

P 4070**Implementação de um protocolo de análise molecular para o gene EGFR em amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina**

Eriza Cristina Hahn, Ursula da Silveira Matte, Patrícia Ashton-Prolla, Jane Maria Ulbrich, Sandra Leistner-Segal
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Devido ao seu importante papel na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR – epidermal growth factor receptor) é um dos principais alvos para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como o adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC - *Non-small-cell lung carcinoma*). O gene *EGFR* está localizado na região cromossômica 7p11.2 e é composto por 28 éxons, sendo os de número 18, 19, 20 e 21 os responsáveis pela codificação do domínio protéico com função tirosina-quinase. Mutações com relevância clínica localizadas nestes éxons constituem importantes biomarcadores para a predição da eficiência de tratamentos que utilizam inibidores de tirosina-quinase de EGFR. Neste contexto, torna-se indispensável a testagem molecular de *EGFR* antes da tomada de decisão acerca do tratamento, sendo necessária a padronização e validação de protocolos que garantam confiabilidade e sensibilidade no resultado do teste. Assim, o objetivo deste trabalho é apresentar o processo de padronização de técnicas utilizadas na testagem molecular de mutações nos éxons 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* em pacientes com NSCLC. Amostras de biópsias fixadas em formalina e embebidas em parafina (N=19) foram utilizadas para a extração de DNA. Devido às dificuldades inerentes ao uso de tecidos preservados desta maneira, foram testados quatro diferentes protocolos de extração, sendo o kit comercial *ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep system* o mais adequado em termos de qualidade e quantidade do DNA. Em seguida, procedeu-se com a padronização da técnica de PCR para cada um dos éxons. Durante este processo, foram executados diversos protocolos de titulações de *primers* e de $MgCl_2$, bem como a testagem de diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*. Após amplificação dos quatro éxons, foi realizado o seqüenciamento direto pelo método de Sanger, para padronização deste procedimento em amostras controle. No presente momento, estamos participando de um controle de Qualidade Internacional (EMQN), no qual amostras contendo as principais mutações com relevância clínica serão genotipadas, a fim de que o teste molecular seja validado e disponibilizado como exame de rotina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Palavras-chaves: EGFR, mutação, padronização.