



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

PEDRO HENRIQUE NOGUEIRA DE SOUZA

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS MARCADORES *PCNA* E *BRDU* EM
PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS DE PULMÃO, PROCEDENTES DE
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA CIDADE DO RECIFE – PE**

RECIFE

2019

PEDRO HENRIQUE NOGUEIRA DE SOUZA

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS MARCADORES *PCNA* E *BRDU* EM
PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS DE PULMÃO, PROCEDENTES DE
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA CIDADE DO RECIFE – PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Jacinto Costa Silva Neto

RECIFE

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

S729p	<p>Souza, Pedro Henrique Nogueira de Perfil imunohistoquímico dos marcadores PCNA e BRDU em pacientes portadores de neoplasias de pulmão, procedentes de um hospital universitário da cidade do Recife – PE/ Pedro Henrique Nogueira de Souza. – 2019. 54 f.; il.</p> <p>Orientador: Mário Ribeiro de Melo-Júnior. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia. Recife, 2019. Inclui referências e anexo.</p> <p>1. Neoplasias pulmonares. 2. Antígeno nuclear de célula em proliferação. 3. Bromodesoxiuridina. 4. Imunohistoquímica. 5. Biomarcadores. I. Melo-Júnior, Mário Ribeiro de (Orientador). II. Título.</p> <p>616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 291)</p>
-------	---

PEDRO HENRIQUE NOGUEIRA DE SOUZA

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS MARCADORES *PCNA* E *BRDU* EM
PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS DE PULMÃO, PROCEDENTES DE
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA CIDADE DO RECIFE – PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovado em: 13/09/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacinto Costa Silva Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.a. Dr.a. Paloma Lys de Medeiros (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.a. Dr.a. Rosa Valéria da Silva Amorim (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

“Quanto mais alto se subia, tanto menos se entendia, como a nuvem tenebrosa que na noite esclarecia; por isso quem a sabia fica sempre não sabendo, toda ciência transcendendo” (CRUZ, J., 1577, p.137).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, através do Programa de Pós Graduação em Patologia, pela oportunidade de crescimento pessoal e por sua contribuição no desenvolvimento científico deste país.

Ao Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM-UFPE), ao Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas (HC-UFPE) e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pela parceria tão necessária em tempos de escassez de recursos financeiros para a ciência.

Aos servidores da UFPE e HC pelo suporte e paciência ao longo do curso, especialmente Romildo, Silvânia, Artur e Margarete.

Aos professores Jacinto Costa e Mário Ribeiro, que uniram esforços físicos e intelectuais para conceber o presente estudo de forma econômica, mas mantendo todo rigor científico preconizado pela academia.

Aos colegas de turma que compartilharam momentos únicos e irrepetíveis, que permanecem eternizados na lembrança com toda sua intensidade.

À minha namorada pela paciência e amor, sempre compreensiva quando, por várias vezes, minhas ausências roubaram nossos momentos.

À minha família por me ensinar valores que superam todo saber secular.

A Deus, que é.

RESUMO

No mundo inteiro, as neoplasias de pulmão apresentam maior taxa de incidência e mortalidade, liderando as estatísticas de novos casos de câncer, com uma estimativa de 2,1 milhões de pacientes diagnosticados em 2018. O correto diagnóstico da neoplasia direciona ao tratamento correto e mais efetivo, e a utilização de marcadores imunohistoquímicos (IHQ) nas neoplasias de pulmão, quando associada a outros métodos, possibilita um aumento na acuidade diagnóstica, subsidiando a escolha do protocolo terapêutico mais adequado. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil imunohistoquímico dos marcadores de proliferação celular PCNA e BrdU, em pacientes portadores de neoplasias de pulmão, comparando os achados com a imunomarcagem de lesões benignas e metastáticas. Foram selecionadas amostras de 55 pacientes. Desses, 52 eram portadores de neoplasia de pulmão, 2 possuíam tumores metastáticos, além de 2 casos de bronquiectasia. Entre os pacientes com informações relacionadas ao tabagismo, 72% eram ex-fumantes. A análise imunohistoquímica demonstrou um percentual de positividade para PCNA de 98,2%, incluindo positividade para os tumores metastáticos e as alterações não neoplásicas. A análise da BrdU apresentou positividade de 87,3%, incluindo as metástases e um caso de bronquiectasia. Dessa forma, se concluiu que o emprego da IHQ para PCNA e BrdU em pacientes portadores de câncer de pulmão, demonstrou limitações diagnósticas, uma vez que não possibilitou uma correta distinção entre lesões inflamatórias benignas, malignas ou metastáticas; não apresentando, portanto, especificidade diagnóstica para as neoplasias de pulmão, sendo recomendado o emprego de outros marcadores para essa finalidade.

Palavras-chaves: Neoplasias pulmonares. Antígeno nuclear de célula em proliferação. Bromodesoxiuridina. Imunohistoquímica. Biomarcadores.

ABSTRACT

Worldwide, lung cancer presents the highest incidence and mortality rate, leading the statistics on new cancer cases, with an estimated number of 2.1 million patients diagnosed in 2018. A correct diagnose of the neoplasia leads to the right and more effective treatment, and the use of immunohistochemical (IHC) markers for pulmonary cancer, when associated to other diagnostic methods, increases diagnostic accuracy, ensuring that the correct treatment protocol is being employed. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical profile of the cell proliferation PCNA and BrdU markers, in patients diagnosed with lung cancer, comparing the outcomes with the immunostaining of benign and metastatic lesions. A total of 55 patients samples were selected for the study. From them, 52 patients presented lung cancer, 2 patients had metastatic tumors, and the other 2 were diagnosed with bronchiectasis. Among patients who presented information related to smoking, 72% were former smoker. The results demonstrated 98.2% positivity for PCNA, including the metastatic tumors and the non-neoplastic lesions. The BrdU analysis presented 87.3% positivity, including metastasis and bronchiectasis. Thus, it is possible to conclude that the use of IHC for PCNA and BrdU in patients diagnosed with lung cancer has demonstrated diagnostic limitations once it did not allow a correct distinction among benign, neoplastic or metastatic lesions; therefore, not presenting diagnostic specificity for lung cancer, and the use of more specific biomarker for this purpose being recommended.

Keywords: Lung cancer. Proliferating cell nuclear antigen. Bromodeoxyuridine. Immunohistochemistry. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número de novos casos em 2018, ambos os sexos, todas as idades	16
Figura 2 –	Número de mortes em 2018, ambos os sexos, todas as idades	17
Figura 3 –	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma.....	19
Figura 4 –	Árvore traqueobrônquica, imagem adaptada.....	21
Figura 5 –	Vista frontal dos pulmões.....	22
Figura 6 –	Composição celular das vias aéreas proximais e distais.	23
Figura 7 –	Cavidade pleural.....	24
Figura 8 –	Ultraestrutura da membrana alveolar, corte transversal.	25
Figura 9 –	Variáveis histológicas do câncer de pulmão. A, adenocarcinoma formando uma glândula; no detalhe, IHQ positiva para o marcador TTF-1. B, carcinoma de células escamosas bem diferenciado, apresentando áreas de queratinização. C, carcinoma de células pequenas, com ilhas de pequenas células fortemente basofílicas e regiões de necrose. D, carcinoma de grandes células, apresentando pleomorfismo e sem evidência de diferenciação glandular ou escamosa.....	27

Figura 10 – Células de origem e alterações características de acordo com o subtipo histológico.....	28
Figura 11 – Método indireto simples, onde “M” é o marcador, “Ac 2” é o anticorpo secundário, “Ac 1” é o anticorpo primário e “Ag” é o antígeno.....	31
Figura 12 – Localização citogenética do PCNA: 20p12.3, braço curto (p) do cromossomo 20 na posição 12.3.....	31
Figura 13 – Estrutura molecular do PCNA.....	32
Figura 14 – Estrutura química da timidina (esquerda) e BrdU (direita).....	33
Figura 15 – Distribuição de casos por classificação histológica.....	37
Figura 16 – Percentual de pacientes com (azul) e sem (laranja) histórico de tabagismo.....	38
Figura 17 – IHQ demonstrando células positivas para PCNA. Barra de escala: 2 μ m.....	38
Figura 18 – IHQ demonstrando células positivas para BrdU. Barra de escala: 2 μ m.....	39
Figura 19 – Comparação entre os percentuais de positividade e negatividade do PCNA e BrdU.....	39
Figura 20 – Concordância qualitativa e quantitativa da imunomarcação com PCNA e BrdU.....	40

- Figura 21** – Percentual de positividade na marcação com PCNA e BrdU, em pacientes com histórico de tabagismo..... 41
- Figura 22** – Percentual de positividade na marcação com PCNA e BrdU, em pacientes sem histórico de tabagismo..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Tipos de câncer mais comuns, ambos os sexos, todas as idades.....	18
Tabela 2	– Número de mortes por tipo de câncer, ambos os sexos, todas as idades.....	18
Tabela 3	– Mortalidade segundo localização primária do tumor, em homens brasileiros, 2015.....	19
Tabela 4	– Mortalidade segundo localização primária do tumor, em mulheres brasileiras, 2015.....	19
Tabela 5	– Intensidade da marcação IHQ com PCNA, em percentual de ocorrência, em amostras de pulmão.....	40
Tabela 6	– Intensidade da marcação IHQ com BrdU, em percentual de ocorrência, em amostras de pulmão.....	40
Tabela 7	– Intensidade da marcação IHQ para PCNA e Brdu, em percentual de ocorrência, de pacientes com histórico de tabagismo.....	42
Tabela 8	– Intensidade da marcação IHQ para PCNA e Brdu, em percentual de ocorrência, de pacientes sem histórico de tabagismo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-BrdU	Anticorpo BrdU
Anti-PCNA	Anticorpo PCNA
BrdU	Bromodexosiidina
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPCNP	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas
CPPC	Câncer de Pulmão de Pequenas Células
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
Estadiamento TNM	Estadiamento tumor-nódulo-metástase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IHC	Imunohistochemistry
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
NCI	National Cancer Institute
NLST	National Lung Cancer Screening Trial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PET-TC	Positron Emission Tomography-Computed Tomography
Pro-SFTP B	Pro-Surfactant Protein B
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
TC	Tomografia Computadorizada
TTF-1	Fator de Transcrição da Tireoide 1
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	16
2.1.1	Fatores de Risco	17
2.1.2	Incidência	18
2.1.3	Incidência do câncer de pulmão	20
2.2	ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA DOS PULMÕES	20
2.2.1	Câncer de pulmão	25
2.2.2	Perfil molecular do câncer de pulmão	27
2.2.3	Rastreamento e diagnóstico	28
2.3	IMUNOHISTOQUÍMICA	30
2.3.1	Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)	31
2.3.2	Bromodesoxiuridina (BrdU)	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	GERAL	34
3.2	ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	CASUÍSTICA	35
4.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	35
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A – PARECER DO CEP	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é o tumor mais incidente e letal entre os tipos de câncer do mundo, com uma taxa de mortalidade relacionada de 1,6 milhões de mortes por ano. A correlação do cigarro com a mortalidade por câncer de pulmão foi bem estabelecida na literatura (RECK; RABE, 2017).

A maioria dos tumores de pulmão não causa sintomas até sua disseminação, contudo, algumas pessoas em estágios iniciais da doença manifestam algum sintoma. Dentre os mais comuns estão tosse persistente com piora progressiva, acompanhada ou não de sangue, dor no peito, rouquidão, falta de ar e infecções respiratórias recorrentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os fatores de risco relacionados ao histórico familiar contemplam a susceptibilidade genética herdada, que quando associada à exposição a agentes carcinógenos, fatores alimentares e comportamentais, desencadeiam alterações genéticas que culminam com o desenvolvimento e progressão da neoplasia. Essas alterações incluem ativação de vias de crescimento celular, e inibição de vias de supressão tumoral (HERBST; HEYMACH; LIPPMAN, 2008; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Os tipos histológicos de tumor de pulmão incluem adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de pequenas células e carcinoma neuroendócrino. Apesar de compartilharem várias características moleculares, a maioria das alterações genéticas de tais tumores é distinta (SWANTON; GOVINDAN, 2016). O diagnóstico é importante para o início do tratamento e manejo dos sintomas, porém, ainda é um ponto desafiador. A análise citológica associada a exames de imagem é o padrão tradicional para o diagnóstico, contudo, a sensibilidade varia entre 30 e 60%. Além disso, o benefício de biópsias consecutivas às cegas é limitado. Apesar da toracocentese ser amplamente utilizada na prática clínica, tal procedimento não está disponível em todas as unidades hospitalares. Com os avanços na biologia molecular do câncer, marcadores tumorais vêm sendo aplicados como ferramentas diagnósticas. Contudo, a acurácia diagnóstica de tais marcadores ainda é insipiente, sendo necessária a utilização de painéis com vários marcadores, elevando o impacto financeiro do diagnóstico e tratamento da doença (FENG *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017).

Considerando a problemática dos biomarcadores atualmente disponíveis para auxiliar o diagnóstico precoce do câncer de pulmão, seu impacto negativo no processo de recuperação de saúde do paciente e a oneração dos sistemas de saúde, o presente trabalho objetivou analisar o perfil de expressão dos marcadores de proliferação celular PCNA e BrdU e sua correlação com pacientes portadores de neoplasias de pulmão.

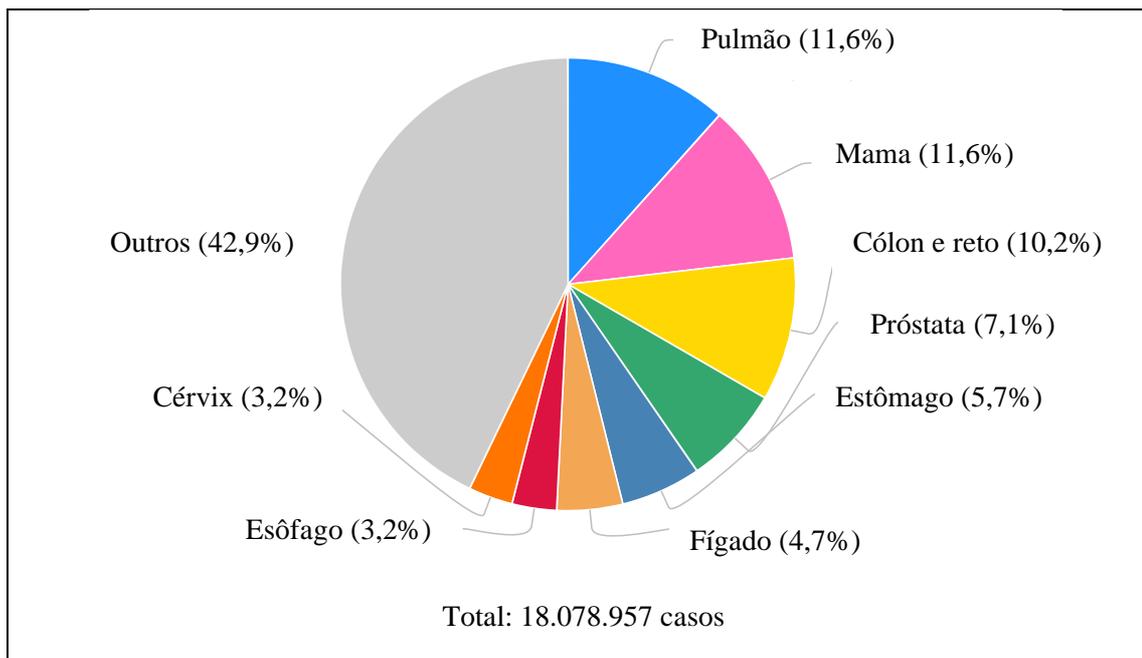
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o câncer como sendo um termo genérico designado para um amplo número de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Uma característica do câncer é o rápido surgimento de células anormais que crescem além dos seus limites usuais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Pode apresentar diversos subtipos anatômicos e moleculares que requerem estratégias de manejo específicas. Outros termos comuns utilizados para descrever a doença são tumores malignos e neoplasias (WHO, 2019).

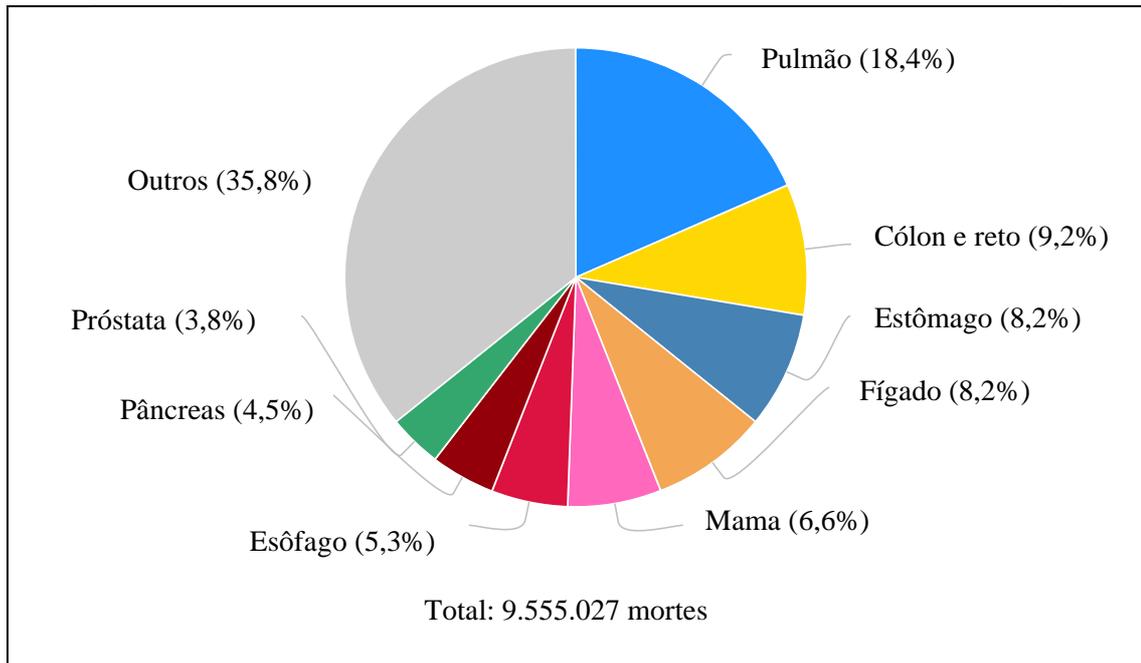
As estimativas para 2018 apontaram um aumento no número de novos casos para 18,1 milhões (figura 1), e para 9,6 milhões o número de mortes no mundo (figura 2). Um a cada cinco homens e uma a cada seis mulheres desenvolvem câncer durante sua vida, e um a cada oito homens e uma a cada onze mulheres morrem pela doença. É estimado em 43,8 milhões o número de portadores da doença que continuam vivos 5 anos após o diagnóstico, a chamada taxa de sobrevivência em 5 anos (IARC, 2018b).

Figura 1 – Número de novos casos em 2018, ambos os sexos, todas as idades



Fonte: IARC, 2018a.

Figura 2 – Número de mortes em 2018, ambos os sexos, todas as idades



Fonte: IARC, 2018a.

2.1.1 Fatores de Risco

Segundo a OMS, os cinco principais fatores de risco alimentar e comportamental, responsáveis por um terço da mortalidade pela doença, são: o elevado índice de massa corporal, o baixo consumo de frutas e vegetais, a ausência de atividade física, o uso de tabaco e a ingestão de bebidas alcoólicas. O fumo é o fator de risco mais importante para o câncer, responsável por 22% das mortes associadas à doença (WHO, 2019).

Países com baixos índices de desenvolvimento humano (IDH) apresentam maior frequência de certos tipos de câncer associados à pobreza. Nesses países, as infecções causadoras de câncer como hepatites, *Helicobacter pylori*, vírus Epstein-Barr e o Papiloma Vírus Humano (HPV), são responsáveis por 25% de todos os casos e 70% de todas as mortes. A manifestação tardia dos sintomas associada à diagnósticos e tratamentos inacessíveis são comuns. Em 2017, apenas 26% dos países de baixa renda afirmaram possuir serviços de diagnóstico disponíveis no setor público, e apenas 30% relataram possuir serviços de tratamento especializado. O impacto econômico vem aumentando significativamente e o custo anual em 2010 foi estimado em aproximadamente 1,16 trilhões de dólares (IARC, 2018b; WHO, 2019).

O aumento populacional e seu envelhecimento também estão entre os principais fatores de risco. A incidência de neoplasias aumenta significativamente com o aumento da idade, onde o risco habitual é combinado à menor eficiência dos mecanismos de reparação celular (IARC, 2018b).

2.1.2 Incidência

A incidência e mortalidade em função do tipo de câncer no mundo, estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Tipos de câncer mais comuns, ambos os sexos, todas as idades (WHO, 2019).

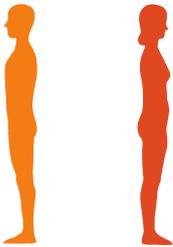
TIPO	NÚMERO DE CASOS
Pulmão	2,09 milhões
Mama	2,09 milhões
Cólon e Reto	1,80 milhões
Próstata	1,28 milhões
Câncer de pele (não melanoma)	1,04 milhões
Estômago	1,03 milhões

Tabela 2 – Número de mortes por tipo de câncer, ambos os sexos, todas as idades (WHO, 2019).

TIPO	NÚMERO DE MORTES
Pulmão	1,76 milhões
Cólon e Reto	862.000
Estômago	783.000
Fígado	782.000
Mama	627.000

No Brasil, a incidência por tipo de câncer e por sexo estão descritas na figura 3. A taxa de mortalidade, por tipo de câncer, é descrita nas tabelas 3 e 4.

Figura 3 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, no Brasil, por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018.

Tabela 3 – Mortalidade segundo localização primária do tumor, em homens brasileiros, 2015 (INCA, 2019a).

TIPO	NÚMERO DE MORTES
Traqueia, Brônquios e Pulmões	15.514
Próstata	14.484
Estômago	9.132
Cólon e Reto	8.163
Esôfago	6.525
Fígado e vias biliares	5.647
Sistema Nervoso Central	4.718
Cavidade oral	4.672
Pâncreas	4.654
Laringe	3.809

Tabela 4 – Mortalidade segundo localização primária do tumor, em mulheres brasileiras, 2015 (INCA, 2019a).

TIPO	NÚMERO DE MORTES
Mama	15.403
Traqueia, Brônquios e Pulmões	10.978
Cólon, Reto e Ânus	8.433
Colo do útero	5.727
Estômago	5.132
Pâncreas	4.808
Sistema Nervoso Central	4.315
Fígado e vias biliares	4.063
Ovário	3.536
Localização primária desconhecida	3.189

2.1.3 Incidência do Câncer de Pulmão

Os tumores de pulmão são os mais incidentes e apresentam a maior taxa de mortalidade por câncer. Essa neoplasia, juntamente com o câncer de mama, lidera os números de novos casos de câncer no mundo. Aproximadamente 2,1 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer de pulmão em 2018. Dessas, a grande maioria é composta por pessoas do sexo masculino (IARC, 2018b).

No Brasil, o câncer de pulmão é o segundo mais comum entre homens e o quarto entre mulheres, com uma estimativa de 31.270 novos casos em 2018, sendo 18.740 nos homens e 12.530 nas mulheres. O último levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontou um total de 26.498 mortes pela doença, sendo 15.514 homens e 10.978 mulheres (INCA, 2019a).

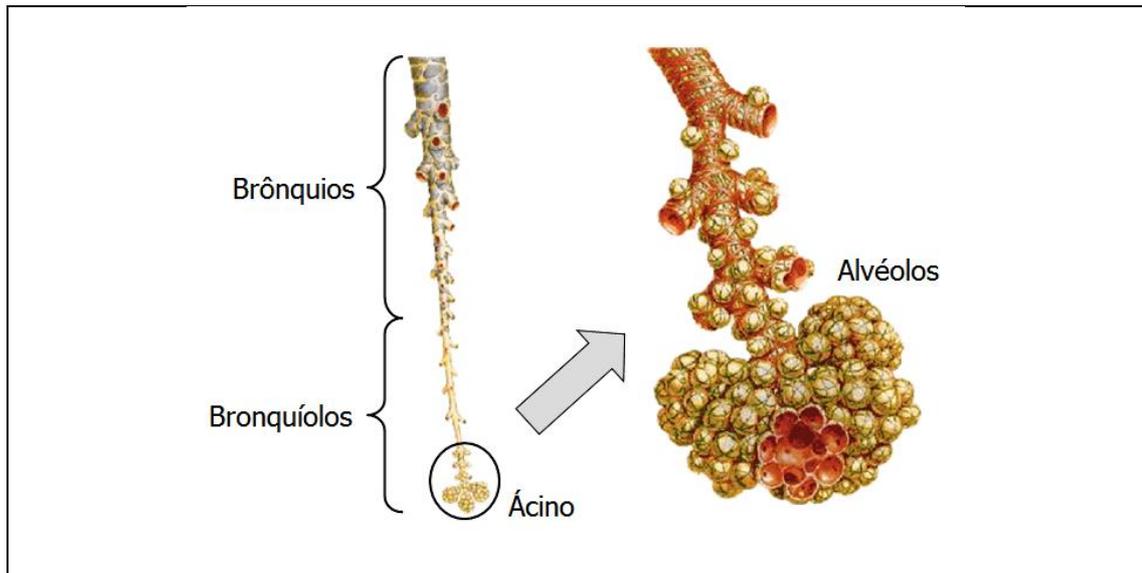
Ainda segundo o INCA, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de 18%. Essa taxa aumenta para 56% quando os casos são diagnosticados no estágio inicial da doença. Todavia, no Brasil apenas 16% dos casos são diagnosticados em seu início (INCA, 2019a).

Dentre os fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento dos cânceres de pulmão, o tabagismo aparece como principal agente, sendo responsável por 85 a 90% dos casos, além de aumentar em até 20 vezes o risco de morte em consequência da doença. Outros fatores de risco incluem exposição a agentes químicos e minerais carcinógenos, radiação ionizante, exposição ao asbesto, além de fatores dietéticos e genéticos (CHABNER; LONGO, 2015).

2.2 ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA DOS PULMÕES

O trato respiratório pode ser dividido em compartimentos superior e inferior. As vias aéreas superiores se estendem da região sino-nasal até a laringe. O trato respiratório inferior se estende da traqueia aos pulmões. A árvore traqueobrônquica se divide em unidades progressivamente menores: brônquios, bronquíolos e ácinos (CIBAS; DUCATMAN, 2009).

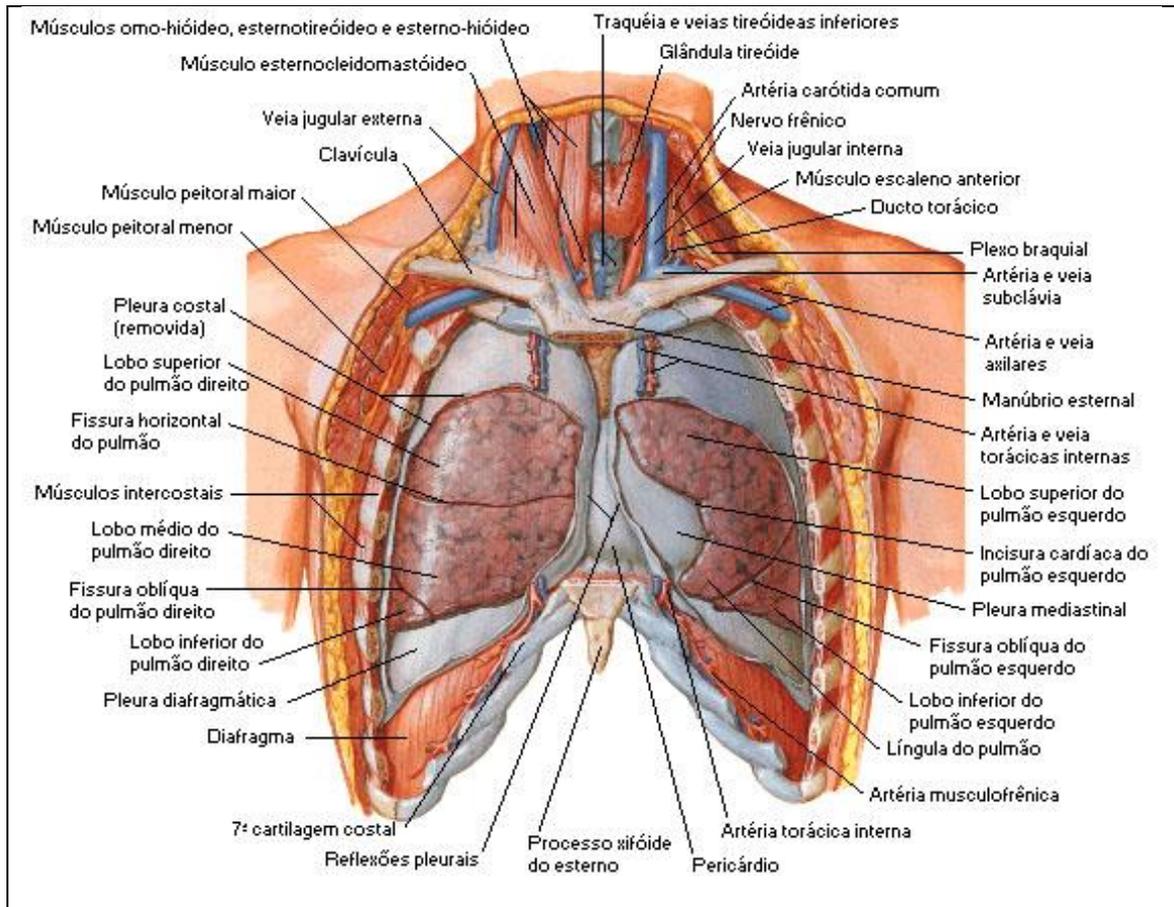
Figura 4 – Árvore traqueobrônquica, imagem adaptada



Fonte: NETTER, 2000.

Os pulmões são órgãos esponjosos, essenciais à respiração, estão localizados nos dois lados do tórax, separados pelo coração e conteúdos do mediastino. Cada pulmão possui formato de cone, e apresenta ápice, base, duas bordas e duas superfícies. O ápice se estende para a raiz do pescoço, aproximadamente 2,5 a 3,8 centímetros acima do nível da primeira costela. A base é mais ampla, côncava e fica acima da superfície superior do diafragma. A superfície externa ou torácica é convexa e possui o formato da cavidade do peito. A superfície interna é côncava e possui, anteriormente, uma depressão que corresponde à superfície convexa do pericárdio; posteriormente, uma fissura profunda (hilo pulmonar), promove a adesão à raiz pulmonar (HENRY GRAY, 2010).

Figura 5 – Vista frontal dos pulmões



Fonte: NETTER, 2000.

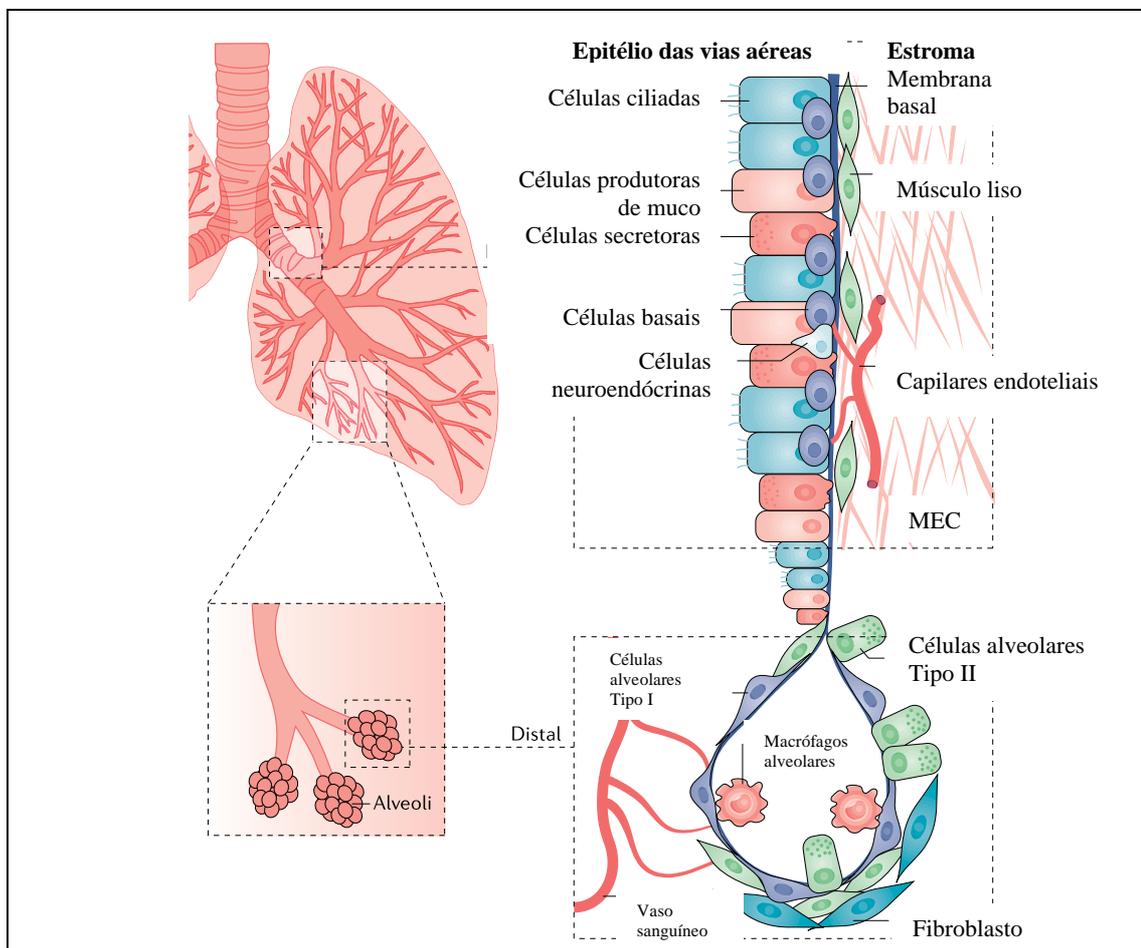
Ainda segundo Gray (2010), cada pulmão é dividido em lobos, superiores e inferiores, por uma fissura. O pulmão direito é maior e mais pesado; é mais largo que o esquerdo devido à inclinação do coração para o lado esquerdo. A raiz pulmonar está localizada um pouco acima da região medial da superfície interna de cada pulmão, e é através dela que os pulmões se conectam ao coração e à traqueia. A raiz pulmonar é formada pelo tubo brônquico, artéria pulmonar, veias pulmonares, artérias e veias brônquicas, plexo de nervos pulmonares, sistema linfático pulmonar, glândulas brônquicas e tecido areolar, todos envolvidos pela pleura. O peso dos dois pulmões juntos é de aproximadamente 1,2 kg, sendo mais pesado em homens do que em mulheres (HENRY GRAY, 2010).

Os componentes celulares do trato respiratório inferior variam de acordo com a localização: a traqueia e os brônquios apresentam epitélio pseudoestratificado, cilíndrico e ciliado, com células colunares ciliadas, células caliciformes, células basais e neuroendócrinas (células de Kulchitsky); os bronquíolos terminais apresentam epitélio cúbico ciliado com células de Clara (não ciliadas); e os alvéolos são revestidos

por epitélio simples pavimentoso, composto de pneumócitos do tipo I e II, além de macrófagos alveolares (CIBAS; DUCATMAN, 2009; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A figura 6 demonstra um pulmão normal com vias aéreas proximais e distais. As vias aéreas proximais, compostas de células ciliares, células secretórias, células basais indiferenciadas, células calciformes produtoras de muco e células neuroendócrinas. As vias aéreas distais, compostas de células alveolares tipo I e II. Outros tipos celulares presentes no microambiente pulmonar incluem células musculares lisas, fibroblastos, células endoteliais e células imunes, incluindo macrófagos alveolares residentes e células dendríticas (ALTORKI *et al.*, 2019).

Figura 6 – Composição celular das vias aéreas proximais e distais



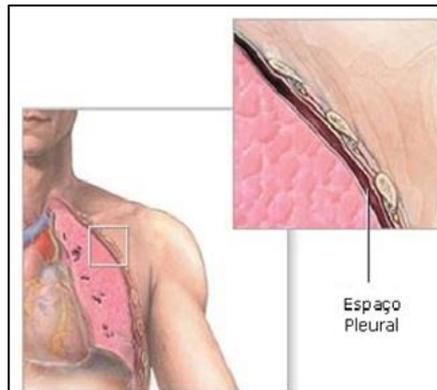
Fonte: traduzido de ALTORKI *et al.*, 2019.

A pleura é uma membrana serosa de dupla camada, presente no tórax (figura 7). A parte da pleura que reveste a superfície dos pulmões é a pleura visceral ou pulmonar. A pleura parietal forra a superfície interna da parede do tórax, diafragma, e se reflete sobre as estruturas que ocupam a parte média do tórax. As duas camadas

da pleura são contínuas no nível da raiz dos pulmões, muito embora em condições normais sejam separadas entre si por uma delgada película líquida, o líquido pleural. O espaço virtual entre elas é denominado cavidade pleural (HENRY GRAY, 2010).

A cavidade pleural possui uma única camada de células mesoteliais. Normalmente, a pequena quantidade de fluido nessa cavidade é suficiente para a lubrificação das superfícies adjacentes à medida que se movimentam durante a respiração (CIBAS; DUCATMAN, 2009). Uma pequena diferença na pressão positiva dos capilares locais resulta em um pequeno excesso de fluido que é reabsorvido pelos capilares do sistema linfático, localizados nas membranas (STRASINGER; DI LORENZO, 2008).

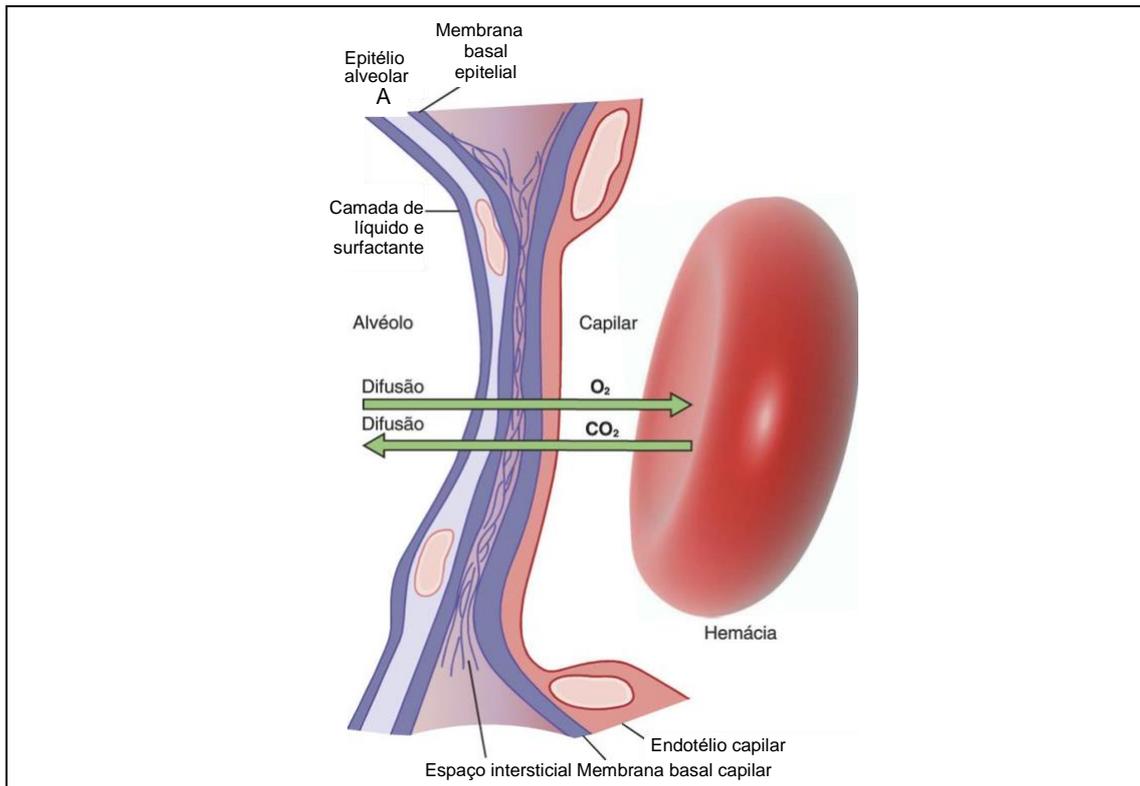
Figura 7 – Revestimento pulmonar, evidenciando o espaço pleural



Fonte: CASTRO, 2014.

A função cardinal desempenhada pelos pulmões é a troca de gases entre o ar inspirado e as hemácias (figura 8). A respiração leva oxigênio aos tecidos e remove dióxido de carbono, podendo ser dividida em quatro principais funções: 1) ventilação pulmonar, representada pelo influxo e efluxo de ar entre o ambiente externo e os alvéolos; 2) difusão do oxigênio de dióxido de carbono (alvéolos e sangue); 3) transporte de gases no sangue e líquidos corporais; 4) regulação respiratória (HALL, 2011; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Figura 8 – Esquema da membrana alveolar, corte transversal



Fonte: HALL, 2011.

2.2.1. Câncer de Pulmão

O termo neoplasia significa “novo crescimento”. Ela pode ser classificada como benigna ou maligna, de acordo com sua capacidade de invadir estruturas adjacentes (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016). Segundo o INCA, o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2019b).

O ciclo celular normal é extremamente organizado e regulado por processos que garantem a duplicação do material genético e a divisão das células. Essa regulação envolve sinais de controle do crescimento, bem como sinais de proteínas que monitoram a integridade celular e garantem a ausência de danos genéticos através de reparos ou, na sua impossibilidade, da morte celular programada (OTTO; SICINSKI, 2017). A divisão celular normal é basicamente composta de quatro fases. Na **fase S**, ocorre a síntese de DNA através da duplicação do material genético e na **fase M** ocorre a divisão dos cromossomos, organelas celulares e citoplasmas das células, processo denominado de mitose. As fases de intervalo ou gap (**G0/G1** e **G2**),

separam, respectivamente, a fase M da fase S, e a fase S da fase M (BOGLIOLO, 2013).

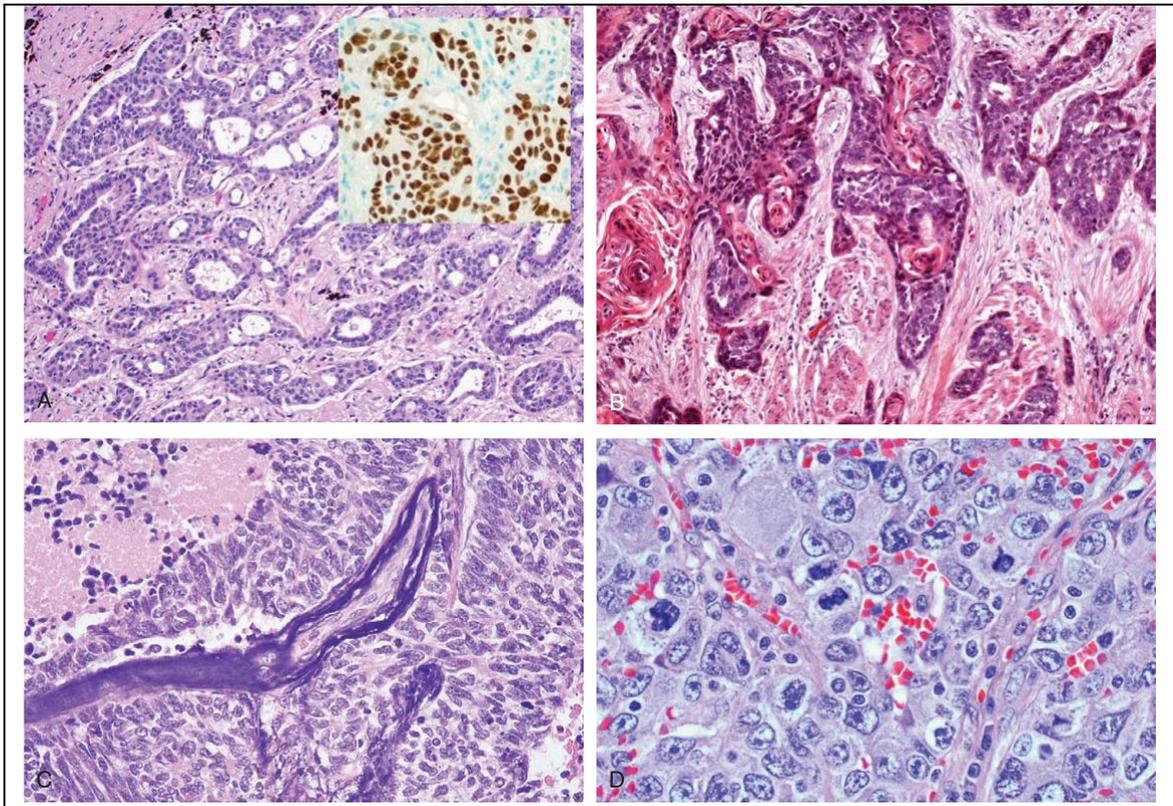
A etiologia do câncer de pulmão é diversa. O tabagismo é o principal fator de risco modificável e responde por 85% a 90% de todos os casos, sendo responsável por um aumento de até 20 vezes o risco de óbito, em comparação com pacientes não fumantes. Existe relação entre a intensidade de exposição à fumaça e a gravidade das alterações da doença. As alterações genéticas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da enfermidade e incluem: deleção do cromossomo 3p, além de mutações nos genes que codificam as proteínas p53, KRAS e p16. Outros fatores incluem a exposição a agentes químicos, radiação ionizante, asbesto e outros minerais carcinógenos (CHABNER; LONGO, 2015; CIBAS; DUCATMAN, 2009; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Evidências recentes sugerem ainda uma correlação entre o câncer de pulmão e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) que é independente do uso do tabaco, e possivelmente mediada por susceptibilidade genética (RECK; RABE, 2017).

As alterações epiteliais se correlacionam com a intensidade de exposição aos agentes carcinógenos, sobretudo ao tabaco, iniciando, geralmente, pela hiperplasia das células basais e metaplasia escamosa, seguidas por displasia escamosa e carcinoma *in situ*, sendo este o último estágio antes da evolução para uma neoplasia invasiva. Normalmente, a doença é diagnosticada a partir dos 50 anos de idade, sendo os sintomas mais comuns a tosse (50% a 70%), dores torácicas (40%), perda de peso (40%) e dispneia (20%). Em muitos casos, o tumor só é descoberto durante sua disseminação metastática (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Tradicionalmente, o câncer de pulmão se divide em duas categorias: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). O CPPC responde por 15% do número de casos de câncer de pulmão e é um tipo de câncer pulmonar neuroendócrino. O CPCNP é responsável por aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão, podendo ser classificado histologicamente como adenocarcinoma, carcinoma epidermoide e carcinoma de células grandes (figura 9). Desses, o adenocarcinoma representa o tipo histológico mais frequente, com uma prevalência estimada de 40% dos casos (CHABNER; LONGO, 2015).

Figura 9 – Variáveis histológicas do câncer de pulmão. A, adenocarcinoma formando uma glândula; no detalhe, IHQ positiva para o marcador TTF-1. B, carcinoma de células escamosas bem diferenciado, apresentando áreas de queratinização. C, carcinoma de células pequenas, com ilhas de pequenas células fortemente basofílicas e regiões de necrose. D, carcinoma de grandes células, apresentando pleomorfismo e sem evidência de diferenciação glandular ou escamosa



Fonte: KAUMAR; ABBAS; ASTER, 2016.

2.2.2 Perfil Molecular do Câncer de Pulmão

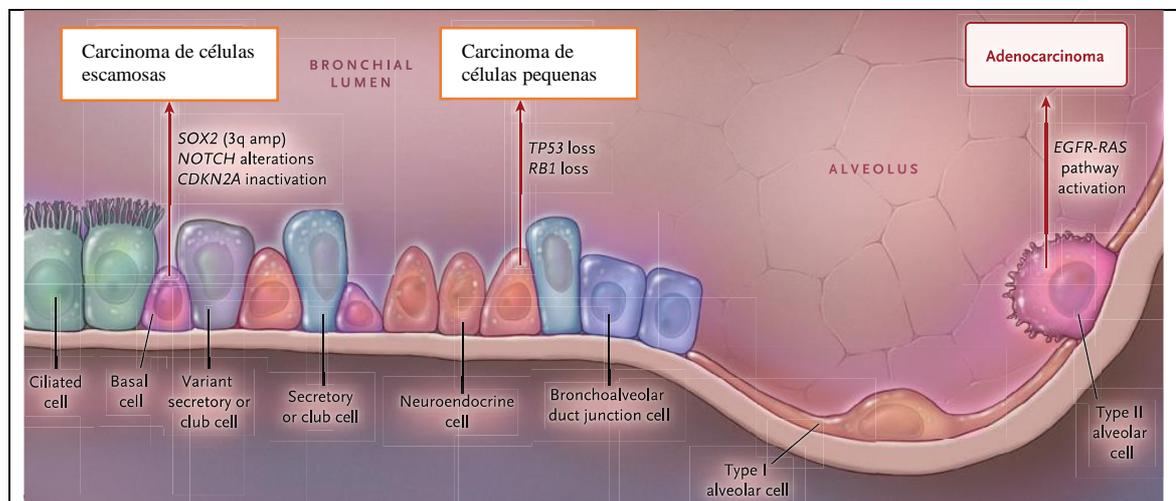
As bases moleculares do câncer de pulmão são complexas e heterogêneas, e seu entendimento direciona o diagnóstico, prognóstico e tratamento desse tipo de neoplasia. O desenvolvimento dos tumores de pulmão envolve múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, ativação de vias de promoção do crescimento celular, bem como inibição de vias de supressão tumoral. A medida que essas vias bioquímicas são conhecidas, novas estratégias de tratamento direcionadas para alterações moleculares específicas podem ser desenhadas (COOPER *et al.*, 2013; ROSE-JAMES; SREELEKHA, 2012).

Existe uma grande diversidade genética dentre as alterações presentes nos diferentes tipos de câncer de pulmão (figura 10), e o entendimento de seu comportamento molecular é de fundamental importância para a abordagem

terapêutica (COOPER *et al.*, 2013; ROSE-JAMES; SREELEKHA, 2012). Em linhas gerais, os oncogenes “condutores” (*driver genes*) são responsáveis pelo crescimento e viabilidade das células tumorais, acumulando mutações de maneira gradativa, o que resulta em transformação neoplásica das células pulmonares (CHABNER; LONGO, 2015; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016). No câncer de pulmão, a tumorigênese se relaciona à ativação de proteínas promotoras do crescimento, sendo as principais KRAS, EGFR, BRAF, MEK-1, HER2, MET, ALK e RET. A ativação de oncogenes promotores do crescimento pode ocorrer por amplificação, mutações pontuais e reorganização estrutural de genes, desencadeando a sinalização descontrolada de vias oncogênicas. As alterações relacionadas à inativação dos genes supressores de tumor incluem *P53*, *PTEN*, *LKB-1* (COOPER *et al.*, 2013).

Nos pacientes não fumantes, a maioria das alterações incluem mutações no *EGFR*, e raramente mutações no gene *KRAS*. Apesar de não serem incomuns, as alterações no gene *TP53* ocorrem com menor frequência em comparação aos pacientes tabagistas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Figura 10 – Células de origem e alterações características de acordo com o subtipo histológico



Fonte: traduzido de SWANTON; GOVINDAN, 2016.

2.2.3 Rastreamento e Diagnóstico

O rastreamento universal para o câncer de pulmão com radiografia do tórax e citologia do escarro não é custo-efetivo. O maior estudo realizado nos Estados Unidos por três institutos médicos, sob supervisão do National Cancer Institute (NCI), contou com a participação de aproximadamente 30.000 homens submetidos à triagem. A

mortalidade global não foi reduzida em comparação com o grupo controle. Recentemente, estudos clínicos randomizados apontaram a tomografia computadorizada (TC) helicoidal de baixa dose associada com a citologia do escarro, como sendo capaz de detectar nódulos em estágio mais precoce, em comparação com a radiografia simples de tórax. Contudo, a exposição a doses de radiação pode ser desnecessária nos nódulos benignos, sendo o método indicado apenas para indivíduos considerados de alto risco para desenvolvimento de câncer de pulmão. O protocolo testado pelo National Lung Cancer Screening Trial (NLST) considerou de alto risco os pacientes entre 55 e 74 anos, fumantes atuais ou ex-fumantes com histórico de pelo menos 30 maços/ano, ou com anormalidades persistentes em radiografias de tórax (CHABNER; LONGO, 2015; CIBAS; DUCATMAN, 2009).

O diagnóstico patológico é estabelecido em conformidade com os critérios de classificação da OMS, uma vez que a maioria das opções de tratamento são baseadas nas características histológicas. As amostras de tecido podem ser obtidas por broncoscopia ou biópsia cirúrgica, e amostras citológicas podem ser preparadas a partir de efusões, aspirados ou escovados pulmonares. A diferenciação morfológica pode ser auxiliada pela imunocitoquímica ou imunohistoquímica (RECK; RABE, 2017).

O estadiamento dos tumores se baseia nos critérios tumor-nódulo-metástase (TNM), que consideram o tamanho do tumor primário, comprometimento de linfonodos regionais, e metástases à distância. Para tanto, os pacientes são submetidos a exames de imagem mais avançados, como a tomografia computadorizada (TC), tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-TC) e ressonância magnética (RNM). O correto estadiamento é fundamental para entender o prognóstico e traçar o plano de intervenção (CHABNER; LONGO, 2015; RECK; RABE, 2017).

A utilização de biomarcadores pode melhorar a avaliação do risco de câncer de pulmão durante a triagem, além de facilitar o diagnóstico. Alguns estudos demonstraram a importância preditiva para desenvolvimento de câncer de pulmão da Proteína Surfactante Pulmonar tipo B (Pro-SFTPB). Outros marcadores são utilizados no diagnóstico e avaliação da evolução clínica da doença instalada, incluindo CA125, CYFRA 21-1, CEA e HE4. Contudo, a utilização de tais marcadores ainda é limitada, sendo necessários avanços nos estudos que buscam melhor compreender as características moleculares dos tumores de pulmão, favorecendo a descoberta de novos marcadores com valor de rastreio e diagnóstico, e que possibilitem o desenho

de estratégias terapêuticas mais eficazes (CANCER, 2018; COOPER *et al.*, 2013; RECK; RABE, 2017; ROSE-JAMES; SREELEKHA, 2012).

Por estar desregulada em muitos tipos de neoplasia, a avaliação da atividade proliferativa de células tumorais tem se tornado uma ferramenta comum na prática histopatológica, uma vez que fornece subsídios para o correto diagnóstico, previsão do comportamento clínico e tratamento da doença (BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013).

2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

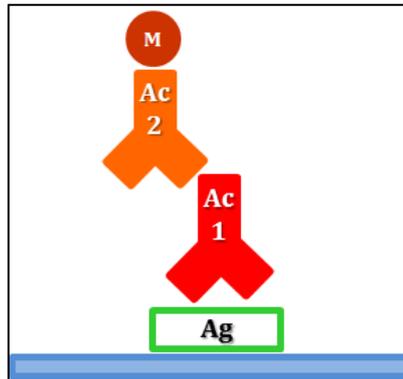
Em 1846, Bence-Jones descobriu a presença de uma proteína na urina de pacientes com mieloma múltiplo, que até hoje é utilizada como diagnóstico da doença. A partir desta descoberta, os marcadores tumorais bioquímicos foram definidos como qualquer substância produzida por células neoplásicas ou pelo hospedeiro em resposta à presença de tumor, que podem ser detectadas em fluidos corporais. Dessa maneira, a introdução de marcadores tumorais na clínica oncológica possui ampla utilidade, principalmente no desenvolvimento de novas técnicas imuno-diagnósticas (DIAMANDIS *et al.*, 2002).

A imunohistoquímica (IHQ) foi introduzida em 1966 como método de diagnóstico em patologia de tumores, e baseia-se no princípio da utilização de anticorpos como reagentes específicos para detecção de antígenos presentes em células ou tecidos. O produto da reação antígeno-anticorpo é examinado ao microscópio em preparados citológicos, em cortes histológicos de amostras incluídas em parafinas ou em cortes obtidos de tecidos congelados e cortados em criostato (BIBBO; FILHO, 2001).

Ainda segundo Bibbo & Filho (2001), as principais indicações de IHQ em oncopatologia incluem a caracterização de linhagens de neoplasias morfológicamente indiferenciadas, ou ainda, a subclassificação de neoplasias cujo padrão morfológico permite apenas identificação genérica; avaliação prognóstica em neoplasias ou lesões potencialmente pré-neoplásicas; e solução de dúvidas diagnósticas.

No método de IHQ indireto, são utilizados dois anticorpos (figura 11). O anticorpo primário se liga diretamente ao antígeno de interesse, ao passo que o anticorpo secundário é dirigido contra as imunoglobulinas do anticorpo primário. O anticorpo secundário é marcado com a substância que permite a revelação do complexo antígeno-anticorpos (FERRO, 2013).

Figura 11 – Método indireto simples, onde “M” é o marcador, “Ac 2” é o anticorpo secundário, “Ac 1” é o anticorpo primário e “Ag” é o antígeno

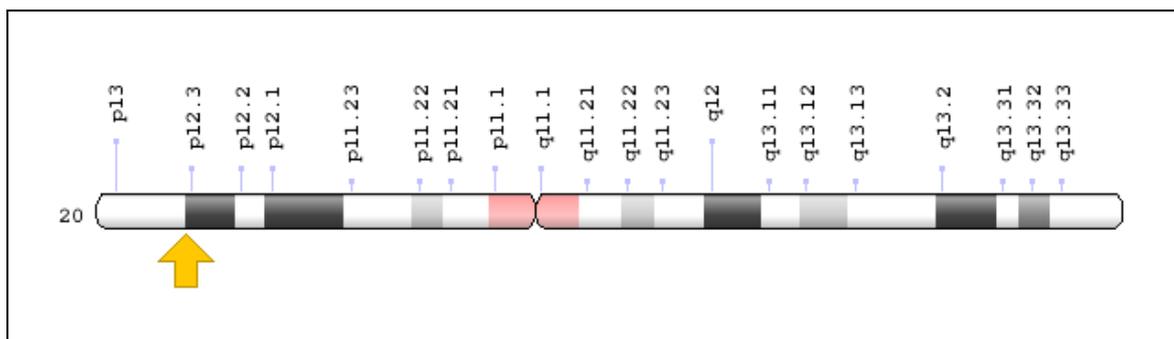


Fonte: FERRO, 2013.

2.3.1 Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

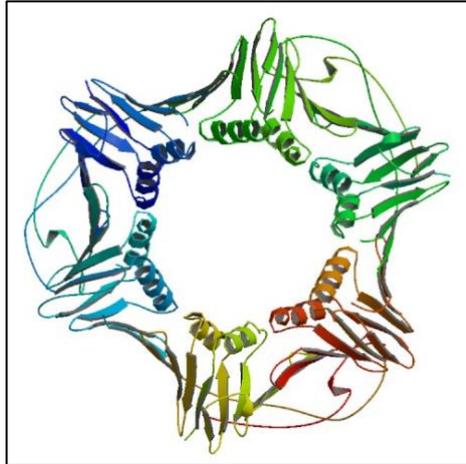
O PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) é uma proteína de 36 kD, codificada pelo gene *PCNA*, também conhecido como *ATLD2*, localizado no braço curto do cromossomo 20 (figura 12). A proteína é encontrada no núcleo e atua como cofator (proteína auxiliar) da DNA polimerase delta. O PCNA (figura 13) foi descrito como sendo um marcador de proliferação celular, agindo como um homotrímero e ajudando a aumentar a processabilidade da síntese da cadeia principal durante a replicação do DNA. Possui papel fundamental na resposta ao dano no DNA, onde é ubiquitinado e envolvido na via de reparo de DNA. (NETO *et al.*, 2001; NIH, 2019) No ciclo celular, a expressão do PCNA aumenta durante a fase G1, com pico na fase S, e declínio durante as fases G2/M (MUSKHELISHVILI; LATENDRESSE; HENDERSON, 2003).

Figura 12 – Localização citogenética do PCNA: 20p12.3, braço curto (p) do cromossomo 20 na posição 12.3



Fonte: NIH, 2019.

Figura 13 –Estrutura molecular do PCNA



Fonte: PDB, 2019.

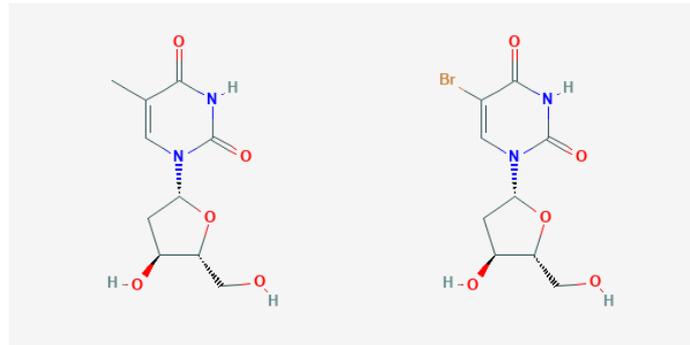
O PCNA tem sido utilizado extensivamente em pesquisas básicas e como ferramenta prognóstica na patologia cirúrgica, sendo o método de identificação de células em atividade proliferativa mais comumente utilizado, depois da bromodesoxiuridina (MUSKHELISHVILI; LATENDRESSE; HENDERSON, 2003).

A elevada expressão do PCNA está associada à infiltração tumoral e metástases em diversos tipos de câncer como mama e fígado, além de estar relacionada à um mau prognóstico em pacientes portadores de câncer gástrico. A detecção dessa proteína auxilia na avaliação da proliferação tumoral e da atividade metastática (HU *et al.*, 2017). Os níveis elevados em adenocarcinoma de pulmão foram relatados por Bai e colaboradores (2018), sendo associados a parâmetros clínico-patológicos, incluindo estadiamento TMN, diferenciação celular e tamanho do tumor, além de metástase (BAI *et al.*, 2018).

2.3.2. Bromodesoxiuridina (BrdU)

A bromodesoxiuridina (figura 14) é um análogo da timidina, utilizada para identificar microscopicamente células em síntese de DNA (fase S), a partir de sua incorporação aos núcleos celulares. A BrdU é eficientemente fosforilada por cinases e então incorporada à fita de DNA pela DNA polimerase. A detecção é realizada por imunohistoquímica (IHQ) com anticorpos anti-BrdU (ALBERTS *et al.*, 2017; LIBOSKA *et al.*, 2012; MUSKHELISHVILI; LATENDRESSE; HENDERSON, 2003).

Figura 14 – Estrutura química da timidina (esquerda) e BrdU (direita)



Fonte: NCBI, 2019.

A avaliação da atividade proliferativa de células é essencial para estudos toxicológicos e de carcinogênese, como demonstrado por Wang e colaboradores (2016) que aplicaram o ensaio com BrdU para detectar a taxa de proliferação celular em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. A utilização da BrdU tem sido considerado o padrão ouro para avaliação da atividade proliferativa de células em cortes de tecido (MUSKHELISHVILI; LATENDRESSE; HENDERSON, 2003; WANG *et al.*, 2016).

Por competir com a timidina na incorporação ao DNA, a bromodesoxiuridina inibe a proliferação celular, apresentando também potencial antineoplásico (NCBI, 2019a).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a expressão do PCNA e da BrdU em neoplasias de pulmão humano, bem como suas aplicações como marcadores tumorais no diagnóstico de câncer de pulmão.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil clínico-laboratorial de pacientes portadores de lesões pulmonares de um hospital universitário na cidade do Recife – PE.
- Utilizar a técnica de imunohistoquímica para identificar os marcadores de proliferação celular PCNA e BrdU em amostras de pulmão.
- Correlacionar a expressão dos marcadores com o diagnóstico de câncer de pulmão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram selecionadas amostras de tecido pulmonar incluídos em blocos de parafina de 55 pacientes, desses, 51 casos de câncer de pulmão, 2 lesões metastáticas e 2 lesões inflamatórias benignas. Do total, 38 amostras eram de pacientes do sexo masculino e 17 do sexo feminino. A faixa etária variou entre 11 e 81 anos de idade. As amostras foram colhidas entre os anos de 2011 e 2015, em pacientes provenientes dos ambulatórios de oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, localizado na cidade do Recife-PE. O processamento imunohistoquímico foi realizado nos laboratórios do Departamento de Pós-Graduação em Patologia da UFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

O estudo foi aprovado (anexo) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS-UFPE) Número do Parecer: 968.840.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de pulmão foram obtidas por broncoscopia ou biópsia transtorácica. Os fragmentos de tecido pulmonar coletados foram fixadas em solução de formalina e encaminhadas para o laboratório de histotecnologia para processamento. Em seguida, as amostras foram clivadas e incluídas em cassetes para processamento histológico, que consiste na difusão dos reagentes para o interior dos tecidos, bem como na remoção de líquidos teciduais, favorecendo sua rigidez. A inclusão em parafina foi realizada em três etapas: desidratação, clarificação (diafanização) e infiltração com parafina, em processador automático de tecidos. Posteriormente, foi realizada a inclusão dos fragmentos em molde contendo parafina líquida que, após solidificação, prosseguiu para microtomia.

Em micrótomo rotativo, os tecidos foram seccionados em fatias uniformes de 4 μ m e em seguida dispostos em lâminas silanizadas. Ao todo foram selecionados 55 casos e confeccionadas 55 lâminas, cada uma contendo 02 cortes da mesma amostra. Ao todo foram realizados 110 cortes dos 55 casos, distribuídos em 55

lâminas.

O processamento imunohistoquímico aconteceu em dois dias. No primeiro dia foi realizada a desparafinização das lâminas através da imersão em xilol P.A, álcool P.A e lavagem com água deionizada. Em seguida, procedeu-se a recuperação antigênica através de solução tampão (Target Retrieval Solution EnVision™ FLEX, DAKO), em panela aquecida por 30s a 125° C e 15 psi de pressão. Após resfriamento, foi aplicada solução de lavagem (Wash buffer EnVision™, DAKO) por 5 minutos. Após remoção do excesso de solução de lavagem, as áreas com cortes de tecido foram marcadas com caneta hidrofóbica. Essas áreas receberam solução de bloqueio da peroxidase (Peroxidase-blocking reagent EnVision™, DAKO), que agiu durante 10 minutos em bandeja de incubação para proteger da luz. Após retirada da bandeja, as amostras foram imersas em solução de lavagem por mais 10 minutos para receber a solução de bloqueio de proteína (EasyPath), que agiu durante 5 minutos. Posteriormente, 100 µL dos anticorpos foram pipetados e aplicados nos 110 cortes. Desses, 55 receberam anti-PCNA (PCNA Antibody, Santa Cruz Biotechnology) e 55 receberam anti-BrdU (BrdU Antibody, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:100. Após imunomarcção, as lâminas seguiram novamente para câmara de incubação que foi colocada na geladeira overnight.

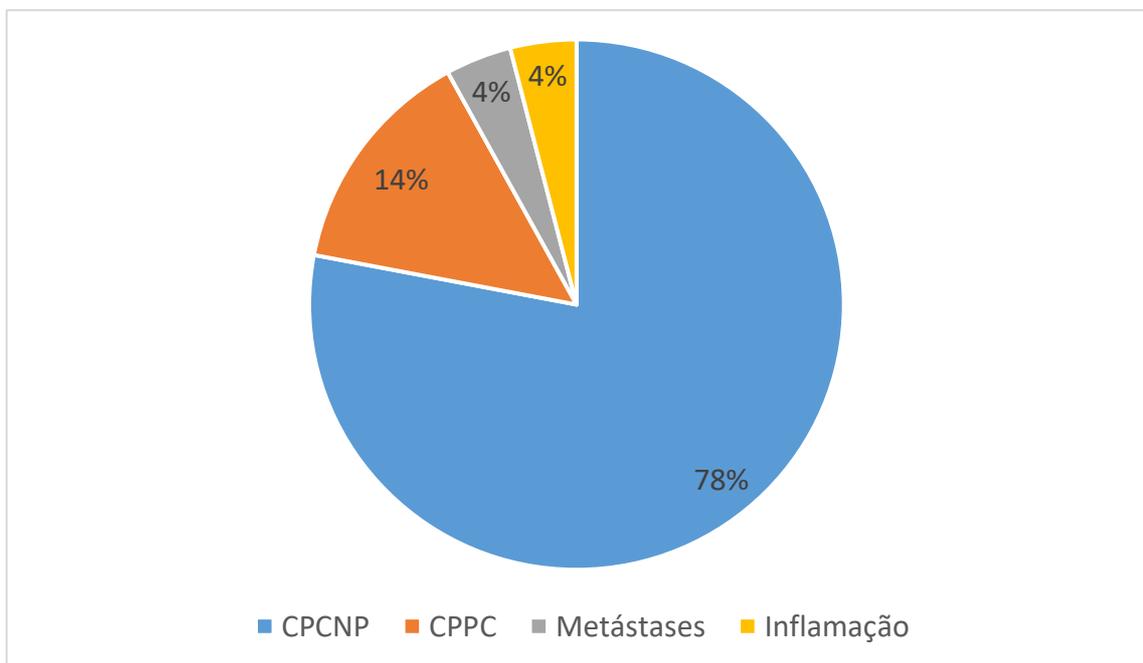
No segundo dia as amostras foram retiradas da geladeira, lavadas com solução de lavagem (Wash buffer EnVision™, DAKO) por 5 minutos. Em seguida, foi aplicado como anticorpo secundário o polímero universal anti-mouse e anti-rabbit (N-Histofine®, NICHIREI BIOSCIENCES's), que agiu durante 20 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas por duas vezes, 5 minutos cada vez, com solução de lavagem padrão. Finalmente, foi utilizado nos cortes a solução reveladora cromógena de diaminobenzidina (DAB EnVision™, DAKO) por 5 minutos, seguido da montagem e análise microscópica.

As imunomarcções foram classificadas em intensas (+++), moderadas (++) , fracas (+) ou negativas (-).

5 RESULTADOS

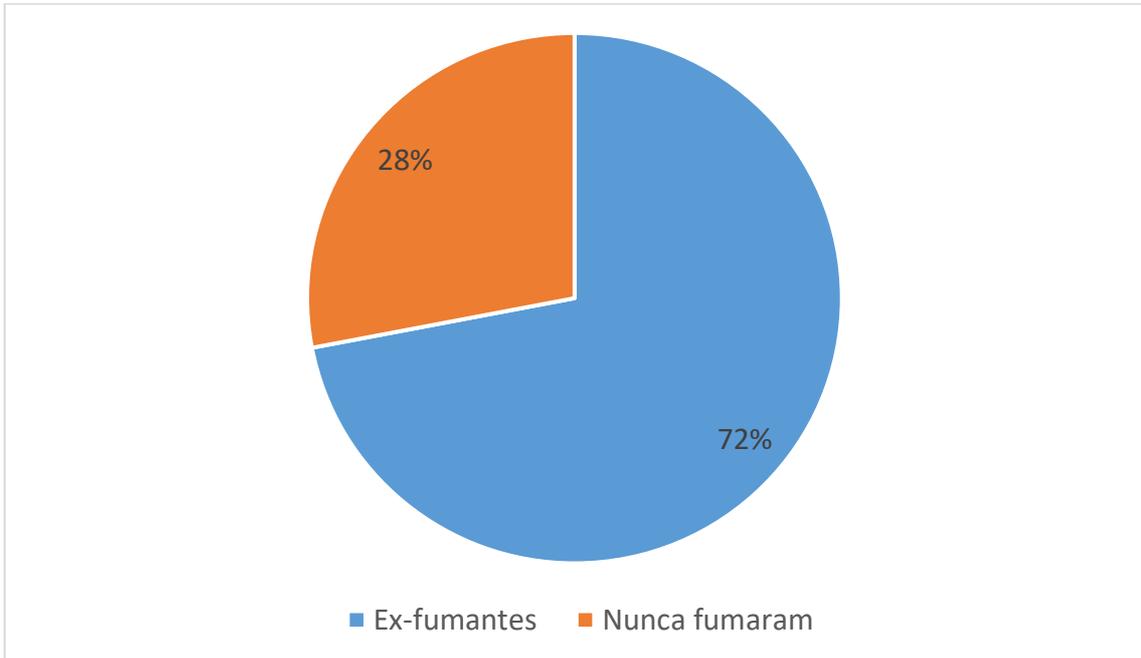
A distribuição das amostras por classificação histológica se deu da seguinte forma: 43 casos de câncer de pulmão de células não pequenas, 08 casos de câncer de pulmão de pequenas células, 02 casos de bronquiectasia, 01 melanoma metastático e 01 osteosarcoma metastático (figura 14). Do total de pacientes, 43 apresentavam informações referentes a tabagismo. Destes, 72% (31 pacientes) apresentaram histórico de tabagismo (figura 15).

Figura 15 – Percentual de distribuição de casos por classificação histológica.



Fonte: o autor.

Figura 16 – Percentual de pacientes com (azul) e sem (laranja) histórico de tabagismo.

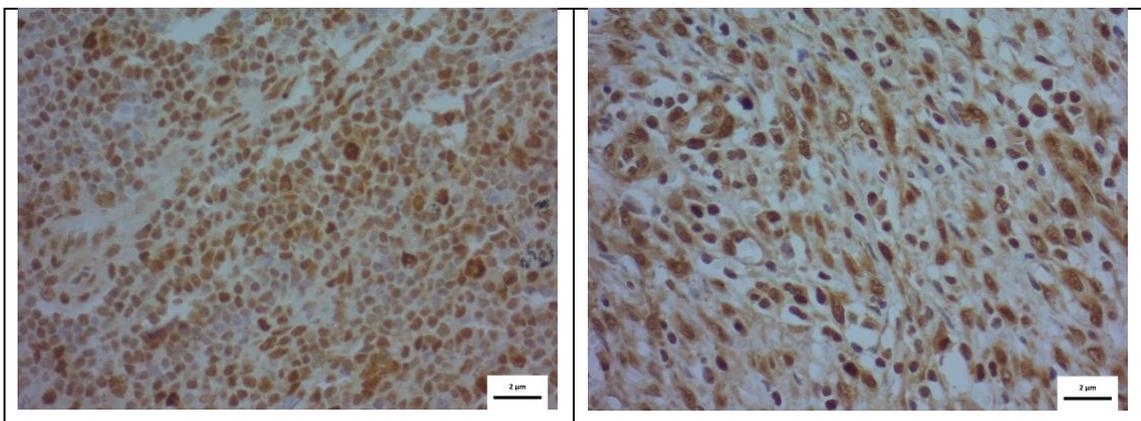


Fonte: o autor.

A imunohistoquímica para os anticorpos primários anti-PCNA e anti-BrdU foi verificada pela marcação nuclear, com discreta variação de intensidade na cor marrom (moderada a intensa), conforme verificado nas figuras 17 e 18. Ao comparar tais características, evidenciou-se um padrão de marcação similar entre PCNA e BrdU. A avaliação foi realizada no parênquima do órgão onde se localizava a massa tumoral. O padrão de variação reativa foi evidenciada em todos os grupos de neoplasias analisadas.

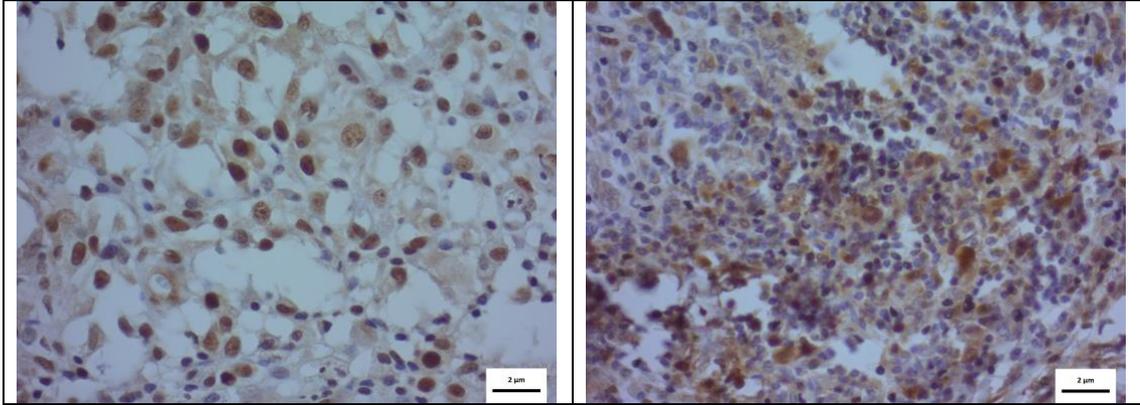
Figura 17 – IHQ demonstrando células de pulmão positivas para PCNA. Barra de escala: 2

μm



Fonte: o autor.

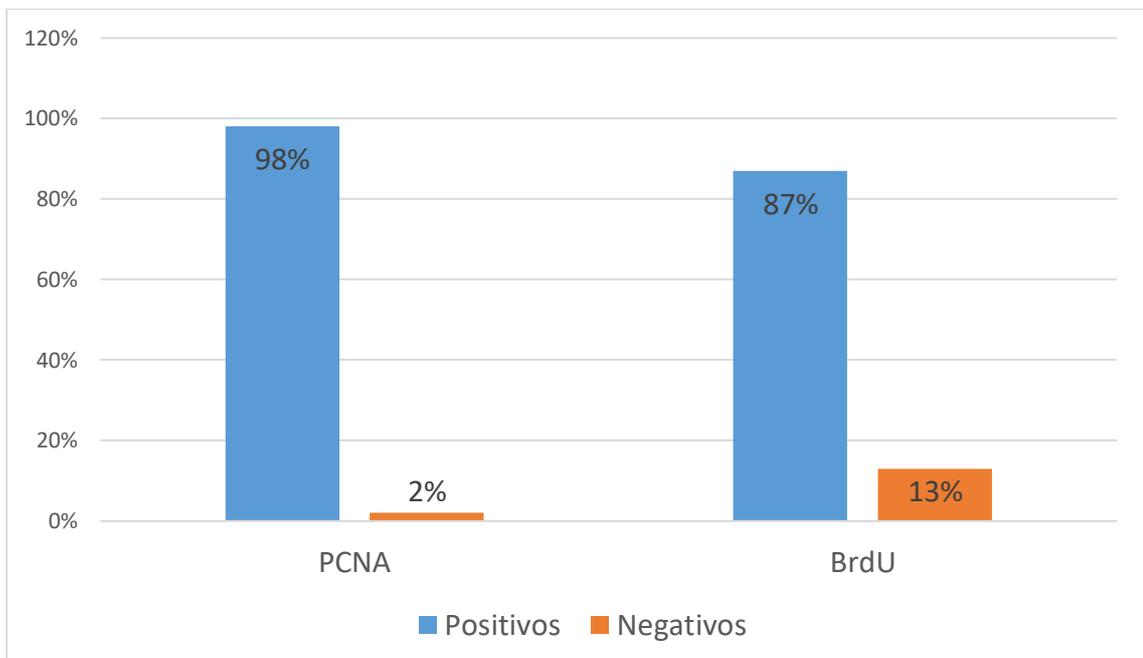
Figura 18 – IHQ demonstrando células de pulmão positivas para BrdU. Barra de escala: 2 µm



Fonte: o autor.

A análise do PCNA revelou um percentual de positividade de 98,2% (54 casos), incluindo os tumores metastáticos (melanoma e osteosarcoma), e as condições não neoplásicas (bronquiectasia). A análise da BrdU foi positiva para 87,3% dos casos (48 pacientes), incluindo as neoplasias metastáticas e um caso de bronquiectasia (figura 19). Um caso de CPCNP foi negativo para análise imunohistoquímica com os dois marcadores. O paciente não apresentava histórico de tabagismo.

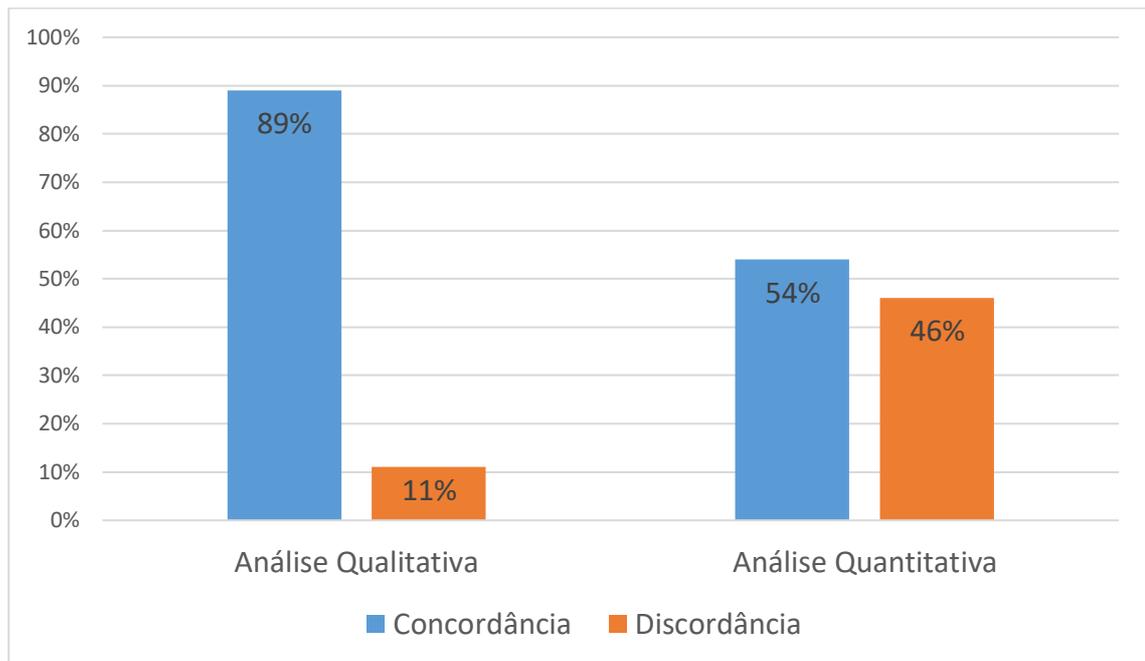
Figura 19 – Comparação entre os percentuais de positividade e negatividade do PCNA e BrdU



Fonte: o autor.

A comparação qualitativa (positividade ou negatividade) entre PCNA e BrdU demonstrou uma concordância de 89,1% (49 casos). A comparação na intensidade da marcação (quantitativa) entre PCNA e BrdU demonstrou uma concordância de 54,5% (30 casos) entre as análises (figura 20).

Figura 20 – Concordância qualitativa e quantitativa da imunomarcção com PCNA e BrdU



Fonte: o autor.

Tabela 5 – Intensidade da marcação IHQ com PCNA, em percentual de ocorrência, em amostras de pulmão.

PCNA	
<i>MARCAÇÃO</i>	<i>PERCENTUAL DE OCORRÊNCIA</i>
Intensa (+++)	82%
Moderada (++)	14%
Fraca (+)	2%
Negativa (-)	2%

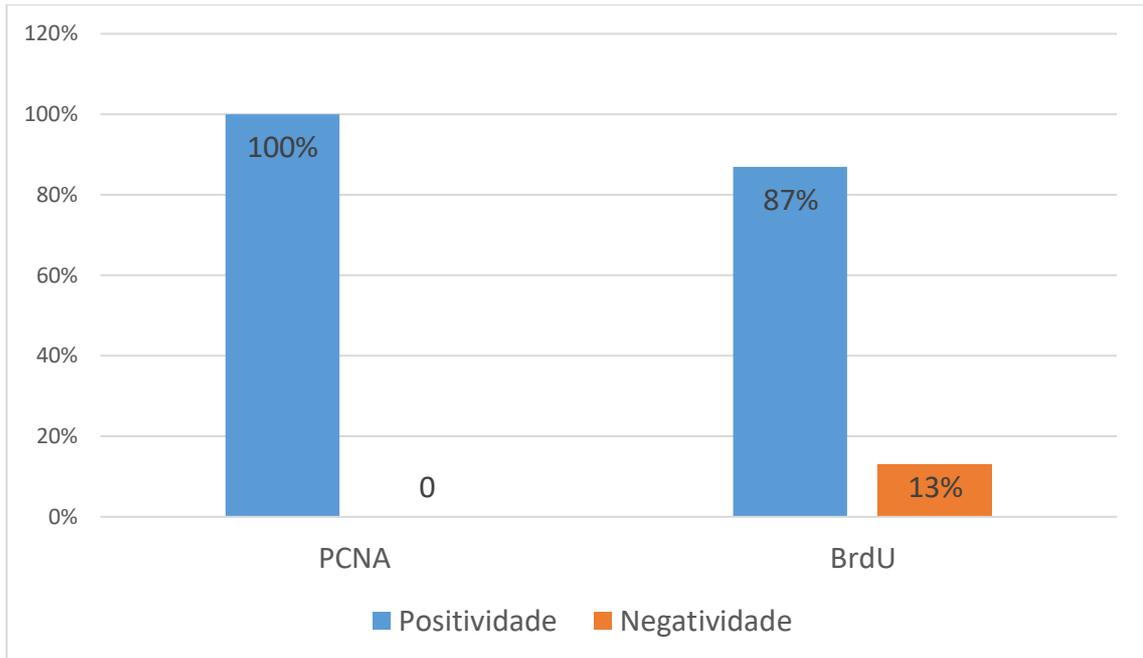
Tabela 6 – Intensidade da marcação IHQ com BrdU, em percentual de ocorrência, em amostras de pulmão.

BrdU	
<i>MARCAÇÃO</i>	<i>PERCENTUAL DE OCORRÊNCIA</i>
Intensa (+++)	44%
Moderada (++)	38%
Fraca (+)	5%
Negativa (-)	13%

Entre os pacientes com histórico de tabagismo, 100% apresentaram positividade para marcação com PCNA, e 87% para BrdU (figura 21).

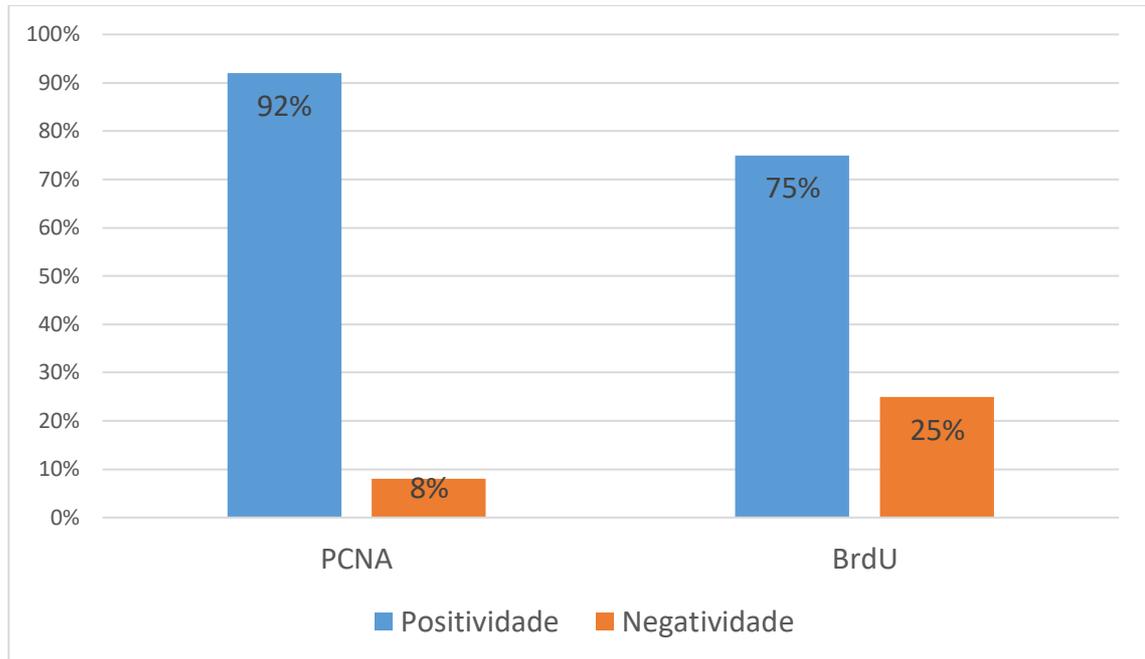
Os pacientes sem histórico de tabagismo apresentaram positividade de 92% para marcação com PCNA e 75% para marcação com BrdU (figura 22).

Figura 21 – Percentual de positividade na marcação com PCNA e BrdU, em pacientes com histórico de tabagismo.



Fonte: o autor.

Figura 22 – Percentual de positividade na marcação com PCNA e BrdU, em pacientes sem histórico de tabagismo.



Fonte: o autor.

A intensidade da marcação variou entre as amostras de pacientes com histórico de tabagismo (tabela 7) e sem histórico de tabagismo (tabela 8).

Tabela 7 – Intensidade da marcação IHQ para PCNA e BrdU, em percentual de ocorrência, de pacientes com histórico de tabagismo.

MARCAÇÃO	PERCENTUAL DE OCORRÊNCIA	
	PCNA	BrdU
Intensa (+++)	81%	52%
Moderada (++)	16%	32%
Fraca (+)	3%	3%
Negativa (-)	0%	13%

Tabela 8 – Intensidade da marcação IHQ para PCNA e BrdU, em percentual de ocorrência, de pacientes sem histórico de tabagismo.

MARCAÇÃO	PERCENTUAL DE OCORRÊNCIA	
	PCNA	BrdU
Intensa (+++)	67%	33,5%
Moderada (++)	25%	33,5%
Fraca (+)	0%	8%
Negativa (-)	8%	25%

6 DISCUSSÃO

A aplicabilidade clínica de um marcador tumoral deve ser avaliada para cada tipo de tumor, considerando suas especificidades. Foram analisadas 51 neoplasias de pulmão, 2 neoplasias metastáticas, 2 alterações inflamatórias, e sua positividade para dois marcadores de proliferação celular, o PCNA e a BrdU. Alguns dados epidemiológicos também foram coletados.

A análise dos dados demonstrou concordância epidemiológica com a literatura no que tange à distribuição etária dos tumores de pulmão, sendo mais prevalentes na população masculina (“Cancer Statistics”, 2017; IARC, 2018b, a; INCA, 2019a).

O tabagismo, principal fator de risco no desenvolvimento de neoplasias pulmonares, esteve presente em 72% dos casos analisados, demonstrando correlação com os dados amplamente encontrados na literatura (CHABNER; LONGO, 2015; WHO, 2019).

A análise IHQ do PCNA revelou um elevado percentual de marcação (98,2%) e baixa especificidade, uma vez que alterações inflamatórias e neoplasias não pulmonares foram igualmente marcadas. A positividade nas bronquiectasias pode ser explicada pelo fato do PCNA estar também superexpresso em células em processo de reparo de DNA. Embora os níveis de PCNA estejam elevados durante o ciclo celular, a meia vida tissular dessa proteína é longa, indicando que o núcleo continua expressando o PCNA mesmo depois de finalizado o reparo, ou seja, em células que não se encontram mais em divisão. Esses achados estão em conformidade com outros estudos (BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013; MUSKHELISHVILI; LATENDRESSE; HENDERSON, 2003; TAUPIN, 2007), que demonstraram que o valor de detecção de células em estado proliferativo pelo PCNA pode variar significativamente de acordo com o tipo celular e entre células normais e malignas, sendo, portanto, considerado um marcador questionável, e recomendada a utilização de marcadores mais específicos, como a proteína Ki-67. Finalmente, não houve distinção quantitativa que permitisse diferenciar os tumores pulmonares dos tumores metastáticos, sendo, portanto, evidenciada a falta de especificidade para os tipos histológicos testados.

O estudo imunohistoquímico para a BrdU demonstrou um elevado percentual de marcação (87,3%), embora um pouco inferior ao apresentado pelo PCNA. Ademais, em uma das lesões inflamatórias, não houve marcação pela BrdU,

sugerindo uma especificidade discretamente superior da BrdU em relação ao PCNA. A imunomarcação evidenciada em um dos casos de bronquiectasia pode ser explicado pelo fato da BrdU estar presente durante o processo de reparo celular, apoptose e até mesmo nas poliploidias, onde há duplicação de material genético sem duplicação celular. Esses achados corroboram os achados de outros estudos que demonstram a desvantagem na utilização da BrdU como marcador de proliferação celular, destacando sua baixa especificidade (MUSKHELISHVILI; LATENDRESSE; HENDERSON, 2003; TAUPIN, 2007). A comparação entre a marcação dos tumores pulmonares com os tumores metastáticos também não evidenciou especificidade qualitativa.

A análise comparativa entre PCNA e BrdU revelou que em 89% dos casos os dois marcadores concordaram qualitativamente, uma vez que marcaram as mesmas amostras. A comparação quantitativa (em cruzes) demonstrou uma variação significativamente maior (54% de concordância), sendo a intensidade da marcação pela BrdU mais oscilante, sugerindo uma sensibilidade levemente superior em relação à PCNA, porém com baixa especificidade quando comparada à outras neoplasias e alterações inflamatórias, denotando baixa utilidade clínica para os tumores de pulmão em relação a outros marcadores.

A negatividade na marcação com PCNA e BrdU apresentada por um paciente portador de câncer de pulmão de células não pequenas pode estar associado ao fato do tumor apresentar uma baixa taxa de proliferação celular, geralmente encontrada em tumores bem diferenciados (EISENBERG; KOIFMAN, 2001), não sendo, portanto, detectado pela imunohistoquímica.

Considerando que o PCNA e BrdU são marcadores de proliferação celular, e que células neoplásicas, no geral, apresentam elevada taxa proliferativa, o emprego de tais marcadores como ferramenta diagnóstica têm sido amplamente empregada no rastreio e diagnóstico do câncer. Contudo, a análise do presente estudo revelou falta de especificidade dos marcadores, uma vez que células não neoplásicas apresentaram elevada atividade proliferativa, resultando em uma alta positividade à análise imunohistoquímica. Ademais, células neoplásicas com baixa taxa de proliferação celular não foram sensíveis à marcação, o que pode ocasionar conflitos diagnósticos.

Outra limitação observada foi a falta de especificidade quantitativa e qualitativa na distinção entre neoplasias de etiologias diversas, como os tumores pulmonares, melanomas e osteosarcomas.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode-se concluir que o perfil imunohistoquímico das amostras marcadas com PCNA e BrdU apresentou relação pouco específica ou inespecífica com os dados clínico-laboratoriais analisados, tais como classificação histológica, tabagismo, sexo ou idade dos pacientes. Os marcadores também se mostraram inespecíficos para auxílio diagnóstico de lesões pulmonares, uma vez que não permitiram uma correta distinção entre alterações benignas, malignas e metastáticas, não demonstrando, portanto, correlação com os tipos histológicos estudados. Além disso, os marcadores não foram sensíveis na detecção de um tipo tumoral bem diferenciado.

Deste modo, é possível sugerir que o emprego da imunohistoquímica para PCNA e BrdU em amostras de pulmão apresentou limitações diagnósticas, não sendo o PCNA e a BrdU, portanto, recomendados como marcadores complementares para auxílio na correta classificação histológica, prognóstico e planejamento terapêutico dos pacientes acometidos com neoplasias de pulmão.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALTORKI, Nasser K *et al.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 1, p. 9–31, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9>>.

AMERICAN CANCER SOCIETY, ACS. *Signs and Symptoms of Lung Cancer*.

BAI, Xianguang *et al.* Progression and prognostic value of ECT2 in non-small-cell lung cancer and its correlation with PCNA. *Cancer Management and Research*, v. 10, p. 4039–4050, 2018.

BIBBO, Marluce; FILHO, Adhemar Longatto. *Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários*. 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2001. Disponível em: <<http://www.revinter.com.br>>.

BOGLIOLO, Luigi. *Bogliolo, Patologia Geral*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

BOLOGNA-MOLINA, Ronell *et al.* Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 18, n. 2, 2013.

CANCER, Integrative Analysis of Lung Cancer Etiology and Risk (INTEGRAL) Consortium for Early Detection of Lung. Assessment of Lung Cancer Risk on the Basis of a Biomarker Panel of Circulating Proteins Assessment of Lung Cancer Risk on the Basis of a Biomarker Panel of Circulating Proteins Assessment of Lung Cancer Risk on the Basis of a Biomarker Panel of Circulating. *JAMA Oncology*, v. 4, n. 10, p. e182078–e182078, 11 out. 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2078>>.

Cancer Statistics. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 7 ago. 2017.

CHABNER, Bruce A.; LONGO, Dan L. *Manual de Oncologia de Harrison*. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2015.

CIBAS, Edmund S.; DUCATMAN, Barbara S. *Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates*. 5. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2009.

COOPER, Wendy A. *et al.* Molecular biology of the lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 2013. Disponível em: <http://www.onko-i.si/uploads/articles/Radiology_39_3_7.pdf%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2005495526>.

DIAMANDIS, E.P. *et al.* *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. 1. ed. Washington: AACCC Press, 2002.

EISENBERG, Ana Lucia Amaral; KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 47, n. 4, p. 377–388, 2001.

FENG, Mei *et al.* Diagnostic value of tumor markers for lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion: a validation study and meta-analysis. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 2, p. 283–290, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10147-016-1073-y>>.

FERRO, A. B. *Imunohistoquímica*.

HALL, John E. *Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2011.

HENRY GRAY, F. R. S. *Gray's Anatomy*. 15. ed. New York: Barnes & Noble, 2010.

HERBST, Roy S.; HEYMACH, John V.; LIPPMAN, Scott M. Lung Cancer. *The Merck Manuals Online Medical Library - Home Edition*, p. 1367–1380, 2008. Disponível em: <<http://www.merck.com/mmhe/sec04/ch057/ch057a.html>>.

HU, Lin *et al.* Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 23, n. 20, p. 3721–3729, 2017.

IARC, International Agency for Cancer Research. *All cancers*. Disponível em:

<<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>>.

Acesso em: 2 jan. 2019a.

IARC, International Agency for Cancer Research. *Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018*.

Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2019b.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. *Estatísticas de Câncer*. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 3 fev. 2019a.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*.

Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 2 jan. 2019.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. *O que é câncer?* Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 6 jan. 2019b.

KIERSZENBAUM, Abraham L.; TRES, Laura L. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K; ASTER, Jon C. *Robbins & Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2016.

LEE, Seung Hyeun *et al.* Reactive oxygen species modulator 1 (Romo1) as a novel diagnostic marker for lung cancer-related malignant effusion. *Medicine*, v. 96, n. 4, p.

e5975, 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28121949>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5287973>.

LIBOSKA, Radek *et al.* Most Anti-BrdU Antibodies React with 2'-Deoxy-5-Ethynyluridine - The Method for the Effective Suppression of This Cross-Reactivity.

PLoS ONE, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2012.

MUSKHELISHVILI, L; LATENDRESSE, R. L. K; HENDERSON, E. B. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67 (MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*,

v. 51, n. 12, p. 1681–1688, 2003. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/002215540305101212>>.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. *PubChem: Broxuridine*. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-bromo-2_-deoxyuridine#section=Top>. Acesso em: 18 jan. 2019a.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. *PubChem: Thymidine*. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5789#section=Top>>. Acesso em: 18 jan. 2019b.

NETO, J. A. D. *et al.* Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) em Carcinoma de Células Transicionais de Bexiga. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 16, n. suppl 1, p. 63–67, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502001000500019&lng=pt&tIng=pt>. Acesso em: 10 jan. 2019.

NETTER, Frank H. *Atlas de Anatomia Humana*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

NIH, National Institute of Health. *Genetics Home Reference: PCNA*. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PCNA>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.138>>.

PDB, Protein Data Bank. *Human PCNA Structure*. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/structure/1AXC>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

RECK, Martin; RABE, Klaus F. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 9, p. 849–861, 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1703413>>.

ROSE-JAMES, Alphy; SREELEKHA, TT. Molecular Markers with Predictive and Prognostic Relevance in Lung Cancer. *Lung Cancer International*, v. 2012, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/lci/2012/729532/>>.

STRASINGER, S. K.; DI LORENZO, M. S. *Uranalysis and Body Fluids*. 5. ed.

Philadelphia: F. A. Davis Company, 2008.

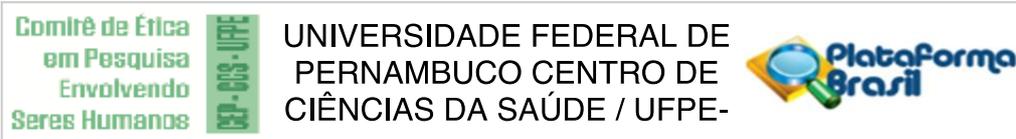
SWANTON, Charles; GOVINDAN, Ramaswamy. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 19, p. 1864–1873, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1504688>>.

TAUPIN, Philippe. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms , pitfalls , limitations , and validation. *Brain Research Reviews*, v. 53, 2007.

WANG, Weihua *et al.* MicroRNA-16-1 Inhibits Tumor Cell Proliferation and Induces Apoptosis in A549 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, v. 24, n. 5, p. 345–351, 2016. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0965-0407&volume=24&issue=5&spage=345>>.

WHO, World Health Organization. *Fact Sheets: Cancer*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 2 jan. 2019.

ANEXO A – PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS E POLIMORFISMOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

Pesquisador: CAROLINA MARIA MEDEIROS DO AMARAL

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 06396812.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 968.840

Data da Relatoria: 29/01/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE em parceria com o Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) cujo objetivo é incluir o Hospital AC Camargo Cancer Center (São Paulo) visando aumentar o número de amostras de DNA e RNA de tumores frescos e a inclusão dos pesquisadores Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos, Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório e Jefferson Luiz Gross, todos do A C Camargo.

O presente estudo de corte transversal retrospectivo, tem por objetivo avaliar a presença do papilomavírus humano em tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão através da detecção e tipificação viral, análise da integração do DNA e expressão dos oncogenes virais, além da análise de polimorfismos gênicos.

O material biológico será obtido do Biobanco do Hospital AC Camargo, que possui procedimentos operacionais padrão para coleta, armazenamento, solicitação, processamento e distribuição de material biológico humano (amostras de tecido congelado e/ou sangue) aprovado dentro de seu protocolo de desenvolvimento (Registro CONEP B-001).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 968.840

Serão selecionadas alíquotas de três microgramas de DNA e RNA extraídas de tumores de pacientes com câncer de pulmão utilizando-se os kits aprovados para uso pelo referido Biobanco e amostras de DNA e RNA de pacientes cujas biopsias apresentaram diagnósticos negativos para o câncer de pulmão. Os diagnósticos correspondentes serão revisados pelo Dr. Antônio Hugo José Frões Marques Campos, patologista responsável pelo Biobanco, e pela Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório, patologista do Departamento de Anatomia Patológica. Dados clínicos de prontuário (idade, gênero, profissão, história de câncer na família, história de tabagismo) serão associados às amostras fornecidas pelo Biobanco do A. C. Camargo Cancer Center.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo geral avaliar a presença do Papilomavírus humano em tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão e por objetivos específicos: 1) detectar a presença do DNA de Papilomavírus humano em material pulmonar e sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão; 2) identificar os tipos de HPV presentes no material pulmonar e sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão; 3) avaliar a expressão dos genes E2, E6 e E7 do HPV no material pulmonar de pacientes com câncer de pulmão; 4) avaliar a presença das oncoproteínas E5, E6, E7 e p16INK4A no tecido tumoral e 5) avaliar a presença de polimorfismos gênicos em material pulmonar e sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto a etapa a ser realizada no A C Camargo Cancer Center, motivo da formulação desta emenda, as amostras e dados associados serão fornecidas aos pesquisadores pelo Biobanco sem identificadores que possam implicar risco de quebra da privacidade dos participantes. A transferência de responsabilidades será feita por assinatura de Termo de Transferência de Material Biológico Humano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante e é viável do ponto de vista metodológico.

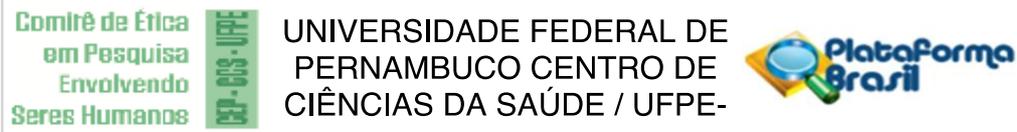
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conteúdo avaliado anteriormente pelo CEP tendo sido considerado adequado.

Recomendações:

Incluir o Lattes dos pesquisadores colaboradores do A C Camargo Dr. Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos (Biobanco), Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório (Departamento de Patologia) e Dr. Jefferson Luiz Gross (Núcleo de Pulmão e Tórax) e de Bianca de França São Marcos (Biomédica do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental da UFPE). Quanto as

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 968.840

cartas de anuência recomendamos que as mesmas, no caso a do Biobanco de AC Camargo, não sejam assinadas por membros da equipe de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada.

RECIFE, 02 de Março de 2015

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br