

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS

**O POTENCIAL PAPEL DA CINASE REGULADORA EXTRACELULAR (ERK)
NA SOBREVIDA DE PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE PULMÃO
EM ESTÁGIOS INICIAIS**

SIMONE DE LEON MARTINI

Porto Alegre

2013

SIMONE DE LEON MARTINI

**O POTENCIAL PAPEL DA CINASE REGULADORA EXTRACELULAR (ERK)
NA SOBREVIDA DE PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE PULMÃO
EM ESTÁGIOS INICIAIS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal de Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Pneumologia.

Orientador: Dr. Cristiano Feijó Andrade

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Martini, Simone de Leon

O potencial papel da cinase reguladora extracelular (ERK) na sobrevida de pacientes com adenocarcinoma de pulmão em estágios iniciais / Simone de Leon Martini . - 2013.
74 f.

Orientador: Cristiano Feijó Andrade.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Cancer de Pulmão. 2. Adenocarcinoma. 3. Cinase Reguladora Extracelular (ERK). 4. Sobrevida. 5. Tratamento cirúrgico. I. Andrade, Cristiano Feijó, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

À minha mãe Divanyr de Leon Ferreira (*in memoriam*), pelo apoio e o amor incondicional ao longo de toda a vida.

Ao meu pai Otolbides de Leon Ferreira, pelo apoio, esforço, amor e dedicação.

Ao meu esposo Flavio Martini Filho, pelo amor, paciência, sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos amigos, que compreenderam a minha falta em várias ocasiões neste período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Cristiano Feijó Andrade, Cirurgião Torácico do Hospital da Criança Santo Antônio da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Doutor em Medicina – Pneumologia pela UFRGS. Meu orientador. Obrigado pelo excelente auxílio na elaboração, correção e término da tese.

Agradeço ao Dr. Nelson Porto, excelente mestre.

Agradeço aos professores do Pavilhão Pereira Filho, Dr. Jorje Lima Hetzel, Dr. José da Silva Moreira, Dr. Luiz Carlos Correa da Silva e Dr. Bruno Carlos Palombini, pelos principais e eternos ensinamentos.

Agradeço ao Dr. José da Silva Moreira, o qual me estimulou na realização do projeto.

Agradeço ao Adalberto Sperb Rubin, excelente orientador do meu Mestrado.

Agradeço ao Fábio Klamt, PhD do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelas orientações e correções na execução desta tese.

Agradeço à Carolina Beatriz Müller, Msc, Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela ajuda inestimável durante todas as fases da tese.

Agradeço à Catiane Zanin Cabral, bióloga responsável pela unidade de pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, indispensável no início do projeto.

Agradeço ao Rodrigo Mariano, aluno do quinto ano do Curso de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), que foi incansável na busca dos blocos de parafina junto ao serviço de patologia.

Agradeço ao Luiz Alberto Forgiarini Junior, pelo estímulo no início da tese.

Agradeço ao Luiz Felipe Forgiarini, que participou do processo de aquisição de materiais, os quais foram imprescindíveis.

Agradeço a Rosalva Meuer, Msc; Marilda da Cruz Fernandez, PhD; Keli Cristina Reiter, Msc; Teresinha Stein, equipe do Laboratório de Pesquisa e Patologia da UFCSPA.

Agradeço à minha secretária Talita Scariot Tesche, pelo esforço e amizade.

Agradeço aos familiares em Santa Maria, especialmente Jussara Terra Marini, Fabiano, Vergínio, Paula, Dorival, Flávia e Ana Stella, pelo apoio e compreensão, pois em vários momentos importantes não pude estar presente.

Agradeço à minha amiga Célia Luiza Schirmer, pelo apoio, amizade e companheirismo.

RESUMO

Introdução: O câncer de pulmão está entre os principais tipos de neoplasias, sendo o adenocarcinoma o tipo histológico mais frequente. Atualmente, tem-se buscado marcadores de prognóstico para o carcinoma não de pequenas células. **Objetivo:** analisar os níveis da cinase reguladora extracelular (ERK) ativada em amostras histológicas de pacientes em estágios iniciais de adenocarcinoma de pulmão que foram submetidos a tratamento cirúrgico e suas correlações com dados clínicos e sobrevida. **Material e métodos:** foram selecionados aleatoriamente 36 pacientes com adenocarcinoma de pulmão nos estágios I e II submetidos a lobectomia pulmonar entre 1998 e 2004. Os pacientes foram divididos em dois grupos segundo os achados imuno-histoquímicos: pacientes com menos de 15% da positividade de células tumorais para ERK e pacientes com 15% ou mais de células positivas. Para comparação com os achados foi realizada análise de enriquecimento de base de dados de microarranjos (GSE29016, n = 72). **Resultados:** 21 pacientes (58%) apresentaram níveis da ERK ativada acima de 15% e 15 pacientes (43%) abaixo de 15%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para idade, sexo, tabagismo e índice de massa corporal entre os grupos estratificados para a ERK. O grupo de maior positividade ($\geq 15\%$) apresentou menor sobrevida ($P = 0,045$). As análises de enriquecimento não demonstraram correlação da variação da expressão gênica de ERK em pacientes com adenocarcinoma quando comparados com a sobrevida nos estágios I e o grupamento dos estágios II e III. **Conclusões:** a alta positividade da ERK em células de amostras biológicas de pacientes com adenocarcinoma de pulmão está relacionada a tumores mais agressivos e com pior prognóstico.

Palavras-chave: câncer de pulmão, adenocarcinoma, cinase reguladora extracelular (ERK), sobrevida.

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer is among the most common types of neoplasias, and adenocarcinoma is the most frequent histological type. Currently, there is an extensive search for prognostic biomarkers of squamous nonsmall cell lung cancer. **Objective:** To analyze the correlation of clinical data and patient survival with the levels of activated extracellular regulatory kinase (ERK) in histological samples of surgically resected early stage lung adenocarcinoma. **Methods:** We randomly selected 36 patients with stage I or II lung adenocarcinoma who underwent pulmonary lobectomy between 1998 and 2004. Patients were divided into the following 2 groups according to immunohistochemical profile: a group with <15% ERK-positive tumor cells and a group with $\geq 15\%$ ERK-positive tumor cells. For data comparison, an enrichment analysis of a microarray database was performed (GSE29016, n = 72). **Results:** Activated ERK levels were $\geq 15\%$ and <15% in 21 (58%) and 15 (43%) patients, respectively. There were no statistically significant differences in age, sex, smoking history, and body mass index among the groups stratified by ERK levels. The survival rate was lower in the ERK $\geq 15\%$ group than in the ERK <15% group (P = 0.045). Enrichment analyses showed no correlation between variations in gene expression of ERK in adenocarcinoma patients and survival rates in patients with stage I and combined stage II+III disease. **Conclusions:** High ERK positivity in cells from biological samples of lung adenocarcinoma is related with tumor aggressiveness and a poorer prognosis.

Keywords: lung cancer, adenocarcinoma, extracellular regulatory kinase, survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frequência de mutação EGRF e KRAS	28
Figura 2 – Via RAS-RAF-MEK-ERK	34
Figura 3 – Rede de interação proteica	35

Artigo

Figura 1 – Immunohistochemical reaction for ERK	57
Figura 2 – Kaplan–Meier mortality curves show that ERK quantification allows for discrimination between good and poor prognosis	60
Figura 3 – Survival analysis using the microarray dataset GSE29016, with 39 adenocarcinoma patients divided into two groups according to disease stage (stage I and combined stage II+III)	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação histológica do câncer de pulmão 26

Tabela 2 – Classificação do adenocarcinoma 27

Artigo

Tabela 1 – Characteristics of lung adenocarcinoma patients according to positivity for extracellular regulatory kinase (ERK) in tumor cells 58

Tabela 2 – Selected characteristics and their relation with survival in patients with lung adenocarcinoma 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	Sociedade Americana do Câncer
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ATS	Sociedade Torácica Americana
ATBA	Aspiração Transbrônquica com Agulha
BAC	Carcinoma bronquíolo alveolar
CPNPC	Carcinoma Pulmonar Não de Pequenas Células
CPPC	Carcinoma de Pequenas Células
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor de Fator de crescimento epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK	Cinase reguladora extracelular
ERS	Sociedade Europeia Respiratória
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IASLC	Associação Internacional do Estudo do Câncer de Pulmão
MAPK	Proteína cinase mitógeno ativada
MIA	Adenocarcinoma minimamente invasivo
MEK	Proteína ativada por mitógeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
QT	Quimioterapia
RKIP	Proteína inibitória RAF cinase
RTKs	Receptor de tirosina cinase
TKs	Tirosina cinases
TGF	Fator de transformação de crescimento
TNM	T = tumor primário, N = linfonodos regionais, M = metástases a distância
VEFG	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	IV
ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
SUMÁRIO	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Câncer de pulmão	23
2.2 Classificação histopatológica	26
2.3 Marcadores tumorais em CPNPC	27
2.3.1 EGFR	27
2.3.2 RAS-RAF-MEK-ERK	31
2.3.3 ERK	34
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo principal	39
4.2 Objetivos secundários	39
5 REFERÊNCIAS	41
6 RESEARCH ARTICLE	51
7 CONCLUSÕES	71
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão está entre os mais frequentes tipos de neoplasias e constitui-se na principal causa de morte nos Estados Unidos da América e a segunda causa no Brasil (1-3).

Infelizmente, o diagnóstico de cancer de pulmão é feito na maioria das vezes em estágios avançados, impedindo o tratamento cirúrgico restringindo os pacientes a quimioterapia e/ou radioterapia, com uma mínima possibilidade de cura (5). Devido a este comportamento do câncer de pulmão é necessário a identificação das vias de sinalização para mudarmos o curso desta doença (4, 5).

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum no câncer de pulmão, em torno de 50% dos casos na maioria das séries. Até recentemente, o adenocarcinoma era tratado como uma doença homogênea, ou seja, por não serem utilizados marcadores específicos, a terapêutica não era individualizada. Hoje se sabe que é heterogêneo, tanto do ponto de vista histológico como biológico (24).

Atualmente, tem-se buscado marcadores de prognóstico para o carcinoma não de pequenas células de pulmão (6, 7). Esses marcadores atuam em diferentes vias de sinalização. As vias de sinalização têm sua função alterada no câncer, sendo importantes caminhos a serem consideradas na terapêutica (57). Uma interessante via de sinalização para esse tipo de estudo é a RAS-RAF-MEK-ERK, que tem sido estudada como alvo de novas alternativas terapêuticas, com o objetivo de aumentar a sobrevida dos pacientes com carcinoma brônquico (8, 40). Essa cascata é regulada por múltiplos efetores também envolvidos na apoptose. RAS-RAF-MEK-ERK tem receptores na superfície celular e fatores de transcrição que regulam a expressão gênica (59).

A via da cinase mitógeno ativada (MAPK) apresenta uma importante função na regulação dos sinais de crescimento e sobrevida celular, estando relacionada à proliferação e à regulação do ciclo celular, angiogênese e migração (46, 68). A ERK é uma cinase que regula um sinal extracelular, sendo uma das MAPK mais estudadas. Faz parte de uma via de transdução que transmite estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores e outros. A ERK é responsável pela integração de sinais ambientais e pela retransmissão dessa informação para o sistema de controle do ciclo celular (71). As ERK 1 e 2 (1/2) são distribuídas em toda a célula (71).

A via de sinalização da ERK encontra-se alterada em um terço das neoplasias (79); es-

tando sua expressão aumentada em vários tipos de tumores em humanos, como mama, cabeça e pescoço (15, 16, 17). Por esse motivo, muitos inibidores do EGFR, RAS, RAF e MEK têm sido desenvolvidos como potenciais bloqueadores da atividade ou proliferação de diferentes componentes da via de sinalização da ERK (14, 18, 19). A proteína ERK tem múltiplos alvos, as funções celulares da ERK são diversas e incluem regulação e proliferação do ciclo celular, sobrevivência, mitose e migração (71).

No entanto, a capacidade de proliferação tumoral é um sistema muito complexo, com envolvimento de vários componentes celulares e diferentes vias de sinalização, fazendo-se muito difícil a escolha de inibição de um único componente neste contexto (6,76). Por isso faz-se necessária a identificação de componentes celulares que estejam alterados em tipos específicos de carcinomas e que sugiram alguma relação com o prognóstico ou a sobrevivência dos pacientes acometidos por determinada neoplasia (81).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é uma das principais causas de morte no mundo (1, 2). Segundo a Sociedade Americana de Câncer (ACS), cerca de 226.160 novos casos foram diagnosticados em 2012. Destes, estima-se que ocorram 160.340 mortes (1, 3).

Na China, houve um aumento dramático no número de fumantes nas últimas duas décadas. Aproximadamente, dois terços dos homens são tabagistas, o que representa um terço dos fumantes no mundo (4).

A chance de um homem em sua vida ter câncer de pulmão é 1: 13, e em mulheres, 1: 16 (5). Estes números incluem fumantes e não fumantes (6, 7).

Pacientes com história de câncer de pulmão apresentam 1 a 2% de risco de desenvolvimento de uma nova neoplasia (8).

Nos homens há um declínio na incidência, enquanto que nas mulheres essas taxas se estabilizaram, e os índices de mortalidade vêm aumentando. Em fumantes o risco é maior (6, 9, 10). Sabe-se que a distribuição geográfica ocorre em decorrência dos locais de maior hábito tabágico (1, 11).

Acredita-se que 80 a 90% dos casos de carcinoma de pulmão estão relacionados ao fumo, com uma relação dose/resposta (1, 12, 13). Há vários estudos que suportam a influência hereditária como um fator de risco para câncer de pulmão. A agregação familiar e a inerente susceptibilidade ao fumo nas famílias pode ser um fator de associação (5, 14). O fumo contém muitos carcinógenos e espécies reativas de oxigênio que produzem danos e quebras no DNA, exigindo reparo, o qual ocorre através de inúmeros caminhos (15). Os carcinógenos incluem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e promotores de tumor, que requerem uma alteração metabólica para exercer seus efeitos (14). Sabe-se que mesmo após a cessação do tabagismo as alterações genéticas permanecem, os ex-fumantes continuando a ter um risco elevado de câncer de pulmão por vários anos (8, 13, 14). Estima-se que o tabagismo passivo cause 3 mil mortes/ano por câncer de pulmão nos EUA e 21.400 mortes no mundo (1, 13). As mulheres são mais sensíveis a carcinogênese relacionada ao fumo do que os homens, havendo um sinergismo entre história familiar e carcinoma de pulmão (14). Estudos epidemiológicos evidenciam que menos

de 20% dos fumantes desenvolvem câncer de pulmão, desta forma sugerindo determinantes genéticos para esta susceptibilidade (2, 16). Fatores como idade, sexo masculino e descendência africana são considerados como pior prognóstico (1).

As causas de câncer de pulmão em não fumantes permanecem controversas, mas vários fatores têm sido identificados. Estudos de epidemiologia molecular demonstram padrões de mutação diferentes em fumantes e não fumantes e diferentes respostas terapêuticas (13). O câncer de pulmão em pacientes HIV é mais agressivo, ocorrendo em indivíduos mais jovens, sendo a terceira neoplasia mais frequente (1).

A carcinogênese pulmonar tem várias etapas, que se caracterizam pelo acúmulo de inúmeras alterações sucessivas, genéticas e epigenéticas, resultantes de uma seleção de células, as quais apresentam um crescimento descontrolado (8, 17, 18).

A quimioprevenção é o mais importante. O abandono do tabagismo, bem como a identificação das populações de alto risco, é de fundamental importância para realização de um estudo mais focado na investigação dessa neoplasia (19, 20). Estima-se que no momento do diagnóstico do carcinoma de pulmão não de pequenas células (CPNPC) 20% dos pacientes têm doença localizada, 25% têm extensão da neoplasia para os linfonodos mediastinais e 55% já apresentaram metástases a distância (35).

Nos últimos 30 anos, não houve mudanças significativas na terapêutica usual. Ressecção cirúrgica, quimioterapia baseada em platina e radiação em combinação ou terapia única são as formas preconizadas atualmente. Porém a maioria dos pacientes no momento do diagnóstico já apresenta doença residual ou não detectada que leva à morte (21).

A sobrevida do estágio IA em cinco anos é de 50%, do estágio IB de 43%, estágio IIA de 36%, estágio IIB de 25%, estágio IIIA de 19%, estágio IIIB de 7% e estágio IV de 2% (35).

No passado, a maior parte dos diagnósticos era realizada através de ressecção cirúrgica, hoje 70% destes são feitos através de biópsias pequenas e ou amostras citológicas. Isso muitas vezes acarreta artefatos devido ao pouco material para análise (22, 23).

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum no câncer de pulmão, em torno de 50% dos casos na maioria das séries. Até recentemente, o adenocarcinoma era tratado como uma doença homogênea, ou seja, por não serem utilizados marcadores específicos, a terapêutica não era individualizada. Hoje se sabe que é heterogêneo, tanto do ponto de vista histológico como biológico (24). O grau de diferenciação tumoral e a proporção de estroma desmoplásico

são parâmetros morfológicos usados pelos patologistas para avaliar a agressividade dos adenocarcinomas. Há uma relação entre a pobre diferenciação tumoral e um pior prognóstico (25, 26).

Os avanços na oncologia, biologia molecular, patologia, radiologia e cirurgia levou à necessidade de uma nova classificação. A classificação do câncer de pulmão, publicada pelo World Health Organization (WHO) em 1967, 1981 e 1999, foi escrita primariamente por patologistas para patologistas (27, 28). Nos últimos anos, houve muitos avanços nas áreas de oncologia, biologia molecular e radiologia. Assim, em 2004 foi realizada uma revisão, sendo introduzidas informações clínicas e genéticas, não somente idealizada para patologistas, mas de uma forma multidisciplinar (28, 29).

A nova classificação apresenta uma abordagem ampla, os marcadores sendo requisitos essenciais para a determinação não somente do prognóstico, mas da terapêutica. O manejo do material obtido através da imuno-histoquímica e/ou do estudo molecular fornece informações importantes que auxiliam para um diagnóstico mais acurado, podendo determinar melhor o prognóstico (30).

A introdução dessas novas terapias moleculares alterou de forma importante a classificação e levou a uma individualização na terapêutica (30).

A classificação histológica do câncer de pulmão e o seu estadiamento são críticos na avaliação do tratamento e diagnóstico definitivo. Houve mudanças principalmente em relação aos pacientes com CPNPC avançado e a descoberta de alterações no receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), que é um dos receptores de tirosina cinases (tabela 1). As mutações desse receptor foram de vital importância na nova classificação. Os pacientes com CPNPC podem ou não ser responsivos aos inibidores de tirosina cinases. A diferenciação histológica e as características étnicas, bem como o hábito tabágico, selecionam os pacientes mais propensos a resposta a esses inibidores (31). Nos últimos dez anos, vários inibidores de tirosina cinases foram aprovados para uso terapêutico (31).

2.2 Classificação histopatológica

Tabela 1 – Classificação histológica do adenocarcinoma de pulmão.

IASLC/ATS/ERS – Classificação do câncer de pulmão – Adenocarcinoma em espécimes cirúrgicos
Lesão pré-invasiva
- Hiperplasia adenomatoide atípica
- Adenocarcinoma <i>in situ</i> (3cm BAC) <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Não mucinoso <input type="checkbox"/> Mucinoso <input type="checkbox"/> Misto
Adenocarcinoma minimamente invasivo
- Não mucinoso
- Mucinoso
- Misto
Adenocarcinoma invasivo
- Predominantemente lipídico
- Predominantemente acinar
- Predominantemente papilar
- Predominantemente micropapilar
- Predominantemente sólido com produção de mucina
Variante do adenocarcinoma invasivo
- Adenocarcinoma mucinoso invasivo
- Coloide
- Fetal (baixo e alto grau)
- Entérico

Fonte: Internacional Association for the study of Lung Cancer. ATS, American Thoracic Society. (28)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define três lesões pré-neoplásicas: displasia escamosa, hiperplasia adenomatoide atípica e hiperplasia de células neuroendócrinas, que progridem para carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e tumor carcinoide, respectivamente (28, 32, 33). Nos pacientes com CPNPC, cirúrgicos, estágio IA, não se recomenda a realização da quimioterapia (QT) pós-operatória (33, 34).

Os pacientes que realizaram ressecção cirúrgica no estágio II, com boa performance e bom *status* têm indicação de receberem QT baseada em platina (35, 36).

A administração de terapia adjuvante para esses pacientes ainda não mostrou benefícios com relação à sobrevida (34, 53).

A QT adjuvante é discutida para os casos em estágio IB, especialmente em pacientes com tumor acima de 4cm, não sendo recomendada para o estágio IA por ser considerada deletéria (53, 54).

Avanços significativos estão sendo feitos no CPNPC, avaliando-se a biologia tumoral, o que leva a uma individualização da terapia, tendo como base as alterações moleculares do tumor e as condições clínico-patológicas do paciente (34, 53, 54).

Abaixo, a nova classificação para os adenocarcinomas (tabela 2) :

Tabela 2 – Classificação do adenocarcinoma.

Categorias de adenocarcinoma
1. Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS) que pode ser mucinoso e raramente não mucinoso.
2. Adenocarcinoma minimamente invasivo (MIA) que pode ser mucinoso e raramente não mucinoso.
3. Adenocarcinoma predominantemente lipídico (não mucinoso).
4. Adenocarcinoma predominantemente invasivo com componente lipídico não mucinoso (isto inclui os tumores mistos e adenocarcinomas avançados classificados como não mucinoso (BAC).
5. Adenocarcinoma mucinoso invasivo (BAC).

Fonte: Internacional Association for the study of Lung Cancer. ATS, American Thoracic Society. (28)

2.3 Marcadores tumorais em CPNPC

2.3.1 EGFR

O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um membro protótipo da família dos receptores de tirosina cinases (RTKs). A ativação da mutação do gene EGFR foi descrita inicialmente em 2004 (39, 69).

Existem cerca de 90 tirosinas cinases conhecidas (TKs) e cerca de 58 receptores de fator de crescimento da superfície celular, com ligantes mediados pela atividade da TKs. A

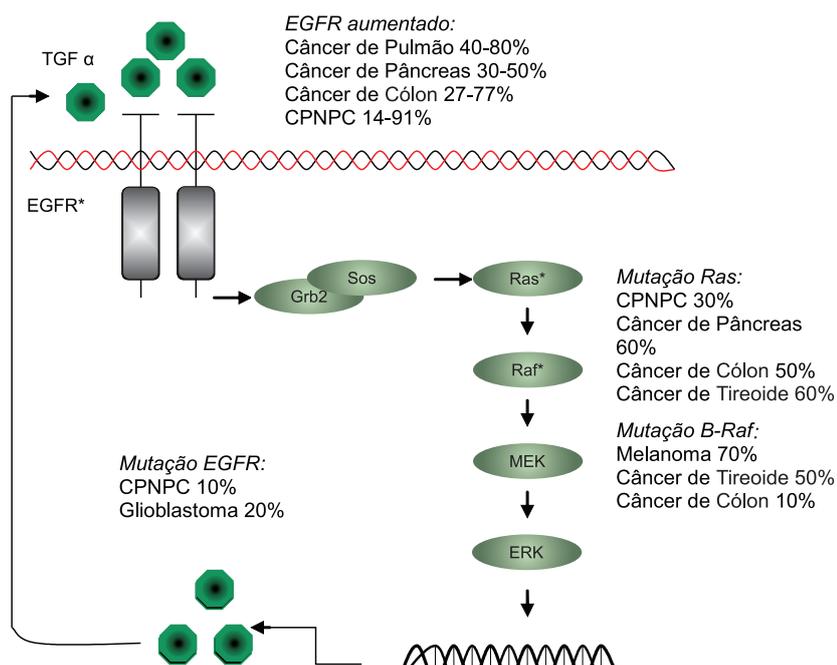
atividade dos RTKs é severamente regulada em células normais, e um aumento ou desregulação da sua expressão pode causar a ativação de oncogenes (40). Esses receptores transmitem sinais capazes de regular a proliferação, a diferenciação e a migração celular (40, 41). O EGFR regula um caminho de sinalização autócrino que contribui para a proliferação celular, apoptose, angiogênese e disseminação metastática, sendo parte de uma subfamília de quatro receptores relacionados EGFR, ERBB2, ERBB3 e ERBB4 (39, 43, 44).

A interação dos fatores de crescimento com os receptores induz a cinase do receptor, ativando a via de sinalização que altera o padrão de expressão do gene e induzindo a mitogênese e a desregulação relacionada ao câncer (44).

Os ligantes para o EGFR incluem EGF, TGF-alfa, HB-EGF, betacelulina e epiregulina. A ação desses ligantes resulta na formação de homodímeros e heterodímeros principais que atuam na ativação do EGFR e subsequentemente na via inferior de transdução de sinal (43, 69). Mais do que 60% dos CPNPC têm uma expressão aumentada do EGFR, o que apresenta um importante papel na tumorigênese. Os ligantes do EGFR podem estimular a cascata intracelular, como RAS-RAF-ERK e PI3 K/ AKT na via de sinalização em direção ao fenótipo maligno (43).

A ativação aberrante do EGFR é frequente nas neoplasias pulmonares, câncer de mama e câncer gástrico (45, 46), conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1 – Frequência da mutação EGFR, K RAS, nas diversas neoplasias.



A mutação dos receptores de membrana e a interação com diversos conjuntos de moléculas sinalizadoras citoplasmáticas resultam na ativação de inúmeras vias, incluindo RAS, PI3K/AKT (47).

A mutação EGFR pode ser encontrada em todos os subtipos de CPNPC, incluindo adenocarcinoma, carcinoma de grandes células e carcinoma de células escamosas, sendo encontrada em 10 a 30% de CPNPC e estando relacionada a um pior prognóstico (39, 48).

Sabe-se que o EGFR está superexpressado em 50 a 80% dos pacientes com CPNPC, mas somente 10% destes acabam respondendo aos inibidores de tirosina cinases (49). Dessa forma, é difícil prever qual paciente vai ser ou não responsivo. Vários estudos evidenciam que pacientes com mutação K-RAS não respondem de forma adequada aos inibidores de cinases, sendo usados de forma única ou em terapia combinada (50).

Esses fatores fazem do EGFR e dos membros de sua família importantes candidatos para o desenvolvimento de alvos terapêuticos, sendo necessário um claro entendimento das mutações e dos seus efeitos na sobrevivência e na proliferação celular (69).

A mutação EGFR está associada com o tipo histológico, etnia, hábito tabágico. Acreditava-se que a mutação EGFR estava relacionada ao sexo, porém isso não é necessariamente verdadeiro, pois o tabagismo nas mulheres é menos prevalente, esta mutação ocorrendo mais em não fumantes (39). A mutação K-RAS difere da mutação EGFR porque é relativamente rara em pacientes asiáticos e ocorre mais frequentemente em homens que em mulheres (51). Isso levou à busca por inibidores seletivos na via de sinalização celular iniciado pela ativação do EGFR, sendo alvo de drogas que bloqueiem sua ativação (52, 53). A mutação EGFR ilustra esta relevância nas aplicações terapêuticas, predizendo a resposta aos inibidores de tirosina cinases (54).

Os primeiros inibidores de tirosina cinases, o gefitinib e o erlotinib, estão sendo usados no tratamento do CPNPC avançado ou recorrente. Uma melhor resposta vem sendo observada em um subgrupo de pacientes: asiáticos, sexo feminino, não fumantes e em pacientes com adenocarcinomas (42).

O domínio EGFR e a mutação K-RAS excluem um ao outro, de maneira que a carcinogênese do tabaco induziria a via de sinalização RAS através dessa mutação, e em não fumantes haveria uma seletividade para via de sinalização EGFR, através da mutação EGFR (42).

A toxicidade desses inibidores ocorre particularmente na pele, incluindo *rasch* cutâneo que afeta a face e o tórax, anormalidades no crescimento do cabelo e prurido (42).

Historicamente, o desenvolvimento de drogas na oncologia focava na máxima dose tolerada, perfil de segurança e eficácia dos componentes em que o estudo dos mecanismos e esforços na resposta pré-seletiva muitas vezes não é compreendido. A grande diferença da maioria das drogas citotóxicas convencionais é a busca de mecanismos para inibir uma proteína particular que hipoteticamente é a chave para o crescimento e a progressão do câncer (35, 42).

Estudos indicam que outros fatores além da mutação EGFR estão relacionados à resposta terapêutica aos inibidores de tirosina cinases. Outros membros da família EGFR, por exemplo, HER2 e EGFR3, estão envolvidos na sensibilidade aos TKI (48).

O desenvolvimento de uma terapia racionalizada baseada no conhecimento da biologia do câncer pode aumentar o arsenal dos oncologistas. O sucesso de uma droga normalmente depende de três etapas: a farmacocinética, o transporte no tecido e seletividade, dessa forma minimizando os efeitos colaterais. O fato dos inibidores de tirosina cinases serem designados contra um alvo de células mutadas ou com mais atividade para esses receptores torna mais seletiva a quimioterapia convencional (48).

As drogas citotóxicas são consideradas mediadores da morte celular, ativando a apoptose em resposta ao estresse. A célula geneticamente normal não tem susceptibilidade a estas drogas, em contraste com as células neoplásicas (55, 56).

Várias vias de sinalização têm sua função alterada no câncer, sendo importantes caminhos a serem consideradas na terapêutica (57). A diferença intrínseca entre as células normais e malignas é um dos principais objetivos na busca de novas terapias (47, 48). Esses sinais, através dos oncogenes, induzem a célula ao fenótipo maligno, proliferação e escape para apoptose. As proteínas oncogênicas mutadas causam um vício nas células tumorais e, em suas funções anormais, esse conceito é referido como “vício oncogênico”. Quando a função normal é inibida ou removida pelo alvo da droga, a célula morre, e isso acarreta uma oportunidade farmacocinética. Assim, as células “viciadas” dependem dessas alterações anormais ou superexpressadas das funções oncogênicas para a susceptibilidade às drogas (48).

A medida da eficácia de uma droga mais direta e relevante seria a avaliação pré e pós-tratamento com o uso de amostras teciduais verificando os marcadores de interesse. Claro que isso não é possível, pois o paciente teria que realizar inúmeras biópsias (47, 58).

Dessa forma, é difícil prever qual paciente vai ser ou não responsivo à terapia combinada, sendo que o ideal seria podermos prever a resposta de um paciente a uma droga em particular (57, 58).

2.3.2 RAS-RAF-MEK-ERK

Esta cascata é regulada por múltiplos efetores também envolvidos na apoptose. RAS-RAF-MEK-ERK tem receptores na superfície celular e fatores de transcrição que regulam a expressão gênica (59). Esta via é muito complexa, pois os seus membros, que são os fatores de transcrição de cinases, reguladores da apoptose e famílias executoras de caspases, podem ser ativados e inativados por proteínas fosforiladas (50, 60).

A MAPK (proteína cinase mitógeno ativada) é expressada ubiquamente em todas as células. São proteínas que pertencem a uma rede dinâmica que através de diversos estímulos regulam atividades de um complexo sistema biológico (61, 62). A via MAPK é frequentemente muito afetada nas mutações do câncer (62, 63). Ela regula as funções celulares responsáveis pela homeostase como expressão de citocinas e proteases, progressão do ciclo celular, motilidade, aderência celular metabolismo e angiogênese (61, 62, 64). Essa cascata anteriormente era descrita como uma via de sinalização linear, porém se evidenciou que RAS-ERK podem ser ativados em vários compartimentos intracelulares e os receptores de tirosina cinases podem modular essa sinalização em vários locais (40, 60).

A MAPK contribui para a resposta celular a diversos estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, estresse, toxinas, alteração na aderência celular, osmolaridade, radicais livres de oxigênio, luz ultravioleta e temperatura (61, 65).

RAS é o primeiro passo da ativação da cascata MAPK (52, 64). O RAS é uma pequena proteína G, com atividade GTPase intrínseca. É um regulador crítico da via de sinalização (40, 49). Recrutado na membrana celular e ativado por um processo que envolve fosforilação e múltiplos cofatores (60), RAS foi uma das primeiras proteínas a ser demonstrada como crucial na regulação do ciclo celular. A proteína GTP é uma molécula da parte superior que tem influência sobre a via de sinalização RAF-MEK-ERK, PI3K/AKT. Múltiplas isoformas de RAS têm sido descritas K- RAS, N-RAS e H- RAS (50, 66). RAS atua em muitas moléculas que influenciam na regulação do ciclo celular p16, p15, p21, podendo parar o ciclo celular de forma prematura na fase G1, levando à senescência dependente da via RAS-RAF-MEK-ERK (52). Por muitos anos se achou que a ativação de RAS ocorria exclusivamente na membrana plasmática. A ativação pode ser encontrada em várias membranas intracelulares, incluindo complexo de Golgi, retículo endoplasmático e endossomos (40, 67).

As proteínas cinases ativadas por RAS e PI3K/AKT atuam nas redes de sinais que vinculam a ativação do EGFR na proliferação e sobrevivência celular (48).

A mutação K-RAS é detectada em 30% dos CPNPC, especialmente em adenocarcinomas e em não fumantes, estando relacionada a pior prognóstico (32, 68).

RAS é frequentemente mutada nos cânceres humanos, e o ponto de mutação ocorre nos códons 12, 13, 59 e 61. Essa mutação ocorre em 30% de todos os cânceres, sendo pâncreas em 90%, cólon em 50%, tireoide em 50%, pulmão em 30% e melanoma em 25% (60). Estudos recentes demonstram a ação de RAS como um efetor adicional na promoção da tumorigênese (50, 60).

RAF é uma serina/treonina cinase que é ativada e recrutada na membrana plasmática e interage com o RAS (50). A dimerização do RAF ocorre por fosforilação e desfosforilação de diferentes domínios. RAF apresenta as isoformas A-RAF, B-RAF, C-RAF ou RAF 1 e é recrutada na membrana celular pela ativação de RAS e ativada por um processo complexo envolvendo a fosforilação de múltiplos cofatores. Esse processo compreende o recrutamento na membrana plasmática pela interação com RAS, dimerização da proteína RAF, fosforilação e desfosforilação de diferentes domínios, dissociação da proteína inibitória RAF cinase (RKIP) (50).

Uma vez ativados, todos os membros da família RAF são capazes de iniciar a cascata de fosforilação, onde a ativação de RAF e MEK simultaneamente ativam a ERK. Contudo, em contraste com a complexidade observada na ativação de RAF, MEK e ERK são ativados por uma simples fosforilação (40).

A existência de outros mecanismos que influenciam a oncogênese é importante na avaliação de que somente o bloqueio de RAF não é suficiente para bloquear a via RAF-MEK-ERK, sendo necessária a inibição de múltiplos efetores. O bloqueio dessas vias acaba sendo deletério também para células normais (40).

A proteína RAF ativa diretamente MEK 1 e 2 e que subsequentemente fosforilam os resíduos de treonina e tirosina em ERK 1 e 2 (40, 62).

RAF 1 tem sido proposto como regulador da apoptose na membrana mitocondrial (40, 62). A superexpressão da proteína RAF está associada com uma resposta no crescimento celular, estando relacionada a apoptose (62). Estruturas de diferentes classes têm sido desenvolvidas para a inibição de RAF (64).

Alternativamente, a expressão de VEGF induzida por RAF pode promover a angiogênese. RAF induz a expressão de fatores de crescimento e contribui para prevenção da apoptose bem como a resistência a drogas quimioterápicas ou fatores de expressão de crescimento (63).

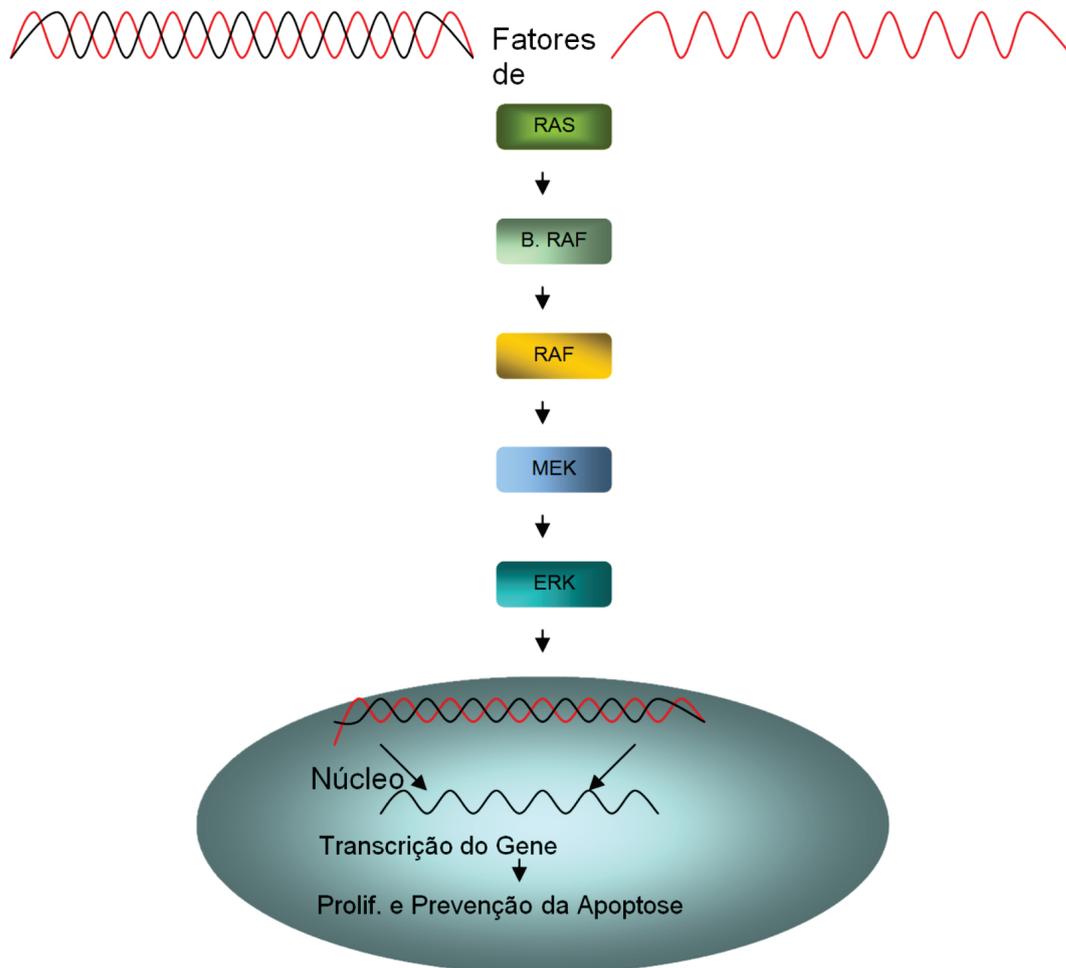
Múltiplos sinais convergem para a regulação da atividade de RAF. Sua ativação pode ocorrer pela ação GTPase de RAS. Contudo, a ativação do RAF é complexa, facilitando a associação na membrana plasmática de RAF citosólica, onde atividades sinalizadoras adicionais, incluindo fosforilação e desfosforilação, são requeridas para a atividade da função dessas tirosina cinases (63).

Por inúmeras razões, a via RAF-MEK-ERK está envolvida em várias intervenções terapêuticas, podendo influenciar na resistência a drogas quimioterápicas e na ativação ectópica, que induz RAF a uma resistência a doxorubicina e paclitaxel em câncer de mama (60, 69).

MEK (proteína ativada por mitógeno) é uma proteína cinase. Sua atividade é positivamente regulada pela fosforilação de RAF ou resíduo S no domínio catalítico. MEK vai ativar a ERK. Sendo que ERK 1/2 são encontradas em todas as células e estão associadas a receptores da membrana plasmática e ao seu mecanismo de transporte, sendo então necessárias para a motilidade celular (70), conforme apresentado na figura 2.

MAPKs são geralmente expressas em todos os tipos celulares, e sua função é regulada por uma resposta específica que difere entre as células. As MAPKs mais extensamente estudadas são ERK 1/2 (62, 63).

Figura 2 – Via RAS-RAF-MEK-ERK.



Fonte: Via RAS-RAF-MEK-ERK, Dhilon et al., 2007.

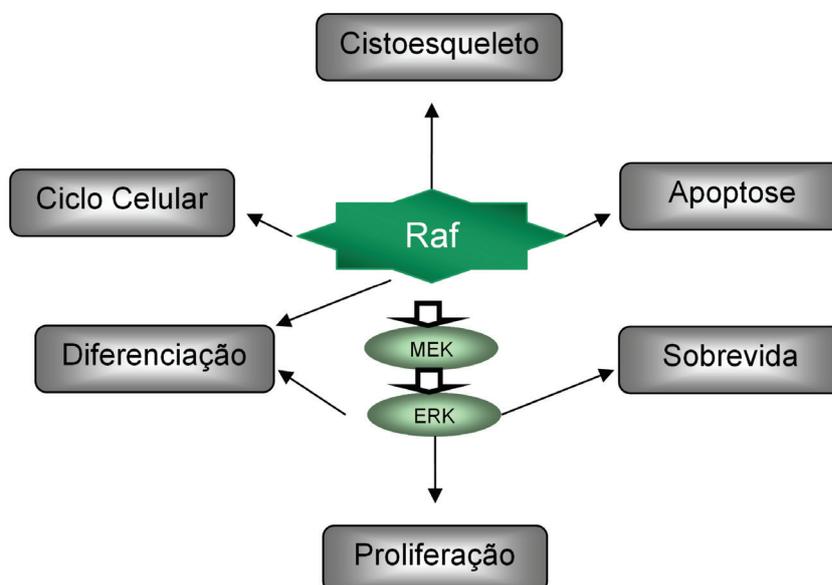
2.3.3 ERK

A ERK é uma cinase que regula um sinal extracelular, sendo uma das MAPKs mais estudadas. Faz parte de uma via de transdução que transmite estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores e outros. A ERK é responsável pela integração de sinais ambientais e pela retransmissão dessa informação para o sistema de controle do ciclo celular (71). As ERK 1 e 2 (1/2) são distribuídas em toda a célula, estando associadas a receptores da membrana plasmática e transportadores de sinal (72). A via da ERK está desregulada em um terço das neoplasias em humanos (63).

Todos esses componentes sinalizadores podem operar junto aos receptores de membrana e assim formar uma rede complexa de interação proteica, que regulam essencialmente todos

os processos relacionados ao estímulo celular como proliferação, diferenciação, resposta ao estresse e apoptose (figura 3) (72, 73).

Figura 3 – Rede de interação proteica que regula o estímulo celular.



Fonte: Via RAS-RAF-MEK-ERK, Dhillon et al., 2007.

Os sinais extracelulares regulados pela ERK1/2 são também mitógenos ativados através da fosforilação da Thr 202 e Tyr 204 (74). A ativação é mediada pela MEK1, que é fosforilada por RAF, a qual é ativada por RAS. EGF, HGF e PDGF também ativam ERK, estando associados com proliferação e/ou diferenciação (75).

O câncer é o resultado da desregulação de múltiplas vias de sinalização, e a inibição de uma única via pode não ser suficiente para promover a apoptose ou inibir o crescimento (76, 77). Muitos receptores de tirosina cinases são capazes de ativar esta via, como o EGFR, PDGF, VEGF e c-Kit. O EGFR ativa um receptor de tirosina cinase intracelular e pode ser ativado e inativado por proteínas fosforiladas (73, 74).

A proteína ERK tem múltiplos alvos, as funções celulares da ERK são diversas e incluem regulação e proliferação do ciclo celular sobrevivida, mitose e migração (71).

A atividade da ERK é regular uma lista crescente de substratos que se estima compreender cerca de 160 proteínas (48). Os maiores substratos da ERK são proteínas nucleares, mas outros são encontrados no citoplasma e em várias organelas. A ativação do ERK pela fosforilação pode regular vários vários Ets (exemplo Elk – 1). Estudos usando abordagens farmacológicas e genéticas têm mostrado que o MEK e a ERK são necessários para a transformação das ativi-

dades do RAS e outros oncogenes (78, 79).

Muitos inibidores do EGFR, RAS, RAF e MEK têm sido desenvolvidos como alvo de diferentes componentes da sinalização da ERK com vários agentes que adicionam ou expandem a terapêutica contra o câncer. As pesquisas evidenciam o aumento da complexidade da cascata RAF-MEK-ERK. Essa complexidade sugere que os alvos deste caminho não são simples. O desenvolvimento de inibidores distintos para os inúmeros alvos é essencial (81).

As moléculas avaliadas na superfície celular e as proteínas cinases continuam sendo alvo de interesse em um futuro terapêutico. Um estudo clínico demonstrou que a detecção da imunorreatividade de P-ERK em pacientes com CPNPC está associada com tumores avançados de maior agressividade (78). Assim, a análise clínica do progresso desses inibidores em paralelo com uma melhor compreensão da biologia e da genética do câncer tende a melhorar o entendimento para futuras terapias (78, 80).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer é o resultado da desregulação de múltiplas vias de sinalização, e a inibição de uma única via pode não ser suficiente para promover a apoptose ou inibir o crescimento. A ativação da ERK está envolvida em muitas funções celulares como motilidade, proliferação, diferenciação e apoptose. A ativação da ERK influencia na promoção e na ativação das células normais bem como na proliferação aberrante das células tumorais. Há poucas evidências da real função da ativação da ERK no carcinoma pulmonar não de pequenas células.

Sabe-se que a ERK encontra-se alterada em um terço das neoplasias, e na literatura há poucos estudos que avaliam a presença da ERK e sua correlação com a sobrevida em pacientes com adenocarcinoma.

O desenvolvimento de novos marcadores que visem analisar a agressividade tumoral através de estudos de sobrevida é de primaz importância para podermos talvez aumentar a sobrevida em pacientes com carcinoma não de pequenas células.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Analisar os níveis da ERK ativada em peças cirúrgicas de pacientes em estágios iniciais de adenocarcinoma de pulmão que foram submetidos à lobectomia pulmonar .

4.2 Objetivos secundários

1. Correlacionar os níveis imuno-histoquímicos da ERK ativada com variáveis clínicas e patológicas de pacientes com adenocarcinoma de pulmão submetidos a tratamento cirúrgico.

2. Avaliar a possibilidade de relação entre os níveis da ERK ativada com sobrevida e os diferentes estágios do adenocarcinoma.

3. Realizar análise de enriquecimento de base de dados de microarranjos para verificar a correlação de expressão gênica da ERK com adenocarcinoma de pulmão.

5 REFERÊNCIAS

1. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2013 May;143(5 Suppl):e1S-e29S.
2. Lam S, Lam B, Petty TL. Early detection for lung cancer. New tools for case finding. Can Fam Physician. 2001 Mar;47:537-44.
3. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. 2007 Sep;132(3 Suppl):29S-55S.
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin Proc. 2008 May;83(5):584-94.
5. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. Carcinogenesis. 2007 Mar;28(3):507-18.
6. Dacic S. Molecular diagnostics of lung carcinomas. Arch Pathol Lab Med. 2011 May;135(5):622-9.
7. Duarte RL, Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. J Bras Pneumol. 2006 Jan-Feb;32(1):56-65.
8. Szabo E, Mao JT, Lam S, Reid ME, Keith RL. Chemoprevention of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2013 May;143(5 Suppl):e40S-60S.
9. Bach PB, Kattan MW, Thornquist MD, Kris MG, Tate RC, Barnett MJ, et al. Variations in lung cancer risk among smokers. J Natl Cancer Inst. 2003 Mar 19;95(6):470-8.

10. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
11. Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, et al. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Nov 1;92(21):1764-72.
12. Alberts WM. Introduction: Diagnosis and management of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd Edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):20S-2S.
13. Leone FT, Evers-Casey S, Toll BA, Vachani A. Treatment of Tobacco Use in Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2013 May;143(5 Suppl):e61S-77S.
14. Van Zandwijk N, Hirsch FR. Chemoprevention strategies for non-small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2002 Mar;14(2):185-90.
15. Consonni D, De Matteis S, Lubin JH, Wacholder S, Tucker M, Pesatori AC, et al. Lung cancer and occupation in a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2010 Feb 1;171(3):323-33.
16. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J.* 2009 Jun;33(6):1485-97.
17. Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, de Fraipont F, Lantuejoul S, Frappat V, et al. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J Suppl.* 2003 Jan;39:36s-44s.
18. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Mar;60(3):319-26.

19. Jeanmart M, Lantuejoul S, Fievet F, Moro D, Sturm N, Brambilla C, et al. Value of immunohistochemical markers in pre-invasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2195-203.
20. Keith RL, Miller YE. Lung cancer: genetics of risk and advances in chemoprevention. *Curr Opin Pulm Med*. 2005 Jul;11(4):265-71.
21. Brunelli A, Kim AW, Berger KI, Addrizzo-Harris DJ. Physiologic Evaluation of the Patient With Lung Cancer Being Considered for Resectional Surgery: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e166S-90S.
22. Wisnivesky JP, Yung RC, Mathur PN, Zulueta JJ. Diagnosis and Treatment of Bronchial Intraepithelial Neoplasia and Early Lung Cancer of the Central Airways: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e263S-77S.
23. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the Diagnosis of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e142S-65S.
24. Nana-Sinkam SP, Powell CA. Molecular Biology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e30S-9S.
25. Carvalho PE, Antonangelo L, Bernardi FD, Leao LE, Rodrigues OR, Capelozzi VL. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2000 Nov;30(11):478-86.
26. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010 May 1;316(8):1324-31.

27. Ellis PM, Blais N, Soulieres D, Ionescu DN, Kashyap M, Liu G, et al. A systematic review and Canadian consensus recommendations on the use of biomarkers in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Aug;6(8):1379-91.
28. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb;6(2):244-85.
29. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest*. 2009 Jul;136(1):260-71.
30. Capelozzi VL. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. *J Bras Pneumol*. 2009 Apr;35(4):375-82.
31. Au NH, Cheang M, Huntsman DG, Yorida E, Coldman A, Elliott WM, et al. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *J Pathol*. 2004 Sep;204(1):101-9.
32. Greenberg AK, Yee H, Rom WN. Pre-neoplastic lesions of the lung. *Respir Res*. 2002;3:20.
33. Greenberg AK, Lee MS. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med*. 2007 Jul;13(4):249-55.
34. Schwartz AM, Rezaei MK. *Diagnostic Surgical Pathology in Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer*, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e251S-62S.
35. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. *Treatment of Stage I and II Non-small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer*, 3rd ed: Ameri-

can College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013 May;143(5 Suppl):e278S-313S.

36. Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, et al. Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res*. 2001 Sep 1;61(17):6500-10.

37. Chu LH, Chen BS. Construction of a cancer-perturbed protein-protein interaction network for discovery of apoptosis drug targets. *BMC Syst Biol*. 2008;2:56.

38. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1105-11.

39. Ohashi K, Maruvka YE, Michor F, Pao W. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1070-80.

40. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3113-21.

41. Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb;12(2):104-17.

42. Wen J, Fu J, Zhang W, Guo M. Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Mod Pathol*. 2011 Jul;24(7):932-43.

43. Laurie SA, Goss GD. Role of epidermal growth factor receptor inhibitors in epidermal growth factor receptor wild-type non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1061-9.

44. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*. 2006 Feb;8(2):77-82.

45. Sadiq AA, Salgia R. MET as a possible target for non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1089-96.
46. Balko JM, Jones BR, Coakley VL, Black EP. MEK and EGFR inhibition demonstrate synergistic activity in EGFR-dependent NSCLC. *Cancer Biol Ther*. 2009 Mar 15;8(6):522-30.
47. Mosca E, Barcella M, Alfieri R, Bevilacqua A, Canti G, Milanese L. Systems biology of the metabolic network regulated by the Akt pathway. *Biotechnol Adv*. 2012 Jan-Feb;30(1):131-41.
48. Meert AP, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte JJ, Mascaux C, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J*. 2002 Oct;20(4):975-81.
49. Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol*. 2006 Aug;59(8):790-800.
50. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1263-84.
51. Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1248-55.
52. Ross JA, Rosen GD. The molecular biology of lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*. 2002 Jul;8(4):265-9.
53. Saintigny P, Burger JA. Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discov Med*. 2012 Apr;13(71):287-97.
54. Cagle PT, Chirieac LR. Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May;136(5):504-9.

55. Alexander S, Friedl P. Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol Med.* 2012 Jan;18(1):13-26.
56. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009 Oct 15;361(16):1570-83.
57. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008 Sep 5;134(5):703-7.
58. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2000 Mar 4;144(5):646-74.
59. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, et al. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science.* 1999 Nov 26;286(5445):1738-41.
60. Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 15;14(2):342-6.
61. Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3159-71.
62. Dhanasekaran DN, Johnson GL. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3097-9.
63. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3279-90.
64. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3291-310.

65. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3122-42.
66. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Apr;161(4 Pt 1):1355-67.
67. Mor A, Philips MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:771-800.
68. Kulesza P, Ramchandran K, Patel JD. Emerging concepts in the pathology and molecular biology of advanced non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol*. 2011 Aug;136(2):228-38.
69. Mok T, Yang JJ, Lam KC. Treating patients with EGFR-sensitizing mutations: first line or second line--is there a difference? *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1081-8.
70. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Nov;6(11):827-37.
71. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3227-39.
72. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-12.
73. Buder-Hoffmann S, Palmer C, Vacek P, Taatjes D, Mossman B. Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) and role in cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Apr;24(4):405-13.
74. Hindley A, Kolch W. Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci*. 2002 Apr 15;115(Pt 8):1575-81.

75. Mirza AM, Gysin S, Malek N, Nakayama K, Roberts JM, McMahon M. Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol*. 2004 Dec;24(24):10868-81.
76. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
77. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):472-82.
78. Vicent S, Lopez-Picazo JM, Toledo G, Lozano MD, Torre W, Garcia-Corchon C, et al. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. *Br J Cancer*. 2004 Mar 8;90(5):1047-52.
79. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012 Aug;66(2):105-43.
80. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J. Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems*. 2006 Feb-Mar;83(2-3):81-90.
81. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*. 2008 Feb;18(1):54-61

6 RESEARCH ARTICLE

THE POTENTIAL ROLE OF EXTRACELLULAR REGULATORY KINASE IN THE SURVIVAL OF PATIENTS WITH EARLY STAGE ADENOCARCINOMA

Simone de Leon Martini^{1,2*}, Carolina Beatriz Müller⁴, Rosalva Thereza Meurer⁶, Marilda da Cruz Fernandes⁶, Rodrigo Mariano², Mariel Barbachan e Silva², Fábio Klamt^{4,5}, and Cristiano Feijo Andrade^{1,2}.

Authors' Affiliations:

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Pulmonares, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90035-903, Porto Alegre (RS), Brasil

²Laboratório de Pulmão e Vias Aéreas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 90035-903, Porto Alegre (RS), Brasil

³Departamento de Cirurgia Torácica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 90035-903, Porto Alegre (RS), Brasil

⁴Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS, 90035-003, Porto Alegre (RS), Brasil

⁵Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Translational em Medicina (INCT-TM), 90035-903, Porto Alegre (RS), Brasil

⁶Laboratório de Pesquisa em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), 90050-170, Porto Alegre (RS), Brasil

Corresponding Author: Cristiano Feijó Andrade Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Thoracic Surgery Department Ramiro Barcelos, 2.350 / 90035-903, Porto Alegre (RS) Brasil Phone: + 55 513359-8684 Fax: +55 513359-8884. E-mail address: cristianofa@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer is among the most common types of neoplasias, and adenocarcinoma is the most frequent histological type. There is currently an extensive search for prognostic biomarkers of squamous nonsmall cell lung cancer.

Objective: To analyze the correlation of clinical data and patient survival with the levels of activated extracellular regulatory kinase (ERK) in histological samples of surgically resected early stage lung adenocarcinoma.

Methods: We randomly selected 36 patients with stage I or II lung adenocarcinoma who underwent pulmonary lobectomy between 1998 and 2004. Patients were divided into the following 2 groups according to immunohistochemical profile: a group with <15% ERK-positive tumor cells and a group with $\geq 15\%$ ERK-positive tumor cells. For data comparison, an enrichment analysis of a microarray database was performed (GSE29016, n = 72).

Results: Activated ERK levels were $\geq 15\%$ and <15% in 21 (58%) and 15 (43%) patients, respectively. There were no statistically significant differences in age, sex, smoking history, and body mass index among the groups stratified by ERK levels. The survival rate was lower in the ERK $\geq 15\%$ group than in the ERK <15% group (P = 0.045). Enrichment analyses showed no correlation between variations in gene expression of ERK in patients with adenocarcinoma and survival rates in patients with stage I and combined stage II+III disease.

Conclusions: High ERK positivity in cells from biological samples of lung adenocarcinoma is related with tumor aggressiveness and a poorer prognosis.

Keywords: Lung cancer, adenocarcinoma, extracellular regulatory kinase, survival.

INTRODUCTION

Lung cancer is among the most common types of neoplasms and is the leading cause of death in the United States and the second major cause of death in Brazil (1-4). Unfortunately, the disease is usually advanced at the time of diagnosis: thus, precluding surgical treatment and restricting patients to chemotherapy and/or radiation therapy with a minimal chance of cure (5). Due to this aggressive behavior of lung cancer, it is necessary to identify molecules, proteins, or

signaling pathways related to tumor growth, which have an influence on the outcome. The study of these prognostic factors could stimulate the development of new potential therapies targeting specific molecules (5).

A persistent search for prognostic biomarkers of nonsmall cell lung cancer (NSCLC) is currently ongoing (6). In this context, the epithelial growth factor receptor (EGFR)-dependent RAS-RAF-MEK-ERK signaling cascade is under intensive investigation to identify new prognostic factors of lung cancer because they regulate signals for cell growth and survival and are involved in cell cycle regulation, angiogenesis, cell proliferation, and migration (8-10). A third of all forms of cancers are associated with enhanced activity of this cascade (11). For this reason, many EGFR (14, 15), RAS, RAF, and MEK inhibitors have been developed as potential blockers of the activity or proliferation of different components of the ERK signaling pathway (16-18). Therefore, the potential of overactive RAS, RAF, MEK, or ERK as prognostic factors for lung adenocarcinoma has become an interesting area of research.

Most of the studies searching for prognostic factors on NSCLC encompass all its types but do not discriminate in a specific cell type or samples from a particular stage, which makes it difficult to draw more detailed conclusions (34). Thus, it is essential to have a more specific population with minimal confusing factors to study potential prognostic factors in NSCLC. Based on these concerns, we selected only those patients who had been surgically treated for early lung adenocarcinoma to study the relationship of ERK and prognosis in this particular population.

We hypothesized that increased levels of activated ERK in patients with lung adenocarcinoma were associated with a poorer prognosis or decreased patient survival. Therefore, we conducted an immunohistochemical study using tumor samples from patients surgically treated for lung adenocarcinoma and performed a microarray analysis of experiments from different databases that included a population having a profile similar to that of our samples.

MATERIALS AND METHODS

We selected patients with lung adenocarcinoma who underwent pulmonary resection between 1998 and 2004 and were included in a previous study by Sanchez et al. (19). The present work was approved by the local Research Ethics Committee under protocol number 1852/08.

Surgical staging was determined according to the TNM classification system (20). All data related to preoperative evaluation, surgical techniques, and postoperative results are described in the article by Sanchez et al (19). We randomly selected 36 patients with postoperative stage I or II disease and with available survival data and immunohistochemical samples. Adjuvant therapy was selected according to postoperative staging.

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION

Gene expression analyses were performed using microarray data from five different studies (21-25). However, we present data from a single study by Staaf et al, a database that included 39 adenocarcinoma patients with 72 available patients (GSE29016, Illumina HT-12 V3. 0) (21). GSE29016 was retrieved from the gene expression database Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), considering it was the only experiment that included all parameters analyzed in our study. To perform gene expression enrichment analysis, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software, which requires a gene set, the parameters to be analyzed, and gene expression data for data processing was used. We used the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) to obtain the gene set to be analyzed. Subsequently, we employed the online tool string to confirm interactions among the 261 genes of the group. The following parameters were analyzed: smoking status (8 nonsmokers and 21 smokers), TNM stage (30 with stage I and 9 with combined stage II+III disease, respectively), and sex (18 males and 21 females).

After the enrichment analysis was performed using GSEA as described by Mootha et al (26), a survival curve for each of the parameters versus gene expression was plotted using GraphPad Prism 5.

SAMPLES

Tissue samples for histopathological studies were obtained from surgical specimens of primary adenocarcinoma lesions from patients with surgical stage I or II. All samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin tissue blocks,

which were then processed for immunohistochemical analyses. A tissue section was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by a pathologist to confirm the presence of adenocarcinoma in the sample.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Tissue sections measuring 4 cm in thickness were prepared on silanized slides. According to a previously standardized protocol, the following procedures were performed after deparaffinization and rehydration: heat-mediated antigen retrieval with sodium citrate buffer, blocking of endogenous peroxidase in a 5% H₂O₂ solution in methanol, and blocking of nonspecific binding in 1% bovine serum albumin (BSA) solution. Subsequently, the slides were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibody specific for the double phosphorylated form of ERK1/2 (Thr202/Tyr204; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) diluted in a 1:300 ratio in 1% BSA. Plate washing, incubation, and color reaction were performed using the HRP-labeled conjugated polymer kit (Invitrogen®). Sections were then counterstained with hematoxylin. Negative controls were obtained using the same protocol, but without the primary antibody.

ANALYSIS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL REACTIONS

Immunohistochemical analyses were performed by counting ERK-positive cells/1000 cells in consecutive microscopic fields, taking into account only tumor cells. Cell count was performed by two independent observers. A maximum interobserver discrepancy of 30% was considered or a third observer was included. Cell counting was performed using a Zeiss® Imager microscope coupled to the Image Pro Plus® 6.1 software. For statistical analysis, patients were divided into the following 2 groups based on a previous study: a group with <15% ERK-positive tumor cells and a group with ≥15% ERK-positive tumor cells (34) (Figure 1).

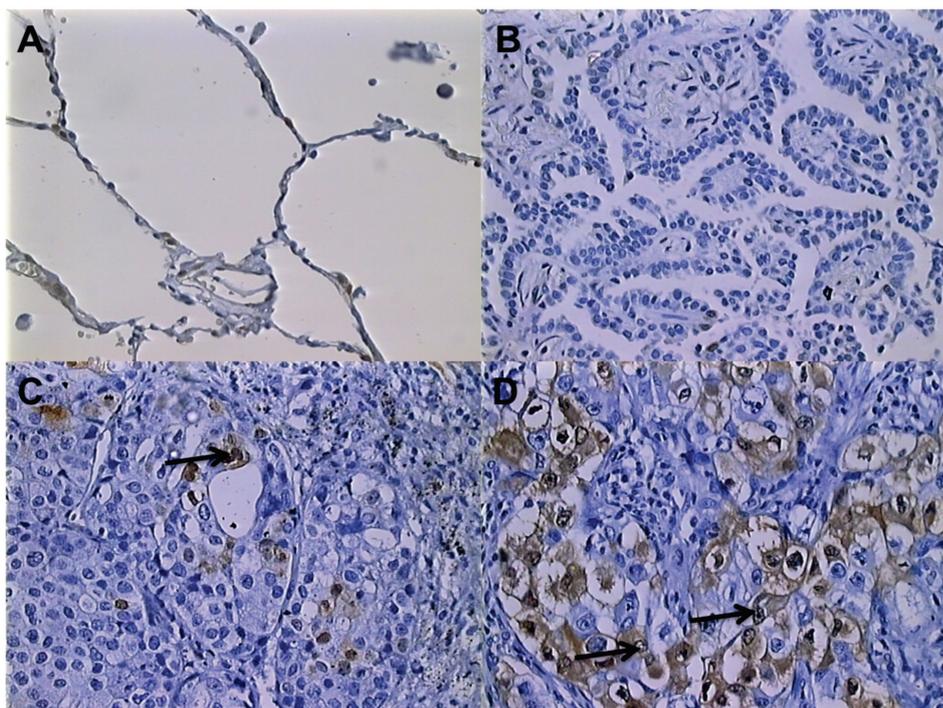


Figure 1. Immunohistochemical reaction for ERK detection in normal lung tissue (A), lung adenocarcinoma without ERK expression (B), and positive cases with low ERK expression (C) and high ERK expression (D). Nuclear and cytoplasmic staining is indicated by arrows.

STATISTICAL ANALYSES

Mean values were compared using Student's *t* test, whereas categorical variables were compared using Fisher's exact test. In addition, for survival analyses, we used Kaplan–Meier curves and Cox regression analyses in univariate and multivariate survival platforms. Statistical data were processed and analyzed using SPSS software, version 18.0 (IBM, USA, Chicago, 2009).

RESULTS

Activated ERK levels were $\geq 15\%$ and $< 15\%$ in 21 (58%) and 15 (43%) patients, respectively (Figure 1). There were no statistically significant differences in age, sex, smoking history, and BMI between the groups stratified by ERK (Table 1). When survival was compared between the ERK $\geq 15\%$ and ERK $< 15\%$ groups, the former group showed lower survival than the latter during the study period (Table 2). We also performed statistical analyses using a cutoff

threshold above and below 45% ERK positivity, and the results were very similar to those obtained when the cutoff threshold of above and below 15% were used.

Table 1 – Characteristics of lung adenocarcinoma patients according to positivity for extracellular regulatory kinase (ERK) in tumor cells

Characteristic	Total n = 36 100 %	Cellular positivity for ERK (%)		P
		< 15 n = 15 42 %	≥ 15 n = 21 58 %	
Age (in years)	64 ± 8	63 ± 8	65 ± 9	0.37 ^a
Males, number (%)	22 (61)	8 (53)	14 (67)	0.50 ^b
Staging, number (%)				0.171 ^b
I A	7 (19)	2 (13)	5 (24)	
I B	16 (44)	10 (67)	6 (29)	
II A	6 (17)	1 (7)	5 (24)	
II B	7 (19)	2 (13)	5 (24)	
Smokers, number (%)	26 (72)	9 (60)	17 (81)	0.26 ^b
FEV1, %	82 ± 22	77 ± 24	87 ± 19	0.174 ^a
BMI, kg/m ²	25.5 ± 5.5	25.3 ± 5.5	25.6 ± 5.6	0.84 ^a

Table 2 – Selected characteristics and their relation with survival in patients with lung adenocarcinoma

Characteristic	N	Event	Multivariate analysis	
		number (%)	HR (95% CI)	P
ERK, per/1000 cells				
≥15	21	11 (52)	4.2 (1.0–17.1)	0.045
<15	15	3 (20)	1	
Age (in years)	36	14 (39)	1.04 (0.97–1.12)	0.32
Sex				
Male	22	9 (41)	1	
Female	14	5 (36)	1.1 (0.3–3.9)	0.90
BMI, kg/m ²	36	14 (39)	0.91 (0.81–1.03)	0.139
FEV1, %	36	14 (39)	0.99 (0.96–1.02)	0.324
Smoking history				
Present	26	10 (39)	0.4 (0.1–1.5)	0.40
Absent	10	4 (40)	1	

By using the multivariate Cox model after adjusting for age, sex, BMI, forced expiratory volume, and smoking history, the difference in survival between the ERK $\geq 15\%$ and $<15\%$ groups was not only maintained but also statistically significant ($P = 0.045$). This difference is shown graphically in Figure 2.

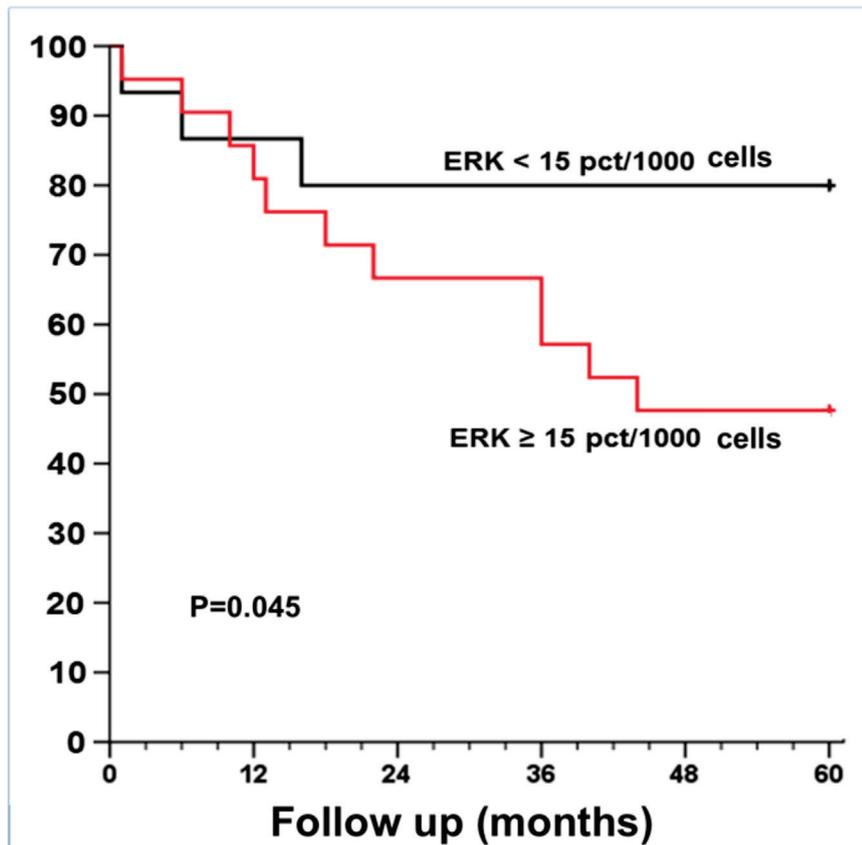


Figure 2. Kaplan–Meier mortality curves show that ERK quantification allows for discrimination between good and poor prognosis. The black line represents cases with $<15\%$ ERK-positive cells and the red line indicates cases with $\geq 15\%$ ERK-positive cells. The gray line represents the cumulative survival for all patients throughout the 5-year evaluation period.

Enrichment analysis showed no correlation of variations in ERK gene expression in the 39 adenocarcinoma patients with stage I and combined stage II+III disease. Likewise, gender and smoking did not show a positive correlation with variations in ERK gene expression (Figure 3).

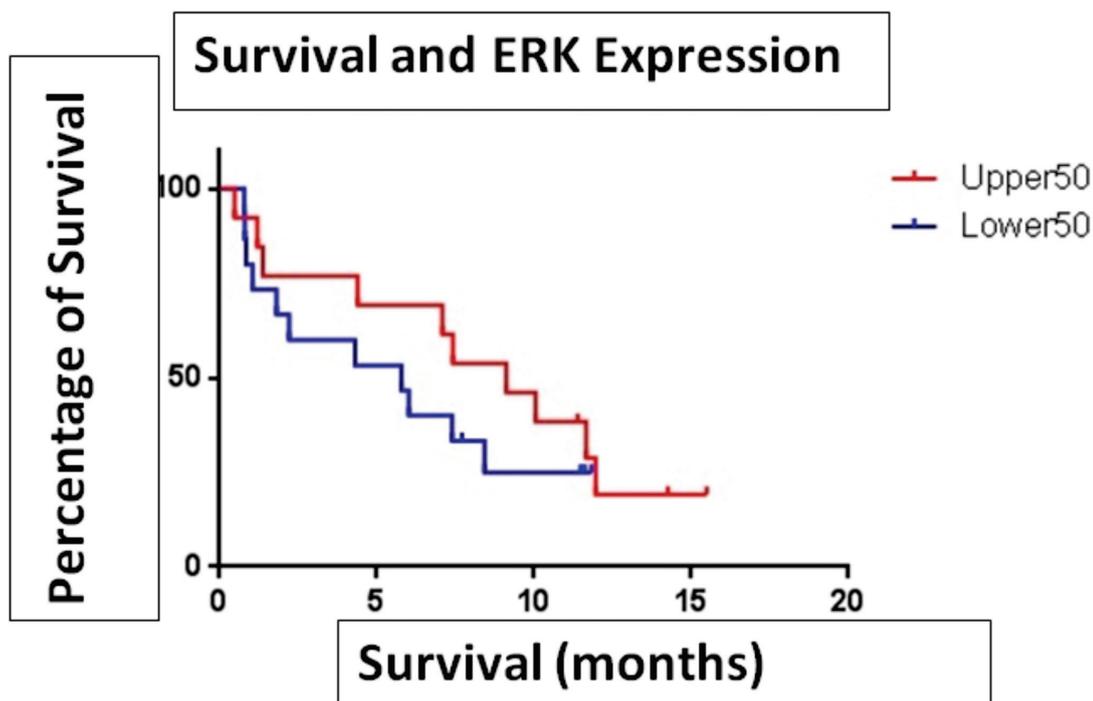


Figure 3. Survival analysis using the microarray dataset GSE29016, with 39 adenocarcinoma patients divided into two groups according to disease stage (stage I and combined stage II+III). No significant differences were observed between groups.

DISCUSSION

Cancer is the result of the deregulation of multiple signaling pathways, and the inhibition of a single pathway may not be sufficient to trigger apoptosis or growth inhibition (8, 27-29). ERK activation is involved in multiple cellular functions such as motility, proliferation, differentiation, and apoptosis (30, 31). ERK activation influences the development and activation of normal cells as well as the abnormal proliferation of tumor cells (32, 33). There is little evidence on the specific role of ERK activation in the development of NSCLC (34, 35). By studying 111 patients with NSCLC, Vincent et al demonstrated a positive correlation between ERK activation and later stages of the disease (34). Our study only examined patients with early stage adenocarcinoma who underwent surgical treatment: thus, constituting a population different from that described by Vincent et al (34), which included patients with advanced stages and different histological types of lung carcinoma. Moreover, Vicent et al separately analyzed ERK activation in the cytoplasm and nucleus and showed that there were no significant differences

between these cell compartments(34). Therefore, we decided to collectively analyze these parameters in our study. However, Harding et al suggested that receptor location, either in the plasma membrane or cytosol, may lead to different responses in the MAPK cascade activation (36). This finding is of great importance in the search for new therapies with ERK, and not MEK, as a target (37). It is believed that signal transduction is stronger in the plasma membrane and weaker in the cytosol (38). Therefore, activation of plasma membrane receptors would trigger a stronger cellular response, whereas ERK activation in the cytoplasm would affect only a subpopulation of cells, leading to an intermediate response (38). For this reason, future therapies would need to address differences in ERK cascade activation on the basis of receptor location. Furthermore, overexpression of this pathway may play an important role in the pathogenesis and progression of breast cancer and other cancers, making their components potential therapeutic targets (12, 13, 39).

We performed enrichment analysis using data from five different experiments (21-25), but because they yielded similar results, the dataset GSE29016 was selected because it was the only dataset containing all our study parameters. Our enrichment analysis had some limitations, in particular with regard to the number of patients diagnosed with adenocarcinoma. Only 39 patients were selected, and most of them were in stage I as verified in our dataset. Moreover, this experiment included few nonsmokers, which is expected in this disease group. Finally, our dataset contained more male patients, as opposed to the female predominance in the other datasets.

Our study demonstrated that high ERK levels are inversely correlated with survival. However, this was not revealed by the enrichment analysis, probably because of the sample type assayed (mRNA vs. protein) as well as the different patient profiles. In the literature, the presence of high ERK levels has been studied mainly in association with tumor aggressiveness and as potential therapeutic targets, and survival analyses have been restricted to only a few studies (40).

This study has several limitations that should be considered before interpreting the results. Our study included a small number of patients; however, they formed a specific group of individuals who did not show advanced stage disease and underwent surgical treatment. This also explains the limited number of patients with stage II disease. However, this makes the study population more homogeneous and helps in avoiding bias

associated with the inclusion of more patients with an advanced stages disease, which tend to show higher ERK expression.

CONCLUSION

Taken together, our results suggest that higher ERK positivity in cells from biological samples of patients with lung adenocarcinoma patients is associated with tumor aggressiveness and poorer prognosis. Despite its limitations, this study demonstrates the importance of the role of ERK in lung adenocarcinomas and reinforces the need for additional studies to confirm our findings.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre Institutional Research Fund) and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflict of interests to declare.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.*2010;60:277-300.
2. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244-85.
3. Consonni D, De Matteis S, Lubin JH, Wacholder S, Tucker M, Pesatori AC, et al. Lung cancer and occupation in a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 2010;171:323-33.
4. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: cancer journal for clinicians.* 2010;60:277-300.
5. Nana-Sinkam SP, Powell CA. *Molecular Biology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer*, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2013;143:e30S-9S.
6. Chanin TD, Merrick DT, Franklin WA, Hirsch FR. Recent developments in biomarkers for the early detection of lung cancer: perspectives based on publications 2003 to present. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10:242-7.
7. Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1248-55.
8. Kreeger PK, Lauffenburger DA. Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis* 2010;31:2-8.
9. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:827-37.

10. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26:3113-21.
11. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAPkinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012;66:105-43.
12. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2002;8:1747-53.
13. Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997;99:1478-83.
14. Ohashi K, Maruvka YE, Michor F, Pao W. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. *J Clin Oncol* 2013;31:1070-80.
15. Mok T, Yang JJ, Lam KC. Treating patients with EGFR-sensitizing mutations: first line or second line--is there a difference? *J Clin Oncol* 2013; 31:1081-8.
16. Kulesza P, Ramchandran K, Patel JD. Emerging concepts in the pathology and molecular biology of advanced non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2011;136:228-38.
17. Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:104-17.
18. Balko JM, Jones BR, Coakley VL, Black EP. MEK and EGFR inhibition demonstrate synergistic activity in EGFR-dependent NSCLC. *Cancer Biol Ther* 2009;8:522-30.
19. Sanchez PG, Vendrame GS, Madke GR, Pilla ES, Camargo Jde J, Andrade CF, et al. Lobectomy for treating bronchial carcinoma: analysis of comorbidities and their impact on postoperative morbidity and mortality. *J Bras Pneumol* 2006;32:495-504.

20. Pepek JM, Chino JP, Marks LB, D'Amico T A, Yoo DS, Onaitis MW, et al. How well does the new lung cancer staging system predict for local/regional recurrence after surgery?: A comparison of the TNM 6 and 7 systems. *J Thorac Oncol* 2011;6:757-61.
21. Staaf J, Jonsson G, Jonsson M, Karlsson A, Isaksson S, Salomonsson A, et al. Relation between smoking history and gene expression profiles in lung adenocarcinomas. *BMC Med Genomics* 2012;5:22.
22. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 2012;150:1121-34.
23. Landi MT, Dracheva T, Rotunno M, Figueroa JD, Liu H, Dasgupta A, et al. Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PloS One* 2008;3:e1651.
24. Selamat SA, Chung BS, Girard L, Zhang W, Zhang Y, Campan M, et al. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. *Genome Res* 2012;22:1197-211.
25. Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, et al. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol* 2006;24:1679-88.
26. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003;34:267-73.
27. Ross JA, Rosen GD. The molecular biology of lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:265-9.
28. Jeanmart M, Lantuejoul S, Fievet F, Moro D, Sturm N, Brambilla C, et al. Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2195-203.

29. Greenberg AK, Lee MS. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:249-
30. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.
31. Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* 2007;26:3159-71.
32. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24:21-44.
33. Dhanasekaran DN, Johnson GL. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* 2007;26:3097-9.
34. Vicent S, Lopez-Picazo JM, Toledo G, Lozano MD, Torre W, Garcia-Corchon C, et al. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. *Br J Cancer* 2004;90:1047-52.
35. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26:3279-90.
36. Harding A, Tian T, Westbury E, Frische E, Hancock JF. Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol* 2005;15:869-73.
37. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26:3291-310.
38. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100-12.

39. Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* 1998;153:1411-23.

40. Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:342-6.

7 CONCLUSÕES

Pela análise dos níveis imuno-histoquímicos da ERK em pacientes nos estágios iniciais de adenocarcinoma pulmonar submetidos a lobectomia, observamos uma correlação negativa entre os níveis de ERK e a sobrevida. Os pacientes que apresentaram níveis de ERK superiores a 15% apresentaram uma menor sobrevida, podendo isso estar relacionado a uma maior agressividade tumoral.

Analisaram-se as características clínicas desses pacientes correlacionando com os níveis de ERK, e não houve diferença significativa com relação às variáveis VEF1, sexo, IMC e tabagismo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de analisar os níveis de ERK em pacientes com adenocarcinoma, correlacionando com a sobrevida, avaliamos a presença do ERK ativado em uma população de pacientes em estágios iniciais do adenocarcinoma

Nossos resultados sugerem que a alta positividade de ERK em células de amostras biológicas de pacientes com adenocarcinoma de pulmão está relacionada a tumores mais agressivos e com pior prognóstico. Apesar das suas limitações, este estudo demonstra a importância do papel do ERK em adenocarcinomas de pulmão e reforça a necessidade de estudos que confirmem nossos achados.

