontrolled, multicenter Phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25(16): 2171-7.
- [36] Cohen MH, Chen H, Shord S, Fuchs C, He K, Zhao H, *et al*. Approval summary: Cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and 5-fluorouracil for the first-line treatment of patients with recurrent locoregional or metastatic squamous cell head and neck cancer. *Oncologist* 2013; 18(4): 460-6.
- [37] Savage CR, Jr., Inagami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1972; 247(23): 7612-21.
- [38] Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 1980; 255(10): 4834-42.
- [39] Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, *et al*. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; 110(6): 763-73.
- [40] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2): 127-37.
- [41] Greenfield C, Hiles I, Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL, *et al*. Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J* 1989; 8(13): 4115-23.
- [42] Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410(1): 83-6.
- [43] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7): 489-501.
- [44] Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2004; 23(48): 8017-23.
- [45] Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, *et al*. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366(1): 2-16.
- [46] Mehra R, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Jr., Robinson MK, Burtness B, Golemis EA. Protein-intrinsic and signaling network-based sources of resistance to EGFR- and ErbB family-targeted therapies in head and neck cancer. *Drug Resist Updat* 2011; 14(6): 260-79.
- [47] Keren S, Shoude Z, Lu Z, Beibei Y. Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: A meta-analysis. *Tumour Biol* 2014; 35(3): 2285-95.
- [48] Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, *et al*. The ErbB receptors and their ligands in cancer: An overview. *Curr Drug Targets* 2005; 6(3): 243-57.
- [49] O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002; 38(7): 627-40.
- [50] Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 1998; 69(1): 55-62.
- [51] Aupperlee MD, Leipprandt JR, Bennett JM, Schwartz RC, Haslam SZ. Amphiregulin mediates progesterone-induced mammary ductal development during puberty. *Breast Cancer Res* 2013; 15(3): R44.
- [52] Busser B, Sancey L, Brambilla E, Coll JL, Hurbain A. The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1816(2): 119-31.
- [53] Nanba D, Higashiyama S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(1): 13-9.
- [54] Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci* 2006; 97(5): 341-7.
- [55] Ito Y, Higashiyama S, Takeda T, Yamamoto Y, Wakasa KI, Matsuura N. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 2001; 29(1): 47-52.
- [56] Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonnetterre J, Peyrat JP. ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Ann Oncol* 2008; 19(1): 73-80.
- [57] Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, Oki E, Tsujioka H, Hachisuga T, *et al*. Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365(3): 555-61.
- [58] Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, Milanezi F, Carvalho S, Savage K, *et al*. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol* 2006; 209(4): 445-53.
- [59] Maire CL, Ligon KL. Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro-Oncol* 2014; 16 Suppl 8: viii1-6.
- [60] Hegi ME, Rajakannu P, Weller M. Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Curr Opin Neurol* 2012; 25(6): 774-9.
- [61] Saif MW. Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway. *Exp Opin Investig Drugs* 2010; 19(3): 357-69.
- [62] Okines A, Cunningham D, Chau I. Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(8): 492-503.
- [63] Rajkumar T, Gullick WJ. The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29(1): 3-9.
- [64] Troiani T, Martinelli E, Capasso A, Morgillo F, Orditura M, De Vita F, *et al*. Targeting EGFR in pancreatic cancer treatment. *Curr Drug Targets* 2012; 13(6): 802-10.
- [65] Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: Role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28 Suppl 1: S24-31.
- [66] Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, *et al*. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer science* 2008; 99(8): 1589-94.

- [67] Willmore-Payne C, Holden JA, Layfield LJ. Detection of EGFR- and HER2-activating mutations in squamous cell carcinoma involving the head and neck. *Mod Pathol* 2006; 19(5): 634-40.
- [68] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012; 483(7391): 603-7.
- [69] Johnson H, Del Rosario AM, Bryson BD, Schroeder MA, Sarkaria JN, White FM. Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts. *Mol Cell proteomics* 2012; 11(12): 1724-40.
- [70] Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, Feramisco JR, et al. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 1996; 271(41): 25639-45.
- [71] Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006; 12(17): 5064-73.
- [72] Melchers LJ, Clausen MJ, Mastik MF, Slagter-Menkema L, Langendijk JA, van der Laan BF, et al. Head and neck squamous cell carcinomas do not express EGFRvIII. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90(2): 454-62.
- [73] Nagalakshmi K, Jamil K, Pingali U, Reddy MV, Attili SS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations as biomarker for head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Biomarkers* 2014; 19(3): 198-206.
- [74] Khattri A, Zuo Z, Bragelmann J, Keck MK, El Dinali M, Brown CD, et al. Rare occurrence of EGFRvIII deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2015; 51(1): 53-8.
- [75] Marti U, Hug M. Acinar and cellular distribution and mRNA expression of the epidermal growth factor receptor are changed during liver regeneration. *J Hepatol* 1995; 23(3): 318-27.
- [76] Zimmermann H, Ganz P, Zimmermann A, Oguey D, Marti U, Reichen J. The overexpression of proliferating cell nuclear antigen in biliary cirrhosis in the rat and its relationship with epidermal growth factor receptor. *J Hepatol* 1995; 23(4): 459-64.
- [77] Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature reviews Mol Cell Biol* 2010; 11(7): 490-501.
- [78] Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(9): 802-8.
- [79] Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 2009; 28(43): 3801-13.
- [80] Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol* 2013; 108(3): 370-7.
- [81] Iida M, Brand TM, Campbell DA, Li C, Wheeler DL. Yes and Lyn play a role in nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 2013; 32(6): 759-67.
- [82] van Dijk LK, Yim CB, Franssen GM, Kaanders JH, Rajander J, Solin O, et al. PET of EGFR with (64) Cu-cetuximab-F(ab')₂ in mice with head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Contrast Media Mol Imaging* 2016; 11(1): 65-70.
- [83] van Dijk LK, Boerman OC, Franssen GM, Lok J, Kaanders JH, Bussink J. Early response monitoring with 18F-FDG PET and cetuximab-F(ab')₂-SPECT after radiotherapy of human head and neck squamous cell carcinomas in a mouse model. *J Nucl Med* 2014; 55(10): 1665-70.
- [84] Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 2011; 71(3): 1103-14.
- [85] van Dijk LK, Boerman OC, Kaanders JH, Bussink J. PET Imaging in Head and Neck Cancer Patients to Monitor Treatment Response: A Future Role for EGFR-Targeted Imaging. *Clin Cancer Res* 2015; 21(16): 3602-9.
- [86] Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5(7): 1621-33.
- [87] Harding J, Burtness B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today* 2005; 41(2): 107-27.
- [88] Dai W, Li Y, Zhou Q, Xu Z, Sun C, Tan X, et al. Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med* 2013.
- [89] Goldberg RM. Cetuximab. *Nat Rev Drug Disc* 2005; Suppl: S10-1.
- [90] Blick SK, Scott LJ. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2007; 67(17): 2585-607.
- [91] Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweck A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Eng J Med* 2008; 359(11): 1116-27.
- [92] Burtness B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA, Eastern Cooperative Oncology G. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2005; 23(34): 8646-54.
- [93] Vermorken JB, Stohlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winquist E, Villanueva C, et al. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label Phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2013; 14(8): 697-710.
- [94] Rojo F, Gracias E, Villena N, Cruz T, Corominas JM, Corradino I, et al. Pharmacodynamic trial of nimotuzumab in unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck: A SENDO Foundation study. *Clin Cancer Res* 2010; 16(8): 2474-82.
- [95] [cited 2013 25/11/2013]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/home>.
- [96] Rodriguez MO, Rivero TC, del Castillo Bahi R, Muchuli CR, Bilbao MA, Vinageras EN, et al. Nimotuzumab plus radiotherapy for unresectable squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biol Ther* 2010; 9(5): 343-9.
- [97] Bastholt L, Specht L, Jensen K, Bruun E, Loft A, Petersen J, et al. Phase I/II clinical and pharmacokinetic study evaluating a fully human monoclonal antibody against EGFR (HuMax-EGFR) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 2007; 85(1): 24-8.
- [98] Machiels JP, Subramanian S, Ruzsa A, Repassy G, Lifirenko I, Flygare A, et al. Zolatumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: An open-label, randomised phase 3 trial. *lancet Oncol* 2011; 12(4): 333-43.
- [99] Schaefer G, Haber L, Crocker LM, Shia S, Shao L, Dowbenko D, et al. A two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer cell* 2011; 20(4): 472-86.
- [100] Li C, Huang S, Armstrong EA, Francis DM, Werner LR, Sliwkowski MX, et al. Antitumor effects of MEHD7945A, a dual specific antibody against EGFR and HER3, in combination with radiation in lung and head and neck cancers. *Mol Cancer Ther* 2015.
- [101] Pedersen MW, Jacobsen HJ, Koefoed K, Hey A, Pyke C, Haurum JS, et al. Sym004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy. *Cancer Res* 2010; 70(2): 588-97.
- [102] Machiels JP, Specenier P, Krauss J, Dietz A, Kaminsky MC, Lalam Y, et al. A proof of concept trial of the anti-EGFR antibody mixture Sym004 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 76(1): 13-20.
- [103] Ward WH, Cook PN, Slater AM, Davies DH, Holdgate GA, Green LR. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol* 1994; 48(4): 659-66.
- [104] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Eng J Med* 2004; 350(21): 2129-39.
- [105] Lewis CM, Glisson BS, Feng L, Wan F, Tang X, Wistuba II, et al. A phase II study of gefitinib for aggressive cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2012; 18(5): 1435-46.
- [106] Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, et al. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2003; 21(10): 1980-7.
- [107] Cohen MH, Johnson JR, Chattopadhyay S, Tang S, Justice R, Sridhara R, et al. Approval summary: erlotinib maintenance therapy of

- advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncologist* 2010; 15(12): 1344-51.
- [108] Rao K, Kalapurakal S, Chalasani P, Robinson K, Malone J, Clausen C, *et al.* A phase II study of intra-arterial cisplatin with concurrent radiation and erlotinib for locally advanced head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72(3): 545-52.
- [109] Arias de la Vega F, Contreras J, de Las Heras M, de la Torre A, Arrazubi V, Herruzo I, *et al.* Erlotinib and chemoradiation in patients with surgically resected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a GICOR phase I trial. *Annals of Oncol* 2012; 23(4): 1005-9.
- [110] Li G, Hu W, Wang J, Deng X, Zhang P, Zhang X, *et al.* Phase II study of concurrent chemoradiation in combination with erlotinib for locally advanced esophageal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78(5): 1407-12.
- [111] Gilbert J, Rudek MA, Higgins MJ, Zhao M, Bienvenu S, Sottles N, *et al.* A phase I trial of erlotinib and concurrent chemoradiotherapy for stage III and IV (M0) squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2012; 18(6): 1735-42.
- [112] Massarelli E, Lin H, Ginsberg LE, Tran HT, Lee JJ, Canales JR, *et al.* Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncol* 2015; 26(7): 1476-80.
- [113] Bauerfeind I, Elling D, Heinemann V. Lapatinib in the Treatment of Hormone Receptor-Positive/ErbB2-Positive Breast Cancer. *Breast care* 2010; 5(s1): 13-5.
- [114] Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, *et al.* Expression and mutation analysis of her2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2010; 28(5): 495-500.
- [115] Agulnik M, Cohen EW, Cohen RB, Chen EX, Volkes EE, Hottel SJ, *et al.* Phase II study of lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands. *J Clin Oncol* 2007; 25(25): 3978-84.
- [116] Harrington K, Berrier A, Robinson M, Remenar E, Housset M, de Mendoza FH, *et al.* Randomised Phase II study of oral lapatinib combined with chemoradiotherapy in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: rationale for future randomised trials in human papilloma virus-negative disease. *Eur J Cancer* 2013; 49(7): 1609-18.
- [117] Cai X, Zhai HX, Wang J, Forrester J, Qu H, Yin L, *et al.* Discovery of 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-N-hydroxyheptanamide (CUDC-101) as a potent multi-acting HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2010; 53(5): 2000-9.
- [118] Shimizu T, LoRusso PM, Papadopoulos KP, Patnaik A, Beeram M, Smith LS, *et al.* Phase I first-in-human study of CUDC-101, a multitargeted inhibitor of HDACs, EGFR, and HER2 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014; 20(19): 5032-40.
- [119] Tan F, Shen X, Wang D, Xie G, Zhang X, Ding L, *et al.* Icotinib (BPI-2009H), a novel EGFR tyrosine kinase inhibitor, displays potent efficacy in preclinical studies. *Lung cancer* 2012; 76(2): 177-82.
- [120] Li X, Yang XJ, Sun YF, Qin N, Lu JL, Wu YH, *et al.* [Clinical observation of icotinib hydrochloride for patients with advanced non-small cell lung cancer]. *Chinese J Oncol* 2012; 34(8): 627-31.
- [121] Shi Y, Zhang L, Liu X, Zhou C, Zhang L, Zhang S, *et al.* Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (ICOGEN): a randomised, double-blind phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2013; 14(10): 953-61.
- [122] Bruns, A., Eichner, S., Lehmann, F., Albrecht, W., Maier, A. Crystalline forms of afatinib di-maleate. WO2013052157 (2013).
- [123] Minkovsky N, Berezov A. BIBW-2992, a dual receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of solid tumors. *Current Opin Invest Drugs* 2008; 9(12): 1336-46.
- [124] Machiels JP, Haddad RI, Fayette J, Licitra LF, Tahara M, Vermorken JB, *et al.* Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): An open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(5): 583-94.
- [125] Xie H, Lin L, Tong L, Jiang Y, Zheng M, Chen Z, *et al.* AST1306, a novel irreversible inhibitor of the epidermal growth factor receptor 1 and 2, exhibits antitumor activity both *in vitro* and *in vivo*. *PLoS one*. 2011; 6(7): e21487.
- [126] Gonzales AJ, Hook KE, Althaus IW, Ellis PA, Trachet E, Delaney AM, *et al.* Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(7): 1880-9.
- [127] Abdul Razak AR, Soulieres D, Laurie SA, Hottel SJ, Singh S, Winkvist E, *et al.* A phase II trial of dacomitinib, an oral pan-human EGF receptor (HER) inhibitor, as first-line treatment in recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Annals of Oncol* 2013; 24(3): 761-9.
- [128] Nunes M, Shi C, Greenberger LM. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, protein kinase B, and signal transducer and activator of transcription 3 are differentially inhibited by an epidermal growth factor receptor inhibitor, EKB-569, in tumor cells and normal human keratinocytes. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(1): 21-7.
- [129] Bryce AH, Rao R, Sarkaria J, Reid JM, Qi Y, Qin R, *et al.* Phase I study of temsirolimus in combination with EKB-569 in patients with advanced solid tumors. *Invest N Drugs* 2012; 30(5): 1934-41.
- [130] Aravindan N, Thomas CR, Jr., Aravindan S, Mohan AS, Veeraghavan J, Natarajan M. Irreversible EGFR inhibitor EKB-569 targets low-LET gamma-radiation-triggered rel orchestration and potentiates cell death in squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2011; 6(12): e29705.
- [131] Kadoaki Ohashi KS, Jing Sun, Yumei Pan, Annette O. Walter, Alex Dubrovskiy, Robert Tjin, Tetsuya Mitsudomi, William Pao. CNX-2006, a novel irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, selectively inhibits EGFR T790M and fails to induce T790M-mediated resistance *in vitro*. 2013 [cited 2014]. Available from: http://www.clovisoncology.com/files/AACR_2013_Jing_CNX-2006_poster_2101A.pdf.
- [132] Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, *et al.* AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 1046-61.
- [133] Greig SL. Osimertinib: First Global Approval. *Drugs* 2016; 76(2): 263-73.
- [134] Butterworth, S., Finlay, M.R.V., Ward, R.A., Kadambar, V.K., Chandrashekar, R.C., Murugan, A., Redfean, H.M. 2 - (2, 4, 5 - substituted -anilino) pyrimidine derivatives as egfr modulators useful for treating cancer. WO2013014448 (2013).
- [135] Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, *et al.* Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2015; 372(18): 1700-9.
- [136] Rubin Grandis J, Chakraborty A, Melhem MF, Zeng Q, Twardy DJ. Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *Oncogene* 1997; 15(4): 409-16.
- [137] He Y, Zeng Q, Drenning SD, Melhem MF, Twardy DJ, Huang L, *et al.* Inhibition of human squamous cell carcinoma growth *in vivo* by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90(14): 1080-7.
- [138] Zeng Q, Kanter PM, Dhir R, Gooding WE, Huang L, Grandis JR. Lack of toxicity of EGFR antisense gene therapy. *J Exp Ther Oncol* 2002; 2(3): 174-86.
- [139] Lai SY, Koppikar P, Thomas SM, Childs EE, Egloff AM, Seethala RR, *et al.* Intratumoral epidermal growth factor receptor antisense DNA therapy in head and neck cancer: first human application and potential antitumor mechanisms. *J Clin Oncol* 2009; 27(8): 1235-42.
- [140] Cohen RB. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancer Treat Rev* 2014; 40(4): 567-77.
- [141] Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12(1): 11-26.
- [142] Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532-6.
- [143] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(11): 761-74.
- [144] Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, *et al.* KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an

- adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res* 2014; 20(11): 3033-43.
- [145] Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(3): 262-71.
- [146] Saki M, Toulany M, Rodemann HP. Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells. *Radiother Oncol* 2013; 108(3): 473-8.
- [147] De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 753-62.
- [148] Boeckx C, Weyn C, Vanden Bempt I, Deschoolmeester V, Wouters A, Specenier P, *et al.* Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: Implications for anti-EGFR treatment response. *BMC Res Notes* 2014; 7: 337.
- [149] Yonesaka K, Zejnullahu K, Lindeman N, Homes AJ, Jackman DM, Zhao F, *et al.* Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21): 6963-73.
- [150] Tinhofer I, Klinghammer K, Weichert W, Knodler M, Stenzinger A, Gauler T, *et al.* Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res* 2011; 17(15): 5197-204.
- [151] Shames DS, Carbon J, Walter K, Jubb AM, Kozlowski C, Januario T, *et al.* High heregulin expression is associated with activated HER3 and may define an actionable biomarker in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *PLoS one.* 2013; 8(2): e56765.
- [152] Troiani T, Martinelli E, Napolitano S, Vitagliano D, Ciuffreda LP, Costantino S, *et al.* Increased TGF-alpha as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2013; 19(24): 6751-65.
- [153] Bedi A, Chang X, Noonan K, Pham V, Bedi R, Fertig EJ, *et al.* Inhibition of TGF-beta enhances the *in vivo* antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(11): 2429-39.
- [154] Li C, Iida M, Dunn EF, Wheeler DL. Dasatinib blocks cetuximab- and radiation-induced nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* 2010; 97(2): 330-7.

ANEXO C

Artigo publicado em Fevereiro de 2016, na revista Cellular Oncology

Cell Oncol.
DOI 10.1007/s13402-016-0270-z

ORIGINAL PAPER

Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker

Renato José Silva-Oliveira¹ · Viviane Aline Oliveira Silva¹ · Olga Martinho^{1,2,3} · Adriana Cruvinel-Carloni¹ · Matias Eliseo Melendez¹ · Marcela Nunes Rosa¹ · Flávia Escremin de Paula¹ · Luciano de Souza Viana^{1,4} · André Lopes Carvalho¹ · Rui Manuel Reis^{1,2,3}

Accepted: 1 February 2016
© International Society for Cellular Oncology 2016

Abstract

Background The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a member of the HER family of growth factors that activates several intracellular signaling pathways promoting proliferation and survival. EGFR over-expression is frequently associated with gene mutation or amplification, thereby constituting a major target for molecular therapies. Recently, a new generation of EGFR inhibitors has been developed with pan-HER properties and irreversible actions. Allitinib® (AST1306) is an orally active, highly selective irreversible inhibitor of the HER family of receptor tyrosine kinases with promising efficacies. In the present study we aimed to investigate the cytotoxicity of allitinib in a large panel of human cancer-derived cell lines and to correlate its efficacy to the mutational status of the *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PI3KCA* and *PTEN* genes. In addition, we aimed to evaluate the functional role of *KRAS* mutations in the response to this new inhibitor.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13402-016-0270-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rui Manuel Reis
ruireis.hcb@gmail.com

¹ Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Villela, 1331, CEP 14784 400 Barretos, São Paulo, Brazil

² Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, Portugal

³ ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga, Guimarães, Portugal

⁴ Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

Results In total 76 different cancer-derived cell lines, representing 11 distinct histological types, were analyzed and classified into three groups: highly sensitive (HS), moderately sensitive (MS) and resistant (R). We found that 28 (36.8 %) cancer-derived cell lines exhibited a HS phenotype, 19 (25.0 %) a MS phenotype and 29 (38.1 %) a R phenotype. Allitinib showed a stronger cytotoxicity in head and neck, esophageal, melanoma and lung cancer-derived cell lines. We found that *KRAS* mutations were significantly associated with the R phenotype. To substantiate these results, an allitinib-sensitive lung cancer-derived cell line (H292) was transfected with plasmids carrying the two most common activating *KRAS* mutations (p.G12D and p.G12S). We found that both mutations reverted the allitinib-sensitive phenotype in these cells.

Conclusions The current study represents the largest *in vitro* assessment of allitinib cytotoxicity performed to date. Through this study, we identified cancer types that could potentially benefit from this drug. Additionally, our findings suggest that prevalent *KRAS* mutations constitute potential predictive biomarkers for allitinib response.

Keywords EGFR inhibitor · Allitinib · *In vitro* screening · *KRAS* mutation

1 Introduction

EGFR is a receptor tyrosine kinase (RTK) belonging to the HER family of growth factor receptors, which encompasses four representative members: EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (ErbB2/neu), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4) [1]. These RTKs bind distinct ligands, such as

EGF (epidermal growth factor), amphiregulin, betacellulin, epiregulin, neuregulin, heparin-binding EGF and transforming growth factor alpha (TGF- α) [1, 2]. Under normal conditions, when RTKs are stimulated by their ligands, receptor dimerization and autophosphorylation take place, leading to downstream activation of intracellular signaling pathways, mainly the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3KCA/AKT pathways, promoting among others cellular proliferation and survival [3, 4].

EGFR over-expression occurs in most solid tumors, including colorectal cancer [5], lung cancer [6], head and neck squamous cell carcinoma [7], pancreatic cancer [8], breast cancer [9] and glioma [10, 11]. In tumor cells, anomalous EGFR activation may occur through several mechanisms, including *EGFR* gene amplifications [12, 13], the occurrence of activating mutations in the extracellular or tyrosine kinase domains [14–16] or by autocrine/paracrine signaling mechanisms [13]. Anomalous EGFR activation may have an impact on tumor cell behavior and, as such, be implicated in metastatic disease and a poor prognosis [17].

Due to its paramount relevance to cancer, several therapeutic strategies targeting the EGFR have been developed during the past decade [18, 19]. The two main anti-EGFR options currently used in clinical practice are small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and monoclonal antibodies [20]. TKIs such as gefitinib (Iressa[®]) or erlotinib (Tarceva[®]) are being used in the treatment of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and metastatic head and neck cancer [21]. Both inhibitors are employed as first-line therapy in *EGFR* mutated NSCLCs [14]. Second-generation TKIs consist of small molecules with irreversible actions in target tyrosine kinase domains. In addition, some of these molecules, such as afatinib (Gilotrif[®], Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), a recently US FDA approved agent for the treatment of patients with NSCLC refractory to gefitinib or erlotinib, and which can target wild-type EGFR, mutant EGFR (L858R)(L858R/T790M) and HER2, have the ability to inhibit various molecular targets [22, 23]. The US FDA approval of afatinib was based on the observed increase in progression-free survival (PFS) in a multi-center, international clinical trial performed with NSCLC patients, which confirmed the activity of afatinib as first-line therapy in *EGFR* mutated patients [24]. Afatinib has been included in several clinical trials for other solid tumors, such as head and neck squamous cell carcinomas and breast cancers [25].

Allitinib (Shanghai Allist Pharmaceuticals, China), also known as AST1306, is similar to afatinib a potent irreversible EGFR inhibitor [26]. Allitinib is an anilino-quinazoline compound that has been reported to inhibit EGFR and other members of the HER family, such as HER2 and HER4 [26]. A recent phase I clinic trial has assessed the safety,

pharmacologic tolerance and anti-tumor effects of allitinib in patients with breast and lung cancer [27].

Several studies have intended to identify potential predictive biomarkers for anti-EGFR responses [28]. The majority of mutations arising in the tyrosine kinase domain of the EGFR are associated with positive responses to erlotinib- and gefitinib-based therapies [29]. However, it has been reported that secondary *EGFR* mutations, mainly T790M, may elicit acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC [30]. In other tumors, such as metastatic colorectal carcinoma, *KRAS* mutations serve as main predictive biomarkers of resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies, such as cetuximab and panitumumab [31]. Moreover, mutations in the *BRAF*, *NRAS* and *PIK3CA* (exon 20) genes have been associated with low response rates to these therapies [32]. Mechanisms of *de novo* resistance were also identified *in vitro* by secondary activation of the interleukin-6 receptor (IL-6R)/JAK1/STAT3 signaling pathway via autocrine IL-6 secretion [33]. Ongoing trials continue to investigate anti-EGFR therapies in various treatment settings but, due to sensitivity and resistance complexities, the underlying mechanisms have remained unclear.

In the current study, we investigated the efficacy of allitinib in a large panel of 76 cancer-derived cell lines, and correlated drug response rates with the mutational statuses of the *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PI3KCA* and *PTEN* genes. In addition we assessed the role of *KRAS* mutations (G12D and G12S) as putative predictive biomarkers for the response to allitinib.

2 Methods

2.1 Cell culture and reagents

In total 76 different human cancer-derived cell lines were included, representing 11 solid tumor types, i.e., 7 head and neck, 4 esophageal, 9 melanoma, 12 glioma, 8 colon, 4 pancreatic, 6 breast, 3 prostate, 4 bladder, 15 lung and 4 cervical cancer-derived cell lines. The cell lines were maintained in RPMI-1640 or DMEM (GIBCO) medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS, GIBCO) and 1 % penicillin and streptomycin (SIGMA) at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Further details on the culture conditions and the origins of the cell lines are provided in Supplementary Table 1 [34–41]. A 10 mM stock of the EGFR-specific tyrosine kinase inhibitor (TKI) allitinib (Selleck Chemical, Houston, TX, USA) was prepared and stored at –20 °C. Next, the drug was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at various intermediate concentrations and stored at –20 °C until use.

2.2 Cell viability (MTS) assay

The cytotoxic effects of the EGFR inhibitor allitinib were determined using a Cell Titer 96 Aqueous cell proliferation assay (MTS assay, PROMEGA, Madison, WI, USA). To this end, the cells were plated in 96 well plates (maximum 5×10^3 /well) and allowed to adhere overnight. The seeding density of each cell line varied (Supplementary Table 1 and [42–49]) in order to assure that cells did not reach confluence during the drug treatment and to allow a uniform MTS measurement. A representation of the distinct proliferation and survival kinetics of the cell lines tested is depicted in Supplementary Fig. 1. Subsequently, the cells were treated with increasing concentrations of allitinib in culture medium (serum-free) for 72 hours. In order to assess the cytotoxicity of allitinib, the treated cells were incubated with MTS reagent after which the absorbance was measured using an automatic microplate reader (Varioskan, Thermo) at 490 nm. The results were expressed as percentages relative to control (DMSO treated) cells. The IC_{50} concentrations were calculated through nonlinear regression analyses using GraphPad Prism software version 5. To uniformly classify the cell lines, growth inhibition (GI) values were determined. Mean GI values were established at a fixed dose of 1000 nM (100 % - percentage of viable cells at this dose), and the cell lines were scored as highly sensitive (HS) if $GI > 60$ %, moderately sensitive (MS) if $GI 40$ – 60 % and resistant (R) if $GI < 40$ %, as previously described using the formula: living cells (%) at 1000 nM - 100 (%) [50]. All the assays were performed in triplicate and repeated at least three times.

2.3 Gene mutation analyses

Mutation analyses of the *EGFR* hotspots (exons 18, 19, 20 and 21), the *KRAS* codons 12/13 and 61 and the *NRAS* codons 12/13 and 61, were performed by direct targeted sequencing as previously described [9, 51, 52]. Briefly, PCR was carried out in a final volume of 15 μ l containing 50 ng DNA, 10 μ M forward and reverse primers and 7, 5 μ l HotStar master mix (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol proposed by the manufacturer. The cycling parameters used were: denaturation at 96 °C for 15 minutes, followed by 40 cycles of 96 °C for 45 seconds and 58 °C for 45 seconds for *EGFR*, 55.5 °C for 45 seconds for *KRAS*, 72 °C for 45 seconds for *NRAS* and, in all cases, a final extension at 72 °C for 10 minutes using a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). The resulting PCR products were purified using EXOSAP-IT (Affymetrix, USB) and subjected to direct sequencing using an ABI PRISM BigDye X Terminator in conjunction with a BigDye X Terminator

purification kit (Applied Biosystems). The analyses were performed using the Genetic Analyzer ABI PRISM 3500 and SeqScape version 2.7 software packages (Applied Biosystems). To retrieve additional mutation profiles we used information from the Roche Cancer Genome Database (Mutome, DB) [53] for the *BRAF*, *PIK3CA* and *PTEN* genes.

2.4 Authentication of the cell lines

Authentication of all cell lines was performed by short tandem repeat (STR) DNA typing according to the International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines using a panel of 8 STR loci (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX and CSF1P0) plus gender determination (AMEL) using fluorescent labeling primers as reported by Dirks et al. [54]. Briefly, 50 ng DNA was amplified by a multiplex PCR reaction in a total volume of 10 μ l using a Qiagen multiplex kit (Qiagen) comprising 0.5 μ M of all fluorescent primer pairs plus 1 μ M of TH01 primer reinforcement, using a Veriti® 96-Well Thermal Cycler. The cycling parameters used were: denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 seconds, 55 °C for 1 minute and 30 seconds, 72 °C for 1 second and a final extension at 72 °C for 30 minutes. The resulting PCR products were diluted 1:100 in nuclease-free water ultrapure (USB, Cleveland, USA) supplemented with 0.3 μ l internal size standard 500ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 8.7 μ l formamide and loaded automatically for capillary electrophoresis using a Genetic Analyzer ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). The analyses were performed using GeneMapper software version 4.1 (Applied Biosystems). The genotyping confirmed the identity of all cell lines, with the exception of U373 and SNB19, which were found to be sub-clones of the U251 cell line.

2.5 Generation of stable *KRAS* mutant cell lines

The lung cancer-derived cell line H292 was used to generate *KRAS* (p.G12D and p.G12S) mutant cell lines through transfection of EGFP-*KRAS* fusion constructs. Briefly, plasmids pEGFP.C1.*KRAS*_wt, pEGFP.C1.*KRAS*_G12D (GAT) and pEGFP.C1.*KRAS*_G12S (AGT) (Reniguard Life Sciences Inc.) were transfected in sub-confluent 6-well plates (2.5×10^5 cells) using Fugene HD (PROMEGA, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours after transfection, positive cell lines were selected in culture medium containing neomycin (250 μ g/ml) during 2 weeks. After this selection, transfected cells (EGFP-positive) were enriched by flow cytometry using BD FACSAria II (BD Biosciences, Bedford, MA, USA). Next, the cells were expanded in culture flasks. *KRAS* mutations were

Table 1 Efficacy of allitinib and mutation status of the cancer-derived cell line panel

Tumor type	Cell line	Mean IC ₅₀ ± SD (nM)*	Mean GI ¹ at 1000 nM	GI score	Gene mutation status					
					<i>KRAS</i>	<i>EGFR</i>	<i>NRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>BRAF</i>
Bladder	5637	221.23 ± 9.17	84.4 ± 1.5	HS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	MCR	923.21 ± 1.45	57.2 ± 2.5	MS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	HT1376	533.73 ± 11.07	66.7 ± 1.5	HS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	T24	>1000	7.4 ± 1.5	R	WT	WT	WT	NR	NR	NR
Breast	MDA-MB 231	710.40 ± 4.5	54.2 ± 8.6	MS	p.G13D	WT	WT	WT	WT	p.G464V
	MDA-MB 468	723.43 ± 4.0	57.3 ± 3.8	MS	WT	WT	WT	p.E545A	p.L70fs*7	WT
	BT20	934.62 ± 6.5	40.0 ± 6.3	MS	WT	WT	WT	p.P539R, p.H1047R	WT	WT
	T47-D	>1000	41.7 ± 3.3	MS	WT	WT	WT	p.H1047R	WT	WT
	MCF7	>1000	47.4 ± 3.7	MS	p.G12R	WT	WT	p.E542K	WT	WT
	HS578T	>1000	29.0 ± 1.0	R	WT	WT	WT	WT	NR	WT
	Cervical	Caski	24.01 ± 2.41	98.4 ± 0.43	HS	WT	WT	WT	p.E545K	WT
C33A		101.13 ± 9.87	75.5 ± 1.9	HS	WT	WT	WT	p.R88Q	p.R130*, p.R233*	WT
HeLa		>1000	3.7 ± 1.7	R	WT	WT	WT	WT	WT	WT
SiHa		>1000	9.7 ± 4.6	R	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Colon	LOVO	100.98 ± 9.9	70.5 ± 6.3	HS	p.G13D	WT	WT	WT	WT	p.G70G
	CACO-2	488.54 ± 13.3	52.9 ± 2.3	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SK-CO10	906.00 ± 4.4	54.4 ± 3.7	MS	p.G13D	WT	WT	NR	NR	NR
	SW480	>1000	37.7 ± 2.0	R	p.G12V	WT	WT	NR	NR	WT
	CO115	>1000	44.5 ± 6.3	MS	WT	WT	WT	WT	WT	p.V600E
	SW620	>1000	7.4 ± 2.0	R	p.G12V	WT	WT	WT	WT	WT
	DLD1	>1000	4.0 ± 6.5	R	p.G13D	WT	WT	NR	NR	NR
	HCT15	>1000	9.1 ± 3.6	R	p.G13D	WT	WT	p.E545K, p.D549N	WT	WT
Esophageal	Kyse 30	386.97 ± 3.5	83.0 ± 8.5	HS	WT	WT	WT	WT	NR	NR
	Kyse 70	418.21 ± 2.7	67.7 ± 1.8	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	Kyse 270	469.67 ± 14.5	65.0 ± 2.1	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	Kyse 410	472.58 ± 7.4	65.0 ± 3.0	HS	p.G12C	WT	WT	WT	WT	NR
Glioma	Res259	335.89 ± 4.8	70.2 ± 6.3	HS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	SF188	419.44 ± 7.8	75.7 ± 5.6	HS	WT	WT	WT	NR	WT	NR
	GAMG	763.38 ± 9.16	51.0 ± 7.5	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SNB19	864.95 ± 12.3	55.7 ± 4.7	MS	WT	WT	WT	WT	p.E242fs*15	WT
	UW479	931.02 ± 3.7	48.7 ± 3.7	MS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	SW1088	963.66 ± 11.9	59.4 ± 4.1	MS	WT	WT	WT	WT	p.R55fs*1	NR
	SW1783	983.25 ± 6.18	50.4 ± 6.0	MS	WT	WT	WT	WT	p.R233*	NR
	Res186	>1000	20.7 ± 8.2	R	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	U251	>1000	8.4 ± 6.0	R	WT	WT	WT	WT	p.E242fs*15	NR
	U87MG	>1000	1.0 ± 3.2	R	WT	WT	WT	WT	p.V54fs*29	NR
	U373	>1000	4.0 ± 1.7	R	WT	WT	WT	NR	p.E242fs*15	WT
Head and neck	KNS42	>1000	13.5 ± 4.0	R	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	SCC-25	207.29 ± 11.6	75.0 ± 5.1	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SCC-4	217.68 ± 16.1	88.4 ± 1.1	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	FADU	384.07 ± 19.0	60.7 ± 4.9	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	JHU13	388.94 ± 15.4	70.0 ± 5.2	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
JHU28	>1000	13.7 ± 1.1	R	p.G12S	WT	WT	WT	WT	WT	NR

Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent

Table 1 (continued)

Tumor type	Cell line	Mean IC ₅₀ ± SD (nM)*	Mean GI ¹ at 1000 nM	GI score	Gene mutation status					
					<i>KRAS</i>	<i>EGFR</i>	<i>NRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>BRAF</i>
Lung	JHU12	>1000	17.7 ± 6.1	R	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	HN13	>1000	28.0 ± 5.2	R	WT	p.H773Y	WT	WT	WT	NR
	NCI-H1975	215.01 ± 12.51	81.9 ± 1.54	HS	WT	L858R + T790M	WT	p.G118D	NR	WT
	NCI-H827	310.00 ± 0.70	89.9 ± 0.79	HS	WT	del 19	WT	WT	WT	WT
	PC9	290.00 ± 0.03	86.6 ± 0.38	HS	WT	del 19	WT	WT	WT	WT
	SK-MES-1	960.13 ± 10.45	40.0 ± 3.5	MS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	H292	732.02 ± 2.41	70.3 ± 1.56	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	LUDLU-1	737.5 ± 1.26	84.0 ± 4.35	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	COR-L105	980.21 ± 0.16	77.3 ± 1.15	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H2228	958.00 ± 0.23	70.5 ± 2.12	HS	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	SK-LU-1	<1000	33.7 ± 4.1	R	p.G12D	WT	WT	NR	NR	NR
	A549	>1000	9.7 ± 6.8	R	p.G12S	WT	WT	WT	WT	NR
	COR-L23	>1000	20.0 ± 2.56	R	p.G12V	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H322	>1000	38.3 ± 3.05	R	WT	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H358	>1000	56.6 ± 4.50	MS	p.G12C	WT	WT	WT	WT	NR
	NCI-H727	>1000	33.3 ± 3.78	R	p.G12V	WT	WT	WT	WT	NR
	Melanoma	Calu-3	>1000	45.1 ± 2.81	MS	WT	WT	WT	WT	WT
WM9		105.35 ± 10.8	69.4 ± 3.4	HS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
A375		488.46 ± 9.9	67.7 ± 3.5	HS	WT	WT	WT	NR	NR	p.V600E
WM852		551.48 ± 14.3	69.5 ± 6.5	HS	WT	WT	p.Q61R	WT	NR	NR
WM793		583.37 ± 8.5	68.9 ± 8.0	HS	WT	WT	WT	WT	NR	p.V600E
WM1617		649.07 ± 6.8	69.2 ± 4.9	HS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
Colo858		902.48 ± 6.6	47.5 ± 2.1	MS	WT	WT	p.Q61H	NR	NR	NR
Colo679		>1000	34.7 ± 4.1	R	WT	WT	WT	WT	WT	p.V600E
SK-MEL37		>1000	14.9 ± 9.3	R	WT	WT	WT	WT	WT	p.V600E
GRM		>1000	10.4 ± 6.0	R	p.G12R	WT	WT	NR	NR	WT
Pancreatic	BXPC-3	164.08 ± 9.2	89.0 ± 3.6	HS	WT	WT	WT	WT	WT	p.V487_P492>A
	PSN1	>1000	24.0 ± 3.4	R	p.G12R	WT	NR	NR	NR	NR
	PANC1	>1000	34.4 ± 1.5	R	p.G12D	WT	NR	NR	NR	NR
Prostate	MiaPaCa2	>1000	20.0 ± 6.0	R	p.G12C	WT	WT	WT	WT	WT
	PNT2	754.45 ± 6.5	53.0 ± 4.8	MS	WT	WT	WT	NR	NR	NR
	LNCap	>1000	36.5 ± 2.8	R	p.G12V	WT	WT	NR	p.K6fs*4	NR
	PC3	>1000	32.2 ± 7.2	R	WT	WT	WT	NR	NR	NR

*Mean ± standard deviation from three independent experiments done in triplicate. ¹ Sensitivity status was determined by the values of growth inhibition (GI) at 1000 nM and defined as HS: highly sensitive if GI > 60 %; MS: Moderate Sensitive if GI 40-60 % and R: Resistant if GI < 40 %; NR: non-reported; Mutation status determined in the present study; Mutation status determined by consulting the RCGDB-The Roche Cancer Genome Database Mutations; normal characters

confirmed by direct sequencing using the primers hCMV_F: AGCAGAGCTGGTTTAGTGAAC and KRAS_R: CCAAGAGACAGGTTTCTCCATCA. This

approach was chosen in order to directly compare the effect of allitinib treatment on wild-type *KRAS* and p.G12D and p.G12S mutant *KRAS* cells. For this

reason, and as previously reported [55], empty vector controls were not included in these assays.

2.6 Viability and cytotoxicity analyses of *KRAS* mutant cell lines

To evaluate the effect of *KRAS* mutations on the sensitivity of H292 cells to allitinib, MTS assays were performed on the wild-type and p.G12D and p.G12S mutant cell lines (see above). To this end, the respective cell lines were seeded in 96-well plates (maximum 5×10^3 /well) and allowed to adhere overnight. Subsequently, the cells were treated with increasing concentrations of allitinib diluted in DMEM (serum-free) for 72 hours to allow IC_{50} determination. Finally, the viability and cytotoxicity changes were assessed using an ApoTox-Glo assay (PROMEGA, Madison, WI, USA) at fixed doses of allitinib (1 μ M and 6 μ M) after 72 hours.

2.7 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software (Statistical Package for Social Sciences; SPSS, Chicago, Ill., USA), version 19. Associations between response rates to allitinib and mutation status of the cell lines were performed using a χ^2 test. When the χ^2 test assumptions were not met Fisher's exact test was used. Single comparisons between mutant *KRAS* H292 cell lines were performed using Student's *t* test, and differences between groups were tested using two-way analysis of variance (ANOVA). The analyses were performed using GraphPad Prism version 5 and significance levels were set at $p < 0.05$.

3 Results and discussion

In order to evaluate the therapeutic efficacy of the tyrosine kinase inhibitor (TKI) allitinib on different solid tumors, we determined its cytotoxicity by MTS assay after exposing a panel of 76 human cancer-derived cell lines to increasing concentrations of this drug (maximum dose 1000 nM) (Table 1). By doing so, we observed IC_{50} values in the nanomolar (nM) range, varying from 24.01 ± 2.41 nM to 980.21 ± 0.16 nM (Table 1). In 32 cell lines the IC_{50} values could not be calculated since they did not reach a 50 % cell viability reduction at the maximum dose applied ($IC_{50} > 1000$ nM). We observed a wide variation between the IC_{50} values for each individual tumor type, hampering clear-cut comparisons among them. In order to uniformly classify the cell lines according to their responses to allitinib, we determined growth inhibition (GI) scores, as depicted in Table 1. According to this classification we found that 38.1 % (29/76) of the cell lines was resistant, 25.0 % (19/76) was moderately sensitive and 36.8 % (28/76) was highly sensitive (Table 2 and Fig. 1). The tumor types that showed high percentages of highly sensitive cell lines were esophageal cancer (100 %), head and neck cancer (57.1 %), melanoma (55.6 %), bladder cancer (50 %) and lung cancer (46.6 %). When considering resistant versus sensitive (highly + moderate) cell lines, we found that the lung, breast, melanoma and glioma-derived cell lines were the most sensitive ones, with lower percentages of cell lines considered as being resistant. In contrast, we found that pancreatic and prostate cancer-derived cell lines showed the least effective responses to the drug (Table 2 and Fig. 1). A representation of the distinct proliferation and survival curves of the cell lines is depicted in Supplementary Fig. 1.

Table 2 Summary of the sensitivity status of the cancer-derived cell line panel to allitinib

Tumor type	N	Sensitivity status		
		Highly sensitive-HS N (%)	Moderately Sensitive-MS N (%)	Resistant-R N (%)
Bladder	4	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)
Breast	6	0 (0.0)	5 (83.3)	1 (16.7)
Cervical	4	2 (50.0)	0(0.0)	2 (50.0)
Colon	8	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50.0)
Esophageal	4	4 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Glioma	12	2 (16.7)	5 (41.7)	5 (41.7)
Head and Neck	7	4 (57.1)	0 (0.0)	3 (42.9)
Lung	15	7 (46.6)	3 (20.0)	5 (33.3)
Melanoma	9	5 (55.6)	1 (11.1)	3 (33.3)
Pancreatic	4	1 (25.0)	0 (0.0)	3 (75.0)
Prostate	3	0 (0.0)	1 (33.3)	2 (66.7)
Total	76	28 (36.8)	19 (25.0)	29 (38.1)

Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent

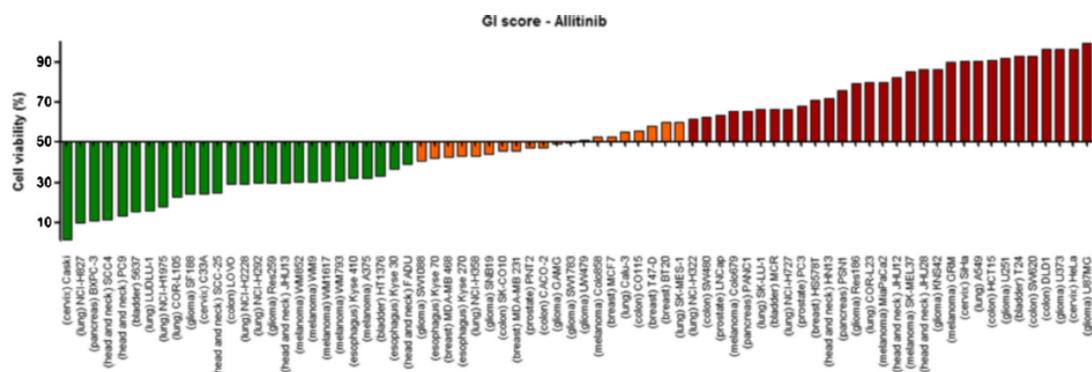


Fig. 1 Cytotoxicity profile of 76 cancer-derived cell lines, exposed to the irreversible EGFR inhibitor allitinib. Bars represent cell viability at 1000 nM. Bar colors represent the GI score classification. Green (HS, Highly Sensitive). Orange (MS, Moderately Sensitive) and Red (R, Resistant)

To identify potential biomarkers for allitinib response, we assessed the mutation status of 3 major genes involved in the primary responses to anti-EGFR therapy in solid tumors, i.e., *EGFR*, *KRAS* and *NRAS* (Table 1). We found that only 4 of the cell lines tested (HN13, H1975, PC9 and NCI-H827) harbored mutations in the *EGFR* gene (H773Y, L858R + T790M and del19). Targeted *KRAS* sequencing revealed 20 mutations in codon 12/13, across distinct tumor types, with high frequencies in colorectal (6/8 cases), lung (5/10 cases) and pancreatic (3/4 cases) cancers (Table 1). We also identified 2 melanoma cell lines (Colo858 and WM852) with *NRAS* mutations. The mutation statuses of other important genes (i.e., *BRAF*, *PTEN* and *PIK3CA*), as deduced from literature data, are summarized in Table 1.

Our statistical analysis revealed that the mutation status of the *KRAS* gene was significantly ($p=0.001$) associated with allitinib resistance (Table 3), i.e., the majority of the *KRAS* mutant cell lines was classified as allitinib resistant (70 %), whereas 70.9 % (39/76) of the *KRAS* wild-type cell lines was classified as allitinib sensitive ($p=0.001$; Table 3). No additional significant associations were found for the other remaining genes (*EGFR*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN* and *PIK3CA*) (Table 3).

In order to substantiate the abovementioned association, we stably transfected a *KRAS* wild-type cell line, H292, with two plasmids carrying the most prevalent *KRAS* mutations (p.G12D and p.G12S) and a control wild-type plasmid. The mutation status of the resulting cell lines was confirmed by sequence analysis (Fig. 2a). As expected, we observed IC_{50} values of $0.95 \pm 0.17 \mu\text{M}$ for H292 wild-type (WT), a six times increase of IC_{50} ($6.56 \pm 0.23 \mu\text{M}$) in the H292-KRAS-G12D (GAT) and an eight times increase of IC_{50} ($8.47 \pm 0.15 \mu\text{M}$) in the H292-KRAS-G12S (AGT) cells (Fig. 2b). Using a fluorescent assay we found that after 72 hours H292-WT cells showed a significant decrease in viability at both allitinib

concentrations used (1 μM and 6 μM) compared to the H292-KRAS-G12D and H292-KRAS-G12S cells ($p=0.03$ and $p=0.003$) (Fig. 2c). In addition, we observed by cytotoxicity fluorescent analyses inverse proportional relations with the viability profiles, i.e., both mutant *KRAS* cell lines exhibited a significantly lower cytotoxicity compared to the H292-WT cells when exposed to 1 μM and 6 μM allitinib ($p=0.005$ and $p=0.006$, respectively) (Fig. 2d).

Table 3 Correlations between the mutation statuses of the cancer-derived cell lines and the sensitivity to allitinib

Mutation status	N	Sensitive HS+MS (%)	Resistant R (%)	p
<i>KRAS</i>				
WT	55	39 (70.9)	16 (29.1)	0.001
Mutant	20	6 (30)	14 (70)	
<i>NRAS</i>				
WT	73	43 (58.9)	30 (41.1)	0.218
Mutant	2	2 (100)	0 (0)	
<i>EGFR</i>				
WT	72	43 (59.7)	29 (40.3)	0.543
Mutant	4	3 (75)	1 (25)	
<i>PIK3CA</i>				
WT	44	27 (61.4)	17 (38.6)	0.448
Mutant	8	7 (87.5)	1 (12.5)	
<i>PTEN</i>				
WT	30	19 (63.3)	11 (36.7)	0.674
Mutant	9	5 (55.6)	4 (44.4)	
<i>BRAF</i>				
WT	25	9 (36)	16 (64)	0.095
Mutant	7	5 (71.4)	2 (28.6)	

N number of cell lines, $p \chi^2$ value, WT wild-type

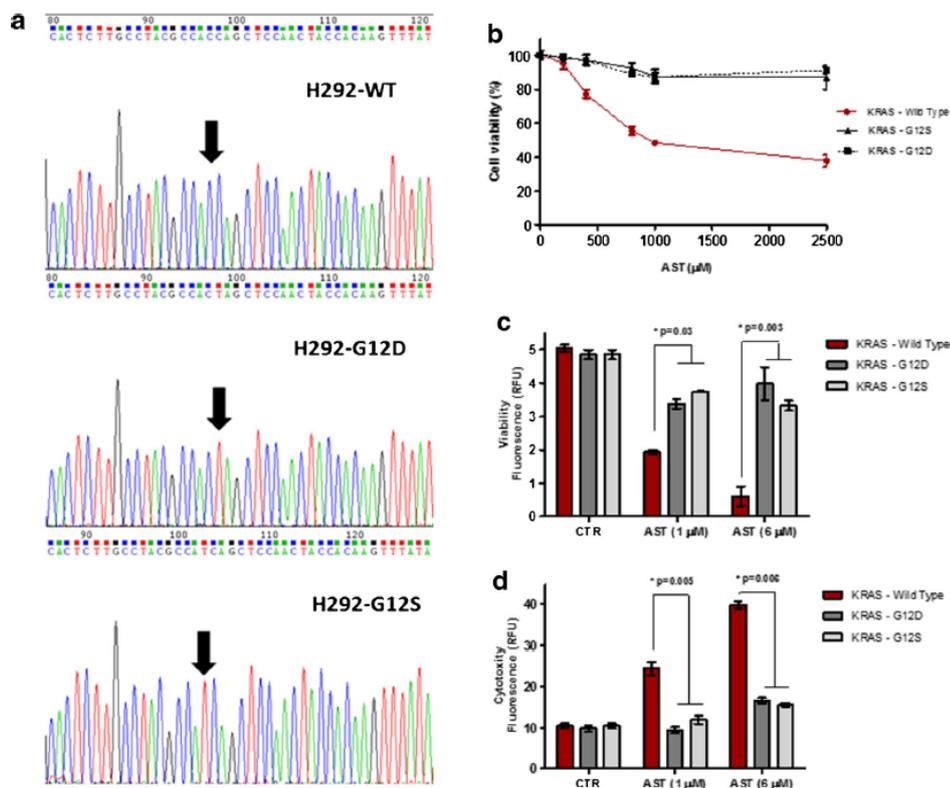


Fig. 2 Viability and cytotoxicity analyses of *KRAS* transfected cell lines (H292-*KRAS*-wt; H292-*KRAS*-G12D and H292-*KRAS*-G12S). (a). Electropherogram of *KRAS* mutant H292 cell lines; (b). Sensitive

response to incremental allitinib (AST) concentrations (MTS assay); Viability (c) and cytotoxicity (d) changes in *KRAS* mutant H292 cell lines exposed to 1 µM and 6 µM allitinib for 72 hours (ApoTox-Glo assay)

Initial preclinical trials have shown that allitinib preferentially inhibits EGFR and HER2, including the erlotinib/gefitinib resistant EGFR T790M mutant form. The IC₅₀ values obtained in these trials were equivalent to those of the recently US FDA approved cancer drug afatinib [26, 56]. Yet, these promising results were obtained in a limited number of cancer-derived cell lines [26]. Here, we extended these initial studies to 76 cancer-derived cell lines corresponding to 11 distinct tumor types. We found that 29 of the cancer-derived cell lines exhibited a high rate of resistance to allitinib, independent of the tumor type. These results thus indicate that the allitinib response is not tumor type dependent, but rather driven by (anomalous) cellular signaling and genetic mutation profiles. Notably, we observed that the *KRAS* mutation status was significantly associated with the allitinib response. This observation was substantiated through stable transfection of the *KRAS* and *EGFR* wild-type lung cancer-derived cell line H292 with plasmids carrying two common *KRAS* mutations (p.G12D and p.G12S), i.e., we found a significant increased resistance to allitinib in both mutant *KRAS* cell lines.

Interestingly, *KRAS* mutations are currently the better surrogate markers for resistance to anti-EGFR monoclonal

antibody therapies, i.e., cetuximab and panitumumab [28, 57]. *KRAS* mutation leads to a constitutive active form of the protein resulting in constant stimulation of downstream signaling pathways, such as the MAPK and AKT pathways, which contribute to cellular proliferation, survival, neoplastic transformation, migration and metastasis [58]. The role of mutant *KRAS* in a cell's response to tyrosine kinase inhibitors, such as gefitinib and erlotinib, is less clear, and its predictive value has been questioned [59]. For these drugs, the most important biomarkers for response are mutations in the tyrosine kinase domain of *EGFR*, specifically in exons 18, 19, 20 and 21, which frequently occur in primary lung adenocarcinomas [60]. Among the cell lines studied, we found that four lines harbored *EGFR* mutations. The HN13 head and neck cancer-derived cell line was found to carry a p.H773Y mutation. This mutation is not known as a hotspot mutation associated with the response of lung cancer cells to gefitinib/erlotinib. We found that the cell line showed resistance to allitinib. The lung cancer-derived cell lines PC9 and NCI-H827 both harbor a hotspot in-frame deletion

of exon 19 and, accordingly, they showed a sensitive response to allitinib. In Asian and Northern American populations deletions in exon 19 account for 45–50 % of the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), and they have been found to be associated with clinical responsiveness to gefitinib [61]. A recent clinical trial (LUX-Lung 3,6) revealed an advantage of afatinib over chemotherapy in NSCLC patients with *EGFR* exon 19 deletions [62]. Finally, we found that the lung cancer-derived cell line NCI-H1975 carries a double p.L858R/p.T790M *EGFR* mutation. The p.T790M *EGFR* mutation is a well-known acquired *EGFR* mutation associated with erlotinib/gefitinib resistance [63]. We found that allitinib exhibited a high efficacy in this cell line. Similar findings were reported by Xie et al. [26] using NIH3T3 cells engineered to express the double p.L858R/p.T790M *EGFR* mutation [26]. These authors also suggested that cell lines exhibiting higher HER2 levels were more sensitive to allitinib.

Allitinib has been entered in a clinical phase I trial for solid tumors and the results of this trial have recently been published [27]. A partial response of patients with breast, lung and gastric cancer was observed, raising high expectations [27]. Based on the present work we believe that other cancers, such as head and neck cancer, melanoma and esophageal cancer, may serve as potential candidates for new allitinib-based clinical trials [64, 65].

In conclusion, the current study represents the largest *in vitro* assessment of allitinib cytotoxicity to date. We identified tumor types that could potentially benefit from this drug and, importantly, suggest that *KRAS* mutations constitute a potential predictive biomarker for allitinib response, thereby constituting a step forward in the selection of patients that will benefit most from allitinib therapy.

Acknowledgments This study was partially supported by FINEP (MCTI/FINEP/MS/SCITE/DECIT-01/2013 - FPXII-BIOPLAT) and the Assistance Program and Incentive Research (PAIP), Barretos Cancer Hospital São Paulo, Brazil. A.L.C and R.M.R are recipients of a National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) scholarship. M.N.R is recipient of a CNPq scholarship (380434/2015-6) and O.C.M is recipient of a Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) scholarship (SFRH/BPD/108351/2015).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Y. Yarden, G. Pines, The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 553–563 (2012)
2. S.L. Jeppe Knudsen, A.S. Wai Mac, L. Henriksen, B. Deurs, L.M. Grovdal, EGFR signaling patterns are regulated by its different ligands. *Growth Factors* **32**, 155–163 (2014)
3. G. Tarcic, Y. Yarden, MAP Kinase activation by receptor tyrosine kinases: in control of cell migration. *Methods Mol. Biol.* **661**, 125–135 (2010)
4. S.B. Prasad, S.S. Yadav, M. Das, A. Modi, S. Kumari, L.K. Pandey, S. Singh, S. Pradhan, G. Narayan, PI3K/AKT pathway-mediated regulation of p27(Kip1) is associated with cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer. *Cell. Oncol.* **38**, 215–225 (2015)
5. F. Ciardiello, N. Kim, T. Saeki, R. Dono, M.G. Persico, G.D. Plowman, J. Garrigues, S. Radke, G.J. Todaro, D.S. Salomon, Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7792–7796 (1991)
6. F.R. Hirsch, M. Varella-Garcia, P.A. Bunn Jr., M.V. Di Maria, R. Veve, R.M. Bremmes, A.E. Baron, C. Zeng, W.A. Franklin, Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3798–3807 (2003)
7. L. Sweeny, N.R. Dean, J.S. Magnuson, W.R. Carroll, E.E. Helman, S.O. Hyde, R.L. Desmond, E.L. Rosenthal, EGFR expression in advanced head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck* **34**, 681–686 (2012)
8. M.L. Fjallskog, M.H. Lejonklou, K.E. Oberg, B.K. Eriksson, E.T. Janson, Expression of molecular targets for tyrosine kinase receptor antagonists in malignant endocrine pancreatic tumors. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1469–1473 (2003)
9. J.S. Reis-Filho, C. Pinheiro, M.B. Lambros, F. Milanezi, S. Carvalho, K. Savage, P.T. Simpson, C. Jones, S. Swift, A. Mackay, R.M. Reis, J.L. Hornick, E.M. Pereira, F. Baltazar, C.D. Fletcher, A. Ashworth, S.R. Lakhani, F.C. Schmitt, EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J. Pathol.* **209**, 445–453 (2006)
10. D.A. Bax, N. Gaspar, S.E. Little, L. Marshall, L. Perryman, M. Regairaz, M. Viana-Pereira, R. Vuononvirta, S.Y. Sharp, J.S. Reis-Filho, J.N. Stavale, S. Al-Sarraj, R.M. Reis, G. Vassal, A.D. Pearson, D. Hargrave, D.W. Ellison, P. Workman, C. Jones, EGFRvIII deletion mutations in pediatric high-grade glioma and response to targeted therapy in pediatric glioma cell lines. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5753–5761 (2009)
11. M. Viana-Pereira, J.M. Lopes, S. Little, F. Milanezi, D. Basto, F. Pardal, C. Jones, R.M. Reis, Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res.* **28**, 913–920 (2008)
12. K. Iida, K. Nakayama, M.T. Rahman, M. Rahman, M. Ishikawa, A. Katagiri, S. Yeasmin, Y. Otsuki, H. Kobayashi, S. Nakayama, K. Miyazaki, EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *Br. J. Cancer* **105**, 420–427 (2011)
13. R. Zandi, A.B. Larsen, P. Andersen, M.T. Stockhausen, H.S. Poulsen, Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell. Signal.* **19**, 2013–2023 (2007)
14. K. Kobayashi, K. Hagiwara, Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Target. Oncol.* **8**, 27–33 (2013)
15. H.K. Gan, A.H. Kaye, R.B. Luwor, The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* **16**, 748–754 (2009)
16. B.S. Paugh, X. Zhu, C. Qu, R. Endersby, A.K. Diaz, J. Zhang, D.A. Bax, D. Carvalho, R.M. Reis, A. Onar-Thomas, A. Broniscer, C. Wetmore, J. Zhang, C. Jones, D.W. Ellison, S.J. Baker, Novel oncogenic PDGFRA mutations in pediatric high-grade gliomas. *Cancer Res.* **73**, 6219–6229 (2013)
17. K. Laimer, G. Spizzo, G. Gastl, P. Obrist, T. Brunhuber, D. Fong, V. Barbieri, S. Jank, W. Doppler, M. Rasse, B. Norer, High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell

- carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 43, 193–198 (2007)
18. A.W. Burgess, Y.I. Henis, N.E. Hynes, T. Jovin, A. Levitzki, R. Pinkas-Kramarski, Y. Yarden, EGF receptor family: twisting targets for improved cancer therapies. *Growth Factors* 32, 74–81 (2014)
 19. S.H. Ou, Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): a better mousetrap? a review of the clinical evidence. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 83, 407–421 (2012)
 20. E. Raymond, S. Faivre, J.P. Armand, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 60 (Suppl 1), 15–23 (2000), discussion 41–42
 21. A. Argiris, M. Ghebremichael, J. Gilbert, J.W. Lee, K. Sachidanandam, J.M. Kolesar, B. Burtneess, A.A. Forastiere, Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial. *J. Clin. Oncol.* 31, 1405–1414 (2013)
 22. R.T. Dungo, G.M. Keating, Afatinib: first global approval. *Drugs* 73, 1503–1515 (2013)
 23. S.M. Kim, M.R. Yun, Y.K. Hong, F. Solca, J.H. Kim, H.J. Kim, B.C. Cho, Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with T790M mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2145–2156 (2013)
 24. A. Passaro, B. Gori, F. de Marinis, Afatinib as first-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations: focus on LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6 phase III trials. *J. Thorac. Dis.* 5, 383–384 (2013)
 25. N.U. Lin, E.P. Winer, D. Wheatley, L.A. Carey, S. Houston, D. Mendelson, P. Munster, L. Frakes, S. Kelly, A.A. Garcia, S. Cleator, M. Uttenreuther-Fischer, H. Jones, S. Wind, R. Vinisko, T. Hickish, A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 1057–1065 (2012)
 26. H. Xie, L. Lin, L. Tong, Y. Jiang, M. Zheng, Z. Chen, X. Jiang, X. Zhang, X. Ren, W. Qu, Y. Yang, H. Wan, Y. Chen, J. Zuo, H. Jiang, M. Geng, J. Ding, AST1306, a novel irreversible inhibitor of the epidermal growth factor receptor 1 and 2, exhibits antitumor activity both in vitro and in vivo. *PLoS One* 6, e21487 (2011)
 27. J. Zhang, J. Cao, J. Li, Y. Zhang, Z. Chen, W. Peng, S. Sun, N. Zhao, J. Wang, D. Zhong, X. Zhang, J. Zhang, A phase I study of AST1306, a novel irreversible EGFR and HER2 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J. Hematol. Oncol.* 7, 22 (2014)
 28. S. Siena, A. Sartore-Bianchi, F. Di Nicolantonio, J. Balfour, A. Bardelli, Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 1308–1324 (2009)
 29. M.S. Tsao, A. Sakurada, K. Ding, S. Aviel-Ronen, O. Ludkovski, N. Liu, A. Le Maitre, D. Gandara, D.H. Johnson, J.R. Rigas, L. Seymour, F.A. Shepherd, Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutation status and gene copy number for adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 6, 139–147 (2011)
 30. K. Takezawa, I. Okamoto, J. Tanizaki, K. Kuwata, H. Yamaguchi, M. Fukuoka, K. Nishio, K. Nakagawa, Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1647–1656 (2010)
 31. W. De Roock, B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilas, K.T. Kalogerias, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P. Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari, P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J. Tabernero, T. Macarulla, F. Di Fiore, A.O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C. Qvortrup, T.P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M. Delorenzi, S. Tejpar, Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 11, 753–762 (2010)
 32. Z.X. Yuan, X.Y. Wang, Q.Y. Qin, D.F. Chen, Q.H. Zhong, L. Wang, J.P. Wang, The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *PLoS One* 8, e65995 (2013)
 33. S.M. Kim, O.J. Kwon, Y.K. Hong, J.H. Kim, F. Solca, S.J. Ha, R.A. Soo, J.G. Christensen, J.H. Lee, B.C. Cho, Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces de novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2254–2264 (2012)
 34. L.B. Cardeal, E. Boccardo, L. Termini, T. Rabachini, M.A. Andreoli, C. di Loreto, A. Longatto Filho, L.L. Villa, S.S. Maria-Engler, HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One* 7, e33585 (2012)
 35. V. Kannen, H. Hintzsche, D.L. Zanette, W.A. Silva Jr., S.B. Garcia, A.M. Waaga-Gasser, H. Stopper, Antiproliferative effects of floxetine on colon cancer cells and in a colonic carcinogen mouse model. *PLoS One* 7, e50043 (2012)
 36. B.M. Costa, J.S. Smith, Y. Chen, J. Chen, H.S. Phillips, K.D. Aldape, G. Zardo, J. Nigro, C.D. James, J. Fridlyand, R.M. Reis, J.F. Costello, Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. *Cancer Res.* 70, 453–462 (2010)
 37. D.A. Bax, S.E. Little, N. Gaspar, L. Perryman, L. Marshall, M. Viana-Pereira, T.A. Jones, R.D. Williams, A. Grigoriadis, G. Vassal, P. Workman, D. Sheer, R.M. Reis, A.D. Pearson, D. Hargrave, C. Jones, Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One* 4, e5209 (2009)
 38. M. Cardinali, H. Pietraszkiewicz, J.F. Ensley, K.C. Robbins, Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int. J. Cancer* 61, 98–103 (1995)
 39. M.F. Calmon, R.V. Rodrigues, C.M. Kaneto, R.P. Moura, S.D. Silva, L.D. Mota, D.G. Pinheiro, C. Torres, A.F. de Carvalho, P.M. Cury, F.D. Nunes, I.N. Nishimoto, F.A. Soares, A.M. da Silva, L.P. Kowalski, H. Brentani, C.F. Zanelli, W.A. Silva Jr., P. Rahal, E.H. Tajara, D.M. Carraro, A.A. Camargo, S.R. Valentini, Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. *Neoplasia* 11, 1329–1339 (2009)
 40. P.T. Hennessey, M.F. Ochs, W.W. Mydlarz, W. Hsueh, L. Cope, W. Yu, J.A. Califano, Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts. *PLoS One* 6, e20584 (2011)
 41. J.F. Sousa, R. Torrieri, R.R. Silva, C.G. Pereira, V. Valente, E. Torrieri, K.C. Peronni, W. Martins, N. Muto, G. Francisco, C.A. Brohem, C.G. Carlotti Jr., S.S. Maria-Engler, R. Chammass, E.M. Espreafico, Novel primate-specific genes, RMEL 1, 2 and 3, with highly restricted expression in melanoma, assessed by new data mining tool. *PLoS One* 5, e13510 (2010)
 42. J. Afonso, L.L. Santos, V. Miranda-Goncalves, A. Morais, T. Amaro, A. Longatto-Filho, F. Baltazar, CD147 and MCT1-potential partners in bladder cancer aggressiveness and cisplatin resistance. *Mol. Carcinog.* 54, 1451–1466 (2015)
 43. F. Morais-Santos, V. Miranda-Goncalves, S. Pinheiro, A.F. Vieira, J. Paredes, F.C. Schmitt, F. Baltazar, C. Pinheiro, Differential

- sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines. *Endocr. Relat. Cancer*. 21, 27–38 (2014)
44. O. Martinho, F. Pinto, S. Granja, V. Miranda-Goncalves, M.A. Moreira, L.F. Ribeiro, C. di Loreto, M.R. Rosner, A. Longatto-Filho, R.M. Reis, RKIP inhibition in cervical cancer is associated with higher tumor aggressive behavior and resistance to cisplatin therapy. *PLoS One* 8, e59104 (2013)
 45. V. Silva, M. Rosa, A. Tansini, J. Lima, C. Jones, L. Pianowski, R. Reis, Cytotoxic activity of semi-synthetic ingenol derived from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer cell lines. *J. Clin. Oncol.* 31, (2013)
 46. R.M. Reis, V.A.O. Silva, M.N. Rosa, A. Tansini, J.P.D.S.N. Lima, P.L.F.C. Jones, Cytotoxic effect of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human. cancer cell lines. *J. Clin. Oncol.* 31, abstract (2013)
 47. O. Martinho, R. Silva-Oliveira, V. Miranda-Goncalves, C. Clara, J.R. Almeida, A.L. Carvalho, J.T. Barata, R.M. Reis, In vitro and in vivo analysis of RTK inhibitor efficacy and identification of its novel targets in glioblastomas. *Transl. Oncol.* 6, 187–196 (2013)
 48. R.H. Shoemaker, The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6, 813–823 (2006)
 49. F. Pinto, N. Pertega-Gomes, M.S. Pereira, J.R. Vizcaino, P. Monteiro, R.M. Henrique, F. Baltazar, R.P. Andrade, R.M. Reis, T-box transcription factor brachyury is associated with prostate cancer progression and aggressiveness. *Clin. Cancer Res.* 20, 4949–4961 (2014)
 50. G.E. Konecny, R. Glas, J. Dering, K. Manivong, J. Qi, R.S. Finn, G.R. Yang, K.L. Hong, C. Ginther, B. Winterhoff, G. Gao, J. Brugge, D.J. Slamon, Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer* 101, 1699–1708 (2009)
 51. L.S. Yamane, C. Scapulatempo-Neto, L. Alvarenga, C.Z. Oliveira, G.N. Berardinelli, E. Almodova, T.R. Cunha, G. Fava, W. Colaiacovo, A. Melani, J.H. Fregnani, R.M. Reis, D.P. Guimaraes, KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. *Oncol. Rep.* 32, 1419–1426 (2014)
 52. O. Martinho, A. Gouveia, M. Viana-Pereira, P. Silva, A. Pimenta, R.M. Reis, J.M. Lopes, Low frequency of MAP kinase pathway alterations in KIT and PDGFRA wild-type GISTs. *Histopathology* 55, 53–62 (2009)
 53. The Roche Cancer Genome Database, 2014 [cited 2014; Available from: <http://rcgdb.bioinf.uni-sb.de/MutomeWeb/>(2014)
 54. W.G. Dirks, S. Faehrich, I.A. Estella, H.G. Drexler, Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX* 22, 103–109 (2005)
 55. M. Monticone, E. Biollo, M. Maffei, A. Donadini, F. Romeo, C.T. Storlazzi, W. Giaretti, P. Castagnola, Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context. *Mol. Cancer* 7, 92 (2008)
 56. D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L.R. Chirieac, R.F. Padera, G.I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W.J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, K.K. Wong, BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 27, 4702–4711 (2008)
 57. A. Lievre, J.B. Bachet, D. Le Corre, V. Boige, B. Landi, J.F. Emile, J.F. Cote, G. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca, P. Laurent-Puig, KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992–3995 (2006)
 58. Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, D. Bar-Sagi, RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 11, 761–774 (2011)
 59. P.J. Roberts, T.E. Stinchcombe, KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *J. Clin. Oncol.* 31, 1112–1121 (2013)
 60. A.F. Gazdar, Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28(Suppl 1), S24–31 (2009)
 61. T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Hasserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, D.A. Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139 (2004)
 62. J.C. Yang, Y.L. Wu, M. Schuler, M. Sebastian, S. Popat, N. Yamamoto, C. Zhou, C.P. Hu, K. O'Byrne, J. Feng, S. Lu, Y. Huang, S.L. Geater, K.Y. Lee, C.M. Tsai, V. Gorbunova, V. Hirsh, J. Bennouna, S. Orlov, T. Mok, M. Boyer, W.C. Su, K.H. Lee, T. Kato, D. Massey, M. Shahidi, V. Zazulina, L.V. Sequist, Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol.* 16, 141–151 (2015)
 63. N. Godin-Heymann, I. Bryant, M.N. Rivera, L. Ulkus, D.W. Bell, D.J. Riese 2nd, J. Settleman, D.A. Haber, Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer Res.* 67, 7319–7326 (2007)
 64. S. Derks, B. Diosdado, Personalized cancer medicine: next steps in the genomic era. *Cell Oncol.* 38, 1–2 (2015)
 65. L. Prudkin, P. Nuciforo, Obstacles to precision oncology: confronting current factors affecting the successful introduction of biomarkers to the clinic. *Cell Oncol.* 38, 39–48 (2015)

ANEXO D

Artigo em preparação para envio a revista Oncotarget

AKT can modulate the *in vitro* response of HNSCC cells to irreversible EGFR inhibitors

Renato José Silva-Oliveira¹; Matias Melendez¹; Olga Martinho^{1,2,3}; Maicon F. Zanon¹, Luciano de Souza Viana^{1,4}; André Lopes Carvalho¹; Rui Manuel Reis^{1,2,3} *

¹Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil; ²Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, Portugal; ³ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal; ⁴Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil.

Abstract

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in up to 90% of head and neck cancer patients. Activating mutations are uncommon and *EGFR* gene amplification has been related in 24-58% of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Cetuximab was the first monoclonal antibody against EGFR approved for the treatment of locally advanced HNSCC, however showed limited success with development of acquired resistance. The new generation of irreversible tyrosine kinase inhibitors targeting HER receptors, such as afatinib and allitinib, represents a promising therapeutic approach for HNSCC patient's treatment. In this study, we intent first to determine the cytotoxicity of these inhibitors in comparison with cetuximab and secondly to identify the potential predictive biomarkers of response to afatinib and allitinib in a panel of eight HNSCC cell lines. Accordingly to the growth inhibition score (GI), allitinib was the most cytotoxic drug, with five cell lines exhibiting resistance to cetuximab, four to afatinib and three to allitinib. Both therapies did not diminished AKT phosphorylation levels in HN13 resistant cell line, but in combination with MK2206 (anti-AKT drug) restored afatinib and allitinib sensitivity. Moreover, when *AKT1* was silenced, afatinib and allitinib induced decreased viability and increased cytotoxicity through caspases 3/7 activation. Additionally, *in silico* analysis of TCGA database showed that *AKT1* overexpression was present in 14.7% (41/279) of HNSCC cases, and was associated with perineural invasion in advanced stages. In conclusion, allitinib presents a greater cytotoxic profile than afatinib and cetuximab, and AKT pathway activation modulates allitinib therapy response. Importantly, the combination of allitinib and afatinib with AKT inhibitor can restore *in vitro* the response of resistant cells.

Introduction

Head and neck cancer comprises a group of malignancies that occurs mainly within the oral cavity, pharynx, and larynx [1]. This group represents the sixth most common cancer worldwide, with approximately 600,000 new cases diagnosed every year [1]. Squamous cell carcinoma is the most common (90–95%) histological type that arises in the mucous membrane of the upper aerodigestive tract [2]. The primary risk factors associated with head and neck cancer include tobacco use, alcohol consumption, human papillomavirus (HPV) infection (for oropharyngeal cancer), and Epstein-Barr virus (EBV) infection (for nasopharyngeal cancer)[2]. Differences in clinicopathological, molecular features and prognoses have been reported in HNSCC patients HPV-positive and negative [3, 4].

Alterations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) is one of major events in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) subtype, being overexpressed in 90% of patients [5]. Despite the high levels of EGFR overexpression, activating *EGFR* mutations are not frequent and *EGFR* gene amplification is reported in 24-58% of HNSCC [6-8]. Therefore, EGFR has become an important therapeutic target in HNSCC [9]. Several anti-EGFR therapeutic approaches, such as anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine

kinase inhibitors (EGFR-TKIs), have been developed and some of them approved for the treatment of solid tumors [10, 11]. Cetuximab (Erbix[®], Bristol-Myers Squibb; New York, NY), a chimeric monoclonal antibody, which recognizes and binds to the ectodomain of EGFR, preventing its phosphorylation, was one of the first successful drugs in cancer [12]. Cetuximab is currently approved in combination with radiation for the treatment of locally advanced HNSCC and in combination with platinum-based chemotherapy for the treatment of recurrent and/or metastatic HNSCC [13]. Nevertheless, cetuximab treatment has been shown limited success in HNSCC patients [14, 15]. A recent comprehensive revision reported that cetuximab in combination with platinum-based chemoradiation (CRT) does not lead to an improved outcome survival [16].

More recently, potent pan-HERs inhibitors and irreversible EGFR-TKIs molecules, such as afatinib (Gilotrif[®], Boehringer Ingelheim, Inc.) and allitinib (Allist Pharmaceuticals Inc.), have been developed and tested in pre-clinical and clinical trials [17, 18]. Afatinib was specially designed against *EGFR* secondary mutation T790M, and thus approved for non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) treatment [19], having also affinity to other EGFR family member proteins (HER2 and HER4) displaying a significant antineoplastic

activity *in vitro* and *in vivo* [20]. The initial phase I clinical trials reported preliminary antineoplastic properties in patients with advanced solid tumor [17]. Moreover, a phase III trial in HNSCC patients (LUX-Head&Neck) have compared the efficacy and safety of afatinib as adjuvant therapy [18].

To better identify the patients that could benefit from such targeted therapies several works studied the potential predictive biomarkers, yet without clear results for HNSCC patients [21, 22]. In colorectal cancer patients, it has been shown that activating mutations of *KRAS* – an EGFR downstream effector - predicts resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies therapy in metastatic patients [23, 24]. Patients carrying wild-type *KRAS* showed a two times progression-free survival than the mutant ones [23, 24]. Additionally, patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus chemotherapy, harboring *BRAF*, *NRAS* and *PIK3CA* (exon 20) mutations, had a significantly lower response rate, pointing out the role of alterations in the intracellular pathways for cetuximab response prediction [25, 26]. In HNSCC, *KRAS* mutations are present at very low frequency [4], and the markers of cetuximab therapy prediction in HNSCC are still unknown. Interestingly, our group analyzed the cytotoxic effect of allitinib in a large panel of solid tumor cell lines, and

also identified *KRAS* mutation as a biomarker of allitinib resistance (ref)

Herein, we aimed to compare the potential cytotoxicity of two irreversible anti-EGFR inhibitors (afatinib and allitinib) with cetuximab and to identify potential predictive biomarkers of response in a panel of HNSCC cell lines.

RESULTS

Molecular profile of HNSCC cell lines

The analysis of ErbB family proteins revealed different patterns of expression in HNSCC cell lines. Under basal conditions, HN13, SCC25 and JHU28 showed EGFR phosphorylation, and any cell line exhibit HER2 phosphorylation (Figure 1A). Concerning HER4, the SCC4 and FADU cell lines display HER4

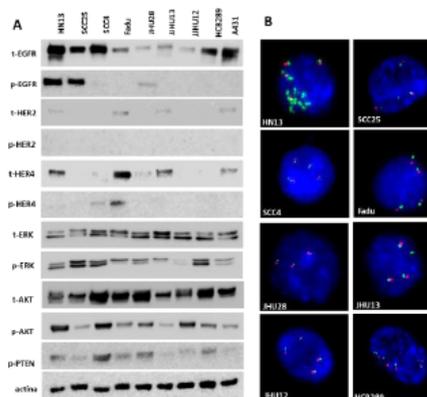
phosphorylation (Figure 1A). We also analyzed AKT and MAPK intracellular pathways, being activated in all cell lines, however with different levels of phosphorylation. Moreover 3 out of 7 established cell lines showed absence of total PTEN protein expression, HCB289 primary HNSCC cell line, showed low rates of total PTEN expression (Figure 1A).

Table 01. HNSCC cell line classification, mutation, amplification status and response to anti-EGFR therapies.

Cell line	Anatomic site	KRAS Mutation	EGFR Mutation	EGFR amplification	NRAS Mutation	BRAF Mutation	PIK3CA Mutation	PTEN Mutation	Cetuximab ($\mu\text{g/mL}$)	Afatinib (nM)	Allitinib (nM)
HN13	Tongue	WT	p.H773Y	Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	>1000	>1000
JHU12	Oral Cavity	WT	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	>1000	>1000
JHU28	n.a	p.G12S	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	>1000	>1000
JHU13	n.a	WT	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	472.60 \pm 10.6	388.94 \pm 15.4
FADU	Hypopharynx	WT	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	774.41 \pm 11.7	384.07 \pm 19.0
SCC25	Oral Cavity	WT	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	216.85 \pm 15.4	224.70 \pm 18.4	207.29 \pm 11.6
SCC4	Oral Cavity	WT	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	115.32 \pm 9.5	217.68 \pm 16.1
HCB289	Oral Cavity	WT	WT	No Ampli.	WT	WT	WT	WT	> 250	>1000	845.32 \pm 11.5
A431	Skin/epidermis	WT	WT	n.a	WT	WT	WT	WT	128.0 \pm 2.64	156.92 \pm 17.3	121.31 \pm 3.21

n.a: not available; WT: wild type; nM: nanomolar,

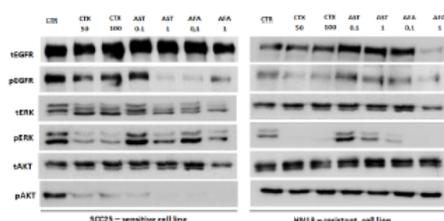
The mutational status of *EGFR*, *KRAS* and *NRAS* was previously performed by our group in the established cell lines [21], showing the presence of an *EGFR* missense mutation (p.H773Y) in HN13 cell line, and a *KRAS* mutation (p.G12S) in the JHU28 cell line (Table 1). Here, the analysis of *BRAF*, *PIK3CA* and *PTEN* genes, did not showed additional mutations (Table 1). Analyzing *EGFR* gene amplification we found that only HN13 cell line have an EGFR:CEN7 signal ratio >4, being in this way classified as EGFR-amplified (Table 1 and Figure 1B).



Viability effect of Cetuximab, afatinib and allitinib in HNSCC cell lines

Cellular viability analysis to defined cytotoxic concentrations of cetuximab (0 to 250 $\mu\text{g/mL}$) showed that only the positive control of drug sensitivity cell line A431 (IC_{50} = 128.0 \pm 2.64 $\mu\text{g/mL}$) and the HNSCC SCC25 (IC_{50} = 216.85 \pm

regulating the response rates of the cells to the drugs.



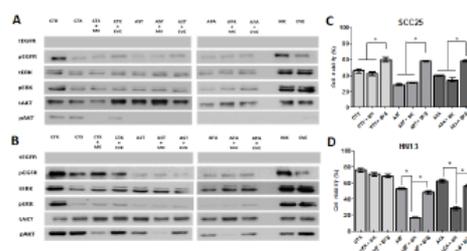
Inhibition of AKT pathway can revert resistance to anti-EGFR TKIs

To further test our assumption, we first combined the anti-EGFR agents (cetuximab, afatinib and allitinib) with an AKT inhibitor (MK2206) and mTOR inhibitor (Everolimus) in the same sensitive (SCC25) and resistant (HN13) cell line (Figure 4). We observed that for SCC25 cell line, the combination with MK2206 showed no differences on cellular viability (Figure 4C), whereas for HN13, the combination of MK2206 with afatinib and allitinib, showed a significant decrease of cellular viability when compared to the effect of the drugs alone (Figure 4D). Unexpectedly, we observed that everolimus led to an increase on cellular viability upon combination with EGFR inhibitors on SCC25 cell line, while no effect was observed in the HN13 cell line (Figure 4C and 4D).

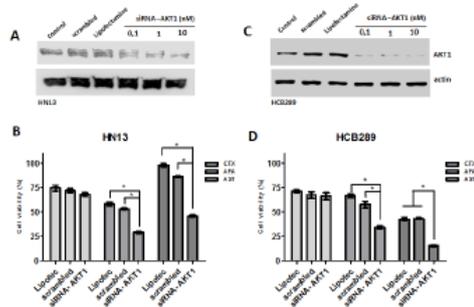
Additionally, we assessed the potential inhibition of the combined drugs in the intracellular phosphorylation levels (Figure 4A and 4B). In SCC25 cell line (Figure 4A), MK2206 inhibit totally AKT phosphorylation in combination with all anti-EGFR drugs, although in

HN13 cell line (Figure 4B) the effect of MK2206 combination showed a total AKT inhibition only for irreversible inhibitors afatinib and allitinib, and diminished its levels in combination with cetuximab. We also found that the combination with everolimus did not changed the levels of the proteins analyzed (Figure 4B).

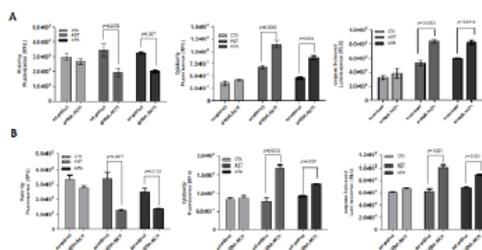
Interestingly, we could observe that treatment with MK2206 and everolimus alone does not fully reduced the AKT phosphorylation levels in resistant HN13 cell line (Fig. 4A and 4B).



To further validate the role of AKT in response to the irreversible anti-EGFR TKIs, the HN13 (resistant phenotype) and HCB289 (resistant phenotype) cell lines were transiently transfected with *AKT1* siRNA (Figure 5A) and exposed to cetuximab (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), allitinib and afatinib (1000 nM). We observed that both *AKT* knockdown cell lines showed reduction on cellular viability when exposed to allitinib and afatinib inhibitor, but not when treated with cetuximab (Figure 5B and D), corroborating our combination findings with AKT pharmacological inhibition (MK2206).



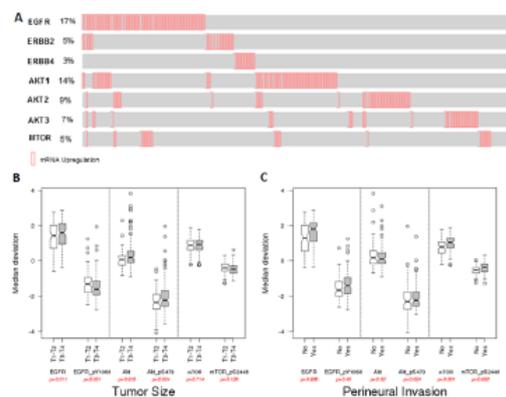
Furthermore, viability, cytotoxicity and cell death was determined by a fluorescence triple assay in the *AKT1* modulated cell lines exposed to the three EGFR inhibitors. Upon cetuximab treatment none of the cell lines showed significant cellular changes (Figure 6A and 6B). At variance, following exposure to both afatinib and allitinib both HN13 (Figure 6A) and HCB289 (Figure 6B) cell lines showed a significant decreased on cellular viability, increased cytotoxicity, and increased caspase 3/7 activation. These results demonstrated that AKT could have a key role on HNSCC cell lines response to afatinib and allitinib drugs.



In silico analysis of ErbB family, AKT and mTOR in HNSCC patients

Analysis of TCGA database showed that EGFR is overexpressed in 17% (47/279) of the HNSCC patients, and the other ErbB family

members, such as ErbB2 (5% - 15/279) and ErbB4 (3% - 8/279) are also overexpressed but at lower frequency. Interestingly, ErbB family overexpression is almost mutually exclusive. We also wondered about the expression of the AKT isoforms and observed that the highest expression levels were found for AKT1 (14.7% - 41/279) (Figure 7A). Moreover, we measured gene expression levels of mTOR that were upregulated in 6% of the patients (16/279). We found that increased EGFR expression and AKT (pS473) phosphorylation were significantly associated with tumor size in T3-T4 stage patients (Figure 7B). Furthermore, AKT1 phosphorylation and total or phosphorylated mTOR were associated with increase on perineural invasion (Figure 7C).



DISCUSSION

EGFR inhibitors are the most promising agents in HNSCC treatment [8]. Cetuximab, was one of the first drugs developed, and currently the only approved anti-EGFR agent by FDA for

HNSCC patients [27]. However, a fraction of HNSCC patients demonstrate a partial or negative response to cetuximab and the critical mechanisms of response remains to be determined [28]. More recently, other classes of EGFR inhibitors have been developed namely irreversible tyrosine kinase inhibitors (irreversible-TKI), such as afatinib and allitinib. Despite to great expectations associated with this novel generation of agents, predictive biomarkers of response are still unknown, hampering the establishment of their rational personalized use. In the present study we aimed to compare the efficacy of these three anti-EGFR drugs in a panel of 8 HNSCC cell lines, and further identified potential predictive biomarkers of response. As expected, we observed that cetuximab was the less effective agent exhibiting a resistance phenotype with the exception for SCC25 cell line. At variance, half of the cell lines exhibited a sensitive response to afatinib (two highly-sensitive, and two moderate sensitive), and allitinib was the most efficient in which five cell lines displayed a sensitive behavior (three highly-sensitive, and two moderate sensitive). Primary cell cultures are the ideal approach to specifically investigate cytotoxicity, since they better mimic the tumor features. Here, we showed that the primary culture HCB289 was sensitive (HS) only for the irreversible inhibitor allitinib. From all this results we consider that HNSCC cells are most

sensitive to irreversible TKIs, compared to cetuximab.

In vitro and *in vivo* approaches have already shown the anti-proliferative effect of afatinib in combination with radiation in a xenograft model of FADU cell line [29]. Although not tested in HNSCC cell lines, preliminary studies using allitinib showed a significant antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo* breast, lung and ovarian cancer models, revealing its therapeutic potential [20]. Recently, our group demonstrated the potential cytotoxicity effect of allitinib in a large panel of 76 cancer cell line in which head and neck, esophagus, melanoma and lung cancer cell lines exhibit a sensitive profile to allitinib.

Afatinib is an irreversible inhibitor of the ErbB family receptors (EGFR, HER2 and ErbB4) and approved to the treatment of NSCLC harboring activating EGFR mutations, exon 19 deletions or L858R mutation [30].

Although we found an EGFR mutation p.H773Y and amplification in HN13 cell line, no EGFR alterations were found in the other resistant cell lines, JHU28 and JHU13. Nevertheless no p.H773Y mutation was detected in HNSCC tumor cell line, however this mutation is rare in HNSCC patients. One mutation in *KRAS* gene (p.G12S) was detected in JHU28 cell line, which was classified as resistant to all anti-EGFR therapies. Interestingly, *KRAS* mutation status is

predictive of response to cetuximab therapy in metastatic colorectal cancer patients [31, 32].

EGFR copy number variation (CNV) it has been detected in genomic characterizations of HNSCC, being present in 11% (31/279) of the patients [4] and increase levels of the EGFR were founded in cetuximab-resistance cell lines [33].

According to TCGA data, *KRAS* mutations are rare in HNSCC patients 0% (1/279)[4] and is not a predictive biomarker of resistance to this particular treatment. Intracellular pathways downstream of EGFR have been identified as plays a central role in numerous cellular processes and addiction, in therapeutic response to cetuximab [34, 35]. We found in SCC25 sensitive cell line, reduced phosphorylation levels of the EGFR, when exposed to TKIs but not in presence to cetuximab, further ERK phosphorylation levels are unchanged in the presence of these inhibitors and AKT phosphorylation was totally inhibited by irreversible inhibitors. However, in HN13 resistant cell line, we detected a persistent AKT phosphorylation for both inhibitors tested. We hypothesized that combination with AKT (MK2206) and mTOR (everolimus) inhibitors can increase the response to anti-EGFR agents. We showed that combination with AKT inhibitors, reduced AKT phosphorylation levels and restores afatinib and allitinib sensitivity to irreversible TKIs in HN13 resistant cell line. Unlike, allitinib or

afatinib combined with everolimus, did not result in total blockage of AKT phosphorylation. Furthermore, everolimus alone increased the AKT phosphorylation levels. Recent clinical trial have found a positive association between cetuximab and everolimus that showed an increased response rate that suggests a favorable clinical efficacy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck [36]. Contrary, erlotinb and everolimus combination did not show benefits to patients with platinum-resistant HNSCC [37]. Most recently, a phase I clinical trial conducted in HNSCC patients to evaluate the efficacy of MK2206 in combination with carboplatin/paclitaxel, docetaxel, or erlotinib showed tolerable levels of the cytotoxicity, beyond antineoplastic effect [38]. Also, the *in vivo* SCC1-orthotopic tongue model, treated with AKT inhibitor, showed a reduced tumor size and a preventive effect in metastasis. Recent phase I clinical trial was conducted in patients with advanced solid tumors (NCT00848718). Among the patients, 2 patients received the MK2206 combination with carboplatin and paclitaxel, docetaxel, or erlotinib and showed a tolerable side effect profile and a complete and partial response [38]. Our results provide a strong evidence that irreversible anti-EGFR (TKIs) inhibitors in combination with MK2206 promotes a potential benefit for unresponsive cells.

Complementary, we evaluated the influence of AKT1 silencing in response to EGFR

inhibitors. PI3-kinase phosphorylation lead to AKT phosphorylation at two conserved residues (Thr308 and Ser473) that triggers intracellular pathways regulation of metabolism, survival and proliferation [39]. AKT1 isoform expression has been reported in gastric [40] and prostate cancer [41], and somatic mutation in pleckstrin homology domain (PHD) of AKT1 was reported in human breast, colorectal and ovarian cancers [42]. We found, that AKT1 knockdown in HN13 and primary HCB289 cell lines restores the response to allitinib and afatinib but not to cetuximab. Additionally, AKT1 silencing induces a decrease of cellular viability and increase of cytotoxicity, measured by sensitive fluorescent assay. Moreover, active caspase-3 levels were higher in HN13 and HCB289 AKT1-knockdown cell lines. A recent study, conducted in 10 primary oral squamous cell carcinoma (OSCC), showed that knockdown of AKT1 reduced growth rate, besides inducing the expression of the tumor suppressor gene CDKN2B and TGFBR1 associated a malignant phenotype [43].

We further evaluated the mRNA expression of the *EGFR*, *ErbB2*, *ErbB4*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT3* and *mTOR* genes in HNSCC patients from TCGA data. As expected, HNSCC patients displayed an upregulation of EGFR mRNA and moreover, we found 5% and 3% of upregulation of other ErbB family which are target of the new inhibitor allitinib. AKT1 isoform is predominant upregulated in HNSCC and besides being

associated with radioresistance mechanisms in HNSCC patients [44], more specifically AKT(Ser473) residue has been used as biomarker to identify HNSCC patients with high risk for treatment failure following radiotherapy [45]. A similar study show that AKT activation in combination with the absence of EGFR internalization/degradation may contribute to cetuximab resistance in HNSCC cell line [35].

Additionally, we associate the phosphorylation levels of proteins with clinical pathological data. Initially, we found a statistical correlation between EGFR_pY1068 phosphorylation levels with tumor size that showed a decrease of phosphorylation levels in T3 and T4 stages compare to initial stages of the HNSCC. Although the prognostic of HNSCC is broadly based upon the tumor size and location and the presence of lymph node metastases the subset of the patients can demonstrate different genetic signature. A subset of HNSCC patients showed benefits from EGFR inhibitor according to expression of set genes (*TGF α* , *MKK6* and *FGF-BP*) involving the pathway, in differences stages of these disease [46]. We showed that AKT phosphorylation levels are significant increase in advanced stage (T3 and T4). This finding suggests that combined use of AKT inhibitors may be a promising for HNSCC patients treatment at this stage, supported for *in vitro* and *in vivo* approaches that used AKT inhibitor (MK2206) that demonstrated efficient reduces primary

tumor size and cervical metastasis while improving survival [47].

Perineural tumor growth is a frequent event associated with extension described in many cancers including HNSCC [48] and is significantly associated with local recurrence and disease-specific mortality [49], showing elevated incidence rates from 14% to 63.2% in HNSCC [48]. Our results showed an increase in phosphorylation levels of the EGFR, AKT and mTOR proteins in perineural invasion status. Until, AKT phosphorylation levels were never associated with perineural invasion in HNSCC patients and this finding enhanced the rational use of the t anti-AKT therapy combination may benefit HNSCC patients treated with TKIs of new generation such as afatinib and allitinib.

In conclusion, our study constitutes the first comparative study of the efficacy of two irreversible anti-EGFR inhibitors afatinib and allitinib in HNSCC cell lines. Our results confirm the potent antineoplastic action of allitinib. Importantly, we identified that persistent AKT activation can play a key role in resistance to the new class of the irreversible anti-EGFR drugs, and conclude that therapeutic combinations with AKT inhibitors can revert this phenotype. Further studies are warranted to assess its *in vivo* and clinical benefit for HNSCC patients.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cell culture conditions

Total of eight HNSCC cell lines of the different anatomic site were used in these study. Seven are established and/or commercially available, including HN13, JHU12, JHU13, JHU28 and FADU, as previously described [21]. One cell line, the HCB289, is a primary HNSCC cell line established from a resected laryngeal primary tumor patient (manuscript in preparation). The A431 (human epithelial carcinoma) was used as positive control of cetuximab efficacy as previous reported [21], and was acquired from Rio de Janeiro Cell Bank. Cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) or RPMI 1640, containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM glutamine, 1% penicillin/streptomycin. Cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Unless stated otherwise, all cell culture reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All commercially cell lines were authenticated by STR analysis and tested for mycoplasma contamination by PCR [21].

Pharmacological agents

Monoclonal antibody Cetuximab was purchased from MERK (Darmstadt, Germany); Afatinib (Cat. N° S1011); Allitinib (Cat. N°S2185) and MK2206 (Cat. N°.S1078) were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX) and Everolimus (Cat. N° 07741) was purchased from Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, USA). All drugs were diluted in DMSO at 10 mM and stored at 20° C for future use. DMSO was used as control vehicle at a final concentration of 1% (V/V) in all experiments.

Cell viability

Cell viability was determined 72 hours after anti-EGFR drug treatments, using the colorimetric CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions and as previous reported [21]. To this end, the cells were plated in 96 well plates (maximum 5x10³/well) in DMEM-

10% and allowed to adhere overnight. Subsequently, the cells were treated with increased concentrations of the each anti-EGFR inhibitor in DMEM-0.5%. Absorbance was measured using the Varioskan Flash multimode reader (Thermo Scientific, Finland), at 490 nm. Results were normalized with DMSO treated control cells. The IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software. Experiments were performed three times in triplicate. Mean growth inhibition (GI) values were calculated at a fixed concentration of 1000 nM (for allitinib and afatinib) or 250 µg/mL (for cetuximab). Cell lines were considered as highly sensitive (HS) if GI>60%, moderately sensitive (MS) if GI 40–60% GI, and resistant to if GI<40%, as previously described [21, 50].

Cytotoxicity, proliferation and apoptosis analysis

Apotox-Glo triplex assay (Promega, Madison, USA) was performed in HN13 and HCB289 cell lines, according to manufacturer's instructions, 24 hours after anti-EGFR drug treatments. To this end, the cells were plated into 96-well plates at a density of 2x10³ cells per well and allowed to adhere overnight in DMEM-10%. Subsequently, the cells were treated with IC₅₀ values of each inhibitor in DMEM-0.5. Luminescence and fluorescence levels were measured using the Varioskan Flash multimode reader (Thermo Scientific, Finland). Results were normalized with DMSO treated control cells. Experiments were performed three times in triplicate.

Western blot analysis

EGFR inhibition and intracellular signaling pathways were analyzed by western blot in all HNSCC cell lines and A431 (sensitive control) cell lines. Cells were rinsed in ice-cold PBS then scraped and lysed in lysis buffer (50mM Tris pH7.6–8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 10mM sodium pyrophosphate, 1% NP-40, and protease cocktail inhibitors). 20 µg of total protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to

nitrocellulose membranes in TransBlot Turbo transfer (Bio-Rad). Primary antibody incubation was performed for human total EGF Receptor (D38B1), pEGFR-Tyr1068 (D7A5), HER2 (4290), pHER2- Tyr1221/1222 (2243), HER4 (4795), pHER4- Tyr1284 (4757), p44/42 MAPK (137F5); p.p44/42 MAPK-Thr202/Tyr204 (D13.14.4E); AKT(pan) (C67E7); pAKT-Ser473 (D9E); AKT1(C73H10) and β-tubulin (endogenous control), from Cell signaling (Danvers, USA). Both primary antibodies were deluded in TBS-T at 1:1000. After washing with TBS-T, membranes were incubated with anti-rabbit secondary antibody Anti-rabbit (#7074, Cell Signaling Technology) at dilution 1:5000. Immune detection was done with ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), in automatic ImageQuant mini LAS4000 (GE Healthcare). Experiments were performed three times.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) assay

EGFR gene copy number was performed by FISH, using dual color EGFR ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe (ZytoVision, Germany). Samples were fixed in methanol/acetic acid (3:1) solution, and whased with 2X SSC buffer at 37°C. Slides were sequentially dehydrated with 70%, 85%, and 100% ethanol in order and air dried at room temperature. Probes were applied to slides, which were covered and sealed with rubber cement, following manufacturer's protocol. After over-night incubation in humidified chamber at 37°C, slides were washed with Igepal buffer (Sigma-Aldrich, USA) and mounted. Thirty well-defined cells were analyzed for each cell line. Scores were defined as the ratio of EGFR and CEN7, as previously described [7].

Mutation analysis

Hotspot regions of EGFR (exons 18, 19, 20 and 21), *KRAS* (codons 12, 13 and 61) and *NRAS* (codons 12 and 13) was previously reported by our group for the present cell lines [21]. *BRAF* exon 15 (codon 660), *PIK3CA* (exon 9, 21 and 22), and *PTEN* (exon 1-9) genes was done as described

[51, 52] [53]. Briefly, PCR was carried out in a final volume of 15 μ l containing 50 ng DNA, 10 μ M forward and reverse primers and 7,5 μ l HotStar master mix (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's specifications. Thermal cycling parameters used were an initial denaturation at 96°C for 15 minutes, followed by 40 cycles of 96°C for 45 seconds and 55.5°C for 45 seconds for *BRAF*, 55.5°C for 45 seconds for *PIK3CA* and finally, 52°C for 45 seconds for *PTEN*. For all genes, we used a final extension at 72°C for 10 minutes using a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). PCR products were purified using EXOSAP-IT (Affymetrix, USB), following for the direct sequencing using an ABI PRISM BigDye XTerminator in conjunction with BigDye XTerminator purification kit (Applied Biosystems). The analyses were performed using the Genetic Analyzer ABI PRISM 3500 and SeqScape version 2.7 software (Applied Biosystems).

AKT1 silencing

AKT1 silencing was performed using TriFECTa-RNAi kit (Integrated DNA Technologies, USA). Each siRNA duplex was transfected using Lipofectamine2000 (Life technologies), in HN13 and HCB289 cells lines, according to the manufacturer's protocol. HN13 cell line was plated into 6-well plates at density of 2.5×10^4 in DMEM-10% and allowed to adhere overnight. Subsequently, the cells were exposed to 10 nM of target-specific dicer-substrate siRNAs against *AKT1* gene in reduced serum media Opti-MEM (31985062 - Gibco, Invitrogen) for 5 hours. Subsequently, *AKT1* protein expression was measured, 72 hours after transfection, by western blot, using anti-*AKT1* antibody (C73H10) from Cell signaling, USA. Knockdowned cells were exposed to the inhibitors above described, and viability was analysed by MTS and Apotox-Glo triplex assay (Promega, USA).

***In silico* analysis of EGFR, AKT1 and mTOR in HNSCC**

Reverse-phase protein array (RPPA) data (Level 3) for patients with HNSCC were downloaded from TCGA

database (<http://cancergenome.nih.gov>). A total of 212 tumor samples, with detailed clinical information, were included in this analysis. Both total and phosphorylated values for EGFR, Akt and mTOR data were analyzed. Expression levels (mRNA) of EGFR, AKT isoforms, mTOR were inquired using the cBioPortal (www.cbioportal.org).

Statistical analysis

Single comparisons between the different conditions studied were done using Student's t test, and differences between groups were tested using two-way ANOVA. *In silico* statistical analyses were done in R Statistical Software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) using Student's t test. All other statistical analyses were done using GraphPad Prism version 5. Significance level in all the statistical analyses was set at $p < .05$.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This study was partially supported by FINEP (MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-01/2013 - FPXII-BIOPLAT) and the Assistance Program and Incentive Research (PAIP), Barretos Cancer Hospital São Paulo, Brazil. A.L.C and R.M.R are recipients of a National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) scholarship and O.C.M is recipient of a Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) scholarship (SFRH/BPD/108351/2015).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.

- International journal of cancer Journal international du cancer. 2015; 136(5):E359-386.
2. Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, nose, & throat journal*. 2006; 85(2):74.
 3. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D and Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008; 14(2):366-369.
 4. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015; 517(7536):576-582.
 5. Kalyankrishna S and Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24(17):2666-2672.
 6. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ and Mao L. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; 25(16):2164-2170.
 7. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Nettekville J, Burke BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24(25):4170-4176.
 8. Oliveira-Silva J, de Carvalho AC, de Souza Viana L, Carvalho AL and Reis RM. Anti-EGFR therapy: Strategies in head and neck squamous cell carcinoma. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 2016.
 9. Cohen EE, Halpern AB, Kasza K, Kocherginsky M, Williams R and Vokes EE. Factors associated with clinical benefit from epidermal growth factor receptor inhibitors in recurrent and metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2009; 45(10):e155-160.
 10. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. 2006; 354(6):567-578.
 11. Cohen MH, Chen H, Shord S, Fuchs C, He K, Zhao H, Sickafuse S, Keegan P and Pazdur R. Approval summary: Cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and 5-fluorouracil for the first-line treatment of patients with recurrent locoregional or metastatic squamous cell head and neck cancer. *The oncologist*. 2013; 18(4):460-466.
 12. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P and Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell*. 2005; 7(4):301-311.
 13. Blick SK and Scott LJ. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs*. 2007; 67(17):2585-2607.
 14. Perez CA, Song H, Raez LE, Agulnik M, Grushko TA, Dekker A, Stenson K, Blair EA, Olopade OI, Seiwert TY, Vokes EE and Cohen EE. Phase II study of gefitinib adaptive dose escalation to skin toxicity in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2012; 48(9):887-892.
 15. Mesia R, Rivera F, Kawecki A, Rottey S, Hitt R, Kienzer H, Cupissol D, De Raucourt D, Benasso M, Koralewski P, Delord JP, Bokemeyer C, Curran D, Gross A and Vermorken JB. Quality of life of patients receiving platinum-based chemotherapy plus cetuximab first line for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010; 21(10):1967-1973.
 16. Specenier P and Vermorken JB. Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics : targets & therapy*. 2013; 7:77-90.
 17. Zhang J, Cao J, Li J, Zhang Y, Chen Z, Peng W, Sun S, Zhao N, Wang J, Zhong D, Zhang X and Zhang J. A phase I study of AST1306, a novel irreversible EGFR and HER2 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of hematology & oncology*. 2014; 7:22.
 18. Burtneess B, Bourhis JP, Vermorken JB, Harrington KJ and Cohen EE. Afatinib versus placebo as adjuvant therapy after chemoradiation in a double-blind, phase III study (LUX-Head & Neck 2) in patients with primary unresected, clinically intermediate-to-high-risk head and neck cancer: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014; 15:469.
 19. Yang JC, Wu YL, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, Zhou C, Hu CP, O'Byrne K, Feng J, Lu S, Huang Y, Geater SL, Lee KY, Tsai CM, Gorbunova V, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *The lancet oncology*. 2015; 16(2):141-151.
 20. Xie H, Lin L, Tong L, Jiang Y, Zheng M, Chen Z, Jiang X, Zhang X, Ren X, Qu W, Yang Y, Wan H, Chen Y, Zuo J, Jiang H, Geng M, et al. AST1306, a novel

- irreversible inhibitor of the epidermal growth factor receptor 1 and 2, exhibits antitumor activity both in vitro and in vivo. *PloS one*. 2011; 6(7):e21487.
21. Silva-Oliveira RJ, Silva VA, Martinho O, Cruvinel-Carlioni A, Melendez ME, Rosa MN, de Paula FE, de Souza Viana L, Carvalho AL and Reis RM. Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker. *Cellular oncology*. 2016.
 22. Mazumdar T, Byers LA, Ng PK, Mills GB, Peng S, Diao L, Fan YH, Stemke-Hale K, Heymach JV, Myers JN, Glisson BS and Johnson FM. A comprehensive evaluation of biomarkers predictive of response to PI3K inhibitors and of resistance mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2014; 13(11):2738-2750.
 23. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012; 486(7404):532-536.
 24. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ and Zalberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2008; 359(17):1757-1765.
 25. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, Penault-Llorca F, Rougier P, Vincenzi B, Santini D, Tonini G, Cappuzzo F, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology*. 2010; 11(8):753-762.
 26. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS and Gonzalez MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005; 114(2):242-248.
 27. Goldberg RM. Cetuximab. *Nature reviews Drug discovery*. 2005; Suppl:S10-11.
 28. Cooper JB and Cohen EE. Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors in head and neck cancer. *Head & neck*. 2009; 31(8):1086-1094.
 29. Schutze C, Dorfler A, Eicheler W, Zips D, Hering S, Solca F, Baumann M and Krause M. Combination of EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibition by BIBW 2992 and BIBW 2669 with irradiation in FaDu human squamous cell carcinoma. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2007; 183(5):256-264.
 30. Hirsh V. Afatinib (BIBW 2992) development in non-small-cell lung cancer. *Future oncology*. 2011; 7(7):817-825.
 31. Qiu LX, Mao C, Zhang J, Zhu XD, Liao RY, Xue K, Li J and Chen Q. Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: a meta-analysis of 22 studies. *European journal of cancer*. 2010; 46(15):2781-2787.
 32. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2009; 101(4):715-721.
 33. Jedlinski A, Ansell A, Johansson AC and Roberg K. EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2013; 42(1):26-36.
 34. Simpson DR, Mell LK and Cohen EE. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2015; 51(4):291-298.
 35. Rebusci M, Peixoto P, Dewitte A, Watzet N, De Nuncques MA, Rezvoy N, Vautravers-Dewas C, Buisine MP, Guerin E, Peyrat JP, Lartigau E and Lansiaux A. Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *International journal of oncology*. 2011; 38(1):189-200.
 36. Saba NF, Hurwitz SJ, Magliocca K, Kim S, Owonikoko TK, Harvey D, Ramalingam SS, Chen Z, Rogerio J, Mendel J, Kono SA, Lewis C, Chen AY, Higgins K, El-Deiry M, Wadsworth T, et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of everolimus in combination with cetuximab and carboplatin for recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2014; 120(24):3940-3951.
 37. Massarelli E, Lin H, Ginsberg LE, Tran HT, Lee JJ, Canales JR, Williams MD, Blumenschein GR, Jr., Lu C, Heymach JV, Kies MS and Papadimitrakopoulou V. Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015; 26(7):1476-1480.
 38. Molife LR, Yan L, Vitfell-Rasmussen J, Zernhelt AM, Sullivan DM, Cassier PA, Chen E, Biondo A, Tetteh E, Siu LL, Patnaik A, Papadopoulos KP, de Bono JS, Tolcher AW and Minton S. Phase 1 trial of the oral AKT

- inhibitor MK-2206 plus carboplatin/paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Journal of hematology & oncology*. 2014; 7:1.
39. Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Current opinion in cell biology*. 2005; 17(2):150-157.
40. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84(14):5034-5037.
41. Ayala G, Thompson T, Yang G, Frolov A, Li R, Scardino P, Ohori M, Wheeler T and Harper W. High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004; 10(19):6572-6578.
42. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007; 448(7152):439-444.
43. Nakashiro K, Tanaka H, Goda H, Iwamoto K, Tokuzen N, Hara S, Onodera J, Fujimoto I, Hino S and Hamakawa H. Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2015; 47(4):1273-1281.
44. Bussink J, van der Kogel AJ and Kaanders JH. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *The lancet oncology*. 2008; 9(3):288-296.
45. Freudlsperger C, Horn D, Weissfuss S, Weichert W, Weber KJ, Saure D, Sharma S, Dyckhoff G, Grabe N, Plinkert P, Hoffmann J, Freier K and Hess J. Phosphorylation of AKT(Ser473) serves as an independent prognostic marker for radiosensitivity in advanced head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015; 136(12):2775-2785.
46. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley WW, Weissler MC, Dressler LG, Shores CG, Yarbrough WG and Perou CM. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer cell*. 2004; 5(5):489-500.
47. Knowles JA, Golden B, Yan L, Carroll WR, Helman EE and Rosenthal EL. Disruption of the AKT pathway inhibits metastasis in an orthotopic model of head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2011; 121(11):2359-2365.
48. Roh J, Muelleman T, Tawfik O and Thomas SM. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral oncology*. 2015; 51(1):16-23.
49. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN and Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*. 1998; 124(6):637-640.
50. Konecny GE, Glas R, Dering J, Manivong K, Qi J, Finn RS, Yang GR, Hong KL, Ginther C, Winterhoff B, Gao G, Brugge J and Slamon DJ. Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *British journal of cancer*. 2009; 101(10):1699-1708.
51. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, Cunha TR, Fava G, Colaiacovo W, Melani A, Fregnani JH, Reis RM and Guimaraes DP. KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. *Oncology reports*. 2014.
52. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, Milanezi F, Carvalho S, Savage K, Simpson PT, Jones C, Swift S, Mackay A, Reis RM, Hornick JL, Pereira EM, Baltazar F, Fletcher CD, Ashworth A, et al. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *The Journal of pathology*. 2006; 209(4):445-453.
53. Reis RM, Konu-Lebleblicioglu D, Lopes JM, Kleihues P and Ohgaki H. Genetic profile of gliosarcomas. *The American journal of pathology*. 2000; 156(2):425-432.

Figure Legends

Figure 1: Protein profile and FISH analyses of the HNSCC cell lines (A). Total and phosphorylated profile of ErbB family and intracellular pathways, AKT, ERK and total PTEN detected by Western Blot. (B). FISH analysis of EGFR gene (green); Centromeric DNA (CEN7) was used as reference (Red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Magnification: 100X. EGFR/CEN7 ratios are shown above each photograph.

Figure 2: Viability analysis (MTS) of HNSCC cells exposed to different concentrations of cetuximab (A), allitinib (B) and afatinib (C). GI score of HNSCC cells were calculated for cetuximab (D) at 250 µg/mL; allitinib (E) and afatinib (D) at 1000 nM. HNSCC cells were classified as highly sensitive-HS (green bars), moderate sensitivity-MS (orange bars) and resistant-R (red bars).

Figure 3: Analysis of EGFR, ERK and AKT total and phosphorylated in SCC25 (Highly sensitive) and HN13 cell lines (Resistant) by Western Blot. EGF ligand was used at 10 ng/mL for 10 minutes. CTR: control; CTX: cetuximab at 50 or 100 µg/mL; AFA: afatinib and AST: allitinib at 0.01 or 0.1 µM.

Figure 4: Anti-EGFR therapeutic combinations with intracellular inhibitor MK2206 and everolimus. Western Blot analysis of EGFR, ERK and AKT total and phosphorylated in SCC25 (Highly sensitive) (A) and HN13 cell lines (Resistant) (B) treated with the AKT inhibitor MK2206 (MK) and mTOR inhibitor everolimus (EVE) at 2.5 µM. SCC25 and HN13 cell lines were exposed to cetuximab (50 µg/mL), allitinib or afatinib (0.01 nM for SCC25 and 0.1 nM for HN13 cell line). (C) Viability assay (MTS) for SCC25 and (D) HN13 cell lines exposed to cetuximab (250 µg/mL) allitinib or afatinib (1 µM) with or without MK2206 (2.5 µM) and everolimus (EVE). CTR: control.

Figure 5: Role of AKT knockdown in cetuximab (CTX) and afatinib (AFA) and allitinib (AST) response in HN13 and HCB289 cell lines. (A and C) Analysis of AKT knockdown efficiency on HN13 and HCB289 at different AKT siRNA concentrations by Western blot. (B and D) Viability assay (MTS) for HN13 and HCB289 cells exposed to Cetuximab (CTX) 250 µg/mL, afatinib (AFA) and allitinib (AST) 1 µM in combination with MK2206 (MK) 2.5 µM or everolimus (EVE) 2.5 µM, bars represent viability at 1000 nM concentration.

Figure 6: ApoTox-Glo assay of HN13 and HCB289 cell lines transfected with AKIT siRNA and exposed to cetuximab (CTX) (250 µg/mL) afatinib (AFA) or allitinib (AST) 1 µM, for 24 hours. Viability, cytotoxicity and caspase 3/7 activation of HN13 (A) and HCB289 (B).

Figure 7: *In silico* analysis from TCGA HNSCC data. (A) mRNA expression profile of the EGFR, ErbB2, ErbB4, AKT1, AKT2, AKT3 and mTOR. Reverse-phase protein array (RPPA) data and correlations with tumor size (B) and perineural invasion (C) of HNSCC patients.

Table legend

Table 1 - Classification, mutation status, EGFR gene copy number and response to anti-EGFR therapies of HNSCC cell lines.