

**CORRELAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE EXPRESSÃO  
PROTÉICA E FATORES PROGNÓSTICOS EM  
CARCINOMA PULMONAR NÃO PEQUENAS CÉLULAS  
AVANÇADO LOCO-REGIONALMENTE**

**IGOR A. PROTZNER MORBECK**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Jefferson Luiz Gross**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Riad Nain Younes**

**São Paulo**

**2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Morbeck, Igor A. Protzner

**Correlação entre o perfil de expressão protéica e fatores prognósticos em portadores de carcinoma pulmonar não pequenas células avançado loco-regionalmente.** / Igor A. Protzner Morbeck – São Paulo, 2007.  
76p.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.  
Orientador: Dr. Jefferson Luiz Gross

**Descritores:** 1. CARCINOMA PULMONAR DE NÃO PEQUENAS CÉLULAS. 2. IMUNOHISTOQUÍMICA. 3. PROGNÓSTICO.

***"Só é útil o conhecimento que nos faz melhores."***

***Sócrates***

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a:

A Minha esposa Cristiane pela compreensão, carinho, apoio incondicional e ajuda pessoal nos momentos de ausência e de maiores dificuldades.

Ao meu filho Rafael por ser a fonte inspiradora da minha busca ao crescimento profissional e espiritual.

Ao Bruno pelo exemplo de humanismo, honestidade e perseverança na busca dos seus objetivos.

Aos meus pais pela educação, orientação de vida e estímulo incessante aos estudos.

Aos meus avós pelo amor e acolhimento em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pacientes por me encorajar ao estudo e à pesquisa.

À Deus.....

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. Jefferson Luiz Gross** pela humildade, disponibilidade, brilhantismo profissional e compreensão por entender as dificuldades da realização de tal projeto residindo em outro estado.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Riad Naim Younes** por ter me proporcionado a abertura de um novo mundo de conhecimento e crescimento profissional.

À **OncoVida** com todo o seu time de profissionais pela compreensão e ajuda nos momentos de ausência.

À **Dra. Andrea Arredondo Farias**, pelo entendimento e apoio, que sem os quais este projeto não poderia ser realizado.

Ao amigo **Dr. Victor Pianna Andrade** pela paciência e competência profissional, um exemplo a ser seguido.

Ao **Luis Alberto Breña** pela amizade e acolhida em São Paulo.

## RESUMO

Morbeck IP. **Correlação entre o perfil de expressão protéica e fatores prognósticos em portadores de carcinoma pulmonar não pequenas células avançado loco-regionalmente.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O Câncer de Pulmão é a causa mais comum de morte por neoplasia em todo o mundo e sua incidência vem aumentando desde a década de 50. No Brasil, foram diagnosticados aproximadamente 27.170 novos casos em 2006. Em nosso meio cerca de 80% dos Carcinomas Pulmonares Não Pequenas Células (CPNPC) apresentam-se como doença avançada localmente ou com metástase à distância. O prognóstico neste grupo de pacientes é ruim, com taxas de sobrevida a 5 anos variando de 10 a 15% nos pacientes com estadio clínico IIIA e de 2-5% em pacientes com estágio clínico IIIB. Para a grande maioria dos autores, os principais fatores prognósticos em CPNPC são: desempenho clínico (índice de Karnofsky), extensão da doença, tipo histológico, raça, sexo, idade e estado nutricional. Através de análise retrospectiva de 64 pacientes com CPNPC estadio clínico (EC) III, tratados com quimioterapia e radioterapia combinadas, correlacionamos variáveis clínicas com a análise da expressão dos marcadores protéicos relacionados ao ciclo celular (p53, pRb, p21 e p27), além dos oncogenes (EGFR, c-erbB2) utilizando-se a imunoistoquímica. Vários estudos tem demonstrado o valor destes marcadores como fator de prognóstico em Câncer de Pulmão. Em nosso estudo, a sobrevida global a 3 anos foi de 22,7% e a 5 anos de 8,3%, com mediana de 16 meses. Entre as variáveis clínicas analisadas, tais como: gênero, idade, histologia, estadio clínico e modalidade de tratamento, apenas o estadio clínico alcançou significância estatística, com sobrevida a 3 anos de 47% para o IIIA e 14,1% para o IIIB, com  $p=0,01$ . Em relação aos anticorpos estudados, a perda de expressão do p21 correlacionou-se com uma maior

sobrevida global a 3 anos (34,6% versus 11%;  $p=0,01$ ). A expressão dos demais marcadores protéicos não mostrou correlação significativa com a sobrevida global. Foi demonstrado, em análise multivariada, que o estadio clínico e a expressão da p21 comportaram-se como variáveis independentes de pior prognóstico em nosso estudo. Em conclusão, entre os marcadores moleculares estudados, apenas a expressão do p21 determinou piora da sobrevida. O EC e a expressão do p21 obtiveram valor prognóstico independente na determinação da sobrevida global. Em virtude da complexidade das interações protéicas presentes no ciclo celular das células neoplásicas, a interpretação desses resultados, deve ser vista de maneira cuidadosa, devido principalmente a nossa casuística limitada, a seleção dos pacientes e o número limitado de marcadores realizados neste estudo.

## SUMMARY

Morbeck IP. **[Correlation between the profile of protein expression and prognostic factors in carriers of locally advanced non small cell lung cancer]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Lung cancer is the most common cause of death for neoplasia in the whole world and its incidence comes increasing since the decade of 50. In Brazil, 27,170 new cases in 2006 were diagnosed, being 80% of them is presented as advanced local illness or with distant metastasis. The prognosis in this group of patients is bad, with a 5 years survival rate varying of 10-15% in the patients with clinical stage (CS) IIIA and of 2-5% in patients with CS IIIB. For the great majority of the authors, the main prognostic factors in non small cell lung cancer (NSCLC) are: performance-status (Karnofsky index), CS, histological subtype, race, gender, age, and nutritional state. Through a data base of 64 patients diagnosed with NSCLC CS III, treated exclusively with chemoradiotherapy or radiotherapy alone, we correlate clinical parameters with the analysis of the expression of the molecular markers related to cellular cycle (p53, pRb, p21 and p27) and expression of oncogenes (EGFR, c-erbB2) using immunohistochemical method. Various studies have demonstrated the value of these molecular markers as prognostic factor in lung cancer. In our study, the 3 and 5 survival rates was of 22,7% and of 8,3%, respectively. In respect of the clinical parameters analyzed, such as: gender, age, histologic subtype, CS and type of treatment, only the CS reached statistical significance, with a 3 years survival rate of 47% for CS IIIA and 14.1% for the IIIB, with  $p=0,01$ . In relation to studied antibodies, the loss of expression of p21 was correlated with a greater survival (34.6% versus 11%;  $p=0,01$ ). The expression of the EGFR, cerb-B2, p53, pRb and p27 did not correlated statistically with survival. It was demonstrated, in a multivariate analysis that the CS and the expression of p21 has behaved as independent



variable of worse prognostic in our study. In conclusion, the CS and expression of p21 had independent prognosis in determination of overall survival. Due to complexity of the protein interactions in the cellular cycle of the neoplastic cells, the interpretation of these results, due to casuistic limitation, patient selection and limited numbers of markers, these data must carefully be analysed, mainly if analyzed of isolated form.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                              |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Adenocarcinoma de pulmão.                                                    | 3  |
| <b>Figura 2</b>  | Carcinoma espino-celular de pulmão.                                          | 4  |
| <b>Figura 3</b>  | Carcinoma bronquíolo-alveolar.                                               | 5  |
| <b>Figura 4</b>  | Critérios de graduação imunoistoquímica.                                     | 29 |
| <b>Figura 5</b>  | Expressão do EGFR 3+.                                                        | 38 |
| <b>Figura 6</b>  | Expressão do cerb-B2 3+.                                                     | 39 |
| <b>Figura 7</b>  | Expressão do pRb 3+.                                                         | 40 |
| <b>Figura 8</b>  | Expressão do p53 3+.                                                         | 41 |
| <b>Figura 9</b>  | Hiper-expressão do p21, marcação nuclear.                                    | 42 |
| <b>Figura 10</b> | Hiper-expressão do p27, marcação nuclear.                                    | 43 |
| <b>Figura 11</b> | Gráfico da curva de sobrevida global 3 anos: 22,7% / 5 anos: 8,3%.           | 44 |
| <b>Figura 12</b> | Gráfico da curva de sobrevida global a 3 anos por estadio clínico.           | 48 |
| <b>Figura 13</b> | Gráfico da curva de sobrevida global a 3 anos em relação a expressão da p21. | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                  |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Distribuição dos principais tipos histológicos de câncer de pulmão e frequência de aparecimento. | 3  |
| <b>Tabela 2</b>  | Correlação da sobrevida a 5 anos e nível do envolvimento linfonodal do mediastino.               | 9  |
| <b>Tabela 3</b>  | Correlação entre o tipo histológico e a expressão do EGFR em CPNPC.                              | 24 |
| <b>Tabela 4</b>  | Resumos dos protocolos das reações de IHC dos anticorpos utilizados no estudo.                   | 27 |
| <b>Tabela 5</b>  | Distribuição dos pacientes em relação ao sexo e idade.                                           | 33 |
| <b>Tabela 6</b>  | Distribuição dos pacientes em relação ao subtipo histológico e estadio clínico.                  | 34 |
| <b>Tabela 7</b>  | Distribuição dos pacientes em relação à modalidade do tratamento e dose de radioterapia.         | 34 |
| <b>Tabela 8</b>  | Distribuição dos pacientes em relação a localização das metástases e tempo de seguimento         | 35 |
| <b>Tabela 9</b>  | Distribuição dos pacientes quanto ao estado atual da doença.                                     | 36 |
| <b>Tabela 10</b> | Distribuição dos pacientes em relação aos marcadores protéicos.                                  | 37 |

|                  |                                                                                                        |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 11</b> | Sobrevida global a 3 anos em relação ao gênero, idade, subtipo histológico e modalidade de tratamento. | 45 |
| <b>Tabela 12</b> | Sobrevida global a 3 anos em relação ao estadio clinico.                                               | 46 |
| <b>Tabela 13</b> | Sobrevida global a 3 anos para os marcadores p53, pRb, p21 e p27.                                      | 47 |
| <b>Tabela 14</b> | Análise multivariada utilizando as variáveis estadio clínico e expressão da p21.                       | 50 |
| <b>Tabela 15</b> | Estudos mostrando a correlação da p21 e p27 e sobrevida em CPNPC.                                      | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |                                           |
|--------------|-------------------------------------------|
| <b>ASCO</b>  | American Society of Clinical Oncology     |
| <b>CDK</b>   | Quinases Ciclina-Dependentes              |
| <b>CEC</b>   | Carcinoma Espino-Celular                  |
| <b>CPNPC</b> | Carcinoma Pulmonar Não Pequenas Células   |
| <b>CPPC</b>  | Carcinoma Pulmonar Pequenas Células       |
| <b>ECOG</b>  | Eastern Cooperative Oncology Group        |
| <b>EGFR</b>  | Epidermal Growth Factor Receptor          |
| <b>EP</b>    | Etoposide e Platina                       |
| <b>HER</b>   | Human Epidermal receptor                  |
| <b>FISH</b>  | Fluorescence in Situ Hybridization        |
| <b>IALT</b>  | International Adjuvant Lung trial         |
| <b>INCA</b>  | Instituto Nacional do Câncer              |
| <b>KPS</b>   | Karnofsky Performance Status              |
| <b>MVP</b>   | Metotrexate Vinblastina Platina           |
| <b>NCCN</b>  | National Comprehensive Cancer Network     |
| <b>NCI</b>   | National Cancer Institute                 |
| <b>OMS</b>   | Organização Mundial de Saúde              |
| <b>PDQ</b>   | Physician Data Query                      |
| <b>pRB</b>   | Proteína do Retinoblastoma                |
| <b>SEER</b>  | Surveillance Epidemiology and end Results |
| <b>SWOG</b>  | Southwest Oncology Group                  |
| <b>TMA</b>   | Tissue Micro Array                        |

# ÍNDICE

|          |                                                    |           |
|----------|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Revisão da Literatura: Tratamento do CPNPC         | 6         |
| 1.2      | Fatores Prognósticos                               | 12        |
| 1.3      | Justificativa                                      | 14        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVO</b>                                    | <b>15</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E METODO</b>                           | <b>17</b> |
| 3.1      | Construção do Pannel de Anticorpos                 | 19        |
| 3.1.1    | Anticorpos e Reações de Imunoistoquímica           | 20        |
| 3.1.2    | Anticorpos (marcadores protéicos)                  | 20        |
| 3.1.3    | Reações de Imunoistoquímica                        | 25        |
| 3.2      | Leitura das reações e interpretação dos resultados | 28        |
| 3.3      | Análise Estatística                                | 30        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>                                  | <b>33</b> |
| 4.1      | Caracterização da amostra de 64 pacientes          | 33        |
| 4.2      | Análise de Sobrevida                               | 44        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b>                                   | <b>51</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO</b>                                   | <b>62</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                  | <b>65</b> |

## ANEXOS

**Anexo 1** Revisão do Sistema Internacional de Estadiamento

**Anexo 2** Mapa das Lâminas

**Anexo 3** Ficha específica para anotação dos dados clínicos

**Anexo 4** Banco de dados

# ***INTRODUÇÃO***

---

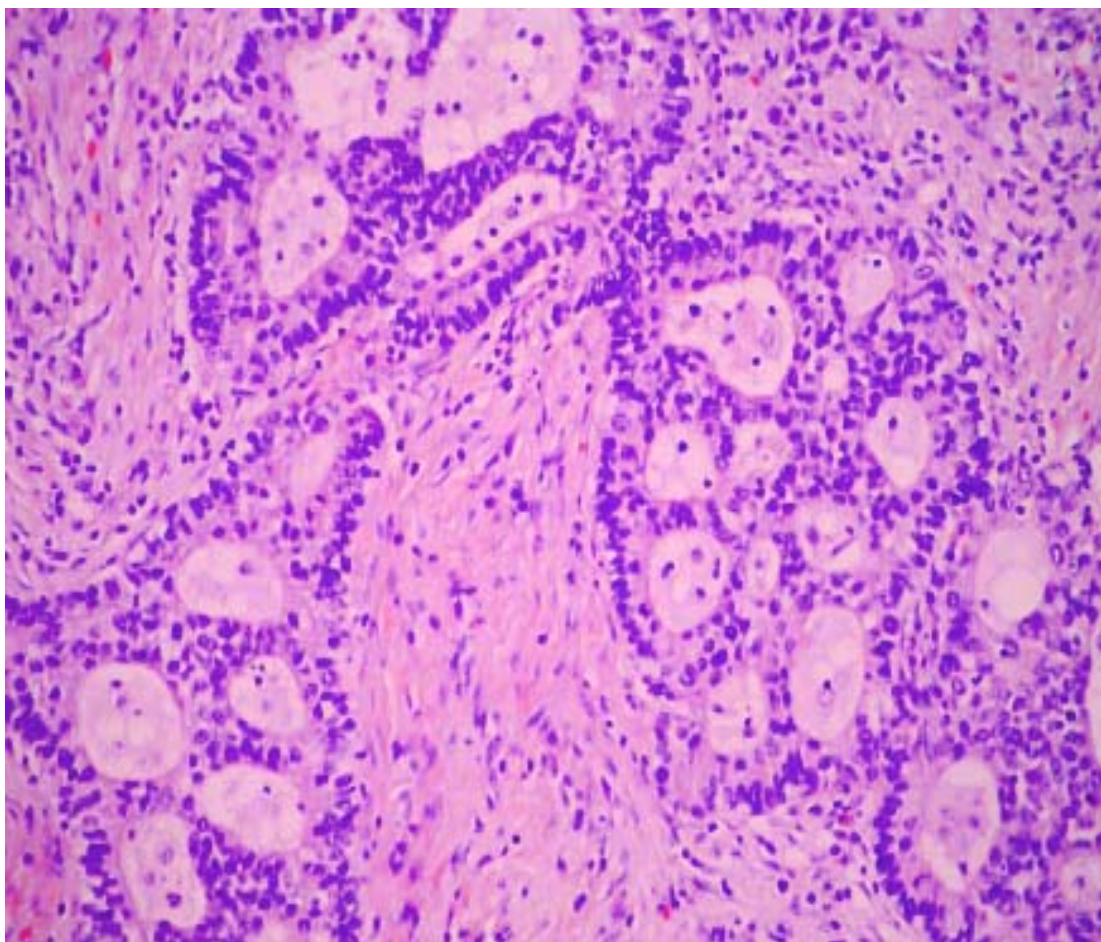
## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por neoplasia em todo o mundo. Estão previstos para o ano de 2007, 213.380 novos casos nos EUA com 160.390 óbitos (Surveillance Epidemiology and end Results-SEER 2007). No Brasil, as estimativas de incidência e mortalidade em 2006 do INCA, revelam que esta neoplasia deve atingir 27.170 pessoas, sendo 17.850 do sexo masculino e 9.320 do sexo feminino (Ministério da Saúde 2005).

Aproximadamente 40% dos pacientes com carcinoma pulmonar de não-pequenas células (CPNPC) apresentam-se com doença avançada e não obstante os avanços no tratamento multidisciplinar, a taxa de sobrevivência global em 10 anos permanece entre 8%-10% (SCHRUMP et al. 2005).

Historicamente a classificação histológica dos CPNPC tornou-se mundialmente aceita em 1967, quando um painel de especialistas da OMS criou a nomenclatura padrão em CPNPC. TRAVIS et al. (2004) atualizaram os dados da histopatologia em CPNPC, levando em consideração as características moleculares e morfológicas desta neoplasia. Em relação ao gênero, o subtipo Adenocarcinoma (Figura 1) é mais prevalente no sexo feminino (42% versus 28%) e o CEC (Figura 2) é mais comum no sexo masculino (44% versus 25%). A variante Bronquíolo-alveolar (Figura 3) encontra-se presente em cerca de 3% dos pacientes com CPNPC e o Carcinoma de Grandes células em 9% (Tabela 1).



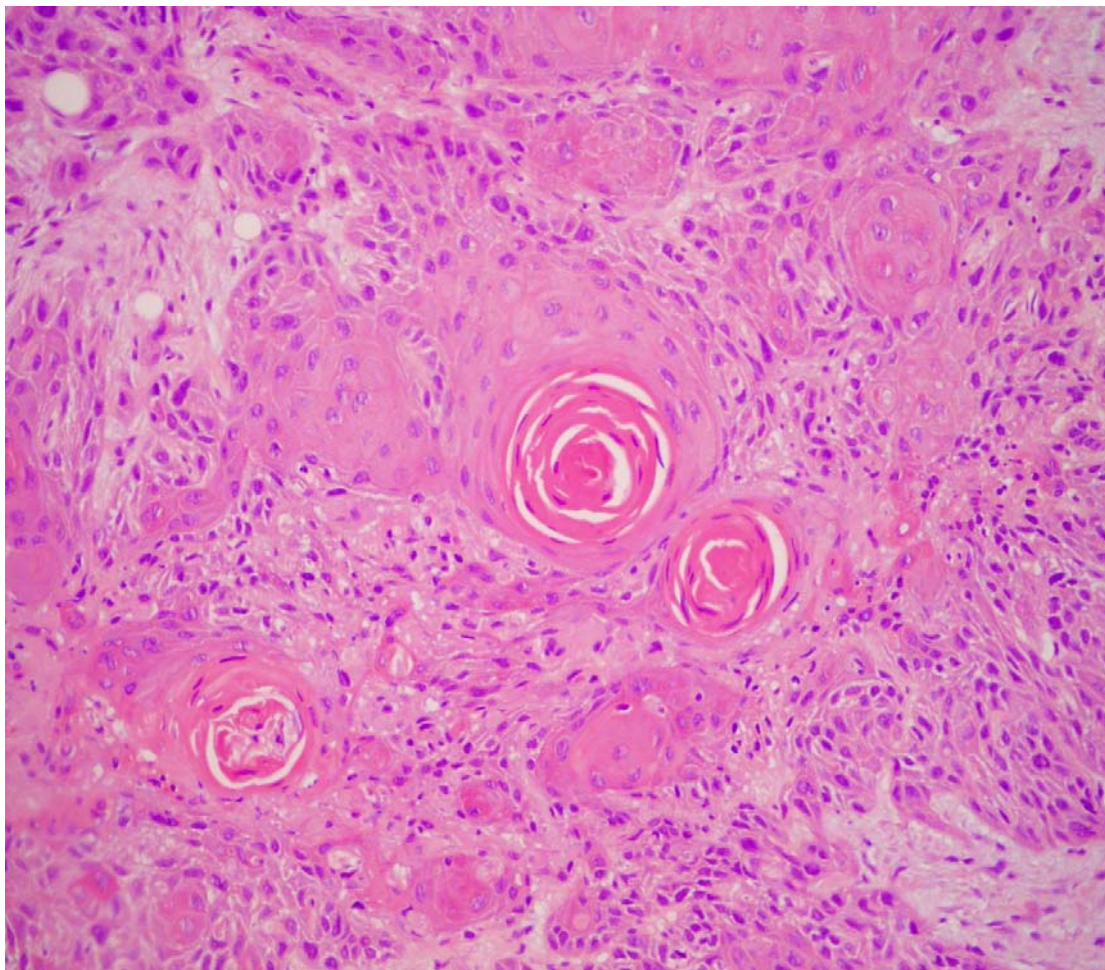


**Legenda:** Ninhos glandulares de aspecto invasivo com citoplasma abundante e basofílico com nucléolos proeminentes e freqüentes figuras de mitose. Aumento de 200x.

**Figura 1** - Adenocarcinoma de pulmão.

**Tabela 1** - Distribuição dos principais tipos histológicos de câncer de pulmão e freqüência de aparecimento.

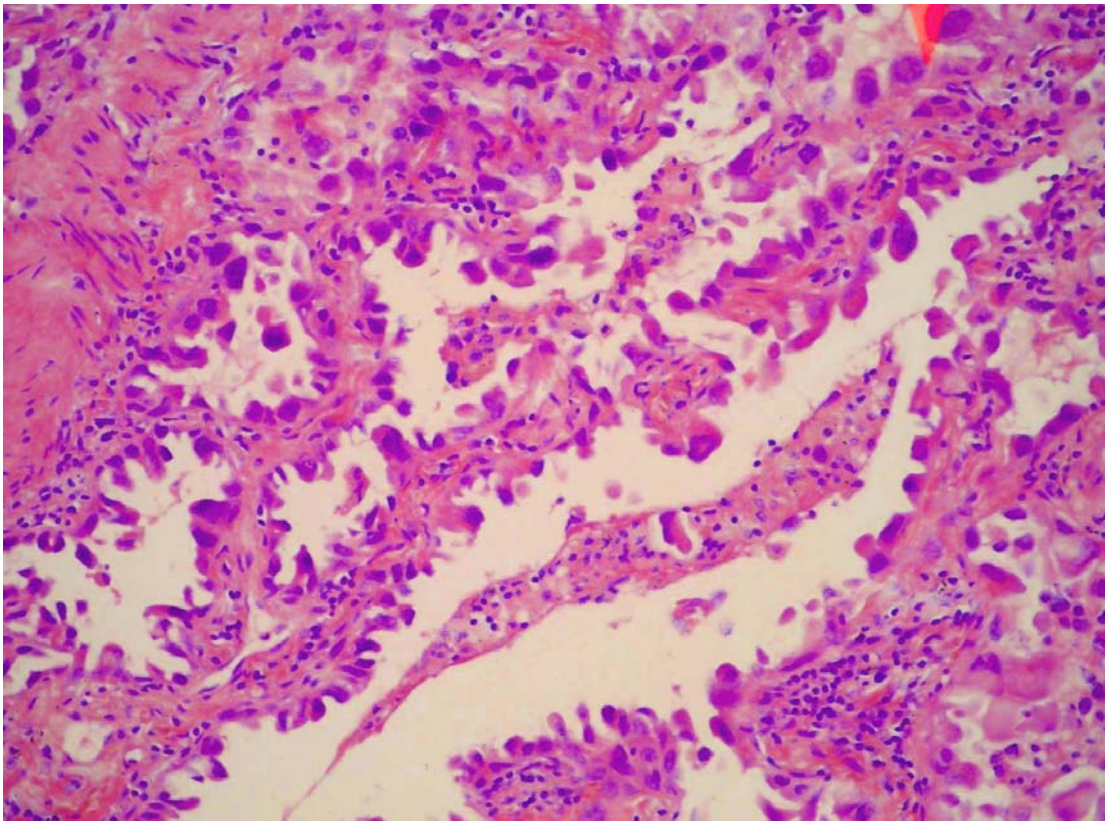
| Tipo Histológico             | Freqüência |
|------------------------------|------------|
| CEC                          | 29%        |
| Adenocarcinoma               | 32%        |
| Variante Bronquíolo-alveolar | 03%        |
| Carcinoma de grandes Céls.   | 09%        |
| Outros                       | 12%        |
| CPPC                         | 20%        |



**Legenda:** Caracterizado por ninhos de células poligonais com focos de ceratinização, formando pérolas córneas. Citoplasma eosinofílico com nucléolos grandes e dismórficos e freqüentes figuras de mitoses. Aumento de 200x.

**Figura 2** - Carcinoma espino-celular de pulmão.





**Legenda:** Deposito de células neoplásicas ao longo dos septos alveolares, com citoplasma abundante e basofílico. Os nucléolos são proeminentes e as figuras de mitoses são infrequentes. Aumento de 400x.

**Figura 3** - Carcinoma bronquíolo-alveolar.

## 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

Ao diagnóstico, os pacientes com CPNPC podem ser divididos em três grupos que refletem a extensão da doença e a abordagem de tratamento.

O primeiro grupo compreende aqueles tumores que são cirurgicamente ressecáveis (em geral EC I e II). Este é o grupo de melhor prognóstico, com taxas de sobrevida a cinco anos de 67% para o EC IA, de 37% para EC IIA e 24% para EC IIB (MOUNTAIN 1997). Segundo YOUNES (2005), a taxa de recidiva sistêmica após ressecção cirúrgica é de 19,6% no estadió clínico (EC) I e 30,9% no EC II.

Os princípios da cirurgia em CPNPC são (GINSBERG 1995):

- a) Lobectomia ou pneumectomia se fisiologicamente factível;
- b) Ressecção limitada (segmentectomia) se fisiologicamente comprometido;
- c) Linfadenectomia mediastinal.

No EC I e II, o prognóstico é influenciado adversamente pela presença de sintomas pulmonares, tamanho do tumor (> 3 cm), acometimento linfonodal, sexo masculino, idade maior que 60 anos e positividade da oncoproteína c-erbB2 (MACCHIARINI et al. 1993; HARPOLE et al. 1995; ICHINOSE et al. 1995; STRAUSS et al. 1995; GRAZIANO 1997). Outros fatores que têm sido identificados e relacionados a um prognóstico adverso em algumas séries de pacientes com CPNPC operáveis incluem: mutação do gene K-ras, invasão vascular, aumento no número de vasos

sanguíneos no espécime tumoral, diminuição da expressão de e-caderinas, níveis elevados de CYFRA-21 e dosagem do antígeno carcino-embrionário no pós-operatório (SLEBOS et al. 1990; FONTANINI et al. 1995; DEEB et al. 2004; PUJOL et al. 2004; SAWABATA et al. 2004).

A radioterapia pode ser uma opção para aqueles pacientes com contra-indicação médica à cirurgia, tais como: baixo desempenho clínico (KPS), idade avançada, doença cardiovascular, baixa reserva pulmonar e recusa do paciente. Um estudo envolvendo uma análise retrospectiva de 347 pacientes com CPNPC EC I, mostrou sobrevida global de 27% aos 5 anos com sobrevida média de 27,9 meses (GAUDEN et al. 1995). No entanto, nenhum estudo clínico randomizado comparou a indicação de radioterapia imediata versus radioterapia à época do surgimento dos sintomas. ROWELL e WILLIAMS (2001) demonstraram, em uma metaanálise, que a radioterapia hiper-fracionada obteve melhor sobrevida aos 2 anos quando comparada a radioterapia convencional, 37% versus 24%, respectivamente.

As metástases à distância representam um padrão comum de falha após a ressecção curativa de CPNPC. O tratamento adjuvante sistêmico é uma estratégia racional que visa diminuir o risco de recidiva e aumentar a sobrevida. Em 1995, uma meta-análise de um grupo colaborativo em câncer de pulmão, falhou em demonstrar ganho de sobrevida no subgrupo de pacientes submetidos à quimioterapia adjuvante baseada em platina (Anonymus 1995). Um estudo do ECOG, publicado por KELLER et al. (2000), randomizou 488 pacientes EC II e IIIA, após cirurgia, para receberem radioterapia isolada ou radioterapia associada à quimioterapia (cisplatina e

etoposide). Na análise de resultados, não se observou diminuição do risco de recorrência loco-regional ou aumento de sobrevida com o tratamento combinado (quimioterapia e radioterapia). SCAGLIOTTI et al. (2003) randomizou os pacientes para quimioterapia adjuvante com o regime MVP versus observação. Neste estudo, houve um ganho absoluto de 3% de sobrevida, o qual não alcançou significância estatística. Finalmente, o grupo do IALT, em 2004, apresentou os resultados de um estudo multicêntrico, prospectivo e randomizado, onde foram examinados os benefícios de quimioterapia adjuvante em portadores de CPNPC completamente ressecados EC I, II e IIIA (ARRIAGADA et al. 2004). Este estudo randomizou 1867 pacientes para observação ou três a quatro ciclos de quimioterapia baseada em platina. A sobrevida global e sobrevida livre de doença foram significativamente maiores, a dois e cinco anos, no grupo que recebeu quimioterapia (4,1% e 5,1%, de benefício absoluto, respectivamente). Após a publicação do IALT, a quimioterapia adjuvante, baseada em platina, tornou-se padrão após a cirurgia em pacientes com CPNPC.

O segundo grupo de pacientes com CPNPC inclui tumores avançados local ou regionalmente. Segundo MOUNTAIN (1997) este grupo compreende o EC III, o qual é subdividido em IIIA e IIIB. O EC IIIA é classificado pela presença de linfonodo mediastinal ipsilateral acometido (N2) ou com lesão T3 com linfonodo hilar positivo (N1). O EC IIIB é caracterizado pela presença de envolvimento de linfonodo mediastinal contra-lateral ou supraclavicular (N3) ou tumor T4 (Estadiamento CPNPC - Anexo 1).

No EC IIIA, os pacientes são estratificados clinicamente em aqueles com envolvimento extenso do mediastino e sem envolvimento extenso do mediastino. Esta distinção é importante por razões de prognóstico, além de determinar diferentes abordagens terapêuticas. A taxa de sobrevida global em cinco anos para pacientes com IIIA N2 varia de 10% a 15%, ao passo que em pacientes com comprometimento extenso do mediastino a sobrevida é de 2-5% (ANDRE et al. 2000) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Correlação da sobrevida a 5 anos e nível do envolvimento linfonodal do mediastino.

| <b>Envolvimento Linfonodal</b>                  | <b>Sobrevida a 5 anos</b> |
|-------------------------------------------------|---------------------------|
| N2 Microscópico, um nível comprometido          | 34%                       |
| N2 Microscópico, múltiplos níveis comprometidos | 11%                       |
| N2 clínico, um nível comprometido               | 8%                        |
| N2 clínico, múltiplos níveis comprometidos      | 3%                        |

O melhor tratamento para o EC III ainda não está claro e muitos aspectos são controversos. Embora existam muitas abordagens, nenhum tratamento leva a um alto potencial de cura. Devido à heterogeneidade clínica deste grupo, nenhuma abordagem de tratamento isolada deve ser recomendada (ALBAIN et al. 2006).

Historicamente a cirurgia era indicada para o tratamento do EC IIIA sem envolvimento extenso do mediastino. No entanto, em virtude dos altos

índices de recorrência local e à distância, além da melhora do estadiamento patológico do mediastino (através da mediastinoscopia), a cirurgia não é mais considerada padrão para este subgrupo de pacientes (National Cancer Institute-NCI 2007).

Um grupo cooperativo de estudos em Radioterapia, coordenado por SAUSE et al. (1995), avaliou a influência da dose de radioterapia no tratamento dos CPNPC avançados localmente. Os pacientes foram randomizados a receber doses de 40, 50 ou 60 Gy com frações diárias de 2 Gy. As taxas de controle local foram significativamente melhores com doses mais elevadas de radioterapia (52 62 e 73%, respectivamente). Este estudo estabeleceu a dose de 60 Gy, divididas em 30 frações, como a mais adequada.

O uso de quimioterapia neo-adjuvante mostrou ser efetiva em dois estudos clínicos randomizados em CPNPC EC IIIA, ambos publicado em 1994 (ROSELL et al. 1994; ROTH et al. 1994). Estes estudos mostraram uma sobrevida mediana maior no grupo que foi submetido ao tratamento combinado (quimioterapia e cirurgia). DEPIERRE et al. (2002) publicaram um estudo fase III, randomizado e multicêntrico, com 355 pacientes, EC I (exceto T1N0), II e IIIA que foram submetidos à cirurgia ou a dois ciclos neoadjuvantes de quimioterapia; nos pacientes que responderam a este regime foi administrado mais dois ciclos adjuvantes. A taxa de resposta no braço submetido ao tratamento neoadjuvante foi de 64%. Este estudo mostrou ganho significativo de sobrevida livre de doença e sobrevida global a quatro anos nos EC I e II no grupo de pacientes submetidos a tratamento



quimioterápico seguido de cirurgia. Entretanto, face ao pequeno número de pacientes na maioria dos estudos realizados em neoadjuvância, esta prática não tem considerado universalmente aceita.

A radioterapia combinada à quimioterapia (baseada em platina) é o tratamento padrão no EC III (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2007). A administração concomitante dessas duas abordagens leva a um tratamento precoce das micrometástases além de explorar o efeito sinérgico da combinação da quimioterapia com a radioterapia. Contudo, o regime considerado ótimo para o tratamento concomitante ainda não é conhecido. Um grupo cooperativo norte americano, denominado SWOG, estudou em um ensaio multicêntrico fase II, a combinação de EP com Radioterapia, seguido de consolidação com o Docetaxel. As taxas de sobrevida alcançadas foram de 17% a 3 anos e de 15% a 5 anos (GANDARA et al. 2003). No entanto, estudos fase III randomizados são necessários para validar esses resultados. Os pacientes com EC IIIB não se beneficiam de cirurgia isolada e são melhor manejados com quimioterapia inicial, quimioterapia associada à radioterapia ou radioterapia isolada. Pacientes com bom KPS podem ser considerados para o tratamento combinado e aqueles com derrame pleural maligno devem ser tratados como estágio clínico IV (NCCN 2007).

O último grupo de pacientes apresenta metástase (M1) ao diagnóstico. Este grupo pode ser tratado com quimioterapia exclusiva baseada em platina ou radioterapia (casos especiais) para palição dos sintomas, além de cuidados paliativos. Neste estágio o prognóstico é pior em pacientes com baixo KPS e perda de peso maior que 10% (NCI 2007).

Na última década grande avanço ocorreu nas estratégias de tratamento multidisciplinar em CPNPC, levando a um melhor controle loco-regional e melhora do intervalo livre de doença. No entanto, houve pouco incremento na sobrevida global. Em virtude dos pobres resultados obtidos no tratamento do CPNPC, seja em estágios iniciais ou na doença avançada localmente, há a necessidade de mais estudos que ressaltem a importância da pesquisa de fatores determinantes do prognóstico em CPNPC. A identificação de pacientes com melhor sobrevida pode auxiliar no sentido de modificar a estratégia de tratamento, como por exemplo, maiores doses de radioterapia, associação de diferentes esquemas de quimioterapia, que mesmo apresentando maior toxicidade, poderia ser justificada para aqueles pacientes identificados como de melhor prognóstico.

## **1.2 FATORES PROGNÓSTICOS**

Na medicina, como destacado por WINDELER (2000), o desenvolvimento de modelos prognósticos tem por objetivo permitir uma melhor compreensão da história natural das doenças, oferecer um meio de auxílio prático a decisão médica e prestar-se para um melhor planejamento de ensaios clínicos. Esses modelos são ainda importantes para informar ao paciente e à sua família sobre o que pode ser esperado do tratamento, auxiliando-os em suas escolhas.

Para a grande maioria dos autores os principais fatores prognósticos em CPNPC são: KPS, extensão da doença, tipo histológico, sexo, etnia,

idade e estado nutricional (STANLEY 1980; PAESMANS et al. 1995; BRUNDAGE et al. 2002). Segundo VAN MEERBEECK (2001), o estadiamento e o KPS são os mais importantes fatores prognósticos em CPNPC, havendo uma clara correlação entre estágios avançados e baixo KPS com uma pior sobrevida. O valor prognóstico da histologia em CPNPC permanece incerto. GAIL et al. (1984) estudaram 392 pacientes com CPNPC e constataram uma maior sobrevida em CEC, comparando com adenocarcinoma e carcinoma de grandes células. Entretanto, outros estudos não mostraram diferenças significativas nas taxas de sobrevida entre os subtipos histológicos (HARPOLE et al. 1995; MARTINI et al. 1995). Em relação ao gênero, conforme destacado por RADZIKOWSKA et al. (2002), o sexo feminino apresenta melhor prognóstico que o sexo masculino em CPNPC (WAKELEE et al. 2006). A raça negra não parece ser um fator prognóstico independente, embora apresente pior sobrevida que a raça branca. Em análise multivariada, essa piora da sobrevida esteve relacionada ao baixo KPS e a perda de peso a apresentação da doença (BLACKSTOCK et al. 2002). Embora alguns autores considerem que a sobrevida diminua com o aumento da idade, em uma série de análises retrospectivas de estudos clínicos, a idade avançada ao diagnóstico não mostrou estar relacionada a uma pior sobrevida ou influenciar na resposta ao tratamento (VERCELLI et al. 1997; THOMAS et al. 1998). A perda de peso é considerada como fator prognóstico independente de menor sobrevida em CPNPC, especialmente se maior que 10% do peso inicial do paciente. A

redução do apetite, que precede a perda de peso, também apresenta implicações de prognóstico pior (HOANG et al. 2005).

### **1.3 JUSTIFICATIVA**

Pelo exposto, julgamos ser relevante o estudo do perfil de expressão protéica em CPNPC para melhor identificação de alguns dos principais marcadores moleculares nesta patologia e sua correlação com características clínicas da doença, visando individualizar o tratamento e o seguimento dos pacientes de acordo com seu prognóstico.

***OBJETIVO***

---

## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo é avaliar, pela técnica de imunoistoquímica, a expressão dos marcadores protéicos: EGFR, cerb-B2 (HER-2), p53, pRb, p21 e p27 em CPNPC EC III e correlacioná-los com fatores prognósticos clínicos, entre eles, estadiamento, KPS, sexo, perda de peso, idade e subtipo histológico.

## ***MATERIAL E MÉTODO***

---

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Analizamos uma coorte retrospectiva dos prontuários do SAME do Hospital AC Camargo de 213 pacientes admitidos para tratamento nos Departamentos de Cirurgia Torácica, Radioterapia ou Oncologia clínica do Hospital A C Camargo, no período de janeiro de 1990 a novembro de 2005 e que preenchiam os seguintes critérios de inclusão:

- a. Diagnóstico histológico de CPNPC;
- b. Estadio clínico IIIa e IIIb;
- c. Terem sido submetidos à radioterapia associada ou não a quimioterapia como tratamento exclusivo.

Todos os pacientes foram estadiados, de forma padronizada no Hospital A C Camargo, com TC de tórax, abdome superior e crânio, cintilografia óssea e broncoscopia. Com base nestes exames de estadiamento os pacientes foram classificados como estadio IIIA ou IIIB. A mediastinoscopia não foi realizada de forma rotineira em todos os pacientes, a invasão mediastinal (T4) foi definida através de exames de imagem (TC ou RNM, quando necessário). A escolha da melhor forma de tratamento (radioterapia isolada; associação com quimioterapia concomitante, antes ou depois da radioterapia) ficou a critério do oncologista e/ou radioterapeuta que estava conduzindo cada caso, uma vez que se trata de estudo retrospectivo.



Dentre os 213 pacientes de nosso banco de dados, 64 casos foram considerados elegíveis para realização de IHC com os marcadores escolhidos.

As razões para a diminuição da nossa casuística foram:

1. Ausência das lâminas e/ou blocos de parafina no arquivo de anatomia-patológica;
2. Material proveniente de outro serviço de patologia cujos blocos originais não estavam disponíveis;
3. Material pouco representativo no bloco de parafina;
4. Biópsia realizada por punção aspirativa (citologia);
5. Outra neoplasia;

Todos os casos de CPNPC elegíveis para o estudo foram revistos por um único patologista do serviço de patologia do Hospital AC Camargo.

### **3.1 CONSTRUÇÃO DO PAINEL DE ANTICORPOS**

Inicia-se com a coleção de casos fixados em lâminas ou blocos de parafinas que o pesquisador se propôs a estudar. O patologista responsável (Dr. Victor Pianna Andrade) procedeu à revisão das lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Foram excluídos os casos duvidosos para CPNPC, bem como os casos de material escasso para confirmação diagnóstica. Em nossa casuística a vasta maioria das biópsias foram provenientes de broncoscopia, por este motivo grande parte do material presente nos blocos de parafina foi

considerada insuficiente para a realização do TMA, o que levaria a uma escassez do material no bloco doador.

Para uma análise prática, criamos uma planilha com os casos selecionados agrupados em lâminas de maneira que cada lâmina pudesse conter de dois a cinco casos (Anexo 2).

Após proceder a seleção dos blocos de parafina que continham material suficiente para realização de imunoistoquímica, demarcamos em cada lâmina as áreas com predomínio de células neoplásicas viáveis para estudo. Estas áreas foram identificadas em seus respectivos blocos e então enviadas ao técnico responsável para confecção das lâminas. Para as reações de imunoistoquímica as lâminas foram desparafinadas, desidratadas e incubadas com os anticorpos anti-HER-2, EGFR, p53, pRb, p21 e p27.

### **3.1.1 Anticorpos e reações de Imunoistoquímica**

Foram avaliadas as proteínas relacionadas ao ciclo celular (p53, pRb p21 e p27) além da expressão dos oncogenes (cerb-B2 e EGFR) em CPNPC e que podem estar relacionadas a fatores prognósticos e preditivos do CPNPC.

### **3.1.2 Anticorpos (Marcadores protéicos)**

**HER-2 (c-erbB-2):** O oncogene HER-2/neu codifica uma glicoproteína transmembrana de 185 KD com atividade intracelular de tirosina-quinase. O receptor HER-2/neu pertence a uma família de receptores de crescimento epidérmico, os quais desempenham um papel crítico na transdução de sinais

intracelulares, controle do crescimento celular, diferenciação celular e possivelmente angiogênese (FELIP e BASELGA 2005). Em contraste com os outros membros desta família de receptores, o ligante fisiológico do c-erbB-2 ainda não foi identificado. A expressão do HER-2 encontra-se presente em aproximadamente 30% dos adenocarcinomas de pulmão e em 20% dos CEC (ARDIZZONI et al. 2001; KRISTIANSEN et al. 2001). MEERT et al. (2003), procederam a uma revisão de trinta estudos publicados que avaliaram o valor prognóstico do HER-2 em CPNPC. Os autores evidenciaram um impacto prognóstico negativo na sobrevida dos pacientes que apresentavam hiperexpressão do HER-2. A correlação entre a positividade da proteína HER-2 e sua amplificação gênica é menos evidente em CPNPC. HIRSCH et al. (2002), publicaram um estudo com 238 pacientes com CPNPC que foram avaliados por imunoistoquímica e FISH. A correlação entre expressão protéica e amplificação gênica foi observada em apenas 4% dos pacientes com HER-2 3+ e nenhuma diferença estatística foi observada.

**P53:** O gene p53 está localizado no cromossomo 17p e codifica uma proteína nuclear que atua como fator de transcrição, bloqueando a progressão do ciclo celular na fase tardia de G1. As Funções do p53, tais como controle do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose estão alteradas em quase a totalidade dos casos de CPNPC, embora a mutação do gene só possa ser vista em 50% dos casos (AHRENDT et al. 2003). A relação entre mutação do p53 e sobrevida em pacientes com CPNPC permanece inconclusiva. Segundo SALGIA e SKARIN (2007), uma das causas é a

heterogeneidade da metodologia empregada para detectar a mutação deste gene. Anormalidades do p53 têm sido relatadas através de técnicas de sequenciamento do DNA ou por expressão protéica através da IHC. O gene p53 mutado codifica uma proteína que não é degradada rapidamente, diferente do tipo selvagem desta proteína que possui meia vida curta, desta forma o gene mutado do p53 pode ser detectado por colorações de IHC. Análises por estas técnicas têm sido realizadas, mas com resultados conflitantes e com algum grau de discordância. Duas meta-análises estudaram a influência da mutação ou hiper-expressão do p53 e sobrevida em CPNPC. Na primeira, STEELS et al. (2001) mostraram um impacto negativo na sobrevida dos pacientes em qualquer estadio, nos pacientes que apresentavam o p53 mutado ou hiper-expresso. No segundo estudo, MITSUDOMI et al. (2000) demonstraram que o prognóstico negativo foi notado apenas nos pacientes com adenocarcinoma.

**Rb:** O gene do retinoblastoma, localizado no cromossomo 13q, está envolvido na patogênese de vários tumores sólidos (SCAMBIA et al. 2006). A proteína Rb (pRb) é um importante regulador do ciclo celular durante a fase G1 e S. Em seu estado desfosforilado, a pRb impede a progressão do ciclo celular de G1 para a fase S, ligando-se a um fator de transcrição, o E2F. Uma vez fosforilada pelo complexo protéico CDK, a E2F é liberada, permitindo a transcrição de uma série de genes, que regulam o metabolismo do DNA, além de ativar outras ciclinas. Isso permite a passagem das células através dos pontos de restrição, conduzindo-a a etapa seguinte (SINGHAL et

al. 2005). A deleção do pRb é encontrada em mais de 90% dos casos de CPPC e em 15% dos CPNPC e a perda da expressão do pRb em CPNPC está associada a pior sobrevida (XU et al. 1996). A mutação do gene Rb pode ser sinérgica com outras anormalidades moleculares, piorando o prognóstico em CPNPC. Neste aspecto, XU et al. (1994) e DOSAKA-AKITA et al. (1997), demonstraram que pacientes com tumores pRb negativos e p53 positivos apresentaram menor sobrevida quando comparado com pacientes pRb positivos e p53 negativos.

**EGFR:** Faz parte de uma família de receptores trans-membrana de quatro membros: HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4. Uma vez ativados por seus ligantes, o EGFR, que possui atividade de tirosina-quinase, sofre dimerização e auto-fosforilação, levando a condução de sinais para o núcleo da célula, utilizando vias específicas, tais como: Ras/Raf/MEK/MAPK e PI3K/AKT. Desta forma, a ativação do EGFR desempenha um papel crítico na regulação da proliferação celular e sobrevida (YARDEN 2001). Em CPNPC a taxa de expressão do EGFR varia de acordo com o subtipo histológico, conforme descrito por FRANKLIN et al. (2002) (Tabela 3). A hiper-expressão do EGFR e sua correlação com a sobrevida permanecem controversas na literatura. SELVAGGI et al. (2004) concluiu que, em pacientes com CPNPC ressecados, a hiper-expressão do EGFR é capaz de prever uma menor sobrevida. MEERT et al. (2002), revisou sistematicamente dezesseis estudos publicados entre 1989 e 2001, dentre os quais quatorze foram baseados em imunoistoquímica. Aproximadamente 70% destes estudos não relacionaram

a expressão do EGFR com sobrevida em CPNPC. Recentemente, TSAO et al. (2005) demonstraram que o EGFR tem papel importante como marcador de resposta e sobrevida em pacientes com CPNPC avançado tratados com inibidores de tirosina-quinase, tais como o Gefitinibe e o Erlotinibe. No entanto, a mutação do gene do EGFR não mostrou correlação com a sobrevida em pacientes com CPNPC avançado que usaram o Erlotinibe. Os inibidores da Tirosina-quinase são capazes de competir com o ganho de função gerado pela mutação do EGFR, revertendo todas as etapas de fosforilação de suas vias de sinalização como a MAP quinase, a via RAS e RAF e a AKT.

**Tabela 3** - Correlação entre o tipo histológico e a expressão do EGFR em CPNPC.

| Histologia                | Hiperexpressão do EGFR |
|---------------------------|------------------------|
| CPPC                      | 0-5%                   |
| Adenocarcinoma            | 40-60%                 |
| Carcinoma de Grandes Cels | 40-60%                 |
| CEC                       | 60-85%                 |

**P21:** O inibidor de CDK p21 (também conhecido por WAF1, KIP1), inibe a progressão do ciclo celular por vários mecanismos. A p21 pode inibir o complexo ciclina D/CDK4 e ciclina E/CDK2 na fase inicial de G1 e também é capaz de inibir o complexo ciclina A/CDK2 ao final da fase S do ciclo celular (GARTEL 2005). SHOJI et al. (2002), publicaram o maior estudo capaz de demonstrar, por IHC, que a presença de expressão da p21 está

correlacionada com aumento da sobrevida em CPNPC. BENNETT et al. (1998) também mostrou haver benefício na sobrevida livre de doença em pacientes com p21 positivo (70% versus 35%,  $p < 0,0003$ ). KOMIYA et al. (1997), em um estudo com 137 pacientes, demonstraram que a função da p21 estava normal em 48 (35%) dos pacientes, entretanto, apenas os pacientes com CEC obtiveram ganho de sobrevida com a expressão da p21.

**P27:** A p27 KIP1 ou p27 é membro da família de inibidores de CDK. Os níveis desta proteína encontram-se elevados em células quiescentes e declinam quando a célula começa a dividir-se em resposta a sinais mitogênicos. Estudos que avaliaram a presença da p27 em CPNPC (HOMMURA et al. 2000 e TSUKAMOTO et al. 2001) também demonstraram um efeito positivo na sobrevida dos pacientes com CPNPC, sendo esta expressão considerada como fator prognóstico independente.

### **3.1.3 Reações de Imunoistoquímica**

Em todos os casos, inicialmente, foi feita a desparafinização dos cortes das amostras em três banhos de Xilol, por 5 minutos cada, seguido por quatro passagens em etanol 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos, em temperatura ambiente. Foram seguidos protocolos distintos para a realização das reações de IHC, dependendo do anticorpo realizado (Tabela 4).

### Protocolos de reações de c-erbB2 e p53

- 1- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato PH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi);
- 2- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 3- Bloqueio da peroxidase endógena: 5 minutos com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;
- 4- Lavagem em PBS/Tween;
- 5- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 6- Incubação do anticorpo primário por 2 horas (Autostainer®, DAKO);
- 7- Lavagem em PBS/Tween;
- 8- Incubação com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer®, Novocastra, UK) por 30 minutos;
- 9- Lavagem em PBS/Tween;
- 10- Incubação com NovoLink Polymer (NovoLink Max Polymer®, Novocastra, UK) por 30 minutos;
- 11- Lavagem em PBS/Tween;
- 12- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia);
- 13- Lavagem em água corrente;
- 14- Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 15- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 16- Desidratação em etanol a 80, 95 e 100% e Xilol;
- 17- Montagem com Entellan neu (Merck, Alemanha).

### Protocolos de reações de EGFR, pRb, p21 e p27

- 1- Recuperação antigênica na Pascal (panela de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão).



- 2- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 3- Bloqueio da peroxidase endógena: 5 minutos com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;
- 4- Lavagem em PBS/Tween;
- 5- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 6- Incubação do anticorpo primário por 2 horas ( Autostainer®, DAKO);
- 7- Lavagem em PBS/Tween;
- 8- Incubação com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer®, Novocastra, UK) por 30 minutos;
- 9- Lavagem em PBS/Tween;
- 10- Incubação com NovoLink Polymer (NovoLink Max Polymer®, Novocastra, UK) por 30 minutos;
- 11- Lavagem em PBS/Tween;
- 12- Revelação da reação com Kit NovoLink Polymer® (NovoCastra);
- 13- Lavagem em água corrente;
- 14- Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 15- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 16- Desidratação em etanol a 80, 95 e 100% e Xilol;
- 17- Montagem com Entellan neu (Merck, Alemanha).

**Tabela 4** - Resumo dos protocolos das reações de imunistoquímica dos anticorpos utilizados no estudo.

| ANTÍGENO | DILUIÇÃO | CLONES       | FABRICANTE |
|----------|----------|--------------|------------|
| c-erbB2  | 1:1000   | Policlonal   | DAKO       |
| P53      | 1:2000   | DO-7         | DAKO       |
| EGFR     | 1:400    | H11          | DAKO       |
| PRb      | 1:100    | Clone 13A10  | NovoCastra |
| p21      | 1:50     | Clone SX118  | DAKO       |
| p27      | 1:200    | Clone SX53G8 | DAKO       |

### **3.2 LEITURAS DAS REAÇÕES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os anticorpos foram analisados pelo mesmo observador e cada anticorpo dentro de um mesmo dia para diminuir a variação intra-observador na intensidade da reação. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus® BX 41) e os resultados classificados em relação à intensidade da reação e porcentagem de células positivas.

As reações foram acompanhadas de controles positivos, presentes em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos estudados, além de um controle negativo.

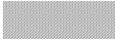
Comparamos a intensidade de coloração em relação ao tempo de arquivamento do bloco de parafina a fim de avaliarmos possíveis interferências desta variável.

Para os anticorpos p53, pRb, p21 e p27, cuja expressão é nuclear, foi estabelecido um índice de 0 a 4 para intensidade (0 = negativo, 1 = fracamente positivo, 2 = moderadamente positivo, 3 = fortemente positivo e 4 = intensamente positivo) e porcentagem de células positivas (0 = negativa, 1 = < 10% das células positivas, 2 = 10-50% das células positivas, 3 = 50-90% das células positivas, 4 = > 90% das células positivas). Foi considerada como reação positiva quando mais de 10% das células tumorais encontravam-se coradas, não importando a sua intensidade. O índice final foi estabelecido segundo ilustração da Figura 4 e classificado em negativo, fraco, moderado e forte.

Para os anticorpos HER-2 (cerb-B2) e EGFR, cujas expressões são de membrana, a positividade da reação foi avaliada pela acentuação da coloração observada na membrana celular. Através de análise subjetiva, a imunomarcacão foi interpretada da seguinte maneira: negativa (0), quando não se observa coloração marrom na membrana celular; baixa (+), quando a mesma é fraca e incompleta na membrana; média (++), quando a marcação é fraca ou moderada, mas completa em seu contorno na membrana em pelo menos 10% das células; (+++), forte, quando a cor é forte e totaliza a membrana citoplasmática em pelo menos 10% das células. Os casos de marcação moderada (++) foram também considerados positivos.

| Porcentagem de Células Neoplásicas Marcadas (%) |   |          |       |       |     |
|-------------------------------------------------|---|----------|-------|-------|-----|
| Intensidade                                     | 0 | 1-10     | 11-50 | 50-90 | >90 |
|                                                 | 1 | Fraco    |       |       |     |
|                                                 | 2 | Moderado |       |       |     |
|                                                 | 3 | Forte    |       |       |     |
|                                                 | 4 | Forte    |       |       |     |

|                                                                                     |       |                                                                                     |          |                                                                                       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|  | Fraco |  | Moderado |  | Forte |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|

**Legenda:** Relação entre a intensidade da marcação e porcentagem de células neoplásicas marcadas. Os casos foram categorizados em imunomarcacão ausente, fraca, moderada e forte.

**Figura 4** - Critérios de graduação imunoistoquímica.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os prontuários arquivados ou microfilmados do SAME foram revistos para anotação dos dados clínicos em protocolo específico para CPNPC (Tabela 5).

O tempo de seguimento clínico foi calculado em meses pela subtração da data do início do tratamento pela data da última informação (consulta médica ou contato indireto) ou morte pelo CPNPC. A morte relacionada ao CPNPC (ou câncer-específica) foi definida como a morte pela doença em si ou pelos efeitos do tratamento quimioterápico/radioterápico.

Foi realizada a estatística descritiva das variáveis estudadas, com as variáveis contínuas expressas com valor de mediana e variação mínimo e máximo. As variáveis categóricas expressas, com valor absoluto e porcentagem do total. Foi realizado cálculo da sobrevida global estimada, pelo método de Kaplan-Meier. A sobrevida foi calculada a partir da data de início do tratamento até a data da última informação descrita no prontuário, ou até a data do óbito. Em relação ao estado na última informação, os pacientes foram classificados da seguinte forma: vivo e sem evidência de neoplasia em atividade; vivo e com neoplasia em atividade; morto devido a o câncer, morto por outras causas, e perdidos de seguimento. Foram calculadas as curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global para cada uma das variáveis consideradas no estudo, a comparação entre as curvas de sobrevida foi realizada pelo método de Log-rank. Consideramos as diferenças significativas quando o valor de  $p$  foi  $< 0,05$ .

Os modelos de análise uni e multivariada de regressão de Cox foi utilizado para estimar o *Hazard Ratio* (HR) ou Risco Relativo e assim, avaliar os anticorpos estudados como possíveis fatores prognósticos independentes, considerando-se o intervalo de confiança de 95%. A técnica *stepwise* foi utilizada e, para a inclusão das variáveis ao modelo de regressão de Cox, o valor de  $p \leq 0,10$  foi considerado.

## ***RESULTADOS***

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE 64 PACIENTES

A idade dos pacientes variou de 33,4 a 74 anos, com uma mediana de 68,7 anos, sendo 73,4 % do sexo masculino e 26,6% do sexo feminino (Tabela 6). Em relação ao subtipo histológico, 65,6 % dos pacientes eram portadores de Carcinoma espino-celular (CEC), 25% de Adenocarcinomas, 7,8% de Carcinoma de grandes células e 1,6% de CPNPC classificado como outros subtipos. Quanto ao estadiamento, 24,1% dos pacientes eram EC IIIA e 71,9% eram EC IIIB (Tabela 7).

**Tabela 5** - Distribuição dos pacientes em relação ao sexo e idade.

| <b>Variável</b>     | <b>n</b>                               | <b>(%)</b> |
|---------------------|----------------------------------------|------------|
| <b>Gênero</b>       |                                        |            |
| Masculino           | 47                                     | 73,4       |
| Feminino            | 17                                     | 26,6       |
| <b>Idade (anos)</b> |                                        |            |
| Mediana (variação)  | 68,7 anos (variação de 33,4 a 74 anos) |            |

**Tabela 6** - Distribuição dos pacientes em relação ao subtipo histológico e estadió clínico.

| Tipo histológico    | n  | %    |
|---------------------|----|------|
| CEC                 | 42 | 65,6 |
| Adenocarcinoma      | 16 | 25   |
| Carc. Grandes Cels. | 5  | 7,8  |
| Outros              | 1  | 1,6  |
| Estadio Clínico     |    |      |
| IIIA                | 18 | 28,1 |
| IIIB                | 46 | 71,9 |

O tratamento com radioterapia e quimioterapia foi indicado em 43 pacientes (67,2%) e o tratamento com radioterapia exclusiva em 21 pacientes (32,8%). Entre os pacientes que receberam quimioterapia, 74,4% foi concomitante a radioterapia e 25,6% neoadjuvante ou adjuvante a radioterapia. A dose de radioterapia realizada variou de 50 a 70 Gy com mediana de 60 Gy (Tabela 7).

**Tabela 7** - Distribuição dos pacientes em relação a modalidade do tratamento e dose de radioterapia.

| Tratamento         | n                              | %    |
|--------------------|--------------------------------|------|
| RXT                | 21                             | 67,2 |
| RXT + QT           | 43                             | 32,8 |
| Quimioterapia      |                                |      |
| Concomitante       | 32                             | 74,4 |
| Neo ou adjuvante   | 11                             | 25,6 |
| Dose de RXT        |                                |      |
| Mediana (variação) | 60 Gy (variação de 50 a 70 Gy) |      |



Em um seguimento mediano de 24 meses, com uma variação de 3 a 62,1 meses, 21 pacientes (32,8%) evoluíram com metástases a distância. Em relação à localização das metástases, o cérebro foi o local mais atingido em 38%, seguido do osso em 33,3% e pulmão em 19% (Tabela 8).

**Tabela 8** - Distribuição dos pacientes em relação a localização das metástases e tempo de seguimento.

| <b>Localização das metástases</b> | <b>n</b>              | <b>%</b> |
|-----------------------------------|-----------------------|----------|
| Cérebro                           | 8                     | 34,8     |
| Ossos                             | 7                     | 30,4     |
| Pulmão                            | 4                     | 17,4     |
| Adrenal                           | 2                     | 8,7      |
| <b>Seguimento (meses)</b>         |                       |          |
| Mediana (variação)                | 24,3 m (3,0 a 62,1 m) |          |

Dentre os 64 pacientes de nossa casuística, 50 (78%) evoluíram a óbito devido à doença. Dos 12 pacientes vivos, 5 (7,8%) estão vivos com doença e 7 (10,9%) estão vivos sem doença. Houve 2 óbitos (3,1%) por outras causas (Tabela 9).

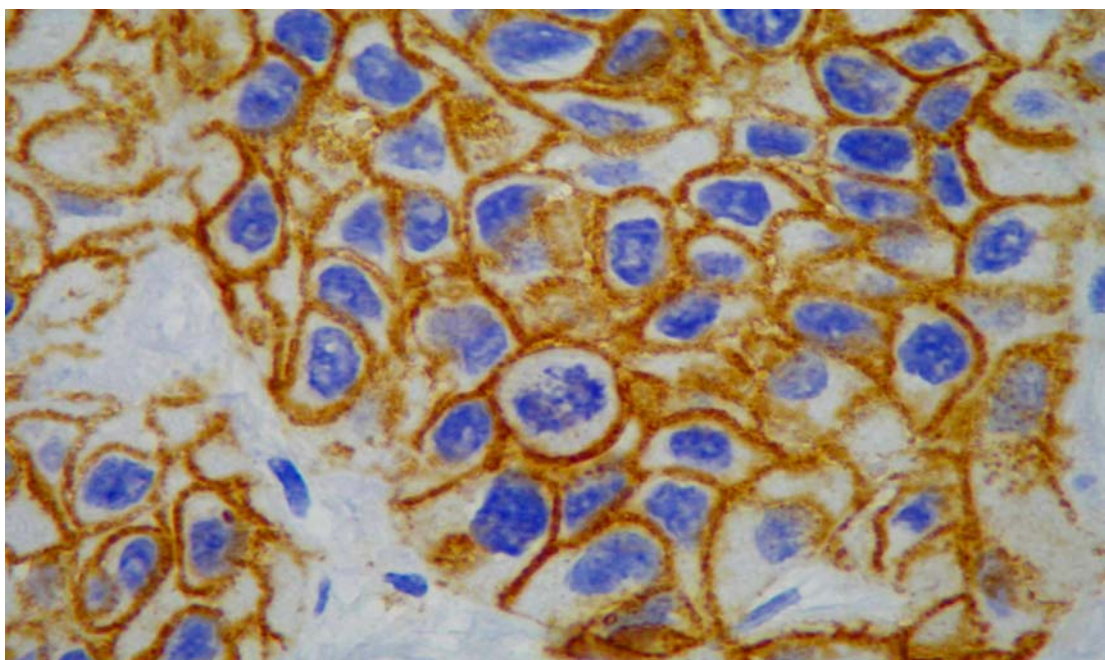
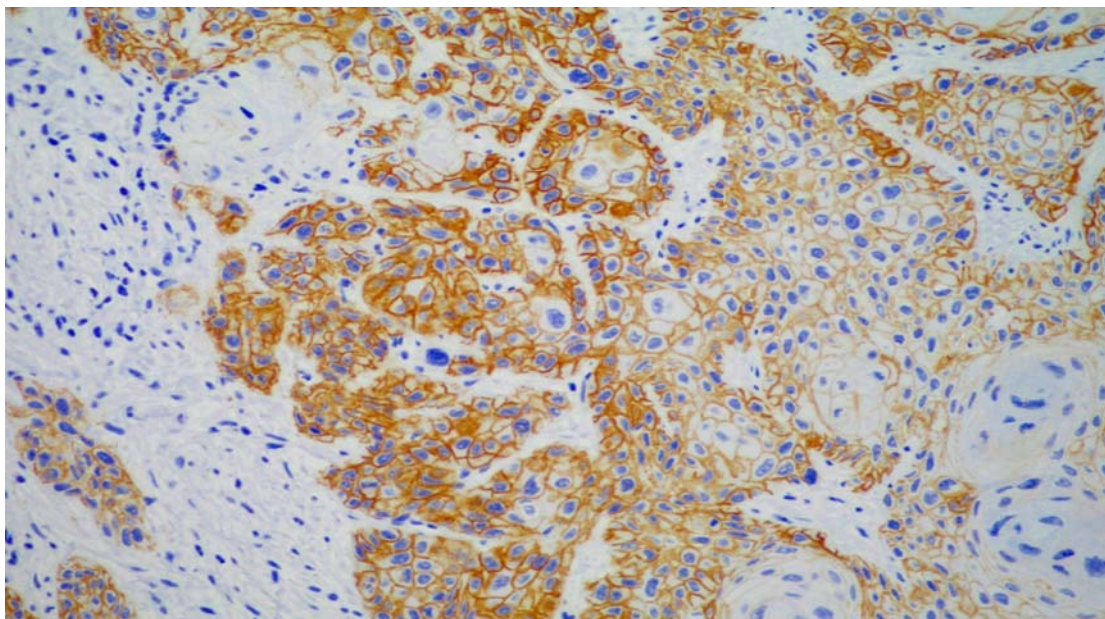
**Tabela 9** - Distribuição dos pacientes quanto ao estado atual da doença.

| <b>Estado atual</b>     | <b>n</b> | <b>%</b> |
|-------------------------|----------|----------|
| Vivo sem doença         | 7        | 10,9     |
| Vivo com doença         | 5        | 7,8      |
| Morto de cancer         | 50       | 78       |
| Morto por outras causas | 2        | 3,1      |

Entre os marcadores moleculares estudados, a hiperexpressão das proteínas EGFR e cerb-B2 foi positiva em apenas 1 caso (1,6%) para cada marcador (Figura 5 e 6). Dos marcadores relacionados ao ciclo celular, o pRb foi positivo em 38 casos (59,4%) e o p53 em 43 casos (67,1%) (Figuras 7 e 8). A perda da expressão da p21 (Figura 9) foi encontrada em 28 pacientes (51,6%) e a perda da expressão da p27 (Figura 10) foi vista em 50 casos (86%) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Distribuição dos pacientes em relação aos marcadores protéicos.

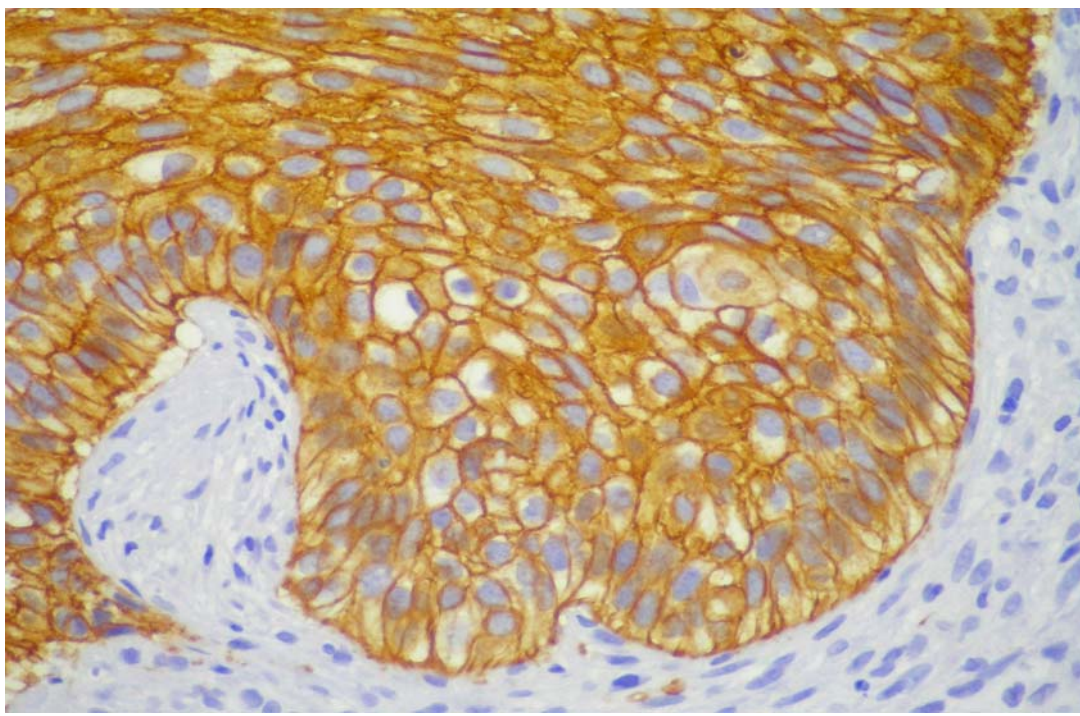
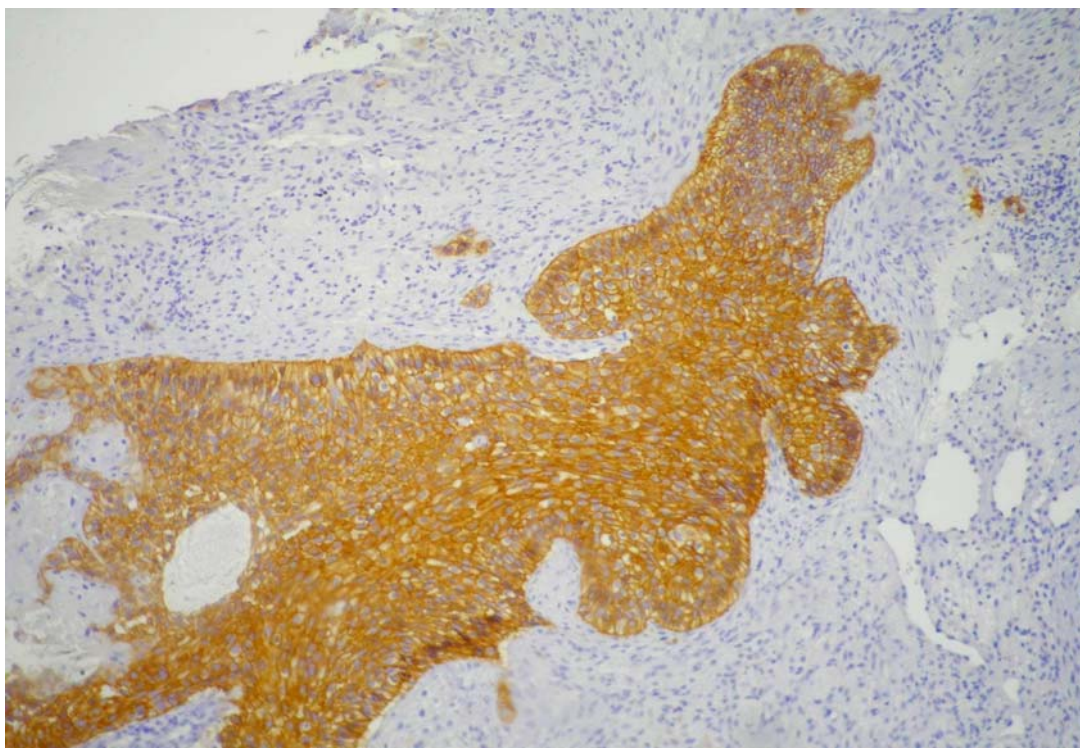
| <b>Marcador</b> | <b>n</b> | <b>%</b> |
|-----------------|----------|----------|
| <b>EGFR</b>     |          |          |
| Positivo        | 1        | 1,6      |
| negativo        | 63       | 98,4     |
| <b>Cerb-B2</b>  |          |          |
| Positivo        | 1        | 1,6      |
| Negativo        | 63       | 98,4     |
| <b>pRb</b>      |          |          |
| Positivo        | 38       | 59,4     |
| Negativo        | 21       | 40,6     |
| <b>p53</b>      |          |          |
| Positivo        | 43       | 67,1     |
| negativo        | 21       | 32,9     |
| <b>p21</b>      |          |          |
| Positivo        | 31       | 48,4     |
| Negativo        | 28       | 51,6     |
| <b>p27</b>      |          |          |
| Positivo        | 09       | 14       |
| Negativo        | 50       | 86       |



**Legenda:** Aumento de 200 x e 400 x.

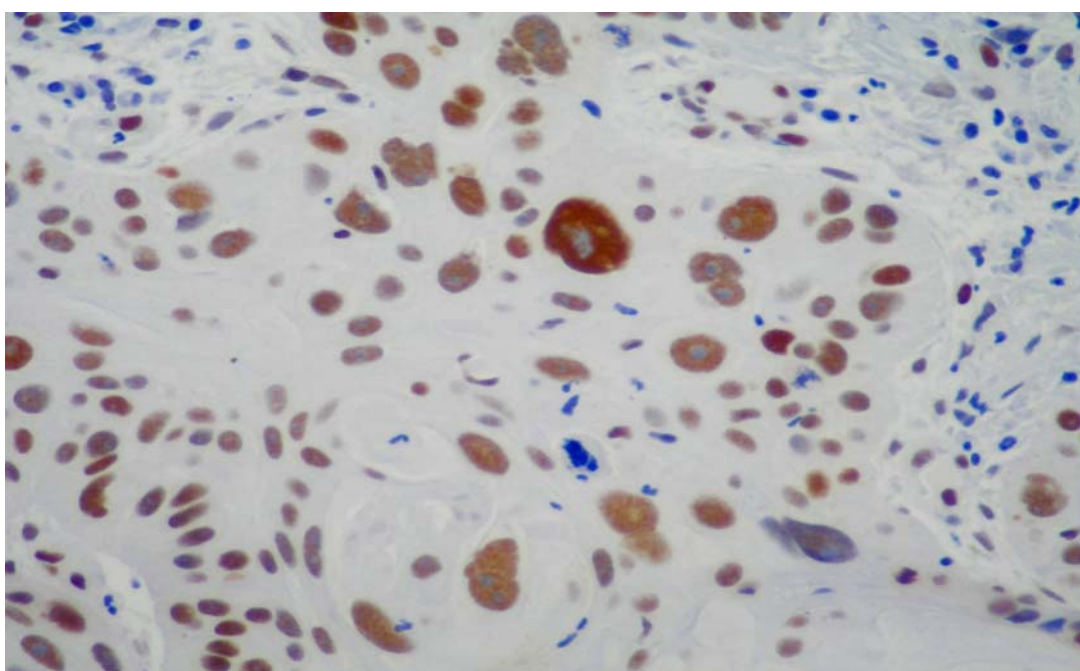
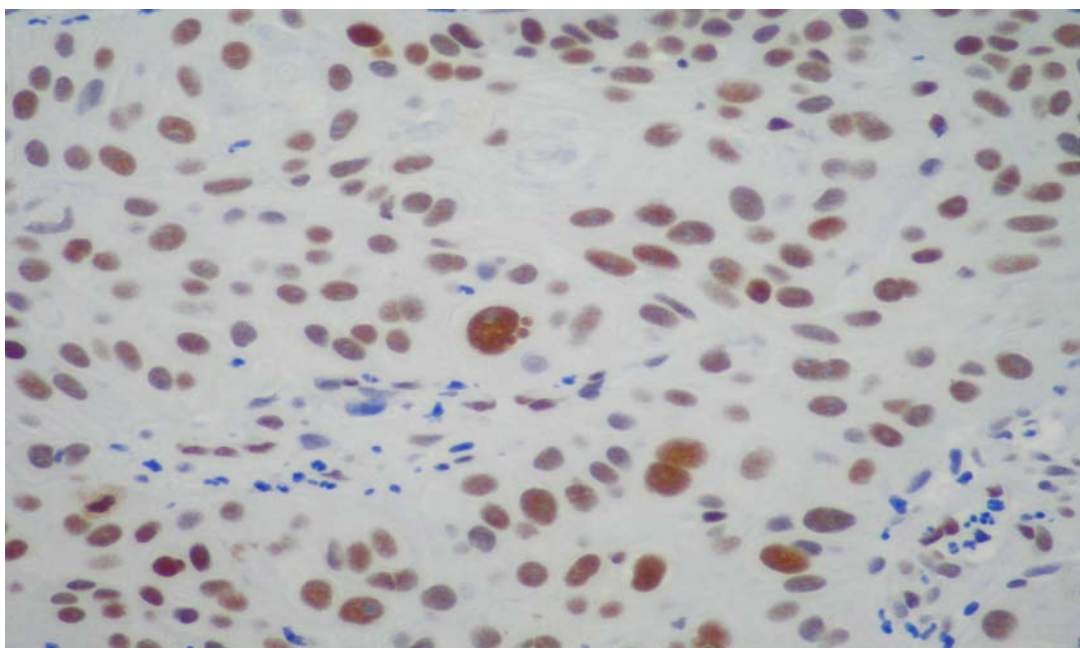
**Figura 5** - Expressão do EGFR 3+.





**Legenda:** Aumento de 100x e 400x.

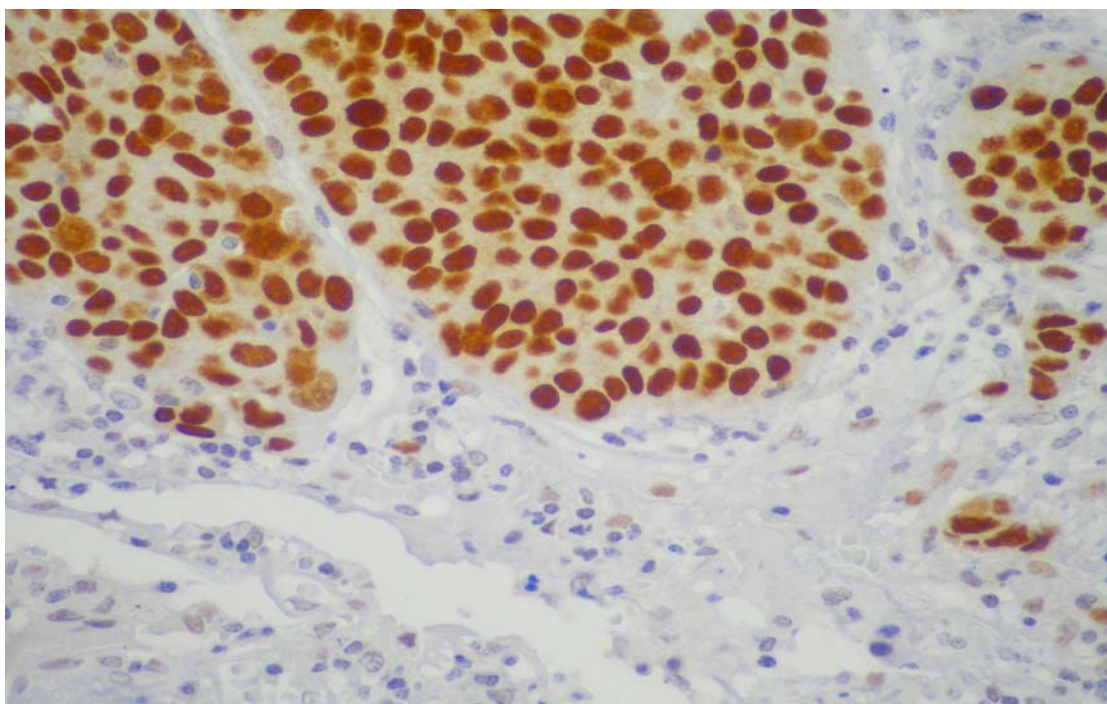
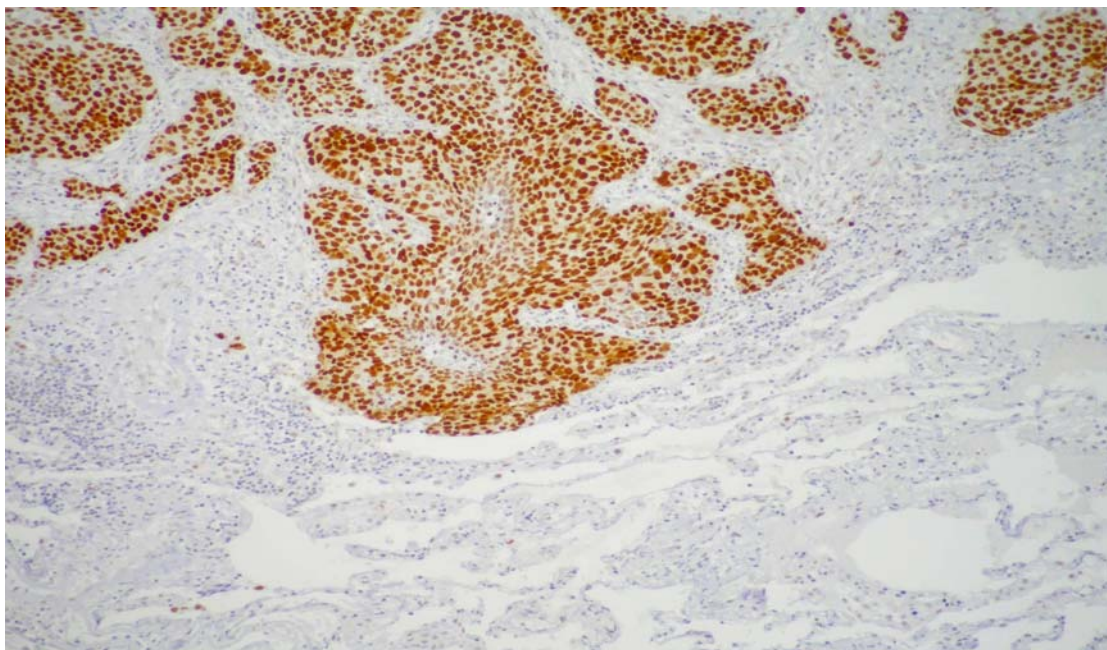
**Figura 6** - Expressão do cerb-B2 3+.



**Legenda:** Aumento de 200 x e 400 x.

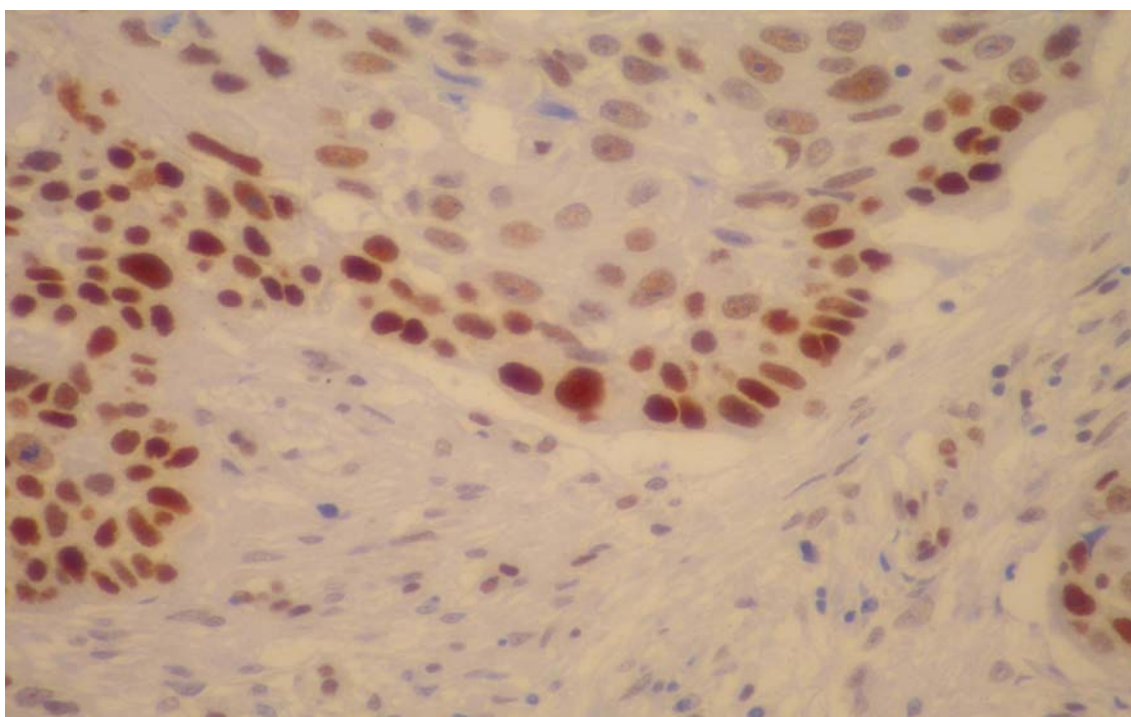
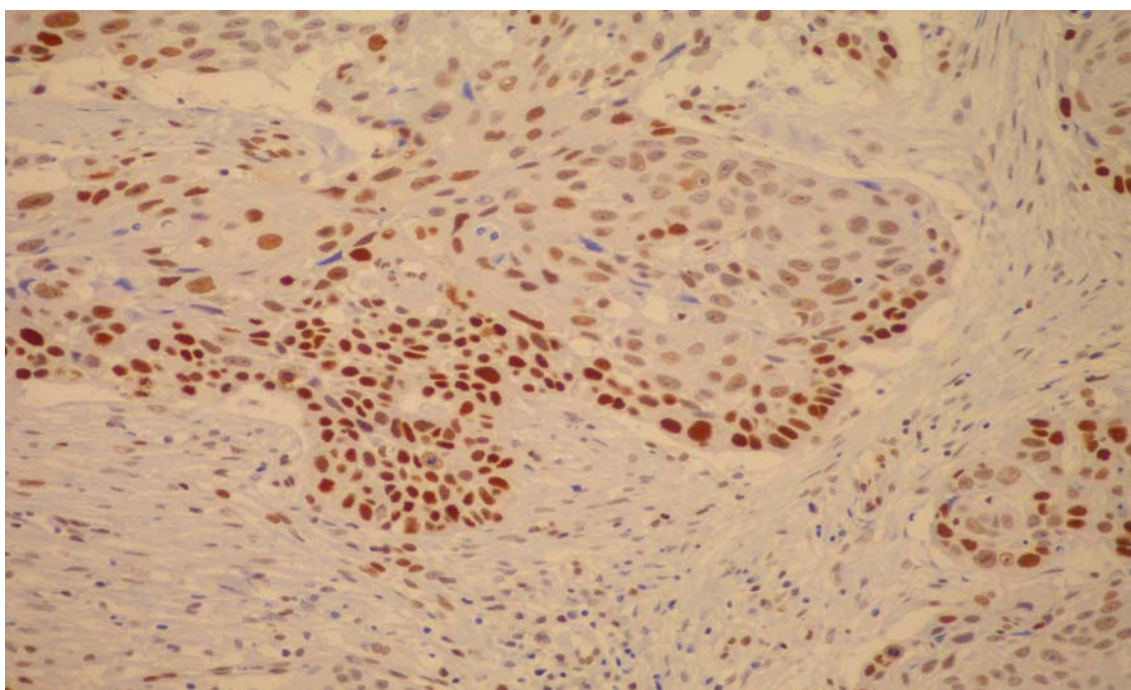
**Figura 7** - Expressão do pRB 3+.





**Legenda:** Aumento de 100 e 400x.

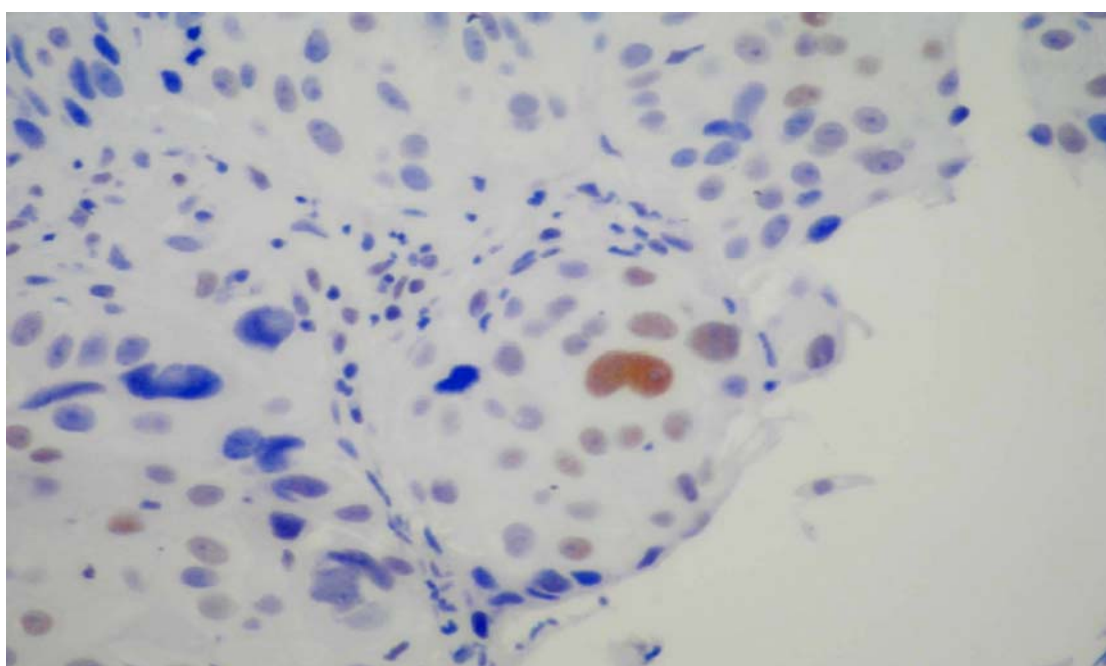
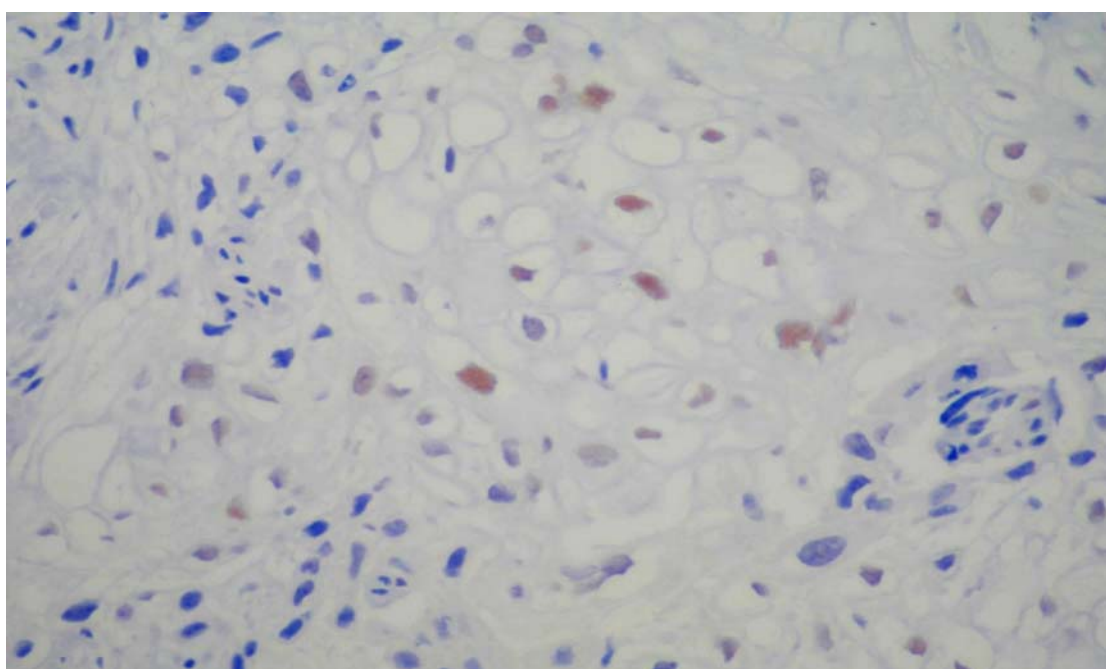
**Figura 8** - Expressão do p53 3+.



**Legenda:** Aumento de 100x e 200x.

**Figura 9** - Hiper-expressão do p21, com marcação nuclear.



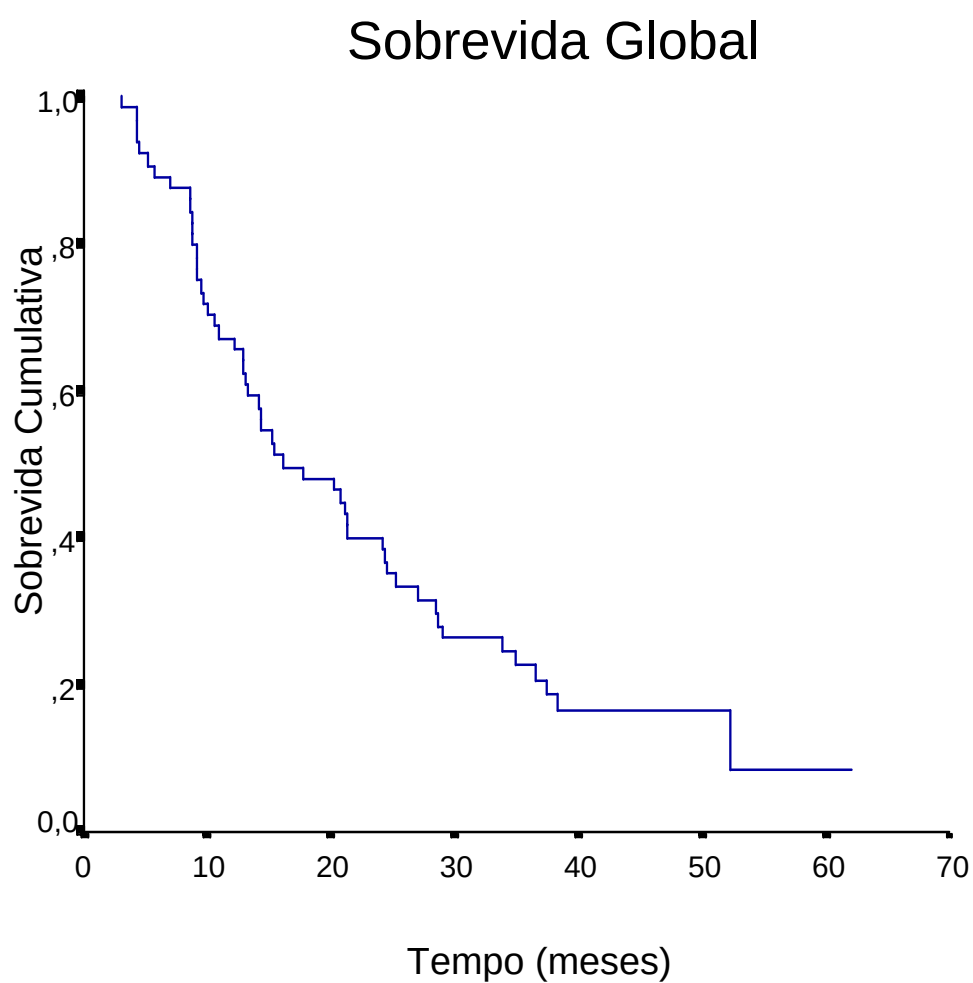


**Legenda:** Aumento de 200 e 400x.

**Figura 10** - Hiper-expressão da p27, com marcação nuclear.

## 4.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Em relação à sobrevida global, 22,7 % dos pacientes estavam vivos a 3 anos e 8,3 % a 5 anos, com uma mediana de 16 meses (Figura 11).



**Figura 11** – Gráfico da curva de sobrevida global 3 anos: 22,7% / 5 anos: 8,3% (Mediana: 16 meses)

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as seguintes variáveis: sexo, idade, tipo histológico, modalidade de tratamento (Quimio/radioterapia x Radioterapia) e concomitância de quimioterapia e radioterapia (Tabela 11). Houve diferença estatística na comparação da sobrevida global entre os estadios clínicos: 24 meses para EC IIIA contra 13 meses para EC IIIB (Tabela 12) (Figura 12).

**Tabela 11** - Sobrevida global a 3 anos em relação ao gênero, idade, subtipo histológico e modalidade de tratamento.

| Variável                   | n  | SV 3 a (%) | SV mediana (m) | p (Log-rank) |
|----------------------------|----|------------|----------------|--------------|
| <b>Gênero</b>              |    |            |                |              |
| Masculino                  | 47 | 18,8       | 16             |              |
| Feminino                   | 17 | 34,3       | 20             | 0,43         |
| <b>Idade</b>               |    |            |                |              |
| Até 65 anos                | 32 | 26         | 21             |              |
| Acima de 65 anos           | 32 | 20         | 12             | 0,16         |
| <b>Tipo histológico</b>    |    |            |                |              |
| CEC                        | 42 | 16,7       | 14             |              |
| Não CEC                    | 22 | 35,8       | 24             | 0,08         |
| <b>Tratamento</b>          |    |            |                |              |
| RXT                        | 21 | 19         | 18             |              |
| RXT + QT                   | 43 | 24,6       | 16             | 0,7          |
| <b>QT/RXT concomitante</b> |    |            |                |              |
| Sim                        | 11 | 18,1       | 14             |              |
| Não                        | 32 | 27         | 20             | 0,68         |

**Tabela 12** - Sobrevida global a 3 anos em relação ao estadio clinico.

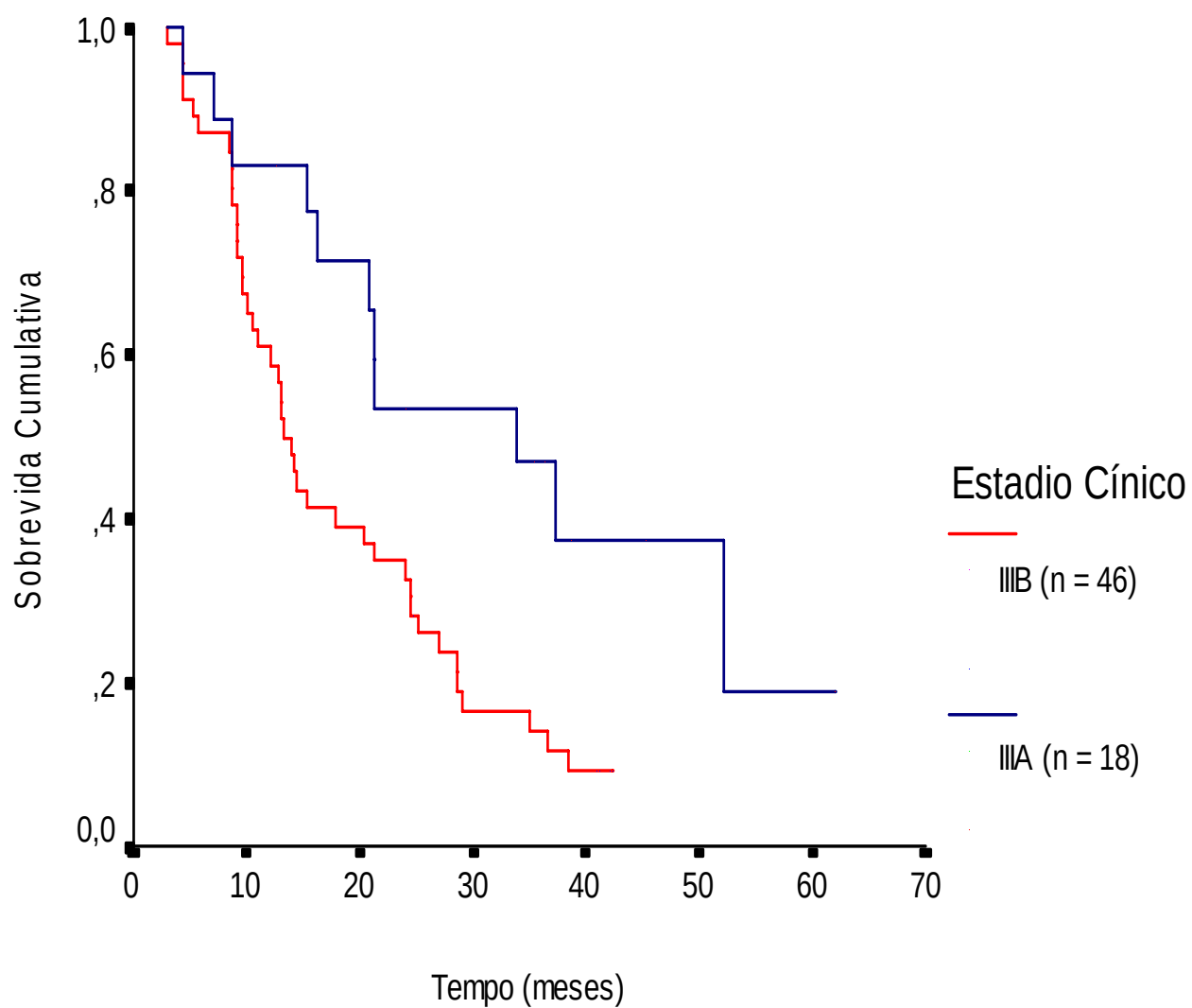
| Variável               | N  | SV 3 a (%) | SV mediana (m) | p (Log-rank) |
|------------------------|----|------------|----------------|--------------|
| <b>Estadio Clínico</b> |    |            |                |              |
| IIIA                   | 18 | 47         | 34             |              |
| IIIB                   | 46 | 14,1       | 13             | <b>0,01</b>  |

O cálculo de sobrevida global a 3 anos foi realizado para os marcadores moleculares: p53, pRb, p21 e p27. A proteína p21 foi considerada positiva em 31 pacientes (11%), e negativa em 28 (34,6%) e esta diferença foi estatisticamente significativa com  $p=0,02$  (Figura 13). Os demais marcadores não atingiram significância estatística (Tabela 13). Devido à baixa taxa de positividade do EGFR e cerb-B2 encontrada em nossa casuística, o cálculo de sobrevida para estas duas variáveis não foi realizado.

**Tabela 13** - Sobrevida global a 3 anos para os marcadores p53, pRb, p21 e p27.

| <b>Variável</b> | <b>N</b> | <b>SV 3 a (%)</b> | <b>SV mediana (m)</b> | <b>p (Log-rank)</b> |
|-----------------|----------|-------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>p53</b>      |          |                   |                       |                     |
| Positivo        | 43       | 22                | 21                    |                     |
| Negativo        | 21       | 23,8              | 13                    | 0,89                |
| <b>pRb</b>      |          |                   |                       |                     |
| Positivo        | 38       | 25,5              | 15                    |                     |
| Negativo        | 21       | 17,8              | 18                    | 0,81                |
| <b>P21</b>      |          |                   |                       |                     |
| Positivo        | 31       | 11                | 14                    |                     |
| Negativo        | 28       | 34,6              | 21                    | <b>0,02</b>         |
| <b>P27</b>      |          |                   |                       |                     |
| Positivo        | 9        | 11,1              | 21                    |                     |
| Negativo        | 50       | 22,4              | 15                    | 0,84                |

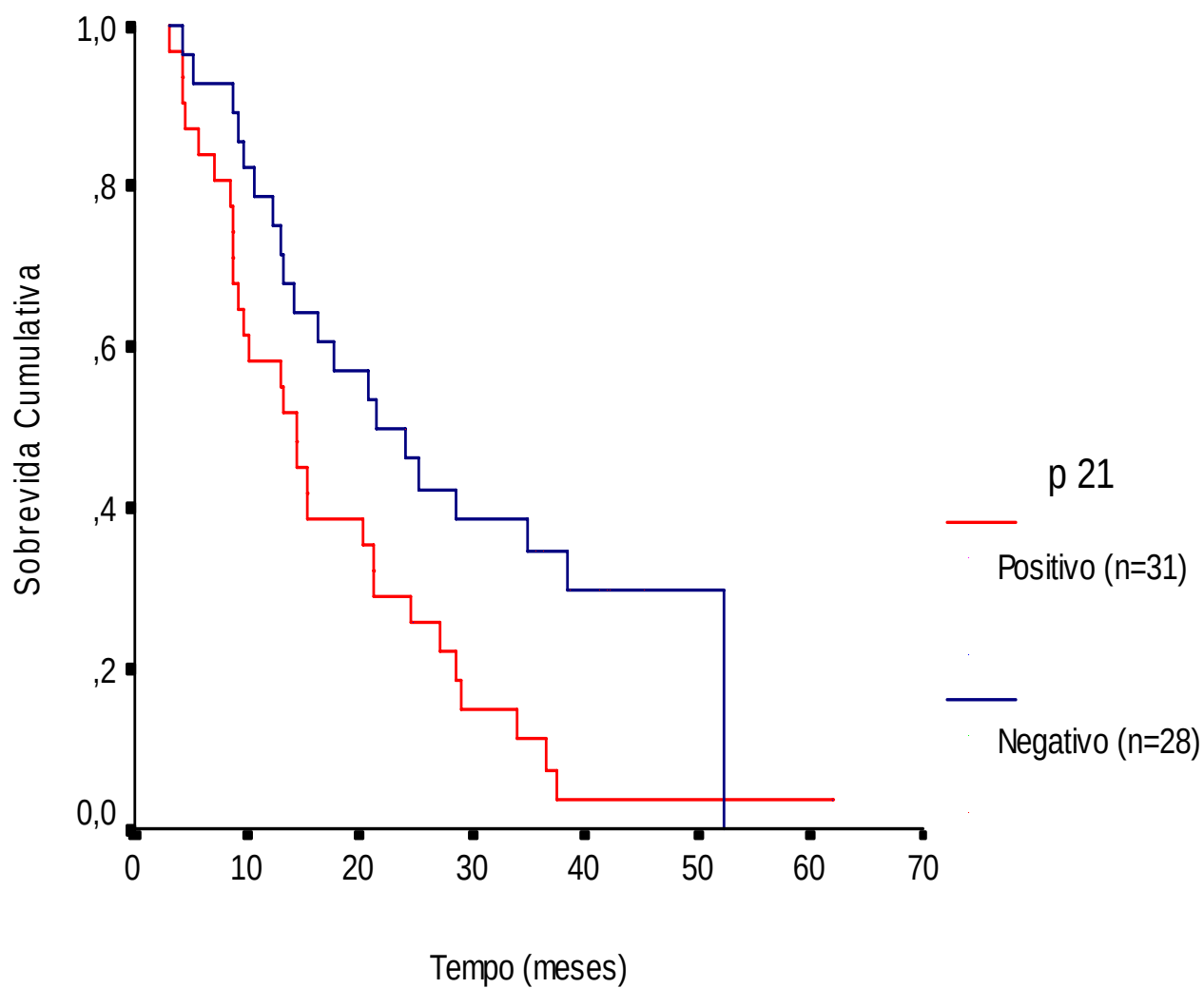
## Sobrevida Global - Estadio Clínico



p = 0,01 (Log rank)

**Figura 12** – Gráfico da curva de sobrevida global a 3 anos por estadio clínico.

## Sobrevida Global - Expressão do p21



$p = 0,02$  (Log rank)

**Legenda:** Os pacientes considerados como p21 negativos alcançaram sobrevida estatisticamente mais longa em comparação aos pacientes p21 positivos.

**Figura 13** - Gráfico da curva de sobrevida global a 3 anos em relação a expressão da p21.

As variáveis consideradas significativas em análise univariada foram incluídas para análise multivariada. Utilizando o modelo de regressão de Cox, o estadiamento clínico IIIB e a positividade da proteína p21 mostraram estar independentemente associadas a uma menor sobrevida (Tabela 14).

**Tabela 14** - Análise multivariada utilizando as variáveis estadio clínico e expressão da p21.

| Variável               | Hazard Ratio | CI (95%)     | <i>p</i>    |
|------------------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>Estadio Clínico</b> |              |              |             |
| IIIA                   | 1            |              |             |
| IIIB                   | 2,38         | (1,17-4,82)  | <b>0,02</b> |
| <b>p21</b>             |              |              |             |
| Negativo               | 1            | 1            |             |
| Positivo               | 1,93         | ( 1,07-3,46) | <b>0,03</b> |



***DISCUSSÃO***

---

## 5 DISCUSSÃO

O CPNPC compreende um grupo heterogêneo de entidades patológicas que apresentam comportamento clínico e de prognóstico distintos. Na última década, não obstante o avanço ocorrido no diagnóstico e tratamento desses tumores houve pouco aumento na sobrevida global dos pacientes CPNPC em todo o mundo. Neste período, um grande número de estudos relacionando fatores prognósticos e câncer de pulmão foi publicado com o objetivo de melhor compreender o comportamento clínico desta entidade. O estudo dos fatores prognósticos em CPNPC é importante para dividir a população estudada em subgrupos de maior ou menor risco com o objetivo de melhorar e individualizar a decisão médica de tratamento (SOLAN e WERNER-WASIK 2003).

No presente trabalho, estudamos um subgrupo específico de pacientes com CPNPC avançados localmente, todos EC III e tratados em uma única instituição com associação de quimioterapia e radioterapia ou radioterapia isolada. A nossa casuística inicial de 213 pacientes foi significativamente reduzida para 64 casos devido à escassez de material adequado para a realização de imunoistoquímica, bem como a ausência do mesmo nos arquivos da anatomia-patológica. Na nossa casuística, os pacientes não foram submetidos a tratamento cirúrgico e os principais métodos empregados para o diagnóstico foram a punção-biopsia guiada por tomografia computadorizada e a broncoscopia, os quais geralmente

fornece material em pequena quantidade ou pouco representativos. Em virtude desta seleção não voluntária de pacientes, os resultados apresentados podem não representar de maneira fidedigna o perfil epidemiológico do câncer de pulmão do Hospital A C Camargo, conforme descrito por YOUNES (2005). Um exemplo foi a alta incidência de carcinomas espino-celulares e a baixa incidência de adenocarcinomas encontrada em nosso estudo. Uma possível explicação do elevado número de CEC encontrado é o fato de esses tumores apresentarem localização central no pulmão e, portanto serem mais acessíveis a broncoscopia. Em contrapartida os adenocarcinomas tem localização periférica, sendo mais acessíveis a punção percutânea. Pela broncoscopia é possível obter maior quantidade de material comparando-se com a punção percutânea.

Em termos de sobrevida global, 8,3% dos pacientes estavam vivos a 5 anos. Segundo MOUNTAIN (1997) a sobrevida do EC IIIA a 5 anos é de 13% e de 5% para o EC IIIB. Nossos dados estão de acordo com o que se deveria esperar para pacientes com doença localmente avançada, refletindo o prognóstico ruim neste subgrupo de pacientes, principalmente levando-se em conta que 72% dos casos representavam o EC III B.

O número de casos selecionados em nosso estudo inviabilizou a construção do bloco de arranjo tecidual em matriz, conhecido como TMA. Esta tecnologia possibilita que centenas de amostras de tecidos estejam presentes em uma única lâmina, permitindo uma análise de grande variedade de marcadores biológicos em um único experimento. O TMA apresenta acurácia comprovada que justifica seu emprego com amplas

vantagens de custo e tempo para os grandes estudos retrospectivos ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (HOOS e CORDON-CARDO 2001).

Com a finalidade de manter a uniformidade do experimento agrupamos os casos em uma tabela de maneira a facilitar a localização dos mesmos para as reações de imunoistoquímica e análise dos dados (Anexo 2).

Poucos estudos avaliaram a relação entre marcadores moleculares e prognóstico em pacientes com CPNPC localmente avançado. Este cenário tem se modificado nos últimos anos com o interesse pela pesquisa de expressão gênica para estratificação prognóstica (BHATTACHARJEE et al. 2001; ENDOH et al. 2004). Marcadores de prognóstico correspondem a qualquer fator que, no momento do diagnóstico, podem fornecer informações sobre o comportamento clínico do paciente, como sobrevida livre de doença e sobrevida global (SOUSSI 2001). Os marcadores moleculares relacionados a prognóstico podem potencialmente ser representados por alterações no número de cópias de um gene, na expressão do mRNA ou em níveis de expressão protéica. A imunoistoquímica é o método mais prático capaz de avaliar as alterações em nível protéico de uma célula ou tecido. A imunoistoquímica não só é capaz de predizer, de maneira semi-quantitativa, a abundância de determinada proteína, como também definir a localização celular (membrana celular, citoplasma, núcleo) da expressão da mesma (ZHU et al. 2006). Entretanto, os níveis de expressão gênica nem sempre

apresentam uma boa correlação com os níveis de expressão protéica analisados durante a imunoistoquímica (SINGHAL et al. 2005).

Em nosso estudo selecionamos os marcadores moleculares relacionados ao ciclo celular (p53, pRb p21 e p27) além dos oncogenes (HER-2 e EGFR). Muitos destes genes ou proteínas envolvidas nestas vias tem sido alvo de interesse em estudos controlados devido à evidência de atuarem com fator prognóstico independente ou mesmo atuarem como fator preditivo de resposta a determinada droga.

Em nossa série, apenas um caso de hiperexpressão para as proteínas *cerb-B2* e EGFR foi encontrada (1,6%) e por este motivo a análise de sobrevida não foi realizada. As fortes expressões encontradas nestes dois casos e dos controles positivos avaliados em paralelo, atestam a fidelidade do protocolo da reação. MEERT et al. (2002) revisou sistematicamente 16 estudos publicados entre 1989 e 2001, sendo 14 baseados em imunoistoquímica. A taxa de expressão de EGFR nesses estudos foi de 51%, sendo que a expressão foi menos frequente em adenocarcinomas (46,2%) do que em CEC (82,6%). Aproximadamente dois terços desses estudos não mostraram correlação entre expressão de EGFR e sobrevida. Em 2005, NAKAMURA et al., em uma metaanálise, revisou 44 estudos de expressão de HER-2 em CPNPC. A taxa de expressão global foi de 35%, sendo o adenocarcinoma o mais comum. Os resultados desses estudos sugerem que a hiperexpressão do *cerbB2* está relacionada à pior sobrevida, especialmente em adenocarcinomas.

O gene p53 é reconhecido pela sua multifuncionalidade e desempenha um papel crítico no controle do ciclo celular, atuando na transição da fase S para G1 do ciclo celular, levando a célula a apoptose ou ao reparo do DNA, através da indução da proteína BAX ou ativando enzimas de reparo do DNA. Em nossa casuística o p53 foi encontrado em 67,1% dos casos e a sobrevida mediana foi de 21 meses para os casos positivos e de 13 meses para os casos negativos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. NIKLINSKI et al. (2001) demonstraram que a presença do p53 pode ser encontrada em 58% a 70% dos casos de CPNPC e esta expressão está consistentemente relacionada a menor sobrevida. Entretanto alguns estudos falharam em demonstrar esta associação (GERADTS et al. 1999; ZEREU et al. 2003). As diferenças de resultados reportados entre p53 e sobrevida podem ser devido as diferentes metodologias empregada nos estudos. Estas distintas técnicas incluem a detecção da p53 em nível protéico, onde as formas mutadas levam a uma maior meia vida e a proteína pode ser facilmente detectada por imunoistoquímica ou através da análise de sequenciamento do DNA e detecção da forma mutante, caracterizando a perda da função do gene. No entanto, outros mecanismos podem levar a detecção de níveis alterados da p53, na ausência da mutação da mesma. Ainda, diferentes mutações podem levar a diferentes funções do p53, dependendo do domínio envolvido (NIKLINSKI et al. 2002).

Embora a mutação ou ausência de expressão do pRb seja mais comum em CPPC e tumores neuroendócrinos, casos de pRb negativos é

descrita em 20% dos CPNPC, podendo variar de 17% a 60% (LEVERSHA et al. 2003). A ausência de expressão da proteína pRb está relacionada a pior prognóstico. Em nossa série, 21 pacientes (41,6%) apresentaram perda da expressão do pRb e a sobrevida a 3 anos foi de 17,8% para os casos pRb negativos e 25,5% para os casos positivos e a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa ( $p=0,81$ ).

As proteínas p21 e p27 são membros da família de moléculas que inibem o complexo ciclina-CDK no núcleo. A p21 contribui para a apoptose induzida pela p53 (WINTERS 2002) e raramente está expressa no tecido pulmonar normal. Em CPNPC a expressão da p21 varia de 35% a 51% dos casos sem haver diferenças significativas entre adenocarcinomas e CEC (HAYASHI et al. 1997). No presente estudo a ausência da expressão da proteína p21 foi vista em 28 casos (51,6%) e a sobrevida encontrada foi significativamente maior nos casos com expressão negativa de p21 (34,6% versus 11% a 3 anos,  $p=0,02$ ), o que contradiz a literatura. A Tabela 15 mostra os principais estudos que utilizaram a p21 e sua relação com sobrevida em CPNPC. A ausência de expressão da proteína p21 tem sido correlacionada a pior prognóstico, especialmente quando associada a positividade da p53 (ESPOSITO et al. 2004). As explicações para os resultados divergentes encontrados nesse estudo, em relação à expressão da proteína p21, podem ser devidas ao tamanho de nossa amostra, ao fato de termos estudado uma população específica de pacientes, ou seja, EC III ou ainda a expressão em uma proteína isolada talvez não seja reflexo da determinação de prognóstico em CPNPC (CAPUTI et al. 1998). Além disso,

GARTEL e RADHAKRISHNAN (2005) afirmaram que a presença ou hiperexpressão da p21 nas células nem sempre está relacionada a supressão do ciclo celular e, ao contrário, poderia promover a ativação do ciclo. Este efeito paradoxal dependeria do contexto celular utilizado, além da ativação de vias intracelulares específicas como a via Notch, por exemplo. O mecanismo de ação do p21 em CPNPC merece ser melhor esclarecido, inclusive com a identificação de suas moléculas ativadoras e repressoras tanto na célula normal como na célula neoplásica.

Os estudos que avaliaram o papel da expressão da p27 em CPNPC revelam certa controvérsia entre a positividade dessa proteína e sobrevida. A Tabela 16 mostra que entre os 4 maiores estudos com este objetivo, apenas dois tiveram correlação prognóstica positiva entre ausência de expressão de p27 e ganho de sobrevida. De uma maneira geral a perda da expressão proteína p27 tem sido relatada em aproximadamente 30% dos pacientes (ESPOSITO et al. 2004). Em nosso estudo, a ausência de expressão da p27 foi vista em 50 pacientes (86%) e a sobrevida mediana encontrada foi de 15 meses neste subgrupo, comparado com 21 meses nos pacientes com p27 positivo, mas com um valor de  $p$  não significativo. Um aspecto que pode ser crítico na interpretação dos nossos resultados diz respeito à sublocalização celular destas proteínas. Na coorte estudada, todos os casos considerados positivos mostraram marcação nuclear para as proteínas p21 e p27 o que pode levar a hipótese de perda de função dessas proteínas, uma vez que a presença delas no citoplasma está associada ao processo de apoptose (COQUERET 2002).



**Tabela 15** - Estudos mostrando a correlação da p21 e p27 e sobrevida em CPNPC.

| <b>Autor</b>     | <b>Ano</b> | <b>n</b> | <b>EC</b> | <b>Metodologia</b> | <b>p</b> |
|------------------|------------|----------|-----------|--------------------|----------|
| <b>p21</b>       |            |          |           |                    |          |
| Shoji et al.     | 2002       | 233      | I-III A   | Imunoistoquímica   | 0,04     |
| Komiya et al.    | 1997       | 137      | I-III A   | Imunoistoquímica   | NS       |
| Esposito et al.  | 2004       | 68       | I-III     | Imunoistoquímica   | 0,006    |
| <b>p27</b>       |            |          |           |                    |          |
| Tsukamoto et al. | 2001       | 161      | I-IV      | Imunoistoquímica   | 0,02     |
| Hayashi et al.   | 2001       | 98       | I-II      | Imunoistoquímica   | NS       |
| Hommura et al.   | 2000       | 107      | I-II      | Imunoistoquímica   | 0,01     |
| Esposito et al.  | 1997       | 108      | I-III     | Imunoistoquímica   | NS       |

NS: Não significativo

A análise multivariada foi realizada, através do método de regressão de Cox, para as variáveis EC, expressão da p21, genero e idade. Foi demonstrado que o EC IIIB e a presença da p21 estão independentemente relacionados à pior sobrevida.

Anormalidades nas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular são muito freqüentes em quase todas as neoplasias. No entanto nem todos os tumores apresentam uma clara correlação entre sobrevida e a presença das proteínas repressoras ou controladoras do ciclo celular, tais como a p16, p21, p27 entre outras (BAEKELANDT et al. 1999; KOUREA et al. 2006).

Nos últimos anos muito tem se estudado a respeito dos marcadores moleculares ou proteínas que podem ter significância prognóstica em CPNPC, no entanto, controvérsias têm sido geradas a este respeito. Até o momento nenhum painel de marcadores tem sido utilizado como rotina na

avaliação dos pacientes com CPNPC e capaz de identificar aqueles pacientes com risco elevado de recorrência ou resistência ao tratamento. Os diferentes resultados encontrados nos mais variados estudos podem ser devido à heterogeneidade da população estudada e a seleção dos pacientes incluindo as diferenças nos aspectos clínico-patológicos e estadiamento.

O estudo dos marcadores moleculares em CPNPC tem sido mais relevante em tumores iniciais ou ressecáveis. GUGGER et al. (2001), demonstrou que marcadores específicos podem ter significância prognóstica diferente em pacientes com EC precoce. Este autor estudou 92 casos de CPNPC em vários estadios, utilizando a imunoistoquímica para identificar algumas proteínas do ciclo celular, entre elas a pRb, p53, p16, e a ciclina D1. Neste estudo, a expressão de algumas destas proteínas foi significativamente maior em tumores iniciais (EC I a IIIA), demonstrando que as proteínas reguladoras do ciclo celular podem ser menos expressas em CPNPC avançado. Desta forma a inclusão de pacientes com tumores avançados em coortes de pacientes com tumores iniciais pode produzir resultados indesejáveis. Infelizmente, análises de subgrupos reduzem significativamente o número de pacientes e assim há diminuição do poder estatístico do estudo. Além disso, a seleção voluntária de pacientes também pode gerar um viés de resultados que pode ser difícil de reproduzir em outros estudos.

Em oncologia, poucos estudos abordam uma grande quantidade de marcadores para de fato se entender as vias de sinalização das células tumorais e, ao contrário, se concentram em marcadores pontuais ou

específicos. O mais relevante para a ciência seria conhecer em detalhes todas as etapas das vias, em estudos bem desenhados e com grande número de pacientes. Devido à complexidade das interações protéicas no ciclo celular das células neoplásicas, a interpretação dos resultados, especificamente resultados de sobrevida, devem ser cuidadosamente interpretados, principalmente se analisados de forma isolada (BURKE et al. 2005).

## ***CONCLUSÃO***

## 6 CONCLUSÃO

Entre as variáveis clínicas analisadas, tais como: gênero, idade, histologia, estadió clínico e modalidade de tratamento, apenas o estadió clínico obteve importância prognóstica.

Em relação aos anticorpos estudados, a perda de expressão do p21 correlacionou-se com uma maior sobrevida global a 3 anos.

A expressão dos marcadores p53, pRb e p27 não mostrou correlação significativa com a sobrevida global.

O EC e a expressão da p21 obtiveram valor prognóstico independente na determinação da sobrevida global.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymus] Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. **BMJ** 1995; 311:899-909.

Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, et al. p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:961-70.

Albain K, Jablons D, Gandara D, et al. Stage III Non-small cell lung cancer: tailored therapies for a complex disease. The American Society of Clinical Oncology. **Educational Book** 2006. p.453-61.

Andre F, Grunenwald D, Pignon JP, et al. Survival of patients with resected N2 non-small-cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. **J Clin Oncol** 2000; 18:2981-9.

Ardizzoni A, Cafferata MA, Paganuzzi M, et al. Study of pretreatment serum levels of HER-2/neu oncoprotein as a prognostic and predictive factor in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer** 2001; 92:1896-904.

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2004; 350:351-60.

Baekelandt M, Holm R, Trope CG, Nesland JM, Kristensen GB. Lack of independent prognostic significance of p21 and p27 expression in advanced ovarian cancer: an immunohistochemical study. **Clin Cancer Res** 1999; 5:2848-53.

Bennett WP, el-Deiry WS, Rush WL, et al. p21waf1/cip1 and transforming growth factor beta 1 protein expression correlate with survival in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 1998; 4:1499-506.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:13790-5.

Blackstock AW, Herndon JE 2nd, Paskett ED, et al. Outcomes among African-American/non-African-American patients with advanced non-small-cell lung carcinoma: report from the Cancer and Leukemia Group B. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:284-90.

Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. **Chest** 2002; 122:1037-57.

Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, et al. Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 11:232-41.

Caputi M, Esposito V, Baldi A, et al. p21waf1/cip1mda-6 expression in non-small-cell lung cancer: relationship to survival. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1998; 18:213-7.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. **Gene** 2002; 299:35-55.



Deeb G, Wang J, Ramnath N, et al. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. **Mod Pathol** 2004; 17:430-9.

Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, et al. French Thoracic Cooperative Group. Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:247-53.

Dosaka-Akita H, Hu SX, Fujino M, et al. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. **Cancer** 1997; 79:1329-37.

Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, et al. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **J Clin Oncol** 2004; 22:811-9.

Esposito V, Baldi A, De Luca A, et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. **Cancer Res** 1997; 57:3381-5.

Esposito V, Baldi A, Tonini G, et al. Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer. **J Clin Pathol** 2004; 57:58-63.

Felip E, Baselga J. Receptor tyrosine kinase abnormalities in lung cancer. In: Pass H, Carbone D, Johnson D, Minna J, Turrisi A, editors. **Lung cancer principles and practice**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.147-59.

Fontanini G, Bigini D, Vignati S, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. **J Pathol** 1995; 177:57-63.

Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA Jr. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. **Semin Oncol** 2002; 29(1 Suppl 4):3-14.

Gail MH, Eagan RT, Feld R, et al. Prognostic factors in patients with resected stage I non-small cell lung cancer: a report from the Lung Cancer Study Group. **Cancer** 1984; 54:1802-13.

Gandara DR, Chansky K, Albain KS, et al. Consolidation docetaxel after concurrent chemoradiotherapy in stage IIIB non-small-cell lung cancer: phase II Southwest Oncology Group Study S9504. **J Clin Oncol** 2003; 21:2004-10.

Gartel A., Radhakrishnan S. Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms and Consequences. **Cancer Res** 2005; 65: 3980-4.

Gauden S, Ramsay J, Tripcony L. The curative treatment by radiotherapy alone of stage I non-small cell carcinoma of the lung. **Chest** 1995; 108:1278-82.

Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. **Clin Cancer Res** 1999; 5:791-800.

Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. **Ann Thorac Surg** 1995; 60:615-22; discussion 622-3.

Graziano SL. Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. **Lung Cancer** 1997; 17 Suppl 1:S37-58.

Gugger M, Kappeler A, Vonlanthen S, et al. Alterations of cell cycle regulators are less frequent in advanced non-small cell lung cancer than in resectable tumours. **Lung Cancer** 2001; 33:229-39.

Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. **Cancer Res** 1995b; 55:51-6.

Hayashi H, Miyamoto H, Ito T, et al. Analysis of p21Waf1/Cip1 expression in normal, premalignant, and malignant cells during the development of human lung adenocarcinoma. **Am J Pathol** 1997; 151:461-70.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. **Br J Cancer** 2002; 86:1449-56.

Hoang T, Xu R, Schiller JH, Bonomi P, Johnson DH. Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on eastern cooperative oncology group data. **J Clin Oncol** 2005; 23:175-83.

Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, et al. Prognostic significance of p27KIP1 protein and ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers. **Clin Cancer Res** 2000; 6:4073-81.

Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. **Lab Invest** 2000; 81:1331-8.

Ichinose Y, Yano T, Asoh H, Yokoyama H, Yoshino I, Katsuda Y. Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small-cell lung cancer: an analysis in each pathologic stage. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1995; 110:601-5.

Keller SM, Adak S, Wagner H, et al. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. **N Engl J Med** 2000; 343:1217-22.

Komiya T, Hosono Y, Hirashima T, et al. p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. **Clin Cancer Res** 1997; 3:1831-5.

Kourea HP, Koutras AK, Zolota V, et al. Expression of p27KIP1, p21WAF1 and p53 does not correlate with prognosis in node-negative invasive ductal carcinoma of the breast. **Anticancer Res** 2006; 26:1657-68.

Kristiansen G, Yu Y, Petersen S, et al. Overexpression of c-erbB2 protein correlates with disease-stage and chromosomal gain at the c-erbB2 locus in non-small cell lung cancer. **Eur J Cancer** 2001; 37:1089-95.

Leversha MA, Fielding P, Watson S, Gosney JR, Field JK. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. **J Pathol** 2003; 200:610-9.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, et al. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1993; 106:80-9.

Martini N, Bains MS, Burt ME, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1995; 109:120-9.

Meert AP, Paesmans M, Martin B, et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Br J Cancer** 2002; 87:694-701.

Meert AP, Martin B, Paesmans M, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. **Br J Cancer** 2003; 89:959-65.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2006: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. **Clin Cancer Res** 2000; 6:4055-63.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. **Chest** 1997; 111:1710-7.

[NCI] National Cancer Institute. **Non-small cell lung cancer (PDQ®): treatment**. Available from: <URL:<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/HealthProfessional/page1>> [2007 maio 12].

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. Non-small cell lung cancer. Available from: <URL:[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/nscl.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nscl.pdf)> [2007 jul 18].

Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. **Cancer** 2005; 103:1865-73.

Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2001; 34 Suppl 2:S53-8.

Paesmans M, Sculier JP, Libert P, et al. Prognostic factors for survival in advanced non-small-cell lung cancer: univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation algorithms in 1,052 patients. The European Lung Cancer Working Party. **J Clin Oncol** 1995; 13:1221-30.

Pujol JL, Molinier O, Ebert W, et al. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. **Br J Cancer** 2004; 90:2097-105.

Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. **Ann Oncol** 2002; 13:1087-93.

Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 1994; 330:153-8.

Roth JA, Fossella F, Komaki R, et al. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:673-80.

Rowell NP, Williams CJ. Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. **Thorax** 2001; 56:628-38.

Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. **J Clin Oncol** 1998; 16:1207-17.

Sause WT, Scott C, Taylor S, et al. Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 88-08 and Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 4588: preliminary results of a phase III trial in regionally advanced, unresectable non-small-cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:198-205.

Sawabata N, Maeda H, Yokota S, et al. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. **Cancer** 2004; 101:803-9.

Scagliotti GV. The ALPI Trial: the Italian/European experience with adjuvant chemotherapy in resectable non-small lung cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5011s-6s.

Scambia G, Lovergine S, Masciullo V. RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. **Oncogene** 2006; 25:5302-8.

Schrump D, Altorki N, Henschke C, Carter D, Turrisi A, Gutierrez M. Non-small cell lung cancer. In: De Vitta V, Hellman S, Rosenberg S, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.753-54.

[SEER] Surveillance Epidemiology and end Results. **Cancer of the lung and bronchus**. Available from: <URL:[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/results\\_single/sect\\_01\\_table.01.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/results_single/sect_01_table.01.pdf)> [2007 jul 18].

Selvaggi G, Novello S, Torri V, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. **Ann Oncol** 2004; 15:28-32.

Shoji T, Tanaka F, Takata T, et al. Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:3865-71.

Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. **Clin Cancer Res** 2005; 11:3974-86.

Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. **N Engl J Med** 1990; 323:561-5.

Solan MJ, Werner-Wasik M. Prognostic factors in non-small cell lung cancer. **Semin Surg Oncol** 2003; 21:64-73.

Soussi T. Genetics and cancer: fundamental and clinical aspects. **Cancer Radiother** 2001; 5 Suppl 1:36s-41s.

Stanley KE. Prognostic factors for survival in patients with inoperable lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 1980; 65:25-32.

Steels E, Paesmans M, Berghmans T, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. **Eur Respir J** 2001; 18:705-19.

Strauss GM, Kwiatkowski DJ, Harpole DH, Lynch TJ, Skarin AT, Sugarbaker DJ. Molecular and pathologic markers in stage I non-small-cell carcinoma of the lung. **J Clin Oncol** 1995; 13:1265-79.



Thomas P, Piraux M, Jacques LF, Gregoire J, Bedard P, Deslauriers J. Clinical patterns and trends of outcome of elderly patients with bronchogenic carcinoma. **Eur J Cardiothorac Surg** 1998; 13:266-74.

Travis W, Coldy T, Koss M. **Tumors of the lower respiratory tract**. IARC. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2004.

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. **N Engl J Med** 2005; 353:133-44.

Tsukamoto S, Sugio K, Sakada T, Ushijima C, Yamazaki K, Sugimachi K. Reduced expression of cell-cycle regulator p27(Kip1) correlates with a shortened survival in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2001; 34:83-90.

Van Meerbeeck JP. Staging of non-small cell lung cancer: consensus, controversies and challenges. **Lung Cancer** 2001; 34 Suppl 2:S95-107.

Vercelli M, Quaglia A, Casella C, Mangone L. Cancer patient survival in the elderly in Italy. ITACARE Working Group. **Tumori** 1997; 83:490-6.

Wakelee HA, Wang W, Schiller JH, et al. Survival differences by sex for patients with advanced non-small cell lung cancer on Eastern Cooperative Oncology Group trial 1594. **J Thorac Oncol** 2006; 1:441-6.

Windeler J. Prognosis - what does the clinician associate with this notion? **Stat Med** 2000; 19:425-30.

Winters ZE. P53 pathways involving G2 checkpoint regulators and the role of their subcellular localisation. **J R Coll Surg Edinb** 2002; 47:591-8.

Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:695-9.

Xu HJ, Cagle PT, Hu SX, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. **Clin Cancer Res**. 1996; 2:1169-76.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur J Cancer** 2001; 37 Suppl 4:S3-8.

Younes RN. **Câncer de pulmão: abordagem multidisciplinar**. São Paulo: MBC Marketing e Propaganda; 2005. Estágio clínico I,II,III; p.41-109.

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; 59:790-800.

Zereu M, Vinholes JJ, Zettler CG. p53 and Bcl-2 protein expression and its relationship with prognosis in small-cell lung cancer. **Clin Lung Cancer** 2003; 4:298-302.

***ANEXOS***

---

## **Anexo 1 - Revisão do Sistema Internacional de Estadiamento.**

### **T - Tumor Primário**

**TX** O tumor primário não pode ser avaliado, ou tumor detectado pela presença de células malignas no escarro ou lavado brônquico, mas não visualizado em diagnóstico por imagem ou broncoscopia

**T0** Não há evidência de tumor primário

**Tis** Carcinoma in situ

**T1** Tumor com 3 cm ou menos em sua maior dimensão, circundado por pulmão ou pleura visceral, sem evidência broncoscópica de invasão mais proximal que o brônquio lobar (i.e., sem invasão do brônquio principal)

**T2** Tumor com qualquer das seguintes características de tamanho ou extensão:

- Com mais de 3 cm em sua maior dimensão
- Compromete o brônquio principal, com 2 cm ou mais distalmente à carina
- Invade a pleura visceral
- Associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva que se estende até a região hilar, mas não envolve todo o pulmão

**T3** Tumor de qualquer tamanho que invade diretamente qualquer uma das seguintes estruturas: parede torácica (inclusive os tumores do sulco superior), diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal; ou tumor do brônquio principal com menos de 2 cm distalmente à carina<sup>1</sup>, mas sem envolvimento da mesma; ou tumor associado com atelectasia ou pneumonite obstrutiva de todo o pulmão

**T4** Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina; ou nódulo(s) tumoral(ais) distinto(s) no mesmo lobo; tumor com derrame pleural maligno

### **N - Linfonodos Regionais**

**NX** Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

**N0** Ausência de metástase em linfonodos regionais

**N1** Metástase em linfonodos peribrônquicos e/ou hilares homolaterais e nódulos intrapulmonares, incluindo o comprometimento por extensão direta

**N2** Metástase em linfonodo(s) mediastinal(ais) homolateral(ais) e/ou em linfonodo(s) subcarinal(ais)

**N3** Metástase em linfonodo(s) mediastinal(ais) contralateral(ais), hilar(es) contralateral(ais), escaleno(s) homo- ou contralateral(ais), ou em linfonodo(s) supra-clavicular(es)

|                                  |
|----------------------------------|
| <b>M - Metástase à Distância</b> |
|----------------------------------|

**MX** A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

**M0** Ausência de metástase à distância

**M1** Metástase à distância, inclusive nódulo(s) tumoral(is) distinto(s) num lobo diferente (homolateral ou contralateral)

|                                |
|--------------------------------|
| <b>Grupamento por Estádios</b> |
|--------------------------------|

|                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| <b>Carcinoma oculto</b> | TX N0 M0                 |
| <b>Estadio 0</b>        | Tis N0 M0                |
| <b>Estadio IA</b>       | T1 N0 M0                 |
| <b>Estadio IB</b>       | T2 N0 M0                 |
| <b>Estadio IIA</b>      | T1 N1 M0                 |
| <b>Estadio IIB</b>      | T2 N1 M0                 |
|                         | T3 N0 M0                 |
| <b>Estadio IIIA</b>     | T3N1M0                   |
|                         | T1N2M0                   |
|                         | T2N2M0                   |
|                         | T3N2M0                   |
| <b>Estadio IIIB</b>     | T4N0M0                   |
|                         | T4N1M0                   |
|                         | T4N2M0                   |
|                         | T1N3M0                   |
|                         | T2N3M0                   |
|                         | T3N3M0                   |
|                         | T4N3M0                   |
| <b>Estadio IV</b>       | Qualquer T Qualquer N M1 |

**Fonte:** MOUNTAIN (1997).

## Anexo 2 - Mapa das Lâminas

L  
Â  
M  
I  
N  
A  
S

| p53 | c-erbB2 | pRB | EGFR | p21 | p27 |
|-----|---------|-----|------|-----|-----|
|-----|---------|-----|------|-----|-----|

A

|           |           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| B99-8305  | B99-8305  | B99-8305  | B99-8305  | B99-8305  | B99-8305  |
| BA0-795   | BA0-795   | BA0-795   | BA0-795   | BA0-795   | BA0-795   |
| BAO-3538  | BAO-3538  | BAO-3538  | BAO-3538  | BAO-3538  | BAO-3538  |
| BAO-7477  | BAO-7477  | BAO-7477  | BAO-7477  | BAO-7477  | BAO-7477  |
| BA0-10816 | BA0-10816 | BA0-10816 | BA0-10816 | BA0-10816 | BA0-10816 |

B

|          |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| BA0-7748 | BA0-7748 | BA0-7748 | BA0-7748 | BA0-7748 | BA0-7748 |
| BA0-8334 | BA0-8334 | BA0-8334 | BA0-8334 | BA0-8334 | BA0-8334 |
| BA0-2488 | BA0-2488 | BA0-2488 | BA0-2488 | BA0-2488 | BA0-2488 |

C

|           |           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| BA2-1033  | BA2-1033  | BA2-1033  | BA2-1033  | BA2-1033  | BA2-1033  |
| BA2-3667B | BA2-3667B | BA2-3667B | BA2-3667B | BA2-3667B | BA2-3667B |
| BA2-8048  | BA2-8048  | BA2-8048  | BA2-8048  | BA2-8048  | BA2-8048  |

D

|          |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| BA2-8805 | BA2-8805 | BA2-8805 | BA2-8805 | BA2-8805 | BA2-8805 |
| CA1-8671 | CA1-8671 | CA1-8671 | CA1-8671 | CA1-8671 | CA1-8671 |
| 291956   | 291956   | 291956   | 291956   | 291956   | 291956   |

E

|        |        |        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 299478 | 299478 | 299478 | 299478 | 299478 | 299478 |
| 307185 | 307185 | 307185 | 307185 | 307185 | 307185 |
| 340260 | 340260 | 340260 | 340260 | 340260 | 340260 |

F

|           |           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 310107    | 310107    | 310107    | 310107    | 310107    | 310107    |
| B97-1149  | B97-1149  | B97-1149  | B97-1149  | B97-1149  | B97-1149  |
| B97-3533  | B97-3533  | B97-3533  | B97-3533  | B97-3533  | B97-3533  |
| B98-3684B | B98-3684B | B98-3684B | B98-3684B | B98-3684B | B98-3684B |

G

|            |            |            |            |                        |            |
|------------|------------|------------|------------|------------------------|------------|
| B97-3946C  | B97-3946C  | B97-3946C  | B97-3946C  | B97-3946C              | B97-3946C  |
| B98-4159   | B98-4159   | B98-4159   | B98-4159   | B98-4159               | B98-4159   |
| B98-4680   | B98-4680   | B98-4680   | B98-4680   | B98-4680               | B98-4680   |
| B98-7466   | B98-7466   | B98-7466   | B98-7466   | B98-7466               | B98-7466   |
| B98-09352A | B98-09352A | B98-09352A | B98-09352A | B98-09352 <sup>A</sup> | B98-09352A |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| H | B99-0430 | B99-0430 | B99-0430 | B99-0430 | B99-0430 | B99-0430 |
|   | 325425   | 325425   | 325425   | 325425   | 325425   | 325425   |
|   | 326861   | 326861   | 326861   | 326861   | 326861   | 326861   |
|   | 328095   | 328095   | 328095   | 328095   | 328095   | 328095   |
|   | 335321   | 335321   | 335321   | 335321   | 335321   | 335321   |

|   |            |            |            |            |            |            |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| I | B97-04486A | B97-04486A | B97-04486A | B97-04486A | B97-04486A | B97-04486A |
|   | 336227     | 336227     | 336227     | 336227     | 336227     | 336227     |
|   | B97-00867  | B97-00867  | B97-00867  | B97-00867  | B97-00867  | B97-00867  |

|   |           |           |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| J | 340083    | 340083    | 340083    | 340083    | 340083    | 340083    |
|   | B99-00165 | B99-00165 | B99-00165 | B99-00165 | B99-00165 | B99-00165 |
|   | B99-8828  | B99-8828  | B99-8828  | B99-8828  | B99-8828  | B99-8828  |
|   | BA1-11289 | BA1-11289 | BA1-11289 | BA1-11289 | BA1-11289 | BA1-11289 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| K | 339352   | 339352   | 339352   | 339352   | 339352   | 339352   |
|   | B99-6570 | B99-6570 | B99-6570 | B99-6570 | B99-6570 | B99-6570 |
|   | B99-5198 | B99-5198 | B99-5198 | B99-5198 | B99-5198 | B99-5198 |
|   | B98-8821 | B98-8821 | B98-8821 | B98-8821 | B98-8821 | B98-8821 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| L | 327266   | 327266   | 327266   | 327266   | 327266   | 327266   |
|   | B99-9368 | B99-9368 | B99-9368 | B99-9368 | B99-9368 | B99-9368 |
|   | B99-2927 | B99-2927 | B99-2927 | B99-2927 | B99-2927 | B99-2927 |
|   | BA1-9938 | BA1-9938 | BA1-9938 | BA1-9938 | BA1-9938 | BA1-9938 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| M | BA0-9762 | BA0-9762 | BA0-9762 | BA0-9762 | BA0-9762 | BA0-9762 |
|   | 339138H  | 339138H  | 339138H  | 339138H  | 339138H  | 339138H  |
|   | BA4-7724 | BA4-7724 | BA4-7724 | BA4-7724 | BA4-7724 | BA4-7724 |

|   |           |           |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| N | BA3-1677  | BA3-1677  | BA3-1677  | BA3-1677  | BA3-1677  | BA3-1677  |
|   | BA3 – 142 | BA3 – 142 | BA3 – 142 | BA3 – 142 | BA3 – 142 | BA3 – 142 |
|   | BA3- 5987 | BA3- 5987 | BA3- 5987 | BA3- 5987 | BA3- 5987 | BA3- 5987 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| O | BA3-5551 | BA3-5551 | BA3-5551 | BA3-5551 | BA3-5551 | BA3-5551 |
|   | BA4-1540 | BA4-1540 | BA4-1540 | BA4-1540 | BA4-1540 | BA4-1540 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| P | BA4-430  | BA4-430  | BA4-430  | BA4-430  | BA4-430  | BA4-430  |
|   | BA3-4471 | BA3-4471 | BA3-4471 | BA3-4471 | BA3-4471 | BA3-4471 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Q | BA3-381  | BA3-381  | BA3-381  | BA3-381  | BA3-381  | BA3-381  |
|   | BA4-5022 | BA4-5022 | BA4-5022 | BA4-5022 | BA4-5022 | BA4-5022 |
|   | BA3-2438 | BA3-2438 | BA3-2438 | BA3-2438 | BA3-2438 | BA3-2438 |

|   |          |          |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| R | BA4-7511 | BA4-7511 | BA4-7511 | BA4-7511 | BA4-7511 | BA4-7511 |
|   | BA2-2603 | BA2-2603 | BA2-2603 | BA2-2603 | BA2-2603 | BA2-2603 |

|   |           |           |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| S | BA5-8087  | BA5-8087  | BA5-8087  | BA5-8087  | BA5-8087  | BA5-8087  |
|   | BA3-05298 | BA3-05298 | BA3-05298 | BA3-05298 | BA3-05298 | BA3-05298 |
|   | BA3-0966  | BA3-0966  | BA3-0966  | BA3-0966  | BA3-0966  | BA3-0966  |



### Anexo 3 - Ficha específica para anotação dos dados clínicos

#### CARCINOMA DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS

Nome: \_\_\_\_\_ RGH: \_\_\_\_\_

Data Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( 1 ) M ( 2 ) F

Admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data do início dos sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

História de Tabagismo: ( 1 ) Sim ( 2 ) Não Tempo de tabagismo: \_\_\_\_\_

**Manifestações iniciais:** ( 1 ) Dispnéia ( 2 ) Hemoptise ( 3 ) Tosse  
( 4 ) Dor torácica ( 5 ) Emagrecimento  
( 6 ) Outros: \_\_\_\_\_

**Manifestações atuais:** ( 1 ) Dispnéia ( 2 ) Hemoptise ( 3 ) Tosse  
( 4 ) Dor torácica ( 5 ) Emagrecimento  
( 6 ) Outros: \_\_\_\_\_

**Tempo de duração dos sintomas atuais:** \_\_\_\_\_ meses.

**Exames radiológicos:** ( 1 ) RX Tórax ( 2 ) TC Tórax ( 3 ) RNM Tórax  
( 4 )- Outros: \_\_\_\_\_

**Achados:** No. Nódulos: \_\_\_\_\_ Dimensões: \_\_\_\_\_ Lado ( 1 ) D ( 2 ) E

**Localizacao: LSD / LM / LID / LSE / LIE / Sem informacoes**

**Broncoscopia:** ( 1 ) Não ( 2 ) Sim. Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Achados:** ( 1 ) normal ( 2 ) lesão vegetante  
( 3 ) Outros: \_\_\_\_\_

**Local:** ( 1 ) B. fonte ( 2 ) B. lobar ( 3 ) B. segmentar

**Complicações:** ( 1 ) sangram. ( 2 ) Pneumotórax ( 3 ) sem compl.  
( 4 ) Outros: \_\_\_\_\_

**Biópsia pré-operatória:** ( 1 ) Não ( 2 ) Broncoscopia ( 3 ) Punção transtorácica  
( 4 ) Mediastinoscopia

**AP da Biópsia:** ( 1 ) Adenocarcinoma ( 2 ) Carcinoma Epidermóide  
( 3 ) Carcinoma bronquíolo-alveolar ( 4 ) Carcinoma de grandes cels.  
( 5 ) Outros: \_\_\_\_\_

**N. do exame:** \_\_\_\_\_

**IHQ:** ( 1 ) Não ( 2 ) Sim.

**Estadiamento:** ( 1 ) Não ( 2 ) Sim **Exames:** ( 1 ) US abdome ( 2 ) TC abdome  
( 3 ) Cintilografia óssea  
( 4 ) TC Crânio ( 5 ) PetScan  
( 6 ) Outros \_\_\_\_\_

**TNM CLÍNICO:** T\_\_\_\_N\_\_\_\_M\_\_\_\_ Local das Metástases: \_\_\_\_\_

---

**Tratamento:** (1) RXT ( 1 ) Não ( 2 ) Sim: ( 1 ) Neo-Adjuvante ( 2 ) Adjuvante  
( 3 ) Exclusivo

Dose: \_\_\_\_\_

(2) QT ( 1 ) Não ( 2 ) Sim: ( 1 ) Neo-Adj ( 2 ) Adj  
( 3 ) Exclusivo

Protocolo (regime): \_\_\_\_\_

ciclos: \_\_\_\_\_

---

**Recidiva:** ( 1 ) Não ( 2 ) Sim. Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Onde: (1) Local ( 2 ) Sistêmica.

Órgão(s): \_\_\_\_\_

**Biópsia da recidiva:** ( 1 ) Não ( 2 ) Sim

Tratamento: ( 1 ) Sem tratamento ( 2 ) Cirurgia

( 3 ) Qt ( 4 ) Rxt

Resposta: ( 1 ) RC ( 2 ) RP ( 3 ) DE ( 4 ) PD

---

**Data da última consulta:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Estado:** ( 1 ) VSD ( 2 ) VCD ( 3 ) MD ( 4 ) MOC ( 5 ) PV

---

# Anexo 4 – Banco de Dados

1/10

| Num | Nome                            | sexo | Idade ao   | IDADE | FX ETÁRIA | RG       |
|-----|---------------------------------|------|------------|-------|-----------|----------|
| 1   | Felipa M R de rocabado          | 2    | 01/05/1922 | 74,37 | 2         | 9602659  |
| 2   | Julio Ferreira da Costa         | 1    | 20/05/1934 | 62,66 | 1         | 9401953  |
| 3   | Wi Suk Kim                      | 1    | 05/10/1921 | 77,13 | 2         | 9804280  |
| 4   | Seiichi Iwamoto                 | 1    | 02/07/1929 | 66,95 | 1         | 9602165  |
| 5   | Sebastião Alves                 | 1    | 28/09/1931 | 70,17 | 2         | 0104397  |
| 6   | Aparecida Martins Rubbo         | 2    | 09/09/1925 | 71,19 | 2         | 9604217  |
| 7   | Claudio Loureiro Nadagi         | 1    | 20/09/1949 | 48,95 | 1         | 9402808  |
| 8   | Afonso Feliciano da silva       | 1    | 03/08/1932 | 67,87 | 1         | 0001313  |
| 9   | Gustavo Oliveira Campos         | 1    | 18/01/1921 | 74,87 | 2         | 9503521  |
| 10  | Joao Alberto Delazaro           | 1    | 44 a       | 44    | 1         | 9402001  |
| 11  | Olindo Basso                    | 1    | 11/12/1925 | 71,59 | 2         | 9700975  |
| 12  | Benedito Rodrigues              | 1    | 10/09/1931 | 69,18 | 2         | 0004086  |
| 13  | Artur Guamieri                  | 1    | 01/05/1932 | 66,24 | 1         | 9801898  |
| 14  | Marcia Aparecida de Moura       | 2    | 10/09/1961 | 40,99 | 1         | 0203494  |
| 15  | Jose Barbosa da Silva           | 1    | 14/11/1943 | 55,64 | 1         | 9702638  |
| 16  | Geraldo Guimarães               | 1    | 13/07/1920 | 75,28 | 2         | 9503727  |
| 17  | Waldir de Campos Barros         | 1    | 08/11/1947 | 52,39 | 1         | 0000388  |
| 18  | Plinio Figueiredo               | 1    | 12/05/1929 | 70,41 | 2         | 9504274  |
| 19  | Alceu Paulo Squillanti          | 1    | 26/03/1931 | 70,75 | 2         | 9604508  |
| 20  | Aurelino Santana                | 1    | 22/07/1922 | 75,02 | 2         | 8605222  |
| 21  | Lydia Carvalho Policastro       | 2    | 68 a       | 68    | 2         | 0400539  |
| 22  | Yara Rodrigues                  | 2    | 02/06/1934 | 67,93 | 1         | 0001099  |
| 23  | Cicero Candido de Almeida       | 1    | 62 a       | 62    | 1         | 0501535  |
| 24  | Geraldo Duarte Sena             | 1    | 09/07/1954 | 47,86 | 1         | 0201325  |
| 25  | Antonio Grasso                  | 1    | 10/09/1922 | 74,28 | 2         | 9604643  |
| 26  | Estelita Santos Ramos           | 2    | 08/01/1940 | 55,62 | 1         | 9502927  |
| 27  | Dirlene Conceição Meireles      | 2    | 12/08/1965 | 33,46 | 1         | 9804963  |
| 28  | Renato Sequelini                | 1    | 22/10/1930 | 68,93 | 2         | 9903123  |
| 29  | Andrea Aguiar de Arruda Botelho | 2    | 01/08/1956 | 38,73 | 1         | 9501241  |
| 30  | Jose Meneguides dos Santos      | 1    | 23/08/1934 | 59,60 | 1         | 9400158  |
| 31  | Nélio Gaia                      | 1    | 21/11/1932 | 60,12 | 1         | 9205125  |
| 32  | Alcides das Neves               | 1    | 63 a       | 63    | 1         | 9601426  |
| 33  | Carlos Roberto Perez            | 1    | 50 a       | 50    | 1         | 0202252  |
| 34  | Alaor Soares                    | 1    | 26/12/1927 | 69,10 | 2         | 9605577  |
| 35  | Suzana do Céu M. Gomes          | 2    | 25/07/1948 | 53,52 | 1         | 9605120  |
| 36  | Augusta de Oliveira Rosa        | 2    | 13/03/1932 | 65,38 | 1         | 9702057  |
| 37  | Manuel Fernandes C. Barros      | 1    | 12/07/1934 | 59,46 | 1         | 9304117  |
| 38  | João Ivananskas                 | 1    | 23/01/1923 | 75,49 | 2         | 9801902  |
| 39  | Antero dos Santos               | 1    | 18/11/1925 | 75,26 | 2         | 9702111  |
| 40  | Isabel Novellis de Oliveira     | 2    | 66 a       | 66    | 2         | 0402632  |
| 41  | Eugenio Ronato                  | 1    | 10/11/1930 | 66,13 | 1         | 9604433  |
| 42  | Alice Cecília Pereira           | 2    | 69 a       | 69    | 2         | 0402058  |
| 43  | Luiz Antonio da Silva           | 1    | 30/01/1930 | 67,96 | 1         | 9704763  |
| 44  | Wilhelmus Albertus Hendricus    | 1    | 74 a       | 74    | 2         | 04026446 |

**CONT. Anexo 4 – Banco de Dados**

2/10

|    |                                |   |            |       |   |          |
|----|--------------------------------|---|------------|-------|---|----------|
| 45 | Cesar Augusto Florenzano       | 1 | 26/04/1938 | 61,71 | 1 | 9904792  |
| 46 | Jorge Bauab                    | 1 | 10/03/1937 | 65,02 | 1 | 0200361  |
| 47 | Marco Antonio de O. Rodrigues  | 1 | 07/11/1954 | 47,09 | 1 | 0105041  |
| 48 | Antonio Teles Rocha            | 1 | 16/01/1945 | 54,62 | 1 | 9902759  |
| 49 | Nelson Valle                   | 1 | 49 a       | 49    | 1 | 04000242 |
| 50 | Orélio Simão                   | 1 | 03/12/1924 | 71,71 | 2 | 9603181  |
| 51 | Milton Antonio Silva           | 1 | 22/05/1942 | 58,06 | 1 | 0000807  |
| 52 | Lucia Elisa Sotomaior Bezerra  | 2 | 61 a       | 61    | 1 | 9403452  |
| 53 | Nevio Centurioni               | 1 | 74 a       | 74    | 2 | 0301756  |
| 54 | Antonio Puglia                 | 1 | 13/01/1942 | 59,72 | 1 | 0103349  |
| 55 | Olivia Duarte Lima             | 2 | 10/12/1920 | 77,09 | 1 | 8704741  |
| 56 | Wilson Paula Andrade           | 1 | 14/12/1923 | 68,55 | 2 | 9201199  |
| 57 | Dalila Naufal                  | 2 | 60 a       | 60    | 1 | 9304612  |
| 58 | Paulo P Damasio dos santos     | 1 | 61 a       | 61    | 1 | 0300887  |
| 59 | Maria Madalena Beloni          | 2 | 56a        | 56    | 1 | 0302553  |
| 60 | Jamil de Almeida               | 1 | 15/05/1946 | 54,72 | 1 | 0100162  |
| 61 | Waldemar Gonçalves de Oliveira | 1 | 74 a       | 74    | 2 | 0200919  |
| 62 | Margarida Maria Medeiros       | 2 | 61 a       | 61    | 1 | 0101807  |
| 63 | Verissimo Edgar Giehl          | 1 | 07/05/1943 | 52,83 | 1 | 9505358  |
| 64 | Francisco Lopes da Silva       | 1 | 14/05/1931 | 68,08 | 2 | 9502027  |

| Num | Nome                            | Tratamento | rxt vs qtrxt | Ratioterapia | Quimioterapia | Quimioterapia |
|-----|---------------------------------|------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| 1   | Felipa M R de rocabado          | 1          | 1            | 65           |               | 4             |
| 2   | Julio Ferreira da Costa         | 1          | 1            | 64           |               | 4             |
| 3   | Wi Suk Kim                      | 2          | 2            | 65           | cis           | 2             |
| 4   | Seiichi Iwamoto                 | 3          | 2            | 65           | cis,vel       | 2             |
| 5   | Sebastião Alves                 | 3          | 2            | 60           | cis,car,tax   | 12            |
| 6   | Aparecida Martins Rubbo         | 2          | 2            | 65           | cis           | 2             |
| 7   | Claudio Louveiro Nadagi         | 2          | 2            | 64           | cis           | 2             |
| 8   | Afonso Feliciano da silva       | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 9   | Gustavo Oliveira Campos         | 1          | 1            | 65           |               | 4             |
| 10  | Joao Alberto Delazaro           | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 11  | Olindo Basso                    | 3          | 2            | 64           | cis,vel       | 2             |
| 12  | Benedito Rodrigues              | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 13  | Artur Guamieri                  | 3          | 2            | 60           | carbo,tax     | 1             |
| 14  | Marcia Aparecida de Moura       | 3          | 2            | 60           | cis,gen       | 1             |
| 15  | Jose Barbosa da Silva           | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 16  | Geraldo Guimarães               | 1          | 1            | 70           |               | 4             |
| 17  | Waldir de Campos Barros         | 3          | 2            | 64           | cis,gen       | 12            |
| 18  | Plinio Figueiredo               | 3          | 2            | 60           | cis,gen       | 1             |
| 19  | Alceu Paulo Squillanti          | 1          | 1            | 65           |               | 4             |
| 20  | Aurelino Santana                | 1          | 1            | 66           |               | 4             |
| 21  | Lydia Carvalho Policastro       | 2          | 2            | 50           | carbo,tax     | 2             |
| 22  | Yara Rodrigues                  | 3          | 2            | 60           | cis,nav       | 1             |
| 23  | Cicero Candido de Almeida       | 3          | 2            | 60           | cis,eto       | 2             |
| 24  | Geraldo Duarte Sena             | 3          | 2            | 60           | cis,gen       | 12            |
| 25  | Antonio Grasso                  | 1          | 1            | 64           |               | 4             |
| 26  | Estelita Santos Ramos           | 1          | 1            | 69           |               | 4             |
| 27  | Dirlene Conceição Meireles      | 3          | 2            | 60           | cis,nav       | 1             |
| 28  | Renato Sequelini                | 3          | 2            | 64           | cis,nav       | 1             |
| 29  | Andrea Aguiar de Arruda Botelho | 1          | 1            | 64           |               | 4             |
| 30  | Jose Meneguides dos Santos      | 3          | 2            | 64           | cis,vel       | 2             |
| 31  | Nélio Gaia                      | 2          | 2            | 70           | cis           | 2             |
| 32  | Alcides das Neves               | 1          | 1            | 50           |               | 4             |
| 33  | Carlos Roberto Perez            | 3          | 2            | 50           | cis,gen       | 1             |
| 34  | Alaor Soares                    | 1          | 1            | 65           |               | 4             |
| 35  | Suzana do Céu M. Gomes          | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 36  | Augusta de Oliveira Rosa        | 1          | 1            | 66           |               | 4             |

| Num | Nome                           | Tratamento | rxt vs qtrxt | Ratioterapia | Quimioterapia | Quimioterapia |
|-----|--------------------------------|------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| 37  | Manuel Fernandes C. Barros     | 1          | 1            | 70           |               | 4             |
| 38  | João Ivananskas                | 1          | 1            | 60           |               | 4             |
| 39  | Antero dos Santos              | 1          | 1            | 60           |               | 4             |
| 40  | Isabel Novellis de Oliveira    | 3          | 2            | 66           | cis,gen       | 1,2           |
| 41  | Eugenio Ronato                 | 3          | 2            | 60           | cis,vel       | 2             |
| 42  | Alice Cecília Pereira          | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 43  | Luiz Antonio da Silva          | 3          | 2            | 60           | cis,vel       | 2             |
| 44  | Wilhelmus Albertus Hendricus   | 2          | 2            | 63           | cis           | 2             |
| 45  | Cesar Augusto Florenzano       | 3          | 2            | 60           | cis,gen       | 1,2           |
| 46  | Jorge Bauab                    | 2          | 2            | 50           | cis           | 2             |
| 47  | Marco Antonio de O. Rodrigues  | 3          | 2            | 60           | cis,gen       | 13            |
| 48  | Antonio Teles Rocha            | 3          | 2            | 65           | cis,gen       | 1,2           |
| 49  | Nelson Valle                   | 3          | 2            | 64           | cis,gen       | 1             |
| 50  | Orélio Simão                   | 1          | 1            | 65           |               | 4             |
| 51  | Milton Antonio Silva           | 1          | 1            | 64           |               | 4             |
| 52  | Lucia Elisa Sotomaior Bezerra  | 1          | 1            | 60           |               | 4             |
| 53  | Nevio Centurioni               | 1          | 1            | 50           |               | 4             |
| 54  | Antonio Puglia                 | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 55  | Olivia Duarte Lima             | 3          | 2            | 56           | cis,eto       | 3             |
| 56  | Wilson Paula Andrade           | 1          | 1            | 69           |               | 4             |
| 57  | Dalila Naufal                  | 1          | 1            | 50           |               | 4             |
| 58  | Paulo P Damasio dos santos     | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 59  | Maria Madalena Beloni          | 3          | 2            | 59           | cis,gen       | 1             |
| 60  | Jamil de Almeida               | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |
| 61  | Waldemar Gonçalves de Oliveira | 3          | 2            | 60           | cis,gen       | 2             |
| 62  | Margarida Maria Medeiros       | 2          | 2            | 59,4         | cis           | 2             |
| 63  | Verissimo Edgar Giehl          | 2          | 2            | 68           | cis           | 2             |
| 64  | Francisco Lopes da Silva       | 2          | 2            | 60           | cis           | 2             |

**CONT. Anexo 4 – Banco de Dados**

5/10

| Num | Nome                            | rxqt<br>conc | Complicações | Recidiva | Orgãos | Proservação | FUP   |
|-----|---------------------------------|--------------|--------------|----------|--------|-------------|-------|
| 1   | Felipa M R de rocabado          |              |              | 0        |        | 24/11/1996  | 3,00  |
| 2   | Julio Ferreira da Costa         |              | 2            | 0        |        | 6/5/1997    | 4,23  |
| 3   | Wi Suk Kim                      | 2            | 2            | 0        |        | 11/3/1999   | 4,27  |
| 4   | Seiichi Iwamoto                 | 2            | 5,2          | 0        |        | 3/10/1996   | 4,27  |
| 5   | Sebastião Alves                 | 2            | 24           | 0        |        | 22/3/2002   | 4,40  |
| 6   | Aparecida Martins Rubbo         | 2            |              | 0        |        | 7/4/1997    | 5,23  |
| 7   | Claudio Loureiro Nadagi         | 2            |              | 3        |        | 7/2/1999    | 5,70  |
| 8   | Afonso Feliciano da silva       | 2            | 2            | 0        |        | 25/12/2000  | 7,00  |
| 9   | Gustavo Oliveira Campos         |              |              | 0        |        | 26/7/1996   | 8,53  |
| 10  | Joao Alberto Delazaro           | 2            | 6            | 1        | 0      | 29/8/2003   | 8,67  |
| 11  | Olindo Basso                    | 2            | 5            | 0        |        | 15/3/1998   | 8,70  |
| 12  | Benedito Rodrigues              | 2            | 2            | 0        |        | 16/7/2001   | 8,73  |
| 13  | Artur Guamieri                  | 1            |              | 0        |        | 30/3/1999   | 8,77  |
| 14  | Marcia Aparecida de Moura       | 1            | 5            | 1        | 1,2    | 28/5/2003   | 9,10  |
| 15  | Jose Barbosa da Silva           | 2            | 2            | 2        | 0,5    | 22/3/2000   | 9,13  |
| 16  | Geraldo Guimarães               |              |              | 0        |        | 6/7/1996    | 9,20  |
| 17  | Waldir de Campos Barros         | 2            |              | 0        |        | 29/12/2000  | 9,57  |
| 18  | Plinio Figueiredo               | 1            | 6            | 3        |        | 7/7/2000    | 9,70  |
| 19  | Alceu Paulo Squillanti          |              |              | 0        |        | 3/10/2002   | 10,07 |
| 20  | Aurelino Santana                |              | 5            | 0        |        | 25/5/1998   | 10,60 |
| 21  | Lydia Carvalho Policastro       | 2            | 1            | 1        | 4      | 14/4/2006   | 11,00 |
| 22  | Yara Rodrigues                  | 1            | 2            | 0        |        | 20/4/2003   | 12,17 |
| 23  | Cicero Candido de Almeida       | 2            | 1            | 3        |        | 2/10/2006   | 12,57 |
| 24  | Geraldo Duarte Sena             | 2            | 2            | 1        | 7,1    | 29/5/2003   | 12,87 |
| 25  | Antonio Grasso                  |              | 32           | 0        |        | 27/12/1997  | 12,97 |
| 26  | Estelita Santos Ramos           |              | 2            | 0        |        | 3/9/1996    | 13,10 |
| 27  | Dirlene Conceição Meireles      | 1            | 2            | 1        | 1      | 20/2/2000   | 13,20 |
| 28  | Renato Sequelini                | 1            | 4            | 2        | 5      | 5/11/2000   | 14,07 |
| 29  | Andrea Aguiar de Arruda Botelho |              | 63           | 1        | 11     | 18/6/1996   | 14,27 |
| 30  | Jose Meneguides dos Santos      | 2            | 2,4          | 1        | 2      | 19/5/1995   | 14,30 |
| 31  | Nélio Gaia                      | 2            |              | 1        | 3      | 24/3/1994   | 15,27 |
| 32  | Alcides das Neves               |              | 3            | 1        | 0      | 10/5/2004   | 15,40 |
| 33  | Carlos Roberto Perez            | 1            | 1            | 1        | 1      | 24/12/2003  | 16,17 |
| 34  | Alaor Soares                    |              |              | 1        | 8      | 1/7/1998    | 17,73 |
| 35  | Suzana do Céu M. Gomes          | 2            | 5            | 0        |        | 16/9/2003   | 20,27 |

**CONT. Anexo 4 – Banco de Dados**

6/10

| Num | Nome                           | rxqt conc | Complicações | Recidiva | Orgãos | Proservação | FUP   |
|-----|--------------------------------|-----------|--------------|----------|--------|-------------|-------|
| 36  | Augusta de Oliveira Rosa       |           |              | 0        |        | 27/3/1999   | 20,77 |
| 37  | Manuel Fernandes C. Barros     |           |              | 1        | 1      | 9/9/1995    | 21,17 |
| 38  | João Ivananskas                |           |              | 0        |        | 30/3/2000   | 21,27 |
| 39  | Antero dos Santos              |           |              | 1        | 2      | 4/11/2002   | 21,37 |
| 40  | Isabel Novellis de Oliveira    | 2         | 1            | 0        |        | 28/9/2006   | 23,93 |
| 41  | Eugenio Ronato                 | 2         | 2            | 1        | 2      | 5/12/1998   | 24,13 |
| 42  | Alice Cecília Pereira          | 2         | 1            | 1        | 2      | 24/7/2006   | 24,40 |
| 43  | Luiz Antonio da Silva          | 2         |              | 0        |        | 5/1/2000    | 24,57 |
| 44  | Wilhelmus Albertus Hendricus   | 2         | 1            | 1        | 0      | 2/10/2006   | 24,70 |
| 45  | Cesar Augusto Florenzano       | 2         | 2            | 0        |        | 20/1/2002   | 25,17 |
| 46  | Jorge Bauab                    | 2         |              | 1        | 1,2    | 21/5/2004   | 27,07 |
| 47  | Marco Antonio de O. Rodrigues  | 1         | 6            | 0        |        | 2/4/2004    | 28,53 |
| 48  | Antonio Teles Rocha            | 2         | 25           | 0        |        | 21/12/2001  | 28,60 |
| 49  | Nelson Valle                   | 1         | 2            | 0        |        | 22/7/2006   | 29,03 |
| 50  | Orélio Simão                   |           |              | 0        |        | 12/5/1999   | 33,83 |
| 51  | Milton Antonio Silva           |           |              | 1        | 1,2    | 13/4/2003   | 34,93 |
| 52  | Lucia Elisa Sotomaior Bezerra  |           | 1            | 3        |        | 19/4/2006   | 35,53 |
| 53  | Nevio Centurioni               |           | 1            | 3        |        | 6/6/2006    | 36,33 |
| 54  | Antonio Puglia                 | 2         | 2            | 1        | 2      | 17/9/2004   | 36,53 |
| 55  | Olivia Duarte Lima             | 1         |              | 0        |        | 17/1/2001   | 37,37 |
| 56  | Wilson Paula Andrade           |           |              | 0        |        | 11/8/1995   | 38,37 |
| 57  | Dalila Naufal                  |           | 1            | 3        |        | 29/4/2006   | 38,67 |
| 58  | Paulo P Damasio dos santos     | 2         | 1            | 3        |        | 16/8/2006   | 40,90 |
| 59  | Maria Madalena Beloni          | 1         | 1            | 0        |        | 27/9/2006   | 41,23 |
| 60  | Jamil de Almeida               | 2         |              | 0        |        | 30/6/2004   | 42,00 |
| 61  | Waldemar Gonçalves de Oliveira | 2         | 1            | 3        |        | 1/10/2005   | 42,27 |
| 62  | Margarida Maria Medeiros       | 2         | 1            | 1        | 13     | 27/9/2006   | 45,20 |
| 63  | Verissimo Edgar Giehl          | 2         |              | 1        | 1      | 7/6/2000    | 52,23 |
| 64  | Francisco Lopes da Silva       | 2         | 2            | 3        |        | 30/6/2004   | 62,07 |



| Num | Nome                            | Estado atual | Causa MOC         | numero do ap | Histologia | histo rev | Grau |
|-----|---------------------------------|--------------|-------------------|--------------|------------|-----------|------|
| 1   | Felipa M R de rocabado          | 3            |                   | 00336227     | ADC        | 1         | III  |
| 2   | Julio Ferreira da Costa         | 3            |                   | 00340260     | CEC        | 2         | III  |
| 3   | Wi Suk Kim                      | 3            |                   | b98-7466     | CEC        | 2         | III  |
| 4   | Seiichi Iwamoto                 | 3            |                   | 00335321     | CGC        | 3         | III  |
| 5   | Sebastião Alves                 | 3            |                   | BA0-08334    | CEC        | 2         | II   |
| 6   | Aparecida Martins Rubbo         | 3            |                   | 00339138     | ADC        | 1         | II   |
| 7   | Claudio Louveiro Nadagi         | 4            | ABSCESSO PULMONAR | b/98-04680   | CEC        | 2         | II   |
| 8   | Afonso Feliciano da silva       | 3            |                   | BAO-03538    | CEC        | 2         | I    |
| 9   | Gustavo Oliveira Campos         | 3            |                   | 00326861     | CEC        | 2         | III  |
| 10  | Joao Alberto Delazaro           | 3            |                   | BA3-5298     | CEC        | 2         | I    |
| 11  | Olindo Basso                    | 3            |                   | b97-1149     | CEC        | 2         | II   |
| 12  | Benedito Rodrigues              | 3            |                   | BAO-07477    | CEC        | 2         | I    |
| 13  | Artur Guamieri                  | 3            |                   | b98-3684     | CEC        | 2         | III  |
| 14  | Marcia Aparecida de Moura       | 3            |                   | BA02-008048  | CEC        | 2         | II   |
| 15  | Jose Barbosa da Silva           | 3            |                   | b99-02927    | CEC        | 2         | I    |
| 16  | Geraldo Guimarães               | 3            |                   | 328095       | CEC        | 2         | II   |
| 17  | Waldir de Campos Barros         | 3            |                   | BAO-00795    | ADC        | 1         | III  |
| 18  | Plinio Figueiredo               | 4            | PNEUMONIA         | b99-06570    | CEC        | 2         | III  |
| 19  | Alceu Paulo Squillanti          | 3            |                   | ba1-09938    | CEC        | 2         | I    |
| 20  | Aurelino Santana                | 3            |                   | B97-03533    | CEC        | 2         | II   |
| 21  | Lydia Carvalho Policastro       | 3            |                   | BA4-1540     | CEC        | 2         | III  |
| 22  | Yara Rodrigues                  | 3            |                   | BA02-008805  | CEC        | 2         | II   |
| 23  | Cicero Candido de Almeida       | 1            |                   | BA5-8087     | CGC        | 3         | III  |
| 24  | Geraldo Duarte Sena             | 3            |                   | BA02-003667  | ADC        | 1         | III  |
| 25  | Antonio Grasso                  | 3            |                   | 00340083     | CEC        | 2         | I    |
| 26  | Estelita Santos Ramos           | 3            |                   | 325425       | CEC        | 2         | II   |
| 27  | Dirlene Conceição Meireles      | 3            |                   | b98-9352     | ADC        | 1         | SOE  |
| 28  | Renato Sequelini                | 3            |                   | b99-6430     | CEC        | 2         | III  |
| 29  | Andrea Aguiar de Arruda Botelho | 3            |                   | 327266       | CEC        | 2         | III  |
| 30  | Jose Meneguides dos Santos      | 3            |                   | 00310107     | CEC        | 2         | I    |
| 31  | Nélio Gaia                      | 3            |                   | 00299478     | ADC        | 1         | II   |
| 32  | Alcides das Neves               | 3            |                   | BA3-0966     | CGC        | 3         | III  |
| 33  | Carlos Roberto Perez            | 3            |                   | BA3-142      | CAE*       | 1         | II   |
| 34  | Alaor Soares                    | 3            |                   | b97-04486    | CEC        | 2         | III  |

| Num | Nome                           | Estado atual | Causa MOC | numero do ap | Histologia | histo rev | Grau |
|-----|--------------------------------|--------------|-----------|--------------|------------|-----------|------|
| 35  | Suzana do Céu M. Gomes         | 3            |           | ba1-11289    | ADC        | 1         | SOE  |
| 36  | Augusta de Oliveira Rosa       | 3            |           | b97-3946     | CEC        | 2         | III  |
| 37  | Manuel Fernandes C. Barros     | 3            |           | 00307185     | CEC*       | 2         | II   |
| 38  | João Ivananskas                | 3            |           | b98-4159     | CEC        | 2         | I    |
| 39  | Antero dos Santos              | 3            |           | ba0-09762    | CEC        | 2         | I    |
| 40  | Isabel Novellis de Oliveira    | 2            |           | BA4-7511     | ADC        | 1         | I    |
| 41  | Eugenio Ronato                 | 3            |           | 00339352     | ADC        | 1         | I    |
| 42  | Alice Cecília Pereira          | 3            |           | BA4-05022    | CEC        | 2         | III  |
| 43  | Luiz Antonio da Silva          | 3            |           | b99-08828    | CEC        | 2         | II   |
| 44  | Wilhelmus Albertus Hendricus   | 2            |           | BA4-7724     | CGC        | 3         | III  |
| 45  | Cesar Augusto Florenzano       | 3            |           | b99-09368    | CGC        | 3         | III  |
| 46  | Jorge Bauab                    | 3            |           | BA2-1033     | CEC        | 2         | III  |
| 47  | Marco Antonio de O. Rodrigues  | 3            |           | CA1-08671    | CEC        | 2         | -    |
| 48  | Antonio Teles Rocha            | 3            |           | b99-05198    | CEC        | 2         | III  |
| 49  | Nelson Valle                   | 3            |           | BA4- 430A    | CEC        | 2         | III  |
| 50  | Orélio Simão                   | 3            |           | b99-00165    | CEC        | 2         | I    |
| 51  | Milton Antonio Silva           | 3            |           | BA0-02488    | ADC        | 1         | I    |
| 52  | Lucia Elisa Sotomaior Bezerra  | 1            |           | BA3-4471     | ADC        | 1         | I    |
| 53  | Nevio Centurioni               | 1            |           | BA3-5551     | ADC        | 1         | II   |
| 54  | Antonio Puglia                 | 3            |           | BA0-07748    | CEC        | 2         | III  |
| 55  | Olivia Duarte Lima             | 3            |           | B99-08305    | CEC        | 2         | II   |
| 56  | Wilson Paula Andrade           | 3            |           | 00291956     | ADC        | 1         | II   |
| 57  | Dalila Naufal                  | 1            |           | BA3-1677     | ADC        | 1         | II   |
| 58  | Paulo P Damasio dos santos     | 1            |           | BA3-2438     | CEC        | 2         | III  |
| 59  | Maria Madalena Beloni          | 2            |           | BA03-5987    | ADC        | 1         | II   |
| 60  | Jamil de Almeida               | 2            |           | BA0-10816    | CEC        | 2         | III  |
| 61  | Waldemar Gonçalves de Oliveira | 1            |           | BA2-2603     | CEC        | 2         | II   |
| 62  | Margarida Maria Medeiros       | 2            |           | BA3- 0381    | ADC        | 1         | I    |
| 63  | Verissimo Edgar Giehl          | 3            |           | b97-00867    | CEC        | 2         | III  |
| 64  | Francisco Lopes da Silva       | 1            |           | b98-08821    | CEC        | 2         | II   |

| Num | Nome                            | p53 % | c-erbB2 | pRb     | EGFR | p21     | p27     |
|-----|---------------------------------|-------|---------|---------|------|---------|---------|
| 1   | Felipa M R de rocabado          | 34    | 1       | 0       | 0    | 23      | 0       |
| 2   | Julio Ferreira da Costa         | 0     | 0       | 13      | 0    | 23      | 0       |
| 3   | Wi Suk Kim                      | 11    | 0       | 11      | 0    | 0       | 0       |
| 4   | Seiichi Iwamoto                 | 0     | 0       | 22      | 0    | 22      | 0       |
| 5   | Sebastião Alves                 | 22    | 0       | 34      | 0    | 23      | 11      |
| 6   | Aparecida Martins Rubbo         | 22    | 1       | 11      | 0    | 11      | 11      |
| 7   | Claudio Louveiro Nadagi         | 22    | 0       | 33      | 0    | 23      | 0       |
| 8   | Afonso Feliciano da silva       | 32    | 0       | 34      | 0    | 22      | 11      |
| 9   | Gustavo Oliveira Campos         | 34    | 0       | 34      | 0    | 23      | 22      |
| 10  | Joao Alberto Delazaro           | 24    | 0       | 22      | 3    | 33      | 0       |
| 11  | Olindo Basso                    | 31    | 0       | 32      | 0    | 0       | 0       |
| 12  | Benedito Rodrigues              | 42    | 0       | 34      | 0    | 23      | 11      |
| 13  | Artur Guamieri                  | 11    | 0       | 23      | 0    | 23      | 0       |
| 14  | Marcia Aparecida de Moura       | 11    | 0       | 32      | 0    | 13      | 11      |
| 15  | Jose Barbosa da Silva           | 24    | 0       | missing | 0    | missing | missing |
| 16  | Geraldo Guimarães               | 32    | 0       | 34      | 0    | 33      | 0       |
| 17  | Waldir de Campos Barros         | 22    | 0       | 0       | 0    | 11      | 22      |
| 18  | Plinio Figueiredo               | 0     | 0       | 33      | 0    | 34      | 0       |
| 19  | Alceu Paulo Squillanti          | 22    | 0       | 33      | 0    | 24      | 21      |
| 20  | Aurelino Santana                | 34    | 1       | 22      | 0    | 12      | 0       |
| 21  | Lydia Carvalho Policastro       | 44    | 0       | missing | 0    | missing | missing |
| 22  | Yara Rodrigues                  | 22    | 0       | 0       | 0    | 0       | 0       |
| 23  | Cicero Candido de Almeida       | 32    | 1       | 0       | 0    | missing | missing |
| 24  | Geraldo Duarte Sena             | 0     | 0       | 0       | 0    | 0       | 0       |
| 25  | Antonio Grasso                  | 0     | 0       | 24      | 1    | 34      | 23      |
| 26  | Estelita Santos Ramos           | 21    | 0       | 11      | 0    | 33      | 21      |
| 27  | Dirlene Conceição Meireles      | 0     | 0       | 0       | 0    | 21      | 0       |
| 28  | Renato Sequelini                | 33    | 0       | 22      | 0    | 13      | 11      |
| 29  | Andrea Aguiar de Arruda Botelho | 43    | 0       | 22      | 0    | 22      | 0       |
| 30  | Jose Meneguides dos Santos      | 0     | 0       | 34      | 0    | 23      | 21      |
| 31  | Nélio Gaia                      | 44    | 0       | 34      | 0    | 22      | 11      |
| 32  | Alcides das Neves               | 11    | 1       | 0       | 0    | 23      | 0       |
| 33  | Carlos Roberto Perezoz          | 34    | 0       | 23      | 0    | 0       | 0       |
| 34  | Alaor Soares                    | 44    | 0       | 0       | 0    | 13      | 21      |
| 35  | Suzana do Céu M. Gomes          | 22    | 1       | 34      | 0    | 23      | 13      |
| 36  | Augusta de Oliveira Rosa        | 44    | 0       | 12      | 0    | 13      | 0       |

**CONT. Anexo 4 – Banco de Dados**

10/10

| Num | Nome                           | p53 % | c-erbB2 | pRb     | EGFR | p21     | p27     |
|-----|--------------------------------|-------|---------|---------|------|---------|---------|
| 37  | Manuel Fernandes C. Barros     | 0     | 0       | 0       | 0    | 24      | 22      |
| 38  | João Ivananskas                | 34    | 1       | 34      | 0    | 23      | 22      |
| 39  | Antero dos Santos              | 33    | 3       | 23      | 0    | 21      | 22      |
| 40  | Isabel Novellis de Oliveira    | 34    | 1       | 11      | 0    | 13      | 0       |
| 41  | Eugenio Ronato                 | 22    | 1       | 22      | 0    | 12      | 0       |
| 42  | Alice Cecília Pereira          | 44    | 0       | 12      | 0    | 22      | 11      |
| 43  | Luiz Antonio da Silva          | 44    | 1       | missing | 0    | missing | missing |
| 44  | Wilhelmus Albertus Hendricus   | 33    | 0       | 32      | 0    | 22      | 0       |
| 45  | Cesar Augusto Florenzano       | 34    | 1       | missing | 0    | 11      | 11      |
| 46  | Jorge Bauab                    | 21    | 0       | 34      | 0    | 22      | 0       |
| 47  | Marco Antonio de O. Rodrigues  | 0     | 0       | 0       | 0    | 0       | 0       |
| 48  | Antonio Teles Rocha            | 22    | 0       | 0       | 0    | 22      | 21      |
| 49  | Nelson Valle                   | 34    | 1       | 22      | 0    | 24      | 11      |
| 50  | Orélio Simão                   | 32    | 0       | 44      | 0    | 34      | 23      |
| 51  | Milton Antonio Silva           | 44    | 0       | 33      | 0    | 0       | 21      |
| 52  | Lucia Elisa Sotomaior Bezerra  | 11    | 1       | 23      | 0    | 14      | 0       |
| 53  | Nevio Centurioni               | 34    | 1       | 11      | 0    | 12      | 0       |
| 54  | Antonio Puglia                 | 34    | 0       | 23      | 0    | 24      | 0       |
| 55  | Olivia Duarte Lima             | 34    | 0       | 33      | 0    | 23      | 22      |
| 56  | Wilson Paula Andrade           | 32    | 0       | 33      | 0    | 13      | 22      |
| 57  | Dalila Naufal                  | 34    | 1       | 22      | 0    | 0       | 12      |
| 58  | Paulo P Damasio dos santos     | 0     | 0       | missing | 0    | missing | missing |
| 59  | Maria Madalena Beloni          | 11    | 1       | 11      | 0    | 0       | 0       |
| 60  | Jamil de Almeida               | 21    | 0       | 11      | 0    | 11      | 21      |
| 61  | Waldemar Gonçalves de Oliveira | 33    | 0       | 23      | 0    | 0       | 0       |
| 62  | Margarida Maria Medeiros       | 33    | 0       | 23      | 0    | 0       | 0       |
| 63  | Verissimo Edgar Giehl          | 44    | 1       | 33      | 0    | 0       | 0       |
| 64  | Francisco Lopes da Silva       | 21    | 0       | 22      | 0    | 22      | 0       |