

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS  
CD74, TGFB1 E TGFB2 EM TUMORES DE PULMÃO  
DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS OPERADOS E  
CORRELAÇÃO COM EVOLUÇÃO CLÍNICA**

**MILTON JOSÉ DE BARROS E SILVA**

**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: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro  
de Lima**

**São Paulo**

**2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Milton José de Barros

**Avaliação da expressão das proteínas CD74, TGFB1 e TGFB2 em tumores de pulmão de células não-pequenas operados e correlação com evolução clínica** / Milton José de Barros e Silva – São Paulo, 2011.

94p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Jefferson Luiz Gross

Descritores: 1. NEOPLASIAS PULMONARES. 2. CÂNCER DO PULMÃO. 3. CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS. 4. IMUNOISTOQUÍMICA. 5. PROGNÓSTICO.

## **DEDICATÓRIA**

À Deus, que nunca faltou em minha vida.

Ao meu pai, Reinaldo, pelo exemplo de vida, honestidade, humildade e profissionalismo, no qual me espelho.

Às minhas queridas irmãs, Morgana e Ana Luiza, e ao meu sobrinho, Bruno, que tanto os amo.

Aos meus inesquecíveis avós: Milton, Nair, Olinto e Stela.

À todos os pacientes que padecem ou padeceram de câncer.

E, em especial, à minha mãe, Zuila, a luz da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Jefferson Luiz Gross, não apenas pela orientação, mas pelo incentivo, apoio, confiança e sobretudo pelo exemplo de pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima, a quem tenho o prazer de trabalhar diariamente. Uma pessoa apaixonada pela ciência e um amigo verdadeiro.

Ao professor Doutor Fernando Augusto Soares, sempre solícito em contribuir e apoiar todos os pós-graduandos desta instituição

Ao Dr. Clóvis Pinto, pela imensurável ajuda com a leitura das lâminas. Trabalho árduo, transformado em prazer.

À todos do Departamento da Cirurgia Torácica do A.C. Camargo, pelo apoio e disponibilização dos dados.

À Andréia Cristina de Melo e ao Dr. Carlos Gil, do Instituto Nacional do Câncer, que gentilmente se disponibilizaram a colaborar com esse estudo.

Ao colega de profissão e amigo Wilson Luiz, pelo apoio e ajuda inestimável com as análises estatísticas.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia patológica, em especial ao Sr. Severino e Sra. Sueli pela dedicação e apoio.

À Suely Francisco, coordenadora da Biblioteca, pelo carinho, paciência e competência que me recebeu no momento final deste estudo.

Às funcionárias da pós-graduação: Ana Kurinari, Luciana e Vanuza. Pessoas comprometidas com a qualidade desta pós-graduação.

Ao meu Tio, Luiz Carlos, que me despertou para a vocação da medicina.

Ao meu professor de semiologia e amigo, Dr. Vicente Vaz, que durante minha formação acadêmica me mostrou os caminhos da ética, profissionalismo e amor ao paciente. Um eterno incentivador.

À meu Chefe da Residência de Clínica Médica e amigo, Prof. Dr. Renato Lopes, que me apoiou e incentivou desde o primeiro dia em São Paulo até os dias de hoje. Um exemplo de que as barreiras são feitas para serem quebradas. Um apaixonado pela Clínica Médica.

Ao meu amigo Dr. Edílson Diógenes, preceptor em várias esferas da minha vida.

À Roberto Levi, homem com quem pouco convivi, mas muito admiro.

À Regina Jales, por tudo que representou e representa na minha vida.

À minha amiga, Cibele Lamonica e sua família, representantes do amor, da amizade e da força de viver.

À minha amiga, Ana Carolina Sígolo Levy. Pessoa de coração puro. Amiga de todas as horas.

Aos meus queridos amigos que compartilham as minhas alegrias e angústias: Rogério Guedes, Marco Cezário, Ricardo Alexandre, José Francisco, Romero Nery, Carlos Carvalho, Felipe Lopes, André Molina e Héber Salvador. Tenho a sorte de poder ser amigo de vocês.

À todos que fazem parte da Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo. Os colegas do Departamento, em especial Ulisses, Celso, Aldo, Tadeu e Carlos Frederico que sempre estiveram ao meu lado durante os momentos difíceis. Aos residentes, a quem tanto estimo. Aos funcionários, em especial Márcia, Vanessa e Aline, pessoas maravilhosas, que sentem prazer em ajudar o próximo. Ao Dr. Marcello Fanelli, que dirige o Departamento com maestria. Exemplo de competência, de conciliação e de visão.

Aos meus pacientes, que mesmo durante os seus padecimentos, me questionavam pelo andamento do meu mestrado e me davam incentivo, muitas vezes me mandando ir pra casa estudar.

À todos vocês o meu muito obrigado.

## RESUMO

Silva MJB. **Avaliação da expressão das proteínas CD74, TGFB1 e TGFB2 em tumores de pulmão de células não-pequenas operados e correlação com evolução clínica.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** O câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) é um problema de saúde mundial pela alta frequência e mortalidade. A cirurgia permanece como principal modalidade curativa, empregada apenas nos estádios iniciais. Apesar da ressecção curativa e do tratamento adjuvante, grande parte dos pacientes irá apresentar recidiva da doença, mesmo nos estádios iniciais. Recentemente estudos têm demonstrado que aspectos relacionados com o processo inflamatório se correlacionam com a evolução das neoplasias. O CD74, TGFB1 e B2 exercem papel fundamental na regulação do processo inflamatório. **Objetivos:** Avaliar a marcação de CD74, TGFB1 e B2 no tumor e estroma, e correlacionar com dados clínico-patológicos e de evolução em pacientes com CPCNP operados. **Material e métodos:** 129 Pacientes com CPCNP não-metastáticos, operados, sem terapia prévia e com disponibilidade de material anatomopatológico e de evolução clínica foram avaliados através de imunoistoquímica para CD74, TGFB1 e TGFB2 no tumor e estroma tumoral. Os casos foram analisados de acordo com a intensidade e percentagem de células positivas. As análises estatísticas entre as variáveis foram realizadas de acordo pelo método de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida global(SG) e livre de recidiva(SLR) foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier, e a comparação entre elas foi feita através do teste de Log-rank. Na análise multivariada para sobrevida, usou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox. **Resultados:** A marcação de CD74 em mais de 50% das células, quando avaliada no tumor, se correlacionou com melhor sobrevida livre de recidiva (SLR em 3 anos: 93,3% x 67,8%,  $p=0,018$ ) e se

associou de forma significativa com sexo feminino ( $p=0,003$ ), não-tabagistas ( $p=0,019$ ), tipos histológicos adenocarcinoma e bronquíolo-alveolar ( $p=0,001$ ) e estágio I ( $p=0,001$ ), fatores sabidamente de bom prognóstico. Nesse estudo TGFB1 e TGFB2 não se correlacionaram com SLR e SG. Na análise multivariada para SLR apenas o estágio patológico permaneceu como variável independente. Na análise multivariada para SG, estágio e idade se mostraram como variáveis independentes. **Conclusão:** Acreditamos que o CD74 tenha um papel importante na biologia do CPCNP inicial e sua interação com o hospedeiro, embora precisemos esclarecer melhor o seu significado, tanto pela avaliação da expressão de moléculas coadjuvantes e reguladoras (MIF, CD44), quanto pela melhor caracterização do microambiente celular onde estamos observando esta expressão.

## SUMMARY

Silva MJB. **[CD74, TGFB1 and TGFB2 protein expression analysis in resected non-small cell lung cancer and its correlation with clinical outcomes]**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Background:** Non-small cell lung cancer(NSCLC) is a worldwide health problem for high frequency and mortality. Surgery remains the main curative option, offered only in the early stages. In spite of curative resection and adjuvant therapy, most patients will relapse, even in the early stages. Surgery remains the main curative option, offered only in the early stages. In spite of curative resection and adjuvant therapy, most patients will relapse, even in the early stages. Recently, studies have shown that aspects of the inflammatory process can influence the behavior of tumors. The CD74, TGFB1 and B2 play a key role in regulating the inflammatory process.

**Objectives:** To evaluate the expression of CD74, TGFB1 and B2 in tumor and stroma, and correlate with clinical and pathological outcomes in patients with NSCLC who underwent curative resection.

**Material and methods:** One hundred twenty-nine patients with non metastatic NSCLC operated without prior therapy and with availability of pathological material and clinical outcome were evaluated by immunohistochemistry for CD74, TGFB1 and TGFB2 in tumor and stroma. Cases were analyzed according to the intensity and percentage of positive cells. Statistical analysis between variables were performed according the method of Chi-square or Fisher's exact test. The curves of overall survival (OS) and relapse-free (RFS) were analyzed by the Kaplan-Meier method and comparison between them was done using the Log-rank test. In multivariate analysis for survival, we used the proportional hazards model of Cox.

**Results:** The positivity of CD74 in more than 50% of the cells, when evaluated in the tumor, correlated with better relapse-free survival (RFS, 3 years: 93.3% vs. 67.8%,  $p = 0.018$ ) and was associated

significantly with sex ( $p = 0.003$ ), nonsmokers ( $p = 0.019$ ), bronchioloalveolar and adenocarcinoma histologic types ( $p = 0.001$ ) and stage I ( $p = 0.001$ ), factors known to be of good prognosis. In this study TGFB1 and TGFB2 did not correlate with OS and RFS. In multivariate analysis for RFS only pathological stage proved to be as independent variable. In multivariate analysis for OS, pathological stage and age were independent factors.

**Conclusion:** We believe that CD74 has an important role in the biology of NSCLC and its initial interaction with the host, although we need to further clarify its meaning, both by evaluating the expression of supporting and regulating molecules (MIF, CD44). We also need a better characterization of the microenvironment where we are observing this expression.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                       |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Marcação por imunoistoquímica para CD74 no tumor.....                                                                                 | 42 |
| <b>Figura 2</b> | Marcação por imunoistoquímica para CD74 no estroma.....                                                                               | 42 |
| <b>Figura 3</b> | Marcação por imunoistoquímica para TGFB1 e 2 no tumor...                                                                              | 43 |
| <b>Figura 4</b> | Marcação por imunoistoquímica para TGFB1 e 2 no estroma.....                                                                          | 43 |
| <b>Figura 5</b> | Estadiamento agrupado e sobrevida livre de recidiva.....                                                                              | 64 |
| <b>Figura 6</b> | Sobrevida livre de recidiva e marcação para CD74 nas células tumorais avaliada em marcação maior ou menor do que 50% das células..... | 65 |
| <b>Figura 7</b> | SLR e marcação para CD74 nas células tumorais avaliada em marcação maior ou menor do que 50% das células apenas no estágio I.....     | 66 |
| <b>Figura 8</b> | Sobrevida global para pacientes com CPCNP não estratificada para nenhuma variável estudada.....                                       | 68 |
| <b>Figura 9</b> | Sobrevida global e marcação para CD74 nas células tumorais avaliada em marcação maior ou menor do que 50% das células.....            | 73 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Gradação da reação imunoistoquímica quanto à Intensidade                                       | 28 |
| <b>Tabela 2</b>  | Gradação da reação imunoistoquímica quanto ao número de células coradas.....                   | 28 |
| <b>Tabela 3</b>  | Gradação da reação imunoistoquímica quanto ao número de células coradas.....                   | 28 |
| <b>Tabela 4</b>  | Características dos dados clínico-patológicos.....                                             | 32 |
| <b>Tabela 5</b>  | Padrão de expressão de CD74.....                                                               | 35 |
| <b>Tabela 6</b>  | Padrão de expressão de TGFB1.....                                                              | 38 |
| <b>Tabela 7</b>  | Padrão de expressão de TGFB2.....                                                              | 41 |
| <b>Tabela 8</b>  | Intensidade de marcação CD74 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.....      | 43 |
| <b>Tabela 9</b>  | Percentagem CD74 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.....                  | 46 |
| <b>Tabela 10</b> | Intensidade de marcação de CD74 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas..... | 47 |
| <b>Tabela 11</b> | Percentagem CD74 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.....                | 48 |
| <b>Tabela 12</b> | Intensidade de marcação TGFB1 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.....     | 50 |

|                  |                                                                                                 |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 13</b> | Percentagem TGFB1 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.....                  | 51 |
| <b>Tabela 14</b> | Intensidade de marcação TGFB1 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.....    | 52 |
| <b>Tabela 15</b> | Percentagem TGFB1 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.....                | 53 |
| <b>Tabela 16</b> | Intensidade de marcação de TGFB2 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.....   | 55 |
| <b>Tabela 17</b> | Percentagem TGFB2 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.....                  | 56 |
| <b>Tabela 18</b> | Intensidade de marcação de TGFB2 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas..... | 57 |
| <b>Tabela 19</b> | Percentagem TGFB2 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.....                | 58 |
| <b>Tabela 20</b> | Análise univariada para sobrevida livre de recidiva.....                                        | 60 |
| <b>Tabela 21</b> | Análise multivariada para sobrevida livre de recidiva.....                                      | 67 |
| <b>Tabela 22</b> | Análise univariada para sobrevida global.....                                                   | 70 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>AC</b>     | Anticorpo                                                            |
| <b>AJCC</b>   | Do inglês, <i>American Joint Comitte on Cancer</i>                   |
| <b>CPCNP</b>  | Câncer de Pulmão de células não-pequenas                             |
| <b>DC</b>     | Do inglês, <i>Dendritic Cell</i> . Células Dendríticas               |
| <b>DPOC</b>   | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica                                   |
| <b>EGF</b>    | Do inglês, <i>Epidermal Growth Factor</i>                            |
| <b>EGFR</b>   | Do inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>                   |
| <b>FGF</b>    | Do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i>                           |
| <b>GM-CS</b>  | Do inglês, <i>Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor</i> |
| <b>HIV</b>    | Do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>                       |
| <b>IDO</b>    | Indolamina 2,3-dioxigenase                                           |
| <b>IFN</b>    | Interferon                                                           |
| <b>IHQ</b>    | Imunoistoquímica                                                     |
| <b>IL</b>     | Interleucina                                                         |
| <b>KGF</b>    | Do inglês, <i>Keratinocyte Growth Factor</i>                         |
| <b>MCP-1</b>  | Do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>                 |
| <b>M-CSF</b>  | Do inglês, <i>Macrophage - Colony Stimulating Factor</i>             |
| <b>MHC</b>    | Complexo Principal de Histocompatibilidade                           |
| <b>MIF</b>    | Do inglês, <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>             |
| <b>MIP</b>    | Do inglês, <i>Macrophage inflammatory protein</i>                    |
| <b>MMPs</b>   | Do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>                           |
| <b>PDGF</b>   | Do inglês, <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>                     |
| <b>PET-CT</b> | Do inglês, <i>Positron Emission Tomography</i>                       |
| <b>PGE2</b>   | Do inglês, <i>Prostaglandin E2</i>                                   |
| <b>PRRs</b>   | Do inglês, <i>Pattern Recognition Receptors</i>                      |
| <b>RT-PCR</b> | Do inglês, <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>  |
| <b>SG</b>     | Sobrevida Global                                                     |
| <b>SLR</b>    | Sobrevida Livre de Recidiva                                          |
| <b>TAM</b>    | Do inglês, <i>Tumor Associated Macrophage</i>                        |

|              |                                                            |
|--------------|------------------------------------------------------------|
| <b>TGF</b>   | Do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i>               |
| <b>TGFBR</b> | Do inglês, <i>Transforming Growth Factor Beta Receptor</i> |
| <b>TILs</b>  | Do inglês, <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>           |
| <b>TLR4</b>  | Do inglês, <i>Toll-Like Receptor 4</i>                     |
| <b>TNFA</b>  | Do inglês, <i>Tumor Necrosis factor A</i>                  |
| <b>TMA</b>   | Do inglês, <i>Tissue Microarray</i>                        |
| <b>VCAM1</b> | Do inglês, <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>        |
| <b>VEGFA</b> | Do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>     |

## ÍNDICE

|          |                                                                                         |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1      | Câncer de pulmão de células não-pequenas .....                                          | 1         |
| 1.2      | Inflamação e Câncer .....                                                               | 2         |
| 1.3      | Câncer de pulmão células não-pequenas e inflamação .....                                | 13        |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA.....</b>                                                               | <b>22</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                  | <b>23</b> |
| <b>4</b> | <b>PACIENTES E MÉTODO .....</b>                                                         | <b>24</b> |
| 4.1      | Característica do estudo.....                                                           | 24        |
| 4.2      | População do estudo .....                                                               | 24        |
| 4.3      | Critérios de seleção .....                                                              | 25        |
| 4.4      | Realização das reações de Imunoistoquímicas.....                                        | 25        |
| 4.5      | Análise Estatística .....                                                               | 29        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                  | <b>30</b> |
| 5.1      | Caracterização da amostra e correlação com parâmetros clínicos .....                    | 30        |
| 5.2      | Resultado da avaliação Imunoistoquímica para CD74 .....                                 | 33        |
| 5.3      | Resultado da avaliação Imunoistoquímica para TGFB1.....                                 | 36        |
| 5.4      | Resultado da avaliação Imunoistoquímica para TGFB2.....                                 | 39        |
| 5.5      | Resultado da expressão de cd74 e associação com variáveis clínico-<br>Patológicas ..... | 44        |
| 5.6      | Resultado da expressão de TGFB1 e associação com variáveis<br>clínico-patológicas ..... | 49        |
| 5.7      | Resultado da expressão de TGFB2 e associação com variáveis<br>clínico-patológicas ..... | 55        |
| 5.8      | Resultado da sobrevida .....                                                            | 59        |
| 5.8.1    | Análise para Sobrevida Livre de Recidiva .....                                          | 59        |

|          |                                                             |           |
|----------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.8.2    | Análise Univariada para Sobrevida Livre de Recidiva .....   | 59        |
| 5.8.3    | Análise Multivariada para Sobrevida Livre de Recidiva ..... | 67        |
| 5.8.4    | Resultado da Sobrevida Global .....                         | 67        |
| 5.8.5    | Análise Univariada para Sobrevida Global .....              | 68        |
| 5.8.6    | Análise Multivariada para Sobrevida Global .....            | 74        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                      | <b>75</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                     | <b>86</b> |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                     | <b>87</b> |

## **ANEXO**

### **Anexo 1      Ficha de Coleta de Dados**

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS**

A importância de estudar o câncer de pulmão vem crescendo ao longo das últimas décadas. Desde 1985 o câncer de pulmão é a neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em todo o mundo (excetuando-se os tumores de pele não-melanoma), com mais de 1 milhão de casos diagnosticados anualmente, e além da sua alta incidência, possui elevada taxa de mortalidade, sendo o líder de morte relacionada ao câncer em ambos os sexos (JEMAL et al. 2009). O câncer de pulmão é representado histologicamente em mais de 85% dos casos por tumores de células não-pequenas (CPCNP), principalmente pelos subtipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma epidermóide. A cirurgia permanece como a principal modalidade de tratamento com intenção curativa nesta neoplasia, estando indicada nos estádios (AJCC 2010): I, II e num pequeno percentual de pacientes com estágio IIIA . Entretanto este subgrupo compreende apenas cerca de 20% dos pacientes ao diagnóstico (MOUNTAIN 1997).

O tratamento adjuvante padrão se baseia em quimioterapia sistêmica com combinações contendo um sal de platina, observando-se ganho absoluto de sobrevida em 5 anos que varia de 4% a 15% de acordo com o estudo analisado. Apesar do tratamento adjuvante sistêmico adequado nos pacientes com tumores em estágio inicial ressecados, cerca de 40% desses

pacientes apresentarão recidiva da doença em 5 anos, incluindo os tumores mais iniciais, como no estágio IA (<3,0cm), que apresentam taxa de recidiva de 15% e, atualmente, não são incluídos em nenhum protocolo de tratamento adjuvante. Fica claro que o sistema de estadiamento utilizado não permite estabelecer com precisão o desfecho do paciente após o tratamento (ARRIGADA et al. 2004; WINTON et al. 2005; DOUILLARD et al. 2006).

Na tentativa de responder estas questões vários estudos têm pesquisado marcadores de predição de resposta ao tratamento e relacionados à sobrevida (por exemplo: mutações específicas do EGFR e determinados padrões de expressão proteica: ERCC1 e RRM1), bem como analisado em conjunto grupos de genes envolvidos em proliferação, angiogênese, invasão e metástase (DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3 e LCK), estabelecendo assinaturas genéticas com poder de distinguir subgrupos com evoluções diferentes dentro do mesmo estágio (SIMON et al. 2005; HSUAN-YU et al. 2007; SEQUIST et al. 2007; KLIM et al. 2008). Recentemente, vários estudos estão analisando padrões de resposta inflamatória em CPNPC e sua evolução clínica.

## **1.2 INFLAMAÇÃO E CÂNCER**

Em 1863, Rudolf Virchow elaborou o conceito de que o infiltrado linfocitário intratumoral poderia refletir a origem do câncer após a observação do surgimento de neoplasias em sítios de inflamação crônica,

sugerindo uma forte conexão entre inflamação e câncer. Atualmente, sabe-se que a maioria dos tumores é infiltrado por células do sistema imune, e determinadas características da resposta imune local são frequentemente relacionadas com a evolução clínica da neoplasia. Teorias iniciais onde a imunidade inata e adaptativa exerceriam apenas efeito protetor contra as neoplasias (imunovigilância tumoral – Burnet e Tomas 1950) foram recentemente contestadas através de experimentos laboratoriais e clínicos. As evidências demonstram que a resposta inflamatória, a depender de características específicas, como por exemplo, o tipo do infiltrado celular e de determinadas citocinas produzidas, pode estar fortemente relacionada com iniciação, promoção e progressão da neoplasia. Entretanto, muito dos mecanismos moleculares e celulares mediadores desta relação permanece não completamente elucidado (COUSSENS e WERB 2002; DUNN et al. 2002; PHILIP et al. 2004).

No processo inflamatório “normal” ocorre o desencadeamento de uma resposta tecidual a uma injúria causada por um “estímulo inflamatório”. Uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém a resposta do hospedeiro no intuito de “cicatrizsar” o tecido afetado. Este “estímulo inflamatório” pode ser decorrente de um evento físico, substâncias químicas, um corpo estranho, infecções ou combinações dos mesmos. Os neutrófilos (eosinófilos em alguns casos) são as primeiras células do sistema imune a serem recrutadas durante a resposta inflamatória aguda. A quimiotaxia destas células é estimulada por fatores como leucotrieno B<sub>4</sub>, calicreína, complemento circulante C5a, produtos bacterianos (se presentes) e por

numerosos fatores liberados por plaquetas no sítio da lesão (ex.: PDGF, TGFB, fator plaquetário – 4 e fator ativador plaquetário). Esse infiltrado inflamatório inicial, composto principalmente pela migração de neutrófilos e por mastócitos locais, servirá como fonte de produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta inicial como fator de necrose tumoral – alfa (TNFA), interleucina (IL) 1A, IL1B e IL 8. Essas citocinas atuam como mediadores de aderência leucocitária ao endotélio vascular, direcionando e restringindo leucócitos para a área da injúria tecidual. Elas também iniciam o reparo tecidual pela indução da expressão de metaloproteinases (MMPs) pela matriz e pelo estímulo à produção de fatores de crescimento de queratinócitos (KGF e FGF 7) através dos fibroblastos (COUSSENS e WERB 2002; DUNN et al. 2002).

O processo de resposta tecidual também estimula a quimiotaxia de monócitos, principalmente do sistema venoso, para o sítio de lesão. Os fatores implicados na quimiotaxia destas células incluem o fator plaquetário-4, TGFB, PDGF, IL1B, TNFA, MIP(*macrophage inflammatory protein*)-1A/CCL3 e 1B/CCL4 e, principalmente, as citocinas denominadas MCPs (*monocyte chemoattractant protein*) 1 (CCL2), 2(CCL8) e 3(CCL7). A medida que ocorre o aumento do número de monócitos teciduais, o infiltrado neutrofílico diminui (SICA et al. 2006). Uma vez no sítio de lesão tecidual, os monócitos sofrem ação de citocinas produzidas *in situ* pelas células do estroma e por outras células inflamatórias no local e se diferenciam em células dendríticas imaturas ou macrófagos a depender do *pool* de citocinas estimuladoras. A diferenciação em células dendríticas imaturas ocorre

principalmente em decorrência dos efeitos estimulatórios de IL4 e do fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) (SICA et al. 2006; ZITVOGEL et al. 2006).

Existem vários subtipos diferentes de células dendríticas (DC), contudo, podem ser classificadas basicamente em dois grandes grupos: células dendríticas convencionais e células dendríticas plasmocitóides. As células dendríticas convencionais são caracterizadas pela habilidade de reconhecer rapidamente uma alteração na homeostase através da alta expressão de receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors* - PRRs). Diante desta situação de alteração tissular, as DC convencionais imaturas migram para a região de inflamação, capturam antígenos, sofrem processo de maturação, caracterizado pela alta secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL2, TNFA, IL 6, IL 1, IFN tipo I, dentre outras) e migram para a zona de linfócitos T dos linfonodos através da drenagem linfática regional. Nesta localização, as células dendríticas maduras/ativadas apresentam os antígenos para os linfócitos T CD8+ e CD4+ através do Complexo Principal de Histocompatibilidade maior (MHC) tipo I e II, respectivamente, e levam à ativação linfocitária T, tanto de células *naïve*, quanto de células T de memória, funcionando como uma ponte entre a resistência imune inata e a imunidade adaptativa. As citocinas pró-inflamatórias produzidas durante o processo de maturação das células dendríticas contribuem para a ativação de outras células do sistema imune e de células do estroma envolvidas no processo inflamatório (BELL et al. 1999; ZITVOGEL et al. 2006).

As células dendríticas plasmocitóides são células com funções e biologia diferentes das DC convencionais, possuem morfologia “plasmocitóide” e somente após a ativação é que passam a apresentar morfologia dendrítica e algumas das funções de apresentação de antígenos. Diferentemente das DC convencionais, elas migram para os tecidos e linfonodos predominantemente através da via hematogênica. Estas células são as maiores produtoras *in vivo* de IFN tipo I durante infecções virais e possuem propriedades imunossupressoras, ainda não completamente esclarecidas, que incluem a capacidade de produzir uma enzima imunossupressora, a indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), e ativar células T produtoras de IL10, citocina com propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras (BELL et al.1999; COLONNA et al. 2004; ZITVOGEL et al. 2006).

Após a ativação e diferenciação dos macrófagos a partir dos monócitos recrutados ao sítio de inflamação, estes tornar-se-ão a principal fonte de fatores de crescimento e citocinas que modulam o reparo tecidual (TGFB1, PDGF, FGF, TGFA, *Insulin Growth Factor* I e II, TNFA e IL1), assumindo, portanto, a responsabilidade pela evolução do processo inflamatório. Células do microambiente tumoral (epiteliais, mesenquimais e do endotélio vascular) são profundamente afetadas pela produção de citocinas pelos macrófagos (LEE et al. 2006). Entretanto, a função macrofágica é bastante heterogênea, podendo variar desde a promoção da atividade inflamatória até funções anti-inflamatórias, imunopermissivas e pró-angiogênicas. O estado de ativação destas células (M1, macrófagos

classicamente ativados, ou M2, macrófagos “alternativamente” ativados), é dependente de vários fatores que influenciam o fenótipo entre estes dois pólos de diferenciação, sendo determinado por um *background* genético adequado e por estímulos específicos presentes no microambiente em questão, como por exemplo, determinados agentes microbianos, produtos tumorais e linfócitos T efetores (Th1 ou Th2) e seus produtos, ou seja, em última análise esta diferenciação depende da interação entre o patógeno e o tecido do hospedeiro. Na presença de GM-CSF, Interferon gama (IFN G), TNFA, lipopolissacarídes e outros produtos microbianos os monócitos se diferenciam predominantemente em macrófagos M1, que são caracterizados pela alta capacidade de apresentar antígenos, alta produção de IL12, IL1, IL6 e IL23, e baixa produção de IL10 e, conseqüentemente, ativação de uma resposta imune tipo 1 (Th1). Esse pólo de ativação possui ação anti-proliferativa e atividade citotóxica através da secreção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido). Baseado nessas características, macrófagos M1 são geralmente considerados como células com potente capacidade de destruição de microrganismos e células tumorais, além de ser uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias (LEE et al. 2006; ALLAVENA et al. 2008; ONO 2008).

No outro extremo, na presença de IL4, IL13, agentes imunossupressores (corticosteróides, vitamina D3, prostaglandinas) e principalmente de IL10 e M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos) os monócitos se diferenciam em macrófagos M2, que possuem

a característica de promover resposta imune tipo II (Th2), promovendo, dentre outras coisas, o remodelamento da matriz extracelular, reparo tecidual e angiogênese. Os macrófagos M2 possuem atividade imunorreguladora e anti-inflamatória através da alta produção de IL10 e TGFB e baixa produção de IL12, contrapondo e atenuando o processo iniciado por macrófagos do pólo M1 (JO et al. 2006; ALLAVENA et al. 2008).

Esses dois pólos de ativação dos macrófagos não são eventos pontuais e sim um *continuum* do estado funcional destas células que se modifica durante as fases do processo inflamatório, havendo o predomínio de uma sobre a outra de acordo com a fase do processo, sendo essa transição determinada pelo tipo de citocina predominante no momento. O perfeito equilíbrio deve acontecer para que o processo inflamatório se inicie e finalize após o reparo (MANTOVANI et al. 2002; JO et al. 2006; ALLAVENA et al. 2008; SICA et al. 2008).

A persistência de determinado perfil de citocinas e quimiocinas em um sítio inflamatório poderá contribuir para o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico onde prevalecerá macrófagos com características M2. Este tipo de situação pode ser observado em determinadas infecções (*H. pylori*, Hepatites B e C, vírus Epstein-Barr, Herpesvírus, papiloma vírus, HIV), exposição crônica a estímulos químicos (sais biliares e ácido gástrico, álcool, fumaça de tabaco), doenças reumatológicas (artrite reumatóide, psoríase), estados fisiológicos (sítio de inserção placentário) e em neoplasias em maior ou menor grau (MANTOVANI et al. 2002; SICA et al. 2008).

Os leucócitos podem corresponder a até 50% da massa tumoral, principalmente linfócitos e macrófagos. Historicamente, um fator quimiotático derivado do tumor (posteriormente identificado como MCP-1/CCL2) foi descrito há cerca de 25 anos. Estudos experimentais e com humanos confirmam que os níveis de MCP-1/CCL2 correlacionam-se significativamente com a densidade de macrófagos relacionados ao tumor (TAM) em neoplasias de ovário, mama e pâncreas. Outras quimiocinas (CCL5, CCL7, CCL8 e CXCL12) ou citocinas (*vascular endothelial growth factor* – VEGFA, PDGF e M-CSF) têm demonstrado capacidade de atrair monócitos ao sítio tumoral (OGAWA et al. 2004). Monócitos diferenciam-se no microambiente tumoral em macrófagos sob o estímulo de fatores de crescimento derivados do tumor, especialmente M-CSF. As citocinas expressas no microambiente tumoral, sejam produzidas pelo tumor, sejam produzidas por células do estroma, têm importância fundamental na diferenciação dos macrófagos relacionados/associados ao tumor, e estudos recentes demonstram que esses macrófagos são predominantemente M2. Dentre as citocinas e mediadores liberados no microambiente tumoral destacam-se IL10, TGFB, PGE2 e IL6. Por conseguinte, os próprios macrófagos com diferenciação M2 aumentam a produção de IL10 e TGFB colaborando para a manutenção do microambiente com características pró-tumorais (ERIC et al. 2001).

A interleucina-10 e fatores de crescimento vascular como o VEGF, além de promoverem a diferenciação de monócitos em macrófagos M2, possuem a capacidade de interferir com a maturação das células dendríticas

(principal célula apresentadora de antígenos), modificando a ativação da imunidade adaptativa. Estudos que avaliaram a distribuição do infiltrado inflamatório em carcinomas de mama e tireóide observaram infiltração por TAMs ao longo de todo o tecido tumoral, em contraste com as DC que estavam presentes apenas na periferia do tumor (OGAWA et al. 2004; SICA et al. 2008). Os macrófagos sob efeito do microambiente tumoral apresentam efeitos pró-tumorais. Vários produtos dos TAM estimulam diretamente o crescimento de células tumorais (EGF, FGF), possuem efeitos pró-angiogênicos (VEGFA, FGF, TGFB), promovem a invasividade (produção e ativação de metaloproteinases que degradam e remodelam a matriz celular - TNFA) e inibem a resposta imune anti-tumoral (IL10 e TGFB: induzem “quiescência” de células dendríticas imaturas; CCL18, CCL17 e CCL22: quimiocinas com capacidade de atrair subgrupos de linfócitos T desprovidos de funções citotóxicas que quando na periferia de um microambiente tumoral dominado por macrófagos M2 e células dendríticas imaturas irão provavelmente induzir anergia tumoral - Linfócitos Treg) (MANTOVANI et al. 2002; SICA et al. 2008).

A citocina TGFB e sua via de sinalização exercem função crítica e central na carcinogênese. TGFB1, B2 e B3 são as isoformas identificadas em mamíferos, constituindo-se de proteínas de 25 kDa, sendo a isoforma B1 a mais estudada e predominantemente expressa nas células do sistema imune. Diferentemente do que se observa com o fator de crescimento de fibroblastos, com o fator de crescimento epitelial e com o *insulin-like growth factor*, que atuam primordialmente como promotores tumorais, o TGFB

possui ação contraditória na carcinogênese a depender do momento em que o processo se encontra (MEULMEESTER e DIJKE 2010; YANG 2010).

O sinal mediado pelo TGFB ocorre através da sua ligação com receptores de superfície celular (TGFB1, R2 e R3), principalmente o TGFB2, que secundariamente liga-se ao TGFB1, promovendo a fosforilação deste último, desencadeando uma atividade serina-treonina quinase pelo TGFB1. Em resposta à ativação dos receptores, duas proteínas citosólicas, Smad2 e Smad3, tornam-se fosforiladas e associam-se ao TGFB1. Após a sua ativação, Smad2 e Smad3 formam complexos heteroméricos com Smad4. Esses complexos são deslocados até o núcleo, onde ligam-se ao DNA e regulam a transcrição de genes específicos, envolvidos com a atividade de supressão tumoral, atuando no controle da proliferação, diferenciação, apoptose, adesão celular e invasão tumoral (YANG e YANG 2010). O TGFB exerce, também, ação fundamental na homeostase da imunidade mediado pelas células T, através da indução de Foxp3, regulador fundamental de células Treg em T *naive* (YANG e MOSES 2008).

Nos estágios iniciais das neoplasias o TGFB e sua via atuam de forma supressora, entretanto, células tumorais podem se sobrepujar ao efeito supressor tumoral do TGFB, tanto através de mutações ou inativações funcionais dos seus receptores, quanto por alterações na cascata intracelular da via de sinalização do Smad, resultando em última análise, na inativação das funções supressoras do TGFB, consequentemente,

promovendo a progressão tumoral de forma paradoxal (SOUFLA et al. 2006; YANG e MOSES 2008; LAVERTY et al. 2009).

Outro ponto significativo na regulação do processo inflamatório relacionado à neoplasia diz respeito ao fator inibitório de migração de macrófagos (MIF). Originalmente identificado como um produto de linfócitos ativados, tem sido implicado como um dos principais fatores regulatórios da resposta inflamatória ao choque séptico, na artrite reumatóide, na glomerulonefrite, na rejeição de transplantes e na aterosclerose (SCHWARTZ et al. 2009). Atualmente, sabe-se que o MIF exibe propriedades semelhantes às quimiocinas e foi identificado como ligante não-cognato do CXCR2 e CXCR4, eixo envolvido em vários processos de migração de células envolvidas no processo inflamatório e homeostase. O MIF é expresso em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo células T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Diferentemente de outras citocinas, o MIF é constitutivamente sintetizado e armazenado em estoques intracelulares. Em relação às suas propriedades, relaciona-se à diversos processos fundamentais no controle da proliferação celular, diferenciação, angiogênese e progressão tumoral (RENDON et al. 2009; SCHWARTZ et al. 2009).

Até recentemente o receptor de superfície celular do MIF era desconhecido. Atualmente sabe-se que este receptor é o CD74, uma proteína transmembrana tipo II, parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (STARLETS et al. 2006; McCLELLAND et al. 2009). O MIF liga-se com alta afinidade ao domínio extracelular do CD74 e,

através da co-ativação do CD44, ativa dentre outras vias, a via ERK/MAPK (SHI et al. 2006). O CD74 é expresso em células positivas para o MHC de classe II, entretanto, em situações de estímulo inflamatório intenso ele pode ser detectado na membrana plasmática de células MHC classe II negativas, incluindo células epiteliais e estromais. Recentemente vários estudos tem correlacionado MIF e CD74 na fisiopatogenia das neoplasias (REN et al. 2005; NAGATA et al. 2009; SCHWARTZ et al. 2009; VERJANS et al. 2009).

### **1.3 CÂNCER DE PULMÃO CÉLULAS NÃO-PEQUENAS E INFLAMAÇÃO**

Existe atualmente na literatura médica um número crescente de publicações referentes a determinados aspectos do processo inflamatório relacionado ao CPNPC. Entretanto, aspectos fundamentais da fisiopatologia da promoção do câncer através da inflamação são pouco abordados (localização do infiltrado inflamatório: tumor vs. estroma, estado de ativação celular vs. intensidade de infiltração, fenótipo de diferenciação dos macrófagos vs. apenas a presença do macrófago).

A infiltração por células dendríticas no tumor e a expressão de VEGF associada à densidade microvascular foi estudada através de imunoistoquímica (IHQ) em 132 pacientes com neoplasia de pulmão de células não-pequenas e correlacionada com a evolução clínica. Na análise multivariada, a alta expressão de VEGF, a alta densidade microvascular e a baixa intensidade de infiltração por células dendríticas, em combinação com

o estágio da doença, estiveram associadas com pior prognóstico de maneira estatisticamente significativa. Houve correlação inversa da intensidade de marcação por VEGF e da infiltração por células dendríticas. Neste estudo não houve descrição do padrão de localização predominante das células dendríticas (dentro ou na periferia do tumor), sendo empregado anticorpo (AC) anti-S100 (marcador de células dendríticas imaturas) na análise imunoistoquímica (INOSHIMA et al. 2002; PERROT et al. 2007). Um outro estudo avaliou a frequência de células dendríticas imaturas (AC anti-S100) e macrófagos (AC anti-CD68) através de IHQ em CPCNP e tecido pulmonar normal adjacente provenientes de 15 pacientes com doença não-metastática, operada. Este estudo avaliou também a expressão de IL4 e TNFA, fatores envolvidos na diferenciação e maturação das células dendríticas respectivamente. Um maior número de células dendríticas imaturas e macrófagos foi detectado no tecido tumoral em comparação com o pulmão normal. A positividade para IL4 foi menor no tecido neoplásico. Interessantemente, células marcadas com anticorpos anti-TNFA também foram mais frequentes no tecido tumoral, ao contrário do que se esperava. A frequência diminuída de células dendríticas maduras dentro do tumor foi confirmada através de citometria de fluxo em suspensão celular obtida dos mesmos tecidos (BALEEIRO et al. 2008).

Estudos avaliando certos subtipos de células dendríticas, como por exemplo, células dendríticas plasmocitóides são escassos em neoplasia de pulmão. Em um estudo com 152 pacientes portadores de carcinoma ductal invasivo de mama, a presença de células dendríticas com características

plasmocitóides no tumor, avaliada pela positividade do AC anti-CD123, correlacionou-se fortemente com pior sobrevida global (93% x 58%) e sobrevida livre de progressão (90% x 37%), avaliadas em 5 anos. Esse parâmetro mostrou-se ser fator prognóstico independente e foi validado em uma série independente de 103 pacientes (TREILLEUX et al. 2004).

As citocinas produzidas pelo tumor podem afetar o crescimento e a resposta imune anti-tumoral. Em um estudo de 31 linhagens celulares de CPNPC, a produção de citocinas foi avaliada por ELISA e correlacionada com o tipo histológico, indução de citotoxicidade tumor-específica mediada por linfócitos T e angiogênese. Dentre todas as citocinas avaliadas (IL1A, IL1B, IL4, IL6, IL8, IL10, TNFA, GM-CSF, TGFB e VEGF), IL8, TGFB e VEGFA foram expressas em 94%, 100% e 90% das linhagens, respectivamente. Não houve detecção de TNFA e IL4 em nenhuma linhagem celular. Nesse estudo foi realizada análises por IHQ da infiltração macrófaga (anti-CD68) e da angiogênese (anti-CD31) em tumores de pulmão induzidos em cobaias por essas linhagens. Posteriormente, os achados da IHQ foram correlacionados com os níveis de GM-CSF e IL8 produzidos pelas mesmas linhagens celulares. Houve correlação entre a produção de GM-CSF e a presença de infiltrado macrófaga e entre os níveis de IL8 e a densidade microvascular. Em relação ao subtipo histológico, houve maior produção de GM-CSF e TGFB pelos adenocarcinomas em comparação com os carcinomas escamosos. Em três linhagens celulares que apresentavam baixa produção de TGFB (fator previamente conhecido como inibidor da expansão de células T CD8+ e NK),

foi demonstrado que a atividade citotóxica de linfócitos T anti-tumoral estava presente. Posteriormente, com a adição de TGFB, houve supressão da atividade desses linfócitos. A alta expressão de IL8 no ELISA correlacionou-se positivamente com uma maior positividade para IL8 na IHQ, fato não observado em relação ao TGFB (FUKUYAMA et al. 2007).

Macrófagos e linfócitos exercem função fundamental na modulação da resposta imune ao tumor. A magnitude da infiltração por macrófagos (anti-CD68) e mastócitos (anti-triptase) foi avaliada por IHQ e correlacionada com a evolução clínica em 175 pacientes com CPNPC não-metastático operado. A densidade de macrófagos acima da densidade média da população encontrada correlacionou-se com uma sobrevida em 5 anos significativamente superior (52.9% x 7.7%) em relação aos que apresentavam densidade abaixo da média. Neste estudo não houve caracterização ou quantificação do tipo de infiltração macrofágica M1 ou M2 (WELSH et al. 2005).

A caracterização do fenótipo dos macrófagos e sua correlação com o desfecho clínico foi avaliada em um estudo envolvendo 40 pacientes com CPNPC não-metastático operado e divididos de acordo com a sua evolução clínica em pacientes com sobrevida prolongada (sobrevida mediana 97 meses, n=20) e sobrevida desfavorável (sobrevida mediana 7.7meses, n=20). Foi realizado análise por IHQ para anticorpos associados ao infiltrado macrofágico M1 (AC anti- iNOS, anti- HLA-DR, anti-MRP 8/14) e M2 (anti-CD163 e anti-VEGFA). A densidade de macrófagos M1 foi significativamente

maior que M2 no subgrupo de sobrevida prolongada (70% x 38%) (OHRI et al. 2009).

Vários estudos correlacionam a evolução clínica de pacientes com CPCNP com as características do infiltrado linfocitário relacionado ao tumor (TILs – *tumor infiltrating lymphocytes* ). Um estudo com 199 pacientes com diagnóstico de CPCNP, EC IV, analisou, através de IHC de biópsias, a presença de macrófagos (anti-CD68) e linfócitos T CD8 (anti-CD8) no tumor e no estroma tumoral e correlacionou-a com resposta à quimioterapia e evolução clínica. Pacientes com maior número de macrófagos ou linfócitos T CD8 no tumor em relação ao estroma apresentaram maior sobrevida (440 x 199 dias,  $p=0,001$  e 388 x 256 dias  $p=0,007$ , respectivamente). Não houve correlação com resposta à quimioterapia. Novamente, neste estudo não foi feita distinção do tipo de infiltrado macrofágico (KAWAI et al. 2008). Outro estudo com objetivo semelhante foi realizado em 178 pacientes operados, sem doença metastática, entretanto, com resultados diferentes. Foi investigada a associação entre a infiltração linfocitária por linfócitos T CD8+ e TCD4+ no tumor e no estroma e sobrevida. Pacientes com alto número de linfócitos T CD8+ no tumor tiveram pior sobrevida em 5 anos, principalmente nos tumores com alta taxa de replicação (avaliada pela positividade ao Ki-67), em comparação com pacientes com infiltrado menos intenso (47% x 60%,  $p=0,01$ ). Por outro lado pacientes com alto número de linfócitos T CD4 no estroma apresentaram maior sobrevida (64% x 43%,  $p= 0,04$ ) (WAKABAYASHI et al. 2003). Ainda com objetivo de estudar o papel do infiltrado linfocitário tumoral, um estudo realizou *tissue microarray* (TMA)

para avaliação do infiltrado linfocitário T CD8+, TCD4+ e B CD20+ no epitélio tumoral e no estroma de 355 pacientes com CPNPC operados. Na análise multivariada, a alta densidade de Linfócitos TCD4+ e TCD8+ no estroma foi o único fator independentemente associado com sobrevida doença-específica (AL-SHIBLI et al. 2008).

O CPCNP é caracterizado por um padrão específico de metastatização. O mecanismo de metástase órgão-específica é ainda pouco conhecido, entretanto, tal processo compartilha muitas similaridades com o “tráfego leucocitário”, que é significativamente regulado por quimiocinas e seus receptores. As quimiocinas constituem uma família de aproximadamente 50 citocinas de baixo peso molecular, atualmente divididas em 4 subgrupos: CXC, CC, CX3C e C. Entre as suas funções se destacam: a orientação da migração leucocitária, embriogênese, angiogênese, hematopoiese, aterosclerose, crescimento tumoral e metástase, e susceptibilidade à infecção pelo HIV.

As quimiocinas podem ser classificadas quanto a sua função em dois grupos: inflamatória e homeostática. As quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas por determinados tecidos e tipos celulares, e exercem função vital no desenvolvimento e manutenção da homeostase do sistema imune e hematopoiético. Em contraste, as quimiocinas inflamatórias não são constitutivamente expressas, mas são induzidas e reguladas por um estímulo inflamatório (VANDERCAPPELLEN et al. 2008).

Evidências sugerem que a quimiocina CXCL12 (*stromal derived factor-1*) e seu receptor cognato CXCR4 possam formar um eixo biológico

associado com metastatização em diversos tumores como observado em câncer de mama. Estudos avaliando a expressão de CXCL12 e CXCR4 em amostras de CPCNP e linhagens celulares deste tipo de tumor encontraram expressão de CXCR4, mas não de CXCL12. Em modelos murinos, foi observado que os sítios preferenciais de metástases de CPCNP (osso, cérebro, linfonodos e adrenal) expressavam altos níveis de CXCL12 em comparação com o tumor primário, gerando um gradiente quimiotático. A administração de anticorpos específicos anti-CXCL12 em cobaias imunodeprimidas inoculadas com linhagens de CPCNP diminuiu drasticamente o número de metástases, sem, no entanto, afetar a angiogênese (PHILLIPS et al. 2003). Um estudo avaliou a expressão de CXCR4, através de RT-PCR e IHQ, em amostra de 36 pacientes com CPNPC e em 10 espécimes de tecido pulmonar normal. A expressão aumentada de CXCR4 por RT-PCR não foi observada em nenhum dos espécimes de pulmão normal, entretanto estava presente em 34 dos 36 pacientes com CPNPC. Esse grupo de 34 pacientes com expressão aumentada de CXCR4 pelo RT-PCR foi avaliado por ensaio de IHQ para CXCR4 e divididos em dois grupos de acordo com a intensidade de marcação: baixa expressão (n=17) e alta expressão (n=17). Tumores com alta expressão de CXCR4 foram mais propensos a metástases em comparação ao grupo com baixa expressão (LIPING et al. 2005).

Outro estudo ainda avaliou a expressão de CXCR4 e CXCL12, através de ensaio de IHQ, em 154 pacientes operados por adenocarcinoma de pulmão. A intensidade de marcação de CXCL12 no tumor foi associada

com metástase linfonodal, mas sem diferença na sobrevida. Na análise multivariada, a intensidade de positividade de CXCR4 com padrão membrana, em contraposição ao padrão nuclear, foi associado com menor sobrevida livre de doença (RR 2,8 IC 95% 1,4-5,7,  $p=0,04$ ). Neste estudo não foi realizada avaliação dos linfonodos regionais quanto aos marcadores estudados (WAGNER et al. 2009).

Outra via ou eixo estudada em CPNPC é a de CCR7 e seu ligante CCL21 (*secondary lymphoid tissue chemokine*). A expressão de CCR7 foi avaliada por RT-PCR e citometria de fluxo em duas linhagens celulares de CPNPC, Lu-99 e A549, com potencial metastático definido (a primeira sabidamente com alto potencial para metástase linfonodal e a segunda com baixo potencial). A linhagem Lu-99 apresentou altos níveis de expressão de CCR7 em relação a A549. Altos níveis de CCL21 foram detectados nos linfonodos da linhagem Lu-99 e pôde-se observar que CCL21 induz a ativação de integrinas pelas células tumorais e promove a adesão ao VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (KOIZUME et al. 2007). Análises por IHQ de CCR7 e CCL21 em tumores de mama, estômago e pâncreas foram associados com maior incidência de metástases linfonodais (CABIOGLU et al. 2009).

Com relação ao TGFB e sua associação com a evolução da neoplasia (prognóstico), existe um número limitado de dados na literatura, a maioria deles contraditórios, refletindo a complexidade biológica da função desta citocina. Estudos avaliando o papel prognóstico do TGFB1 em câncer de mama, evidenciaram que a expressão aumentada do RNA mensageiro do

TGFB1 foi associada de forma significativa com uma evolução favorável (PAIVA et al. 20010). Em contraste, outros estudos têm demonstrado que a expressão aumentada da proteína do TGFB1 está associado com um prognóstico pior no câncer de mama (GORSH et al. 1992). Em câncer colorretal, a baixa expressão de TGFB1 se correlacionou com maior grau tumoral e maior incidência de metástases linfonodais (BACMAN et al. 2007).

Em câncer de pulmão de células não-pequenas a literatura é escassa, não se dispondo de dados suficientes para nenhuma análise maior.

## 2 JUSTIFICATIVA

O sistema de estadiamento atual para neoplasia de pulmão de células não-pequenas é insatisfatório em diferenciar com precisão a evolução dos pacientes operados mesmo nos estadiamentos mais precoces. A interação entre tumor, estroma e sistema imunológico é determinante para proliferação, angiogênese, invasividade e surgimento de metástases. O padrão de resposta inflamatória relacionado ao tumor aparenta estar relacionado com a evolução clínica de forma independente dos parâmetros atualmente utilizados na avaliação de prognóstico, entretanto, a maioria dos estudos avalia apenas a intensidade do infiltrado inflamatório sem caracterizar a influência de determinados fenótipos celulares nos resultados. A avaliação das características do processo inflamatório relacionado ao câncer de pulmão de células não-pequenas e seu microambiente pode constituir em ferramenta útil na estratificação de risco e, o melhor entendimento da imunologia molecular e celular relacionada a este tumor, pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos.

### **3 OBJETIVO**

Avaliar características do infiltrado inflamatório de tumores de pacientes com carcinoma de pulmão de células não-pequenas não metastáticos operados e correlacionar com dados clínicos (idade, sexo, tabagismo, estadiamento, tipo histológico, grau, tabagismo e DPOC) e de evolução (tempo de sobrevida livre de recidiva, tempo de sobrevida global).

O infiltrado será analisado quanto à expressão do receptor do MIF (CD74) e quanto à expressão de duas isoformas do TGFB, B1 e B2; A análise será de acordo com a microlocalização do infiltrado (tumor ou estroma).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO**

Estudo retrospectivo, sem grupo comparativo, com objetivo de avaliar características inflamatórias do tumor e correlacionar com evolução clínica de forma cega quanto à análise de imunoistoquímica e dados clínicos.

### **4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

Pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão de células não-pequenas operados no Hospital A.C. Camargo - F.A.P. e no Instituto Nacional do Câncer – INCA no período entre 01/2003 à 12/2007. Os dados foram coletados a partir de ficha de coleta de dados desenvolvida pelo Departamento de Cirurgia Torácica do Hospital A.C. Camargo para construção do Banco de Dados do serviço. A base de dados utilizada foi o cadastro de cirurgias do Departamento de Cirurgia Torácica de ambos os centros. Nesses serviços, a rotina de estadiamento foi a tomografia computadorizada do tórax e abdome superior, cintilografia óssea e ressonância magnética do cérebro. Os demais exames eram solicitados de acordo com a necessidade do caso. A dissecação linfonodal sistemática foi realizada em todos os casos.

### **4.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO**

#### **A Inclusão:**

- Câncer de pulmão de células não-pequenas operado
- Ressecção completa
- Estadiamento patológico I-III

#### **B Exclusão:**

- Indisponibilidade de material anatomopatológico para análise
- Indisponibilidade de dados clínicos, epidemiológicos e de evolução em prontuário médico
- Ressecção menor que lobectomia
- Realização de tratamento neoadjuvante

### **4.4 REALIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICAS**

Os espécimes estudados foram fixados em formalina e embebidos em parafina. Foram realizados cortes de 5µm de espessura e foram realizados os procedimentos de rotina como segue abaixo:

1. Desparafinização das lâminas e deixadas em estufa a 60°C por 24hs.
2. Duas passagens em xilol (60°C e em temperatura ambiente).
3. Três passagens em etanol (100%, 85% e 70%).
4. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
5. Incubação em tampão de citrato 10mM pH 6.0 em panela de pressão.

6. Bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (água oxigenada 10vol)- 3 trocas de 10min.
7. Lavagem das lâminas com água corrente e destilada.
8. Aplicação da solução salina tamponada com fosfatos.
9. Incubação com o anticorpo primário, diluído em título previamente estabelecido, em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA, A9647, EUA) e ázida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,1% por 30 min a 37°C e por 18hs em câmara úmida a 4°C.
10. Lavagem em tampão PBS.
11. Incubação com o Link (Advance HRP Link- Dako cod# K4068).
12. Lavagem em tampão PBS.
13. Incubação das lâminas em substrato cromógeno: 3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 100mg% (SIGMA), Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6% (água oxigenada a 20 vol) 1ml, PBS 100ml (5 min a 37°C, ao abrigo da luz).
14. Lavagem das lâminas com água destilada e corrente.
15. Contracoloração com hematoxilina de Harris.
16. Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0,5%), lavando em seguida com água corrente e destilada.
17. Desidratação em etanol (80%, 95% e 100%) e xilol.
18. Montagem das lâminas em Entellan neu (Merk, 10.07961, Alemanha).

Os anticorpos selecionados para o estudo foram:

1. Anti-CD74 (monoclonal, mouse, Cellmarque) – avaliação para o receptor MIF.
2. Anti-TGFB1 (clone policlonal, coelho, Santa Cruz Cat # sc 146, Santa Cruz, CA)
3. Anti-TGFB2 (clone policlonal, coelho, Santa Cruz Cat # sc 90, Santa Cruz, CA)

A análise de expressão imunoistoquímica das proteínas supracitadas foi realizada por patologista experiente (Dr. Clóvis Pinto), o qual era cego para as características clínicas dos pacientes. As proteínas foram analisadas separadamente nas células do tumor (parênquima tumoral) e nas do estroma. Para análise foi realizado a varredura completa da lâmina com microscópio óptico convencional, e as respectivas áreas de ilhotas tumorais e estroma foram avaliadas em aumento de 400x.

Com relação à avaliação das citocinas e do CD74 foram utilizados escores de intensidade de positividade de marcação celular e de número de células positivas expresso em porcentagem conforme previamente descritos em estudos que avaliaram estas moléculas através de imunoistoquímica (Tabelas 1, 2 e 3). Após a realização desses dois escores foi realizado, também, um índice de imunorreatividade construído a partir da soma dos valores obtidos pelos 2 escores previamente descritos. A partir deste índice foi calculado a média do escore para cada setor (tumor e estroma) e, a partir deste valor, os casos foram classificados como acima ou abaixo da média do

escore. Todas as análises foram realizadas sem o conhecimento prévio da evolução clínica do paciente correspondente.

**Tabela 1** - Gradação da reação imunoistoquímica quanto à Intensidade.

| Característica                    | Grau |
|-----------------------------------|------|
| Coloração negativa                | 0    |
| Coloração de intensidade fraca    | 1    |
| Coloração de intensidade moderada | 2    |
| Coloração de intensidade forte    | 3    |

**Tabela 2** - Gradação da reação imunoistoquímica quanto ao número de células coradas (1).

| Característica              | Grau |
|-----------------------------|------|
| Negativo                    | 0    |
| 1-20% de células positivas  | 1    |
| 21-50% de células positivas | 2    |
| >50% de células positivas   | 3    |

**Tabela 3** - Gradação da reação imunoistoquímica quanto ao número de células coradas (2).

| Característica           | Grau |
|--------------------------|------|
| 0-50% de células coradas | 0    |
| >50% de células coradas  | 1    |

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

1. As variáveis categóricas foram descritas como frequências e as numéricas como médias ou medianas e suas respectivas medidas de dispersão.
2. O valor da mediana foi empregado para dicotomizar séries de variáveis numéricas quando necessário.
3. Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher para análise de associação entre variáveis categóricas.
4. Curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevida e comparadas através de teste de log-rank.
5. Utilização de  $p < 0.05$  para consideração da significância estatística.
6. Análise multivariada para predição de sobrevida de variáveis independentes pelo modelo de riscos proporcionais de Cox.
7. Uso do software SPSS versão 18 para análise de todos dados.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS**

No período compreendido entre 01/2003 à 12/2007 foram selecionados 237 casos de câncer de pulmão de células não-pequenas operados. Após a aplicação dos critérios de seleção 129 casos preencheram os critérios de inclusão e exclusão para o estudo. Desses 129 casos, 82 foram provenientes do INCA e 47 do Hospital A.C. Camargo. O principal motivo de exclusão foi a inexistência de material anatomopatológico para análise. Os resultados em relação às variáveis epidemiológicas, clínico e patológicas da amostra estão sumarizados na Tabela 4.

Dos 129 casos de câncer de pulmão de células não-pequenas, 70 eram do sexo masculino (54,3%) e 59 eram do sexo feminino (45,7%). A média de idade desses indivíduos foi de 58,6 anos e a mediana foi de 64,7 anos (mínima de 43 e máxima de 83 anos). Nessa casuística a maioria (54,2%) dos indivíduos tinha idade menor ou igual a 65 anos.

Em relação ao uso de tabaco 58 casos (44,9%) eram tabagistas à época do diagnóstico, 49 (37,9%) eram ex-tabagistas, 16 (12,6%) nunca fumaram e 6 casos (4,6%) não possuíam informações disponíveis. Dos 129 pacientes, 47 (36,5%) tinham o diagnóstico de DPOC, 48 (37,2%) não tinham o diagnóstico e 34 (26,3%) não possuíam dados disponíveis.

O tipo de cirurgia mais realizada foi a lobectomia, compreendendo 101 casos (78,3%), seguido pela pneumectomia, 23 casos (17,9%), e

bilobectomia com 5 casos (3,8%). Na avaliação quanto ao subtipo histológico, o adenocarcinoma foi o mais comum, 67 casos (51,9%), seguido pelo carcinoma epidermóide, 45 casos (34,8%), bronquíolo-alveolar, 12 casos (9,4%) e por outros tipos histológicos mais infrequentes (agrupados em conjunto), 5 casos (3,9%): 4 carcinomas adenoescamosos e 1 carcinoma de grandes células.

Não foi possível obter informações a respeito do grau histológico e invasão vascular e sanguínea na maioria dos casos.

A maioria dos pacientes apresentou doença em estágio patológico inicial: 22 pacientes com estágio IA (17%) e 56 pacientes com estágio IB (43,4%). Quatro pacientes apresentaram estágio IIA (3,1%), 23 estágio IIB (17,8%), 23 estágio IIIA (17,8%) e 1 paciente apresentou estágio IIIB (0,9%).

Em relação à terapia adjuvante, 48 pacientes (37,2%) realizaram alguma forma de tratamento, sendo quimioterapia sistêmica a principal modalidade empregada, 41 casos (85,5%), seguido por radioterapia adjuvante em 4 casos (8,4%) e por radioquimioterapia adjuvante em 3 casos (6,1%). A quimioterapia foi baseada em algum sal de platina em 100% dos casos que se obteve informação: cisplatina e etoposide, 21 casos; carboplatina e paclitaxel, 6 casos; cisplatina e vinorelbina, 5 casos; cisplatina e gemcitabina, 3 casos; carboplatina e etoposide, 1 caso.

Vinte e cinco (29,4%) dos pacientes apresentaram uma segunda neoplasia durante o seguimento. Dentre estes, 6 tumores em região de cabeça e pescoço e 3 tumores de pulmão, considerados como segunda neoplasia primária do pulmão.

**Tabela 4 - Características dos dados clínico-patológicos.**

| <b>Característica</b>            | <b>N</b> | <b>%</b> |
|----------------------------------|----------|----------|
| <b>Idade</b>                     |          |          |
| <65 anos                         | 70       | 54,2     |
| >65 anos                         | 59       | 45,8     |
| <b>Sexo</b>                      |          |          |
| Feminino                         | 59       | 45,7     |
| Masculino                        | 70       | 54,3     |
| <b>Tabagismo</b>                 |          |          |
| Ativo                            | 58       | 44,9     |
| Ex-tabagista                     | 49       | 37,9     |
| Não- fumante                     | 16       | 12,6     |
| Dados não disponíveis            | 6        | 4,6      |
| <b>DPOC</b>                      |          |          |
| Sim                              | 47       | 36,5     |
| Não                              | 48       | 37,2     |
| Dados não disponíveis            | 34       | 26,3     |
| <b>Tipo de cirurgia</b>          |          |          |
| Lobectomia                       | 101      | 78,3     |
| Bilobectomia                     | 5        | 3,8      |
| Pneumectomia                     | 23       | 17,9     |
| <b>Subtipo histológico</b>       |          |          |
| Adenocarcinoma                   | 67       | 51,9     |
| Carcinoma epidermóide            | 45       | 34,8     |
| Bronquíolo-alveolar              | 12       | 9,4      |
| Outros                           | 5        | 3,9      |
| <b>Estadiamento patológico</b>   |          |          |
| IA                               | 22       | 17       |
| IB                               | 56       | 43,4     |
| IIA                              | 4        | 3,1      |
| IIB                              | 23       | 17,8     |
| IIIA                             | 23       | 17,8     |
| IIIB                             | 1        | 0,9      |
| <b>Tipo de terapia adjuvante</b> |          |          |
| Quimioterapia                    | 41       | 85,5     |
| Radioterapia                     | 4        | 8,4      |
| Radioquimioterapia               | 3        | 6,1      |

## **5.2 RESULTADO DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA CD74**

A análise imunoistoquímica para o antígeno CD74 foi realizada tanto no compartimento tumoral quanto no estroma. Ambas as regiões foram analisadas quanto à intensidade da marcação celular e quanto à percentagem de células coradas pelo marcador e graduadas de acordo com o resultado obtido (vide tabela 1, 2 e 3). Os resultados em relação à expressão do CD74 foram sumarizados na Tabela 5.

Dos 129 pacientes analisados, um caso foi excluído por problema técnico na coloração imunoistoquímica. Entre os 128 casos restantes, na avaliação do compartimento tumoral quanto à intensidade de marcação, observou-se que 72 casos (56,1%) eram negativos, 11 casos (8,6%) apresentavam positividade fraca, 12 casos (9,3%) positividade moderada e 33 casos (26%) apresentavam positividade forte para CD74. Durante a leitura da intensidade, encontramos dificuldades técnicas para obtenção de clara diferenciação entre os graus de intensidade de marcação, principalmente entre as marcações forte e moderado, em decorrência da ausência de um parâmetro claro que divida essas categorias.

Em relação à percentagem de células no compartimento tumoral que apresentavam marcação para CD74, observamos que 72 casos (56,1%) eram negativos, 20 (15,7%) casos apresentavam expressão entre 1-20%, 18 casos (14,1%) expressão entre 21-50% e em 18 casos (14,1%) a expressão de CD74 ocorreu em >50% das células do tumor. Utilizando a classificação

da expressão de CD74 em positividade maior ou menor do que 50% das células no tumor, que agrupa os casos negativos com os que apresentaram menos do que 50% de células positivas, 85,9% dos casos apresentaram expressão menor que 50% e 14,1% dos casos apresentaram expressão maior que 50%.

Após a realização do escore de imunoreatividade para a marcação de CD74 no tumor foi realizado o cálculo da média aproximada para os resultados do escore, que foi de 2,0. A partir do valor da média, convencionou-se dois grupos: valores abaixo da média (valores com escore: 0 e 1) ou valores igual ou acima da média (valores com escore: 2,3,4,5 e 6). Observou-se que 99 casos apresentavam valores abaixo da média (77,3%) e 29 casos apresentaram valores igual ou acima da média (22,7%).

Na avaliação do estroma tumoral quanto à imunomarcação para CD74, entre os 128 casos disponíveis, observou-se quanto à intensidade de marcação, que 2 casos (1,6%) eram negativos, 16 casos (12,5%) apresentavam positividade fraca, 34 casos (26,6%) positividade moderada e 76 casos (59,3%) apresentavam positividade forte para CD74. Novamente, houve muita dificuldade na diferenciação entre os graus de intensidade, pelos mesmos motivos apresentados anteriormente.

Em relação à percentagem de células no estroma tumoral que apresentavam marcação para CD74, observamos que 2 casos (1,6%) eram negativos, 18 (14,1%) casos apresentavam expressão entre 1-20%, 36 casos (28,2%) expressão entre 21-50% e em 72 casos (56,1%) a expressão de CD74 ocorreu em >50% das células do estroma. Utilizando a

classificação da expressão de CD74 em positividade maior ou menor do que 50% das células estromais, 43,7% dos casos apresentaram expressão menor que 50% e 56,1% dos casos apresentaram expressão maior que 50%.

Após o cálculo do escore de imunorreatividade para a marcação do CD74 nas células do estroma foi realizado o cálculo da média para os resultados do escore, que foi de aproximadamente 5. A partir do valor da média, convencionou-se dois grupos: valores abaixo da média (valores com escore de 0 à 4) ou valores igual ou acima da média (valores com escore: de 5 à 6). Observou-se que 37 casos apresentavam valores abaixo da média (28,9%) e 91 casos apresentaram valores igual ou acima da média (71,1%).

**Tabela 5 - Padrão de expressão de CD74**

| Característica                    | Tumor |      | Estroma |      |
|-----------------------------------|-------|------|---------|------|
|                                   | N     | %    | N       | %    |
| <b>Intensidade</b>                |       |      |         |      |
| Negativo                          | 72    | 56,1 | 2       | 1,6  |
| Positivo fraco                    | 11    | 8,6  | 16      | 12,5 |
| Positivo moderado                 | 12    | 9,3  | 34      | 26,6 |
| Positivo forte                    | 33    | 26   | 76      | 59,3 |
| Total                             | 128   | 100  | 128     | 100  |
| <b>Número de células marcadas</b> |       |      |         |      |
| Negativo                          | 72    | 56,1 | 2       | 1,6  |
| 1-20%                             | 20    | 15,7 | 18      | 14,1 |
| 21-50%                            | 18    | 14,1 | 36      | 28,2 |
| >50%                              | 18    | 14,1 | 72      | 56,1 |
| Total                             | 128   | 100  | 128     | 100  |

### **5.3 RESULTADO DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA TGFB1**

A análise imunoistoquímica para o antígeno TGFB1 foi realizada tanto no compartimento tumoral quanto no estroma. Ambas as regiões foram analisadas quanto à intensidade da marcação celular e quanto à porcentagem de células coradas pelo marcador e graduadas de acordo com o resultado obtido (vide tabela 1, 2 e 3). Os resultados em relação à expressão do TGFB1 foram sumarizados na Tabela 6.

Dos 129 pacientes analisados, 1 caso foi excluído por problemas técnicos na coloração imunoistoquímica. Entre os 128 casos restantes, na avaliação do compartimento tumoral quanto à intensidade de marcação, observou-se que 74 casos (57,8%) eram negativos, 9 casos (7,0%) apresentavam positividade fraca, 13 casos (10,2%) positividade moderada e 32 casos (25%) apresentavam positividade forte para TGFB1.

Em relação à porcentagem de células no compartimento tumoral que apresentavam marcação para TGFB1, observamos que 74 casos (57,8%) eram negativos, 15 (11,7%) casos apresentavam expressão entre 1-20%, 12 casos (9,4%) expressão entre 21-50% e em 27 casos (21,1%) a expressão de TGFB1 ocorreu em >50% das células do tumor. Utilizando a classificação da expressão de TGFB1 em positividade maior ou menor do que 50% das células no tumor, que agrupa os casos negativos com os que apresentaram menos do que 50% de células positivas, 78,9% dos casos

apresentaram expressão menor que 50% e 21,1% dos casos apresentaram expressão maior que 50%.

Após o cálculo do escore de imunorreatividade para a marcação de TGFB1 no tumor foi realizado o cálculo da média para os resultados do escore, que foi aproximadamente 2. A partir do dado do valor da média, convencionou-se dois grupos: valores abaixo da média (valores com escore de 0 à 1) ou valores igual ou acima da média (valores com escore: de 2 à 6). Observou-se que 74 casos apresentavam valores abaixo da média (57,8%) e 54 casos apresentaram valores igual ou acima da média (42,2%).

Na avaliação do estroma tumoral quanto à imunomarcação para TGFB1, entre os 128 casos disponíveis, observou-se quanto à intensidade de marcação, que 85 casos (66,4%) eram negativos, 15 casos (11,7%) apresentavam positividade fraca, 12 casos (9,4%) positividade moderada e 16 casos (12,5%) apresentavam positividade forte para TGFB1.

Em relação à percentagem de células no estroma tumoral que apresentavam marcação para TGFB1, observamos que 85 casos (66,4%) eram negativos, 21 (16,4%) casos apresentavam expressão entre 1-20%, 9 casos (7,0%) expressão entre 21-50% e em 13 casos (10,2%) a expressão de TGFB1 ocorreu em >50% das células do estroma. Utilizando a classificação da expressão de TGFB1 em positividade maior ou menor do que 50% das células estromais, 89,8% dos casos apresentaram expressão menor que 50% e 10,2% dos casos apresentaram expressão maior que 50%.

Após o cálculo do escore de imunoreatividade para a marcação do TGFB1 nas células do estroma foi realizado o cálculo da média para os resultados do escore, que foi aproximadamente 1. A partir do dado do valor da média, convencionou-se dois grupos: valores abaixo da média (valores com escore de 0) ou valores igual ou acima da média (valores com escore: de 1 à 6). Observou-se que 85 casos apresentavam valores abaixo da média (66,4%) e 43 casos apresentaram valores igual ou acima da média (33,6%).

**Tabela 6** - Padrão de expressão de TGFB1

| Característica                    | Tumor |      | Estroma |      |
|-----------------------------------|-------|------|---------|------|
|                                   | N     | %    | N       | %    |
| <b>Intensidade</b>                |       |      |         |      |
| Negativo                          | 74    | 57,8 | 85      | 66,4 |
| Positivo fraco                    | 9     | 7    | 15      | 11,7 |
| Positivo moderado                 | 13    | 10,2 | 12      | 9,4  |
| Positivo forte                    | 32    | 25   | 16      | 12,5 |
| Total                             | 128   | 100  | 128     | 100  |
| <b>Número de células marcadas</b> |       |      |         |      |
| Negativo                          | 74    | 57,8 | 85      | 66,4 |
| 1-20%                             | 15    | 11,7 | 21      | 16,4 |
| 21-50%                            | 12    | 9,4  | 9       | 7    |
| >50%                              | 27    | 21,1 | 13      | 10,2 |
| Total                             | 128   | 100  | 128     | 100  |

#### **5.4 RESULTADO DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA TGFB2**

A análise imunoistoquímica para o antígeno TGFB2 foi realizada tanto no compartimento tumoral quanto no estroma. Ambas as regiões foram analisadas quanto à intensidade da marcação celular e quanto à porcentagem de células coradas pelo marcador e graduadas de acordo com o resultado obtido (Tabelas 1, 2 e 3). Os resultados em relação à expressão do TGFB2 foram sumarizados na Tabela 7.

Dos 129 pacientes analisados, 2 casos foram excluídos por problemas técnicos na coloração imunoistoquímica. Entre os 127 casos restantes, na avaliação do compartimento tumoral quanto à intensidade de marcação, observou-se que 21 casos (16,5%) eram negativos, 22 casos (17,3%) apresentavam positividade fraca, 34 casos (26,8%) positividade moderada e 50 casos (39,4%) apresentavam positividade forte para TGFB2.

Em relação à porcentagem de células no compartimento tumoral que apresentavam marcação para TGFB2 observamos que 21 casos (16,5%) eram negativos, 8 (6,3%) casos apresentavam expressão entre 1-20%, 31 casos (24,4%) expressão entre 21-50% e em 67 casos (52,8%) a expressão de TGFB2 ocorreu em >50% das células do tumor. Utilizando a classificação da expressão de TGFB2 em positividade maior ou menor do que 50% das células no tumor, que agrupa os casos negativos com os que apresentaram menos do que 50% de células positivas, 47,2% dos casos

apresentaram expressão menor que 50% e 52,8% dos casos apresentaram expressão maior que 50%.

Após o cálculo do escore de imunorreatividade para a marcação de TGFB2 no tumor foi realizado o cálculo da média para os resultados do escore, que foi aproximadamente 4. A partir do dado do valor da média, convencionou-se dois grupos: valores abaixo da média (valores com escore de 0 à 3) ou valores igual ou acima da média (valores com escore: de 4 à 6). Observou-se que 35 casos apresentavam valores abaixo da média (27,3%) e 92 casos apresentaram valores igual ou acima da média (72,7%).

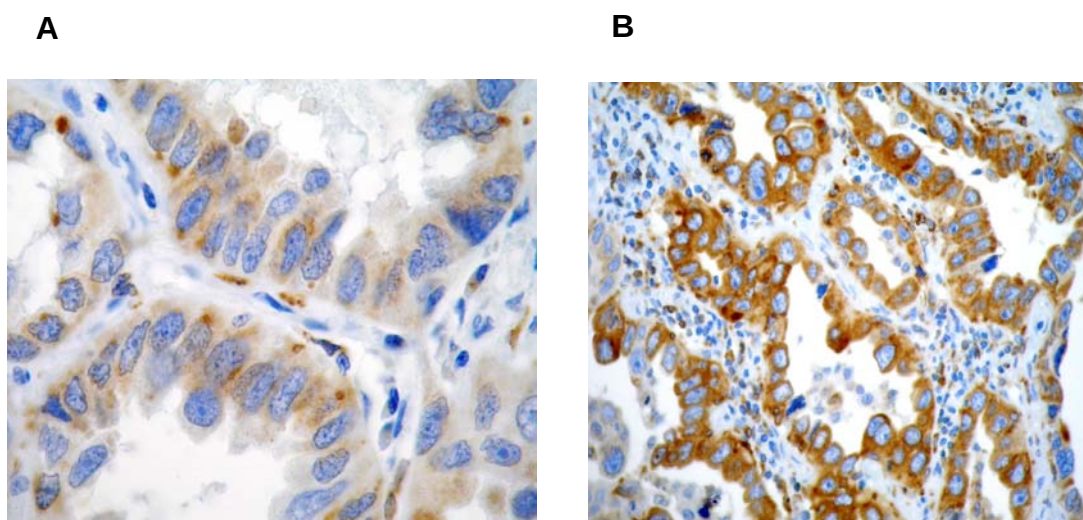
Na avaliação do estroma tumoral quanto à imunomarcação para TGFB2, entre os 127 casos disponíveis, observou-se quanto à intensidade de marcação, que 24 casos (18,9%) eram negativos, 55 casos (43,3%) apresentavam positividade fraca, 37 casos (29,1%) positividade moderada e 11 casos (8,7%) apresentavam positividade forte para TGFB2.

Em relação à percentagem de células no estroma tumoral que apresentavam marcação para TGFB2, observamos que 24 casos (18,9%) eram negativos, 34 (26,8%) casos apresentavam expressão entre 1-20%, 30 casos (23,6%) expressão entre 21-50% e em 39 casos (30,7%) a expressão de TGFB2 ocorreu em >50% das células do estroma. Utilizando a classificação da expressão de TGFB2 em positividade maior ou menor do que 50% das células estromais, 69,3% dos casos apresentaram expressão menor que 50% e 30,7% dos casos apresentaram expressão maior que 50%.

Após o cálculo do escore de imunoreatividade para a marcação do TGFB2 nas células do estroma foi realizado o cálculo da média para os resultados do escore, que foi aproximadamente 3. A partir do dado do valor da média, convencionou-se dois grupos: valores abaixo da média (valores com escore de 0 à 2) ou valores igual ou acima da média (valores com escore: de 3 à 6). Observou-se que 52 casos apresentavam valores abaixo da média (40,6%) e 75 casos apresentaram valores igual ou acima da média (59,4%).

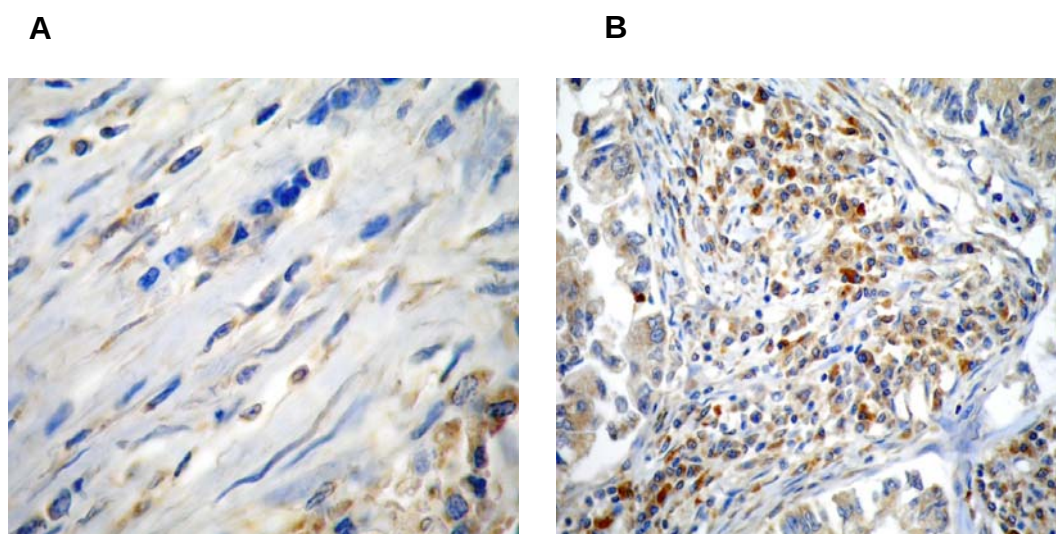
**Tabela 7 - Padrão de expressão de TGFB2**

| Característica                    | Tumor |      | Estroma |      |
|-----------------------------------|-------|------|---------|------|
|                                   | N     | %    | N       | %    |
| <b>Intensidade</b>                |       |      |         |      |
| Negativo                          | 21    | 16,5 | 24      | 18,9 |
| Positivo fraco                    | 22    | 17,3 | 55      | 43,3 |
| Positivo moderado                 | 34    | 26,8 | 37      | 29,1 |
| Positivo forte                    | 50    | 39,4 | 11      | 8,7  |
| Total                             | 127   | 100  | 127     | 100  |
| <b>Número de células marcadas</b> |       |      |         |      |
| Negativo                          | 21    | 16,5 | 24      | 18,9 |
| 1-20%                             | 8     | 6,3  | 34      | 26,8 |
| 21-50%                            | 31    | 24,4 | 30      | 23,6 |
| >50%                              | 67    | 52,8 | 39      | 30,7 |
| Total                             | 127   | 100  | 127     | 100  |



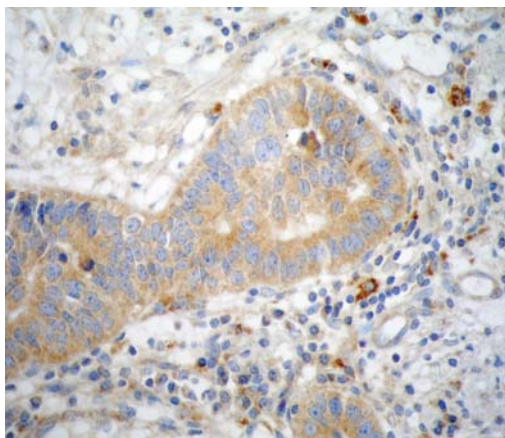
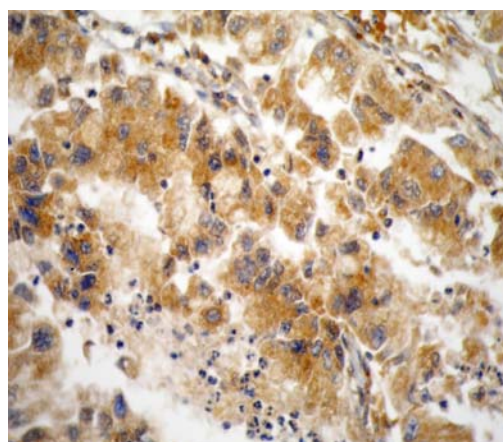
**Legenda:** A = fraco; B= forte

**Figura 1** – Marcação por imunoistoquímica para CD74 no tumor



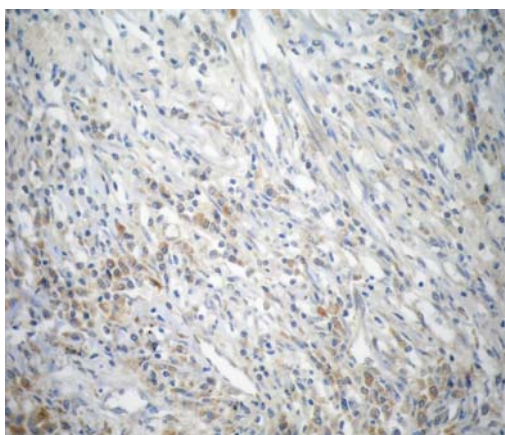
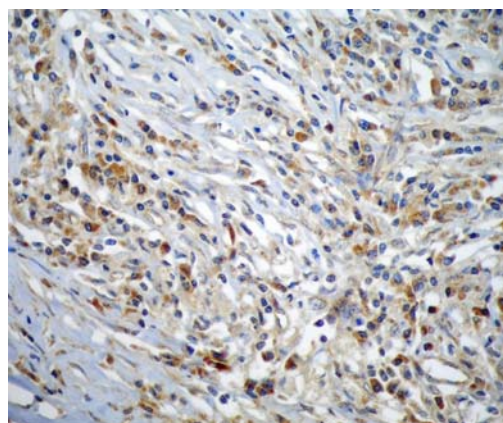
**Legenda:** A = fraco; B= forte

**Figura 2** – Marcação por imunoistoquímica para CD74 no estroma

**A****B**

**Legenda:** A = fraco; B= forte

**Figura 3** – Marcação por imunoistoquímica para TGFB1 e 2 no tumor

**A****B**

**Legenda:** A = fraco; B= forte

**Figura 4** – Marcação por imunoistoquímica para TGFB1 e 2 no estroma

## 5.5 RESULTADO DA EXPRESSÃO DE CD74 E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Avaliando as variáveis clínico-patológicas, foi observado associação estatisticamente significante entre a intensidade de marcação do CD74 no tumor e sexo (sexo feminino: marcação forte 44% x 10,1% masculino),  $p<0,001$ ), tabagismo (nunca fumaram: 62,5% marcação forte, tabagistas: 17,2% marcação forte e em ex-tabagistas: 25% marcação forte,  $p=0,006$ ) e tipo histológico (bronquíolo-alveolar: 58% marcação forte, adenocarcinoma: 34% marcação forte e carcinoma epidermóide: 6,8% de marcação forte,  $p<0,001$ ) (Tabela 8).

Em relação à percentagem de células no tumor que marcavam CD74, foi observado associação com sexo (feminino: expressão  $>50\%$  em 22,1% x 4,3% masculino,  $p=0,003$ ), tabagismo (nunca fumaram: 37,5% expressam  $>50\%$ , tabagistas: 10,5% expressam  $>50\%$  e em ex-tabagistas: 8,3% expressam  $>50\%$ ,  $p=0,019$ ), estadiamento patológico (estádio I: 25% expressam  $>50\%$ , estágio II e estágio III: nenhum paciente expressa  $>50\%$ ,  $p=0,001$ ) e tipo histológico (bronquíolo-alveolar: 41,6% expressa  $>50\%$ , adenocarcinoma: 16,4% expressa  $>50\%$  e carcinoma epidermóide: nenhum caso expressa  $>50\%$ ,  $p=0,001$ ) (Tabela 9).

Na avaliação do estroma tumoral, foi observado associação entre intensidade de marcação do CD74 e tipo histológico (carcinoma epidermóide: 63,6% marcação forte, adenocarcinoma 62,6% marcação forte e bronquíolo-alveolar 41,6% marcação forte,  $p=0,003$ ) (Tabela 10).

Na avaliação da percentagem de células que marcavam CD74 no estroma, tabagismo (tabagistas: 67,2% expressão  $>50\%$ , ex-tabagistas:

54,1% expressão >50% e nunca fumaram: 18,7% expressão >50%,  $p=0,003$ ) e histologia (carcinoma epidermóide: 68,1% expressão >50%, adenocarcinoma: 56,7% expressão >50% e bronquíolo-alveolar: 33,3% expressão >50%,  $p=0,012$ ) apresentaram associação estatisticamente significativa (Tabela 11).

**Tabela 8** - Intensidade de marcação CD74 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL              | INTENSIDADE |         |         |          | TOTAL   | P      |
|-----------------------|-------------|---------|---------|----------|---------|--------|
|                       | 0           | 1       | 2       | 3        |         |        |
| IDADE                 |             |         |         |          |         |        |
| <65 Anos              | 37(53,6)    | 6(8,6)  | 8(11,5) | 18 (26)  | 69(100) | 0,819  |
| >65 Anos              | 35(59,3)    | 5(8,4)  | 4(6,7)  | 15(25,4) | 59(100) |        |
| SEXO                  |             |         |         |          |         |        |
| Masculino             | 47 (68,1)   | 7(10,1) | 8(11,5) | 7 (10,1) | 69(100) | <0,001 |
| Feminino              | 25 (42,3)   | 4 (6,7) | 4 (6,7) | 26 (44)  | 59(100) |        |
| TABAGISMO             |             |         |         |          |         |        |
| Nunca Fumou           | 3(18,7)     | 1(6,2)  | 2(12,5) | 10(62,5) | 16(100) | 0,006  |
| Tabagista             | 36(62,0)    | 8(13,7) | 4(6,8)  | 10(17,2) | 58(100) |        |
| Ex-tabagista          | 28(58,3)    | 2(4,1)  | 6(12,5) | 12(25)   | 48(100) |        |
| DPOC                  |             |         |         |          |         |        |
| Não                   | 24(51,0)    | 2(4,2)  | 6(12,7) | 15(31,9) | 47(100) | 0,344  |
| Sim                   | 29(61,7)    | 4(8,4)  | 2(4,2)  | 12(25,5) | 47(100) |        |
| ESTADIAMENTO          |             |         |         |          |         |        |
| I                     | 41(52,5)    | 5(6,4)  | 5(6,4)  | 27(34,6) | 78(100) | 0,065  |
| II                    | 17(65,3)    | 2(7,6)  | 4(15,3) | 3(11,5)  | 26(100) |        |
| III                   | 14(58,3)    | 4(16,6) | 3(12,5) | 3(12,5)  | 24(100) |        |
| HISTOLOGIA            |             |         |         |          |         |        |
| Carcinoma epidermóide | 36(81,8)    | 0(0)    | 5(11,3) | 3 (6,8%) | 44(100) | <0,001 |
| Adenocarcinoma        | 30(44,7)    | 8(11,9) | 6(8,9)  | 23 (34%) | 67(100) |        |
| Bronquíolo-alveolar   | 4(33,3)     | 1(8,3)  | 0(0)    | 7 (58%)  | 12(100) |        |
| Grandes Células       | 1(100)      | 0(0)    | 0(0)    | 0(0)     | 1(100)  |        |
| Outros                | 1(25)       | 2(50)   | 1(25)   | 0(0)     | 4(100)  |        |

**Tabela 9** - Percentagem CD74 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas

| VARIÁVEL              | PERCENTAGEM |          | TOTAL   | P     |
|-----------------------|-------------|----------|---------|-------|
|                       | 0-50%       | >50%     |         |       |
| IDADE                 |             |          |         |       |
| <65                   | 63(91,3)    | 6(8,7)   | 69(100) | 0,159 |
| >65                   | 49(83,0)    | 10(16,9) | 59(100) |       |
| SEXO                  |             |          |         |       |
| Masculino             | 66(95,6)    | 3(4,3)   | 69(100) | 0,003 |
| Feminino              | 46(77,9)    | 13(22,1) | 59(100) |       |
| TABAGISMO             |             |          |         |       |
| Nunca Fumou           | 10(62,5)    | 6(37,5)  | 16(100) | 0,019 |
| Tabagista             | 52(89,6)    | 6(10,3)  | 58(100) |       |
| Ex-Tabagista          | 44(91,6)    | 4(8,3)   | 48(100) |       |
| DPOC                  |             |          |         |       |
| Não                   | 38(80,8)    | 9(19,1)  | 47(100) | 0,135 |
| Sim                   | 43(91,4)    | 4(8,5)   | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO          |             |          |         |       |
| I                     | 62(79,4)    | 16(20,5) | 78(100) | 0,001 |
| II                    | 26(100)     | 0(0)     | 26(100) |       |
| III                   | 24(100)     | 0(0)     | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA            |             |          |         |       |
| Carcinoma epidermóide | 44(100)     | 0(0)     | 44(100) | 0,001 |
| Adenocarcinoma        | 56(83,5)    | 11(16,4) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 7(58,3)     | 5(41,6)  | 12(100) |       |
| Grandes células       | 1(100)      | 0(0)     | 1(100)  |       |
| Outros                | 4(100)      | 0(0)     | 4(100)  |       |

**Tabela 10** - Intensidade de marcação de CD74 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL              | INTENSIDADE |          |          |          | TOTAL    | P     |
|-----------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|-------|
|                       | 0           | 1        | 2        | 3        |          |       |
| IDADE                 |             |          |          |          |          |       |
| <65 Anos              | 1(1,4)      | 11(15,9) | 20(28,9) | 37(53,6) | 69 (100) | 0,435 |
| >65 Anos              | 1(1,6)      | 5(8,4)   | 14(23,7) | 39(66,1) | 59(100)  |       |
| SEXO                  |             |          |          |          |          |       |
| Masculino             | 1(1,4)      | 9(13,0)  | 19(27,5) | 40(57,9) | 69(100)  | 0,983 |
| Feminino              | 1(1,6)      | 7(11,8)  | 15(25,4) | 36(61,0) | 59(100)  |       |
| TABAGISMO             |             |          |          |          |          |       |
| Nunca Fumou           | 1(6,2)      | 2(12,4)  | 3(18,7)  | 10(62,5) | 16(100)  | 0,783 |
| Tabagista             | 1(1,7)      | 7(12,0)  | 16(27,5) | 34(58,6) | 58(100)  |       |
| Ex-tabagista          | 0(0)        | 7(14,5)  | 14(29,1) | 27(56,2) | 48(100)  |       |
| DPOC                  |             |          |          |          |          |       |
| Não                   | 1(2,1)      | 4(8,5)   | 15(31,9) | 27(57,4) | 47(100)  | 0,462 |
| Sim                   | 0(0)        | 5(10,6)  | 10(21,2) | 32(68,0) | 47(100)  |       |
| ESTADIAMENTO          |             |          |          |          |          |       |
| I                     | 0(0)        | 8(11,7)  | 21(30,8) | 49(72,0) | 68(100)  | 0,343 |
| II                    | 1(3,8)      | 3(11,5)  | 8(30,7)  | 14(53,8) | 26(100)  |       |
| III                   | 1(4,1)      | 5(20,8)  | 5(20,8)  | 13(54,1) | 24(100)  |       |
| HISTOLOGIA            |             |          |          |          |          |       |
| Carcinoma epidermóide | 0(0)        | 3(6,8)   | 13(29,5) | 28(63,6) | 44(100)  | 0,033 |
| Adenocarcinoma        | 2(2,9)      | 7(10,4)  | 16(23,8) | 42(62,6) | 67(100)  |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 0(0)        | 2(16,8)  | 5(41,6)  | 5(41,6)  | 12(100)  |       |
| Grandes Células       | 0(0)        | 1(100)   | 0(0)     | 0(0)     | 1(100)   |       |
| Outros                | 0(0)        | 3(75)    | 0(0)     | 1(25)    | 4(100)   |       |

**Tabela 11** - Percentagem CD74 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL              | PERCENTAGEM |          | TOTAL   | P     |
|-----------------------|-------------|----------|---------|-------|
|                       | 0-50%       | >50%     |         |       |
| IDADE                 |             |          |         |       |
| <65                   | 30(43,4)    | 39(56,5) | 69(100) | 0,947 |
| >65                   | 26(44,0)    | 33(56,0) | 59(100) |       |
| SEXO                  |             |          |         |       |
| Masculino             | 27(39,1)    | 42(60,8) | 69(100) | 0,286 |
| Feminino              | 29(49,1)    | 30(50,8) | 59(100) |       |
| TABAGISMO             |             |          |         |       |
| Nunca Fumou           | 13(81,2)    | 3(18,7)  | 16(100) | 0,003 |
| Tabagista             | 19(32,7)    | 39(67,2) | 58(100) |       |
| Ex-Tabagista          | 22(45,8)    | 26(54,1) | 48(100) |       |
| DPOC                  |             |          |         |       |
| Não                   | 21(44,6)    | 26(55,3) | 47(100) | 0,676 |
| Sim                   | 18(38,2)    | 29(61,7) | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO          |             |          |         |       |
| I                     | 34(43,5)    | 44(56,4) | 78(100) | 0,96  |
| II                    | 11(42,3)    | 15(34,8) | 26(100) |       |
| III                   | 11(45,8)    | 13(54,1) | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA            |             |          |         |       |
| Carcinoma epidermóide | 14(31,8)    | 30(68,1) | 44(100) | 0,012 |
| Adenocarcinoma        | 29(43,2)    | 38(56,7) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 8(66,6)     | 4(33,3)  | 12(100) |       |
| Grandes células       | 1(100)      | 0(0)     | 1(100)  |       |
| Outros                | 4(100)      | 0(0)     | 4(100)  |       |

## 5.6 RESULTADO DA EXPRESSÃO DE TGFB1 E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Na análise dos resultados da marcação para TGFB1 quanto as variáveis clínico-patológicas, foi observado associação estatisticamente significativa entre intensidade de marcação do TGFB1 no tumor e sexo (feminino: 38,9% marcação forte x 13% masculino,  $p=0,003$ ) e tipo histológico (bronquíolo-alveolar: 50% marcação forte, adenocarcinoma: 29,8% marcação forte e carcinoma epidermóide: 11,3% marcação forte,  $p=0,002$ ) (Tabela 12).

Em relação à percentagem de células no tumor que marcavam TGFB1, foi observado associação apenas com o tipo histológico (grandes células: 100% expressão >50%, adenocarcinoma 26,8% expressão >50%, e bronquíolo-alveolar: 25% expressão >50%,  $p=0,039$ ) (Tabela 13).

Na avaliação do estroma tumoral, não foi observado associação entre intensidade de marcação do TGFB1 e as variáveis clínicas estudadas. Entretanto, na avaliação da percentagem de células que marcavam TGFB1 no estroma, houve associação entre a percentagem e estadiamento patológico (estádio I: 15,3% expressão >50%, estágio II: 0% e estágio III: 4,1% expressão >50%,  $p=0,049$ ) (Tabelas 14 e 15).

**Tabela 12** - Intensidade de marcação TGFB1 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL        | INTENSIDADE |         |          |          | TOTAL   | P     |
|-----------------|-------------|---------|----------|----------|---------|-------|
|                 | 0           | 1       | 2        | 3        |         |       |
| IDADE           |             |         |          |          |         |       |
| <65 Anos        | 40(57,9)    | 3(4,3)  | 9(13,0)  | 17(24,6) | 69(100) | 0,436 |
| >65 Anos        | 34(57,6)    | 6(10,1) | 4(6,7)   | 15(25,4) | 59(100) |       |
| SEXO            |             |         |          |          |         |       |
| Masculino       | 47(68,1)    | 7(10,1) | 6(8,6)   | 9(13,0)  | 69(100) | 0,003 |
| Feminino        | 27(45,7)    | 2(3,3)  | 7(11,8)  | 23(38,9) | 59(100) |       |
| TABAGISMO       |             |         |          |          |         |       |
| Nunca Fumou     | 6(37,5)     | 1(6,2)  | 4(25)    | 5(31,2)  | 16(100) | 0,498 |
| Tabagista       | 34(58,6)    | 4(6,8)  | 6(10,3)  | 14(24,1) | 58(100) |       |
| Ex-tabagista    | 28(58,3)    | 4(8,3)  | 3(6,2)   | 13(27,0) | 48(100) |       |
| DPOC            |             |         |          |          |         |       |
| Não             | 21(44,6)    | 2(4,2)  | 8(17,0)  | 16(34,0) | 47(100) | 0,164 |
| Sim             | 29(61,7)    | 4(8,4)  | 3(6,3)   | 11(23,4) | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO    |             |         |          |          |         |       |
| I               | 42(53,8)    | 5(6,4)  | 9(11,5)  | 22(28,2) | 78(100) | 0,245 |
| II              | 18(69,2)    | 1(3,8)  | 0(0)     | 7(26,9)  | 26(100) |       |
| III             | 14(58,3)    | 3(12,5) | 4(16,6)  | 3(12,5)  | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA      |             |         |          |          |         |       |
| Carcinoma       |             |         |          |          |         | 0,002 |
| epidermóide     | 36(81,8)    | 2(0,4)  | 1(0,2)   | 5(11,3)  | 44(100) |       |
| Adenocarcinoma  | 32(47,7)    | 5(7,4)  | 10(14,9) | 20(29,8) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-     |             |         |          |          |         |       |
| alveolar        | 4(33,3)     | 1(8,3)  | 1(8,3)   | 6(50)    | 12(100) |       |
| Grandes Células | 0(0)        | 0(0)    | 1(100)   | 0(0)     | 1(100)  |       |
| Outros          | 2(50)       | 1(25)   | 0(0)     | 1(25)    | 4(100)  |       |

**Tabela 13** - Percentagem TGFB1 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL              | PERCENTAGEM |          | TOTAL   | P     |
|-----------------------|-------------|----------|---------|-------|
|                       | 0-50%       | >50%     |         |       |
| IDADE                 |             |          |         |       |
| <65                   | 56(81,1)    | 13(18,8) | 69(100) | 0,522 |
| >65                   | 45(76,2)    | 14(23,7) | 59(100) |       |
| SEXO                  |             |          |         |       |
| Masculino             | 58(84,0)    | 11(15,9) | 69(100) | 0,134 |
| Feminino              | 43(72,8)    | 16(27,1) | 59(100) |       |
| TABAGISMO             |             |          |         |       |
| Nunca Fumou           | 11(68,7)    | 5(31,2)  | 16(100) | 0,627 |
| Tabagista             | 46(82,7)    | 12(17,2) | 58(100) |       |
| Ex-Tabagista          | 38(79,1)    | 10(20,8) | 48(100) |       |
| DPOC                  |             |          |         |       |
| Não                   | 34(72,3)    | 13(27,6) | 47(100) | 0,632 |
| Sim                   | 37(78,7)    | 10(21,2) | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO          |             |          |         |       |
| I                     | 60(76,9)    | 18(23,0) | 78(100) | 0,128 |
| II                    | 24(92,3)    | 2(7,6)   | 26(100) |       |
| III                   | 17(70,8)    | 7(29,1)  | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA            |             |          |         |       |
| Carcinoma epidermóide | 40(90,9)    | 4(9,1)   | 44(100) | 0,039 |
| Adenocarcinoma        | 49(73,1)    | 18(26,8) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 9(75,0)     | 3(25)    | 12(100) |       |
| Grandes células       | 0(0)        | 1(100)   | 1(100)  |       |
| Outros                | 3(75)       | 1(25)    | 4(100)  |       |

**Tabela 14** - Intensidade de marcação TGFB1 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL              | INTENSIDADE |         |         |          | TOTAL    | P     |
|-----------------------|-------------|---------|---------|----------|----------|-------|
|                       | 0           | 1       | 2       | 3        |          |       |
| IDADE                 |             |         |         |          |          |       |
| <65 Anos              | 45(65,2)    | 8(11,5) | 7(10,1) | 9(13,0)  | 69 (100) | 0,989 |
| >65 Anos              | 40(67,7)    | 7(11,8) | 5(8,4)  | 7(11,8)  | 59(100)  |       |
| SEXO                  |             |         |         |          |          |       |
| Masculino             | 47(68,1)    | 8(11,5) | 7(10,1) | 7(10,1)  | 69(100)  | 0,875 |
| Feminino              | 38(64,4)    | 7(11,8) | 5(8,4)  | 9(15,2)  | 59(100)  |       |
| TABAGISMO             |             |         |         |          |          |       |
| Nunca Fumou           | 10(62,5)    | 2(12,5) | 2(12,5) | 2(12,5)  | 16(100)  | 0,828 |
| Tabagista             | 37(63,7)    | 8(13,7) | 5(8,6)  | 8(13,7)  | 58(100)  |       |
| Ex-tabagista          | 36(75,0)    | 3(6,2)  | 4(8,3)  | 5(10,4)  | 48(100)  |       |
| DPOC                  |             |         |         |          |          |       |
| Não                   | 35(74,4)    | 5(10,6) | 3(6,3)  | 4(8,5)   | 47(100)  | 0,916 |
| Sim                   | 35(74,4)    | 3(6,3)  | 4(8,5)  | 5(10,6)  | 47(100)  |       |
| ESTADIAMENTO          |             |         |         |          |          |       |
| I                     | 51(65,3)    | 9(11,5) | 9(11,5) | 9(11,5)  | 78(100)  | 0,444 |
| II                    | 19(73,0)    | 2(7,6)  | 3(11,5) | 2(7,6)   | 26(100)  |       |
| III                   | 15(62,5)    | 4(16,6) | 0(0)    | 5(20,8)  | 24(100)  |       |
| HISTOLOGIA            |             |         |         |          |          |       |
| Carcinoma Epidermóide | 28(63,6)    | 7(15,9) | 5(11,3) | 4(9,0)   | 44(100)  | 0,204 |
| Adenocarcinoma        | 44(65,6)    | 7(10,4) | 4(5,9)  | 12(17,9) | 67(100)  |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 10(83,3)    | 0(0)    | 2(16,6) | 0(0)     | 12(100)  |       |
| Grandes Células       | 0(0)        | 0(0)    | 1(100)  | 0(0)     | 1(100)   |       |
| Outros                | 3(75)       | 1(25)   | 0(0)    | 0(0)     | 4(100)   |       |

**Tabela 15** - Percentagem TGFB1 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas

| VARIÁVEL              | PERCENTAGEM |          | TOTAL   | P     |
|-----------------------|-------------|----------|---------|-------|
|                       | 0-50%       | >50%     |         |       |
| IDADE                 |             |          |         |       |
| <65                   | 63(91,3)    | 6(8,7)   | 69(100) | 0,537 |
| >65                   | 52(88,1)    | 7(11,8)  | 59(100) |       |
| SEXO                  |             |          |         |       |
| Masculino             | 60(86,9)    | 9(13,1)  | 69(100) | 0,379 |
| Feminino              | 55(93,2)    | 4(6,8)   | 59(100) |       |
| TABAGISMO             |             |          |         |       |
| Nunca Fumou           | 15(93,7)    | 1(6,3)   | 16(100) | 0,942 |
| Tabagista             | 51(87,9)    | 7(12,1)  | 58(100) |       |
| Ex-Tabagista          | 43(89,5)    | 5(10,5)  | 48(100) |       |
| DPOC                  |             |          |         |       |
| Não                   | 42(89,3)    | 5(10,6)  | 47(100) | 0,998 |
| Sim                   | 42(8,3)     | 5(10,6)  | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO          |             |          |         |       |
| I                     | 66(84,6)    | 12(15,3) | 78(100) | 0,049 |
| II                    | 26(100)     | 0(0)     | 26(100) |       |
| III                   | 23(95,8)    | 1(4,1)   | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA            |             |          |         |       |
| Carcinoma epidermóide | 38(86,3)    | 6(13,6)  | 44(100) | 0,15  |
| Adenocarcinoma        | 61(91,0)    | 6(9,0)   | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 12(100)     | 0(0)     | 12(100) |       |
| Grandes células       | 0(0)        | 1(100)   | 1(100)  |       |
| Outros                | 4(100)      | 0(0)     | 4(100)  |       |

## 5.7 RESULTADO DA EXPRESSÃO DE TGFB2 E ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Quanto à marcação do TGFB2 no tumor, foi observado associação estatisticamente significante entre a intensidade de marcação do TGFB2 e tipo histológico (adenocarcinoma: 53,7% marcação forte, bronquíolo-alveolar: 50% marcação forte e carcinoma epidermóide: 13,9% marcação forte,  $p=0,001$ ) e entre percentagem e tipo histológico (bronquíolo-alveolar: 66,6% expressão >50%, adenocarcinoma: 62,6% expressão >50% e carcinoma epidermóide: 36,3% expressão >50%,  $p=0,019$ ) (Tabelas 16 e 17).

Na avaliação do estroma tumoral, foi observado associação entre intensidade de marcação do TGFB2 e idade (menos 65 anos: 13,2% marcação forte, mais de 65 anos: 3,3% marcação forte,  $p=0,017$ ) e entre percentagem de células e tabagismo (ex-tabagistas: 29,1% expressão >50%, nunca fumantes: 6,2% expressão >50% e tabagistas: 3,9% expressão >50%,  $p=0,037$ ) e DPOC (DPOC: 40,4% expressão >50% x 17,1% sem DPOC,  $p=0,01$ ) (Tabelas 18 e 19).

**Tabela 16** - Intensidade de marcação de TGFB2 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas

| VARIÁVEL            | INTENSIDADE |          |          |          | TOTAL   | P     |
|---------------------|-------------|----------|----------|----------|---------|-------|
|                     | 0           | 1        | 2        | 3        |         |       |
| IDADE               |             |          |          |          |         |       |
| <65 Anos            | 11(16,1)    | 10(14,7) | 15(22,0) | 32(47,0) | 68(100) | 0,265 |
| >65 Anos            | 10(16,9)    | 12(20,3) | 19(32,2) | 18(30,5) | 59(100) |       |
| SEXO                |             |          |          |          |         |       |
| Masculino           | 15(21,7)    | 13(18,8) | 19(27,5) | 22(31,8) | 69(100) | 0,191 |
| Feminino            | 6(10,3)     | 9(15,5)  | 15(25,8) | 28(48,2) | 58(100) |       |
| TABAGISMO           |             |          |          |          |         |       |
| Nunca Fumou         | 1(6,2)      | 1(6,2)   | 4(25)    | 10(62,5) | 16(100) | 0,222 |
| Tabagista           | 8(14)       | 11(19,2) | 18(31,5) | 20(35)   | 57(100) |       |
| Ex-tabagista        | 12(25)      | 10(20,8) | 9(18,7)  | 17(35,4) | 48(100) |       |
| DPOC                |             |          |          |          |         |       |
| Não                 | 8(17,3)     | 6(13,0)  | 13(28,2) | 19(41,3) | 46(100) | 0,885 |
| Sim                 | 8(17,0)     | 9(19,1)  | 13(27,6) | 17(36,1) | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO        |             |          |          |          |         |       |
| I                   | 14(18,1)    | 13(16,8) | 17(22,0) | 33(42,8) | 77(100) | 0,083 |
| II                  | 4(15,3)     | 8(30,7)  | 9(34,6)  | 5(19,2)  | 26(100) |       |
| III                 | 3(12,5)     | 1(4,1)   | 8(33,3)  | 12(50)   | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA          |             |          |          |          |         |       |
| Carcinoma           |             |          |          |          |         | 0,001 |
| Epidermóide         | 13(30,2)    | 11(25,5) | 13(30,2) | 6(13,9)  | 43(100) |       |
| Adenocarcinoma      | 6(8,9)      | 8(11,9)  | 17(25,3) | 36(53,7) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar | 1(8,3)      | 2(16,6)  | 3(25)    | 6(50)    | 12(100) |       |
| Grandes Células     | 0(0)        | 0(0)     | 1(100)   | 0(0)     | 1(100)  |       |
| Outros              | 1(25)       | 1(25)    | 0(0)     | 2(50)    | 4(100)  |       |

**Tabela 17** - Percentagem TGFB2 no tumor e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL              | PERCENTAGEM |          | TOTAL   | P     |
|-----------------------|-------------|----------|---------|-------|
|                       | 0-50%       | >50%     |         |       |
| IDADE                 |             |          |         |       |
| <65                   | 31(44,9)    | 37(55,0) | 69(100) | 0,412 |
| >65                   | 29(49,1)    | 30(50,8) | 59(100) |       |
| SEXO                  |             |          |         |       |
| Masculino             | 37(53,6)    | 32(46,3) | 69(100) | 0,153 |
| Feminino              | 23(38,9)    | 35(61,0) | 59(100) |       |
| TABAGISMO             |             |          |         |       |
| Nunca Fumou           | 5(31,2)     | 11(68,7) | 16(100) | 0,115 |
| Tabagista             | 25(43,1)    | 32(56,8) | 58(100) |       |
| Ex-Tabagista          | 28(58,3)    | 20(41,6) | 48(100) |       |
| DPOC                  |             |          |         |       |
| Não                   | 19(40,4)    | 27(59,5) | 47(100) | 0,301 |
| Sim                   | 25(53,1)    | 22(46,8) | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO          |             |          |         |       |
| I                     | 31(39,7)    | 46(60,2) | 78(100) | 0,086 |
| II                    | 17(65,3)    | 9(34,6)  | 26(100) |       |
| III                   | 12(50)      | 12(50)   | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA            |             |          |         |       |
| Carcinoma epidermóide | 28(63,6)    | 15(36,3) | 44(100) | 0,019 |
| Adenocarcinoma        | 25(37,3)    | 42(62,6) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar   | 4(33,3)     | 8(66,6)  | 12(100) |       |
| Grandes células       | 1(100)      | 0(0)     | 1(100)  |       |
| Outros                | 2(50)       | 2(50)    | 4(100)  |       |

**Tabela 18** - Intensidade de marcação de TGFB2 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL            | INTENSIDADE |          |          |         | TOTAL   | P     |
|---------------------|-------------|----------|----------|---------|---------|-------|
|                     | 0           | 1        | 2        | 3       |         |       |
| IDADE               |             |          |          |         |         |       |
| <65 Anos            | 16(23,5)    | 30(44,1) | 13(19,1) | 9(13,2) | 68(100) | 0,017 |
| >65 Anos            | 8(13,5)     | 25(42,3) | 24(40,6) | 2(3,3)  | 59(100) |       |
| SEXO                |             |          |          |         |         |       |
| Masculino           | 15(21,7)    | 28(40,5) | 21(30,4) | 5(7,2)  | 69(100) | 0,743 |
| Feminino            | 9(15,5)     | 27(46,5) | 16(27,5) | 6(10,3) | 58(100) |       |
| TABAGISMO           |             |          |          |         |         |       |
| Nunca Fumou         | 3(16,6)     | 11(61,1) | 2(11,1)  | 0(0)    | 18(100) | 0,332 |
| Tabagista           | 10(17,5)    | 23(40,3) | 17(29,8) | 7(12,2) | 57(100) |       |
| Ex-tabagista        | 11(22,9)    | 21(43,7) | 14(29,1) | 2(4,1)  | 48(100) |       |
| DPOC                |             |          |          |         |         |       |
| Não                 | 10(21,7)    | 21(45,6) | 12(26)   | 3(6,5)  | 46(100) | 0,87  |
| Sim                 | 7(14,8)     | 24(51,0) | 13(27,6) | 3(6,3)  | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO        |             |          |          |         |         |       |
| I                   | 10(12,9)    | 38(49,3) | 22(28,5) | 7(9,0)  | 77(100) | 0,434 |
| II                  | 8(30)       | 9(34,6)  | 7(26,9)  | 2(7,6)  | 26(100) |       |
| III                 | 6(25)       | 8(33,3)  | 8(33,3)  | 2(8,3)  | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA          |             |          |          |         |         |       |
| Carcinoma           |             |          |          |         |         | 0,779 |
| Epidermóide         | 11(25,5)    | 17(39,5) | 11(25,5) | 4(9,3)  | 43(100) |       |
| Adenocarcinoma      | 12(17,9)    | 27(40,2) | 21(31,3) | 7(10,4) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar | 1(8,3)      | 8(66,6)  | 3(25)    | 0(0)    | 12(100) |       |
| Grandes Células     | 0(0)        | 0(0)     | 1(100)   | 0(0)    | 1(100)  |       |
| Outros              | 0(0)        | 3(75)    | 1(25)    | 0(0)    | 4(100)  |       |

**Tabela 19** - Percentagem TGFB2 no estroma e associação com variáveis clínico-patológicas.

| VARIÁVEL            | PERCENTAGEM |          | TOTAL   | P     |
|---------------------|-------------|----------|---------|-------|
|                     | 0-50%       | >50%     |         |       |
| IDADE               |             |          |         |       |
| <65                 | 46(66,6)    | 22(33,3) | 69(100) | 0,703 |
| >65                 | 42(71,1)    | 17(28,8) | 59(100) |       |
| SEXO                |             |          |         |       |
| Masculino           | 48(69,5)    | 21(30,4) | 69(100) | 0,942 |
| Feminino            | 40(67,7)    | 18(32,2) | 59(100) |       |
| TABAGISMO           |             |          |         |       |
| Nunca Fumou         | 15(93,7)    | 1(6,2)   | 16(100) | 0,037 |
| Tabagista           | 35(60,3)    | 22(38,7) | 58(100) |       |
| Ex-Tabagista        | 34(70,8)    | 14(29,1) | 48(100) |       |
| DPOC                |             |          |         |       |
| Não                 | 39(82,9)    | 7(17,1)  | 47(100) | 0,01  |
| Sim                 | 28(59,5)    | 19(40,4) | 47(100) |       |
| ESTADIAMENTO        |             |          |         |       |
| I                   | 53(67,9)    | 24(32,1) | 78(100) | 0,983 |
| II                  | 18(69,2)    | 8(30,7)  | 26(100) |       |
| III                 | 17(70,8)    | 7(29,2)  | 24(100) |       |
| HISTOLOGIA          |             |          |         |       |
| Carcinoma           |             |          |         | 0,098 |
| epidermóide         | 25(56,8)    | 18(43,1) | 44(100) |       |
| Adenocarcinoma      | 47(70,1)    | 20(29,8) | 67(100) |       |
| Bronquíolo-alveolar | 11(91,6)    | 1(8,4)   | 12(100) |       |
| Grandes células     | 1(100)      | 0(0)     | 1(100)  |       |
| Outros              | 4(100)      | 0(0)     | 4(100)  |       |

## **5.8 RESULTADO DA SOBREVIDA**

### **5.8.1 Análise para Sobrevida Livre de Recidiva**

Na avaliação da amostra dos 129 pacientes como um todo, observamos uma sobrevida livre de recidiva de 71% em 3 anos para um tempo de seguimento mediano de 40,37 meses (valor mínimo de 0,23 meses e máximo de 85,9 meses).

### **5.8.2 Análise univariada para Sobrevida Livre de Recidiva**

Após a realização da análise univariada, em relação às variáveis clínico-patológicas estudadas, apenas o estadiamento patológico apresentou associação com sobrevida livre de recidiva em 3 anos ( $p < 0,001$ ). Quanto à avaliação dos marcadores CD74, TGFB1 e TGFB2 no tumor e estroma, foi observado associação entre sobrevida livre de recidiva e percentagem de marcação de CD74, através do parâmetro: marcação maior que 50% versus menor que 50% ou negativo, quando avaliado no tumor (SLR em 3 anos: 93,3% x 67,8%,  $p=0,018$ ). Em análise de subgrupo, quanto ao estágio I apenas, observamos SLR em 3 anos de 93,3% x 82% em favor da marcação em >50% das células tumorais ( $p=0,24$ ) (Tabela 20, Figuras 5 a 7).

Foi observado, também, associação entre a intensidade de marcação de CD74 no estroma ( $p=0,043$ ) e percentagem do CD74, quando avaliado por 4 estratificações: negativo, 1-20%, 21-50% e >50% ( $p=0,028$ ) e sobrevida livre de recidiva. Entretanto, esse achado foi provavelmente relacionado aos casos agrupados como marcação negativa, dois casos apenas, que

apresentaram evolução totalmente distinta do restante do grupo, não parecendo apresentar significado clínico (Tabela 20).

Não foi observado associação entre sobrevida livre de recidiva e os demais marcadores. Houve dificuldades em se estabelecer clara distinção entre os graus de intensidade de marcação dos três marcadores, principalmente entre as marcações forte e moderada, prejudicando a correta interpretação dessa variável, bem como o índice composto por ela.

**Tabela 20** - Análise univariada para sobrevida livre de recidiva.

| Variável                | N  | SLR em 3 anos (%) | Valor de p |
|-------------------------|----|-------------------|------------|
| <b>Idade</b>            |    |                   |            |
| <65 anos                | 69 | 74,2              | 0,493      |
| >65 anos                | 59 | 66,6              |            |
| <b>Sexo</b>             |    |                   |            |
| Masculino               | 69 | 64,0              | 0,197      |
| Feminino                | 59 | 78,4              |            |
| <b>Tabagismo</b>        |    |                   |            |
| Nunca fumou             | 16 | 67,0              | 0,316      |
| Tabagista               | 58 | 67,4              |            |
| Ex-tabagista            | 48 | 78,4              |            |
| <b>DPOC</b>             |    |                   |            |
| Não                     | 47 | 72,5              | 0,644      |
| Sim                     | 47 | 79,3              |            |
| <b>Estadiamento</b>     |    |                   |            |
| I                       | 78 | 84,3              | <0,001     |
| II                      | 26 | 56,4              |            |
| III                     | 24 | 42,9              |            |
| <b>Tipo Histológico</b> |    |                   |            |
| Carcinoma epidermóide   | 44 | 69,1              | 0,899      |
| Adenocarcinoma          | 67 | 67,9              |            |
| Bronquíolo-alveolar     | 12 | 83,3              |            |
| Grandes células         | 1  | 60                |            |
| Outros                  | 4  | 57                |            |

Cont/ Tabela 20

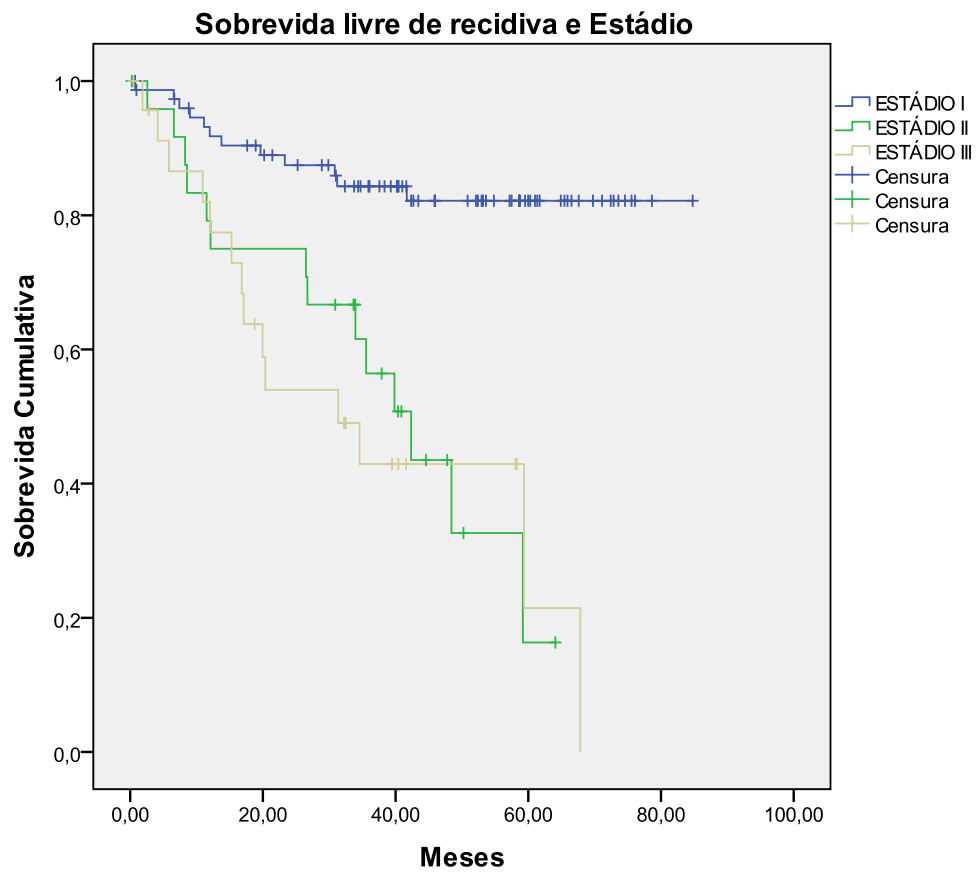
| Variável               | N   | SLR em 3 anos (%) | Valor de p |
|------------------------|-----|-------------------|------------|
| CD74                   |     |                   |            |
| Intensidade-tumor      |     |                   |            |
| Negativo               | 72  | 68                | 0,935      |
| Fraco                  | 11  | 72,7              |            |
| Moderado               | 25  | 73,9              |            |
| Forte                  | 20  | 79,3              |            |
| Percentagem-tumor      |     |                   |            |
| Negativo               | 72  | 69,1              | 0,127      |
| 1-20%                  | 21  | 71,4              |            |
| 21-50%                 | 18  | 65,7              |            |
| >50%                   | 17  | 87,5              |            |
| <50%                   | 112 | 67,8              | 0,018      |
| >50%                   | 16  | 93,3              |            |
| Índice-tumor           |     |                   |            |
| Índice abaixo da média | 99  | 70,1              | 0,816      |
| Índice acima da média  | 29  | 74,6              |            |
| Intensidade-estroma    |     |                   |            |
| Negativo               | 2   | 0                 | 0,041*     |
| Fraco                  | 16  | 79,4              |            |
| Moderado               | 34  | 64,3              |            |
| Forte                  | 76  | 74,6              |            |
| Percentagem-estroma    |     |                   |            |
| Negativo               | 2   | 0                 | 0,028*     |
| 1-20%                  | 18  | 87,8              |            |
| 21-50%                 | 36  | 63,2              |            |
| >50%                   | 72  | 74,1              |            |
| <50%                   | 56  | 65,9              | 0,138      |
| >50%                   | 72  | 77,2              |            |
| Índice-estroma         |     |                   |            |
| Índice abaixo da média | 37  | 65                | 0,078      |
| Índice acima da média  | 91  | 73,7              |            |
| TGFB1                  |     |                   |            |
| Intensidade-tumor      |     |                   |            |
| Negativo               | 74  | 66,9              | 0,96       |
| Fraco                  | 9   | 62,5              |            |
| Moderado               | 13  | 75,5              |            |
| Forte                  | 32  | 80,5              |            |

Cont/ Tabela 20

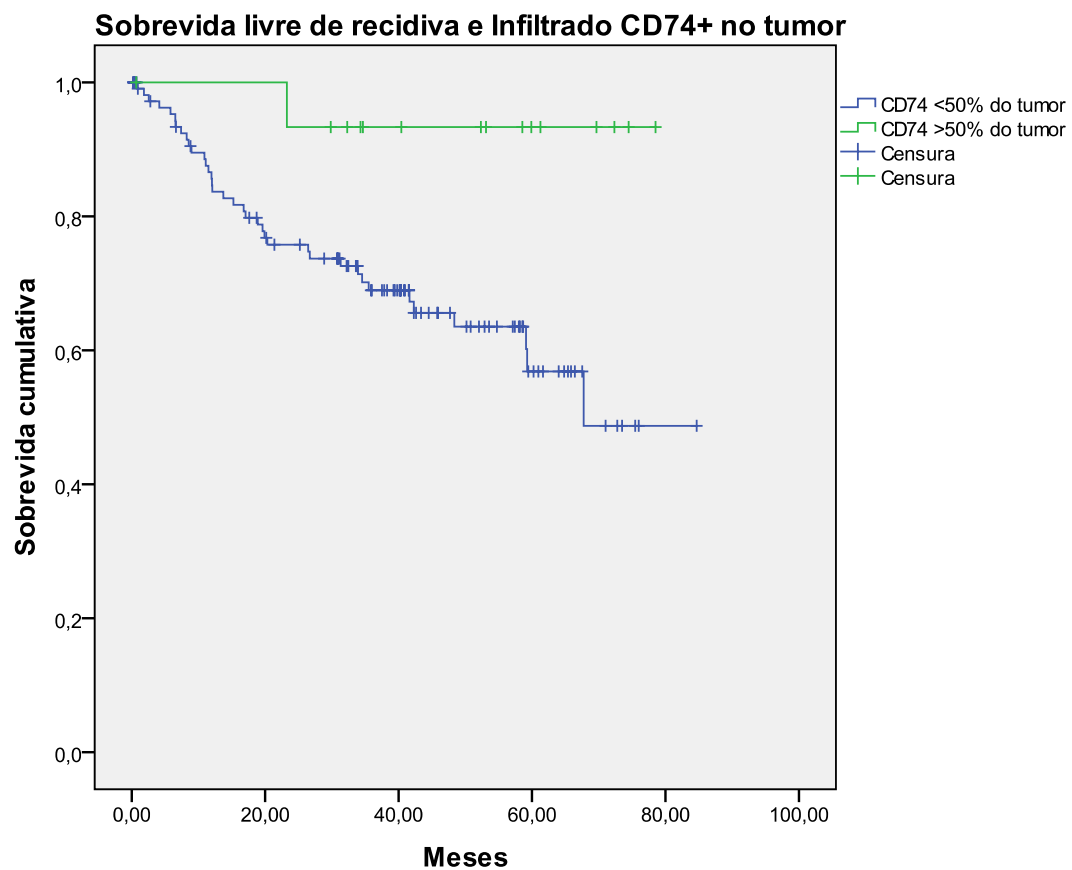
| Variável               | N   | SLR em 3 anos (%) | Valor de p |
|------------------------|-----|-------------------|------------|
| Percentagem-tumor      |     |                   |            |
| Negativo               | 74  | 66,9              | 0,476      |
| 1-20%                  | 15  | 80                |            |
| 21-50%                 | 12  | 75                |            |
| >50%                   | 27  | 75,3              |            |
| <50%                   | 101 | 69,8              | 0,339      |
| >50%                   | 27  | 75,3              |            |
| Índice-tumor           |     |                   |            |
| Índice abaixo da média | 74  | 66,9              | 0,658      |
| Índice acima da média  | 54  | 76,5              |            |
| Intensidade-estroma    |     |                   |            |
| Negativo               | 85  | 74                | 0,566      |
| Fraco                  | 15  | 71,4              |            |
| Moderado               | 12  | 61,4              |            |
| Forte                  | 16  | 62,5              |            |
| Percentagem-estroma    |     |                   |            |
| Negativo               | 85  | 74                | 0,348      |
| 1-20%                  | 21  | 75                |            |
| 21-50%                 | 9   | 67,2              |            |
| >50%                   | 13  | 73,3              |            |
| <50%                   | 115 | 70,7              | 0,51       |
| >50%                   | 13  | 73,3              |            |
| Índice-estroma         |     |                   |            |
| Índice abaixo da média | 74  | 74                | 0,262      |
| Índice acima da média  | 54  | 65,2              |            |
| TGFB2                  |     |                   |            |
| Intensidade-tumor      |     |                   |            |
| Negativo               | 21  | 66,8              | 0,466      |
| Fraco                  | 22  | 75,3              |            |
| Moderado               | 58  | 64,6              |            |
| Forte                  | 26  | 83,2              |            |
| Percentagem-tumor      |     |                   |            |
| Negativo               | 21  | 66,8              | 0,625      |
| 1-20%                  | 8   | 68,6              |            |
| 21-50%                 | 31  | 59,5              |            |
| >50%                   | 67  | 77,6              |            |
| <50%                   | 60  | 62,6              | 0,292      |

Cont/ Tabela 20

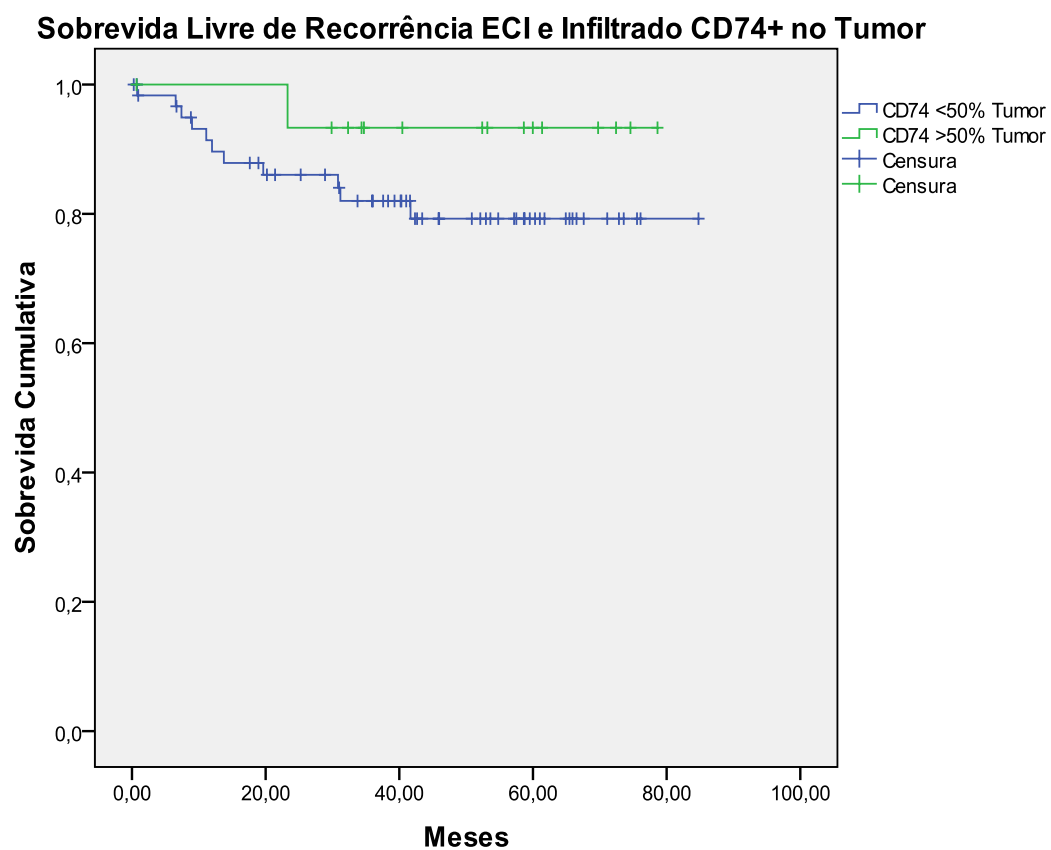
| Variável                   | N  | SLR em 3 anos (%) | Valor de p |
|----------------------------|----|-------------------|------------|
| >50%                       | 67 | 77,6              |            |
| <b>Índice-tumor</b>        |    |                   |            |
| Índice abaixo da média     | 35 | 65,3              | 0,493      |
| Índice acima da média      | 92 | 72,7              |            |
| <b>Intensidade-estroma</b> |    |                   |            |
| Negativo                   | 24 | 58,7              | 0,708      |
| Fraco                      | 55 | 77,6              |            |
| Moderado                   | 37 | 71,1              |            |
| Forte                      | 11 | 63,6              |            |
| <b>Porcentagem-estroma</b> |    |                   |            |
| Negativo                   | 24 | 58,7              | 0,393      |
| 1-20%                      | 34 | 84,3              |            |
| 21-50%                     | 30 | 64,2              |            |
| >50%                       | 39 | 71                |            |
| <50%                       | 88 | 70,8              | 0,843      |
| >50%                       | 39 | 71                |            |
| <b>Índice-estroma</b>      |    |                   |            |
| Índice abaixo da média     | 52 | 75,1              | 0,332      |
| Índice acima da média      | 75 | 67,5              |            |



**Figura 5** - Estadiamento Agrupado e Sobrevida Livre de Recidiva. ( $p < 0,001$ )



**Figura 6** – Sobrevida Livre de Recidiva e marcação para CD74 nas células tumorais avaliada em marcação maior ou menor do que 50% das células. (p=0,018)



**Figura 7** – SLR e marcação para CD74 nas células tumorais avaliada em marcação maior ou menor do que 50% das células apenas no estágio I. (p=0,24)

### 5.8.3 Análise Multivariada para Sobrevida Livre de Recidiva

Na avaliação da análise multivariada para sobrevida livre de recidiva foram utilizadas as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e as variáveis que atingiram valor de p de até 0,20. Através da análise pela técnica de riscos proporcionais de Cox, apenas Estadiamento patológico (HR: 4,5; IC 95% [2,0-10,1],  $p < 0,001$ ) foi fator de risco independente para a recidiva da doença (Tabela 21).

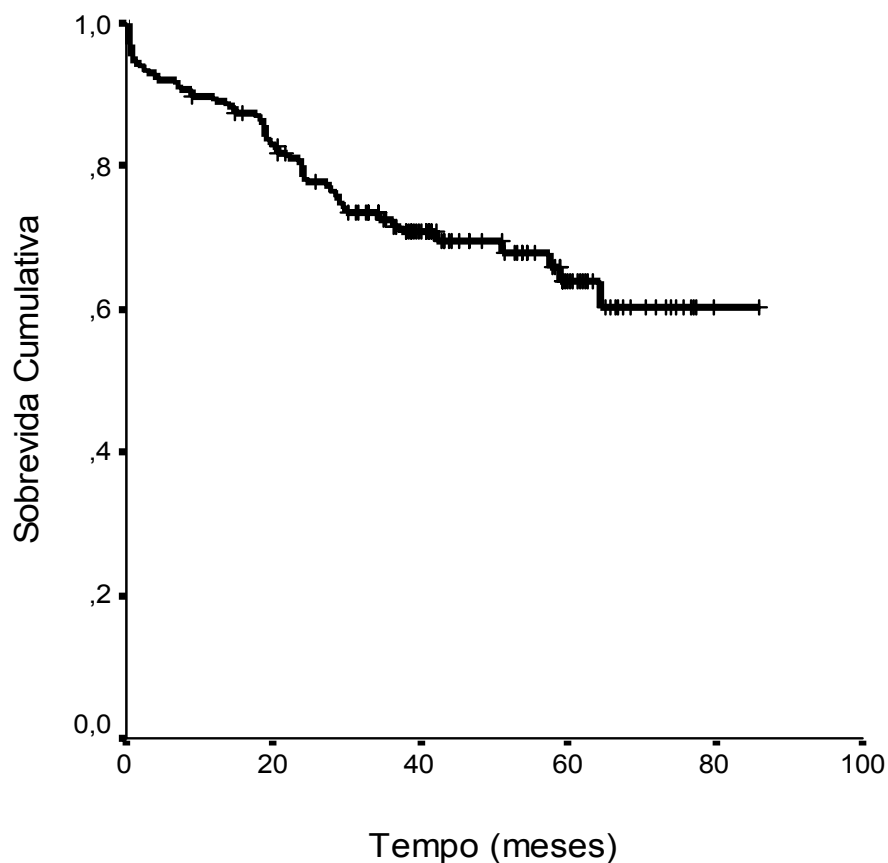
**Tabela 21** - Análise Multivariada para Sobrevida Livre de Recidiva.

| Variável                     | HR  | IC95%      | p      |
|------------------------------|-----|------------|--------|
| Estadiamento                 |     |            |        |
| I                            | 1   | Referência | <0,001 |
| II                           | 3,8 | (1,7-8,6)  |        |
| III                          | 4,5 | (2,0-10,1) |        |
| Positividade CD74 no tumor   |     |            |        |
| > 50%                        | 1   | Referência | 0,197  |
| < 50%                        | 3,8 | (0,49-30)  |        |
| Positividade CD74 no estroma |     |            |        |
| > 50%                        | 1   | Referência | 0,172  |
| < 50%                        | 3,5 | (0,82-4,0) |        |

### 5.8.4 Resultado da Sobrevida Global

Em relação à amostra de 129 pacientes como um todo observamos uma sobrevida global de 71,7% em 3 anos para um tempo de seguimento mediano de 40,37 meses (valor mínimo de 0,23 meses e máximo de 85,9 meses) Figura 8. A análise foi realizada em 3 anos em decorrência da

inclusão de pacientes até o ano 2007, estes com apenas 3 anos de seguimento.



**Figura 8** - Sobrevida Global para pacientes com CPCNP não estratificada para nenhuma variável estudada.

#### 5.8.5 Análise univariada para Sobrevida Global

Em relação às variáveis clínico-patológicas estudadas, foi observado que idade ( $p=0,017$ ), sexo ( $p=0,006$ ) e estadiamento patológico ( $p=0,001$ ) apresentaram associação estatisticamente significativa com a sobrevivida global em 3 anos. Tipo histológico também apresentou associação com SG em 3 anos, entretanto, quando tumores de grandes células (1 caso) foi

agrupado com outros tumores (4 casos de carcinoma adenoescamoso) essa associação foi perdida (Tabela 22).

Na avaliação dos marcadores CD74, TGFB1 e TGFB2 no tumor e estroma e sobrevida global, nenhum marcador apresentou associação estatisticamente significativa com a sobrevida global. Entretanto, ressalva deve ser feita quanto à avaliação do CD74 no tumor, através do parâmetro: marcação maior que 50% versus menor que 50% ou negativo, onde observamos curvas de sobrevida totalmente dissociadas e muitos casos censurados, demonstrando um SG em 3 anos de 87,5% x 69,4%, favorecendo os pacientes com infiltrado >50% de CD74 no tumor ( $p=0,074$ ). Esse achado necessita de maior tempo de seguimento para uma conclusão definitiva (Figura 9). Nenhuma avaliação por intensidade ou pelo índice formado pela intensidade e percentagem se mostrou capaz de diferenciar evoluções distintas em relação à sobrevida global.

**Tabela 22** - Análise univariada para sobrevida global

| Variável                 | N   | SG em 3 anos (%) | Valor de p |
|--------------------------|-----|------------------|------------|
| <b>Idade</b>             |     |                  |            |
| <65 anos                 | 69  | 80,6             | 0,017      |
| >65 anos                 | 59  | 61,2             |            |
| <b>Sexo</b>              |     |                  |            |
| Masculino                | 69  | 62,5             | 0,006      |
| Feminino                 | 59  | 82,4             |            |
| <b>Tabagismo</b>         |     |                  |            |
| Nunca fumou              | 16  | 75,0             | 0,933      |
| Tabagista                | 58  | 71,1             |            |
| Ex-tabagista             | 48  | 74,3             |            |
| <b>DPOC</b>              |     |                  |            |
| Não                      | 47  | 76,2             | 0,971      |
| Sim                      | 47  | 75,6             |            |
| <b>Estadiamento</b>      |     |                  |            |
| I                        | 78  | 80,2             | 0,001      |
| II                       | 26  | 64,1             |            |
| III                      | 24  | 52,3             |            |
| <b>Tipo Histológico</b>  |     |                  |            |
| Carcinoma epidermóide    | 44  | 67,1             | 0,019*     |
| Adenocarcinoma           | 67  | 72,2             |            |
| Bronquíolo alveolar      | 12  | 81,8             |            |
| Grandes células          | 1   | 0                |            |
| Outros                   | 4   | 50               |            |
| <b>CD74</b>              |     |                  |            |
| <b>Intensidade-tumor</b> |     |                  |            |
| Negativo                 | 72  | 70               | 0,742      |
| Fraco                    | 11  | 81,8             |            |
| Moderado                 | 25  | 74,8             |            |
| Forte                    | 20  | 69,6             |            |
| <b>Porcentagem-tumor</b> |     |                  |            |
| Negativo                 | 72  | 70               | 0,296      |
| 1-20%                    | 21  | 71,2             |            |
| 21-50%                   | 18  | 65,2             |            |
| >50%                     | 17  | 88,2             |            |
| <50%                     | 112 | 69,4             | 0,074      |
| >50%                     | 16  | 87,5             |            |

Cont/ Tabela 22

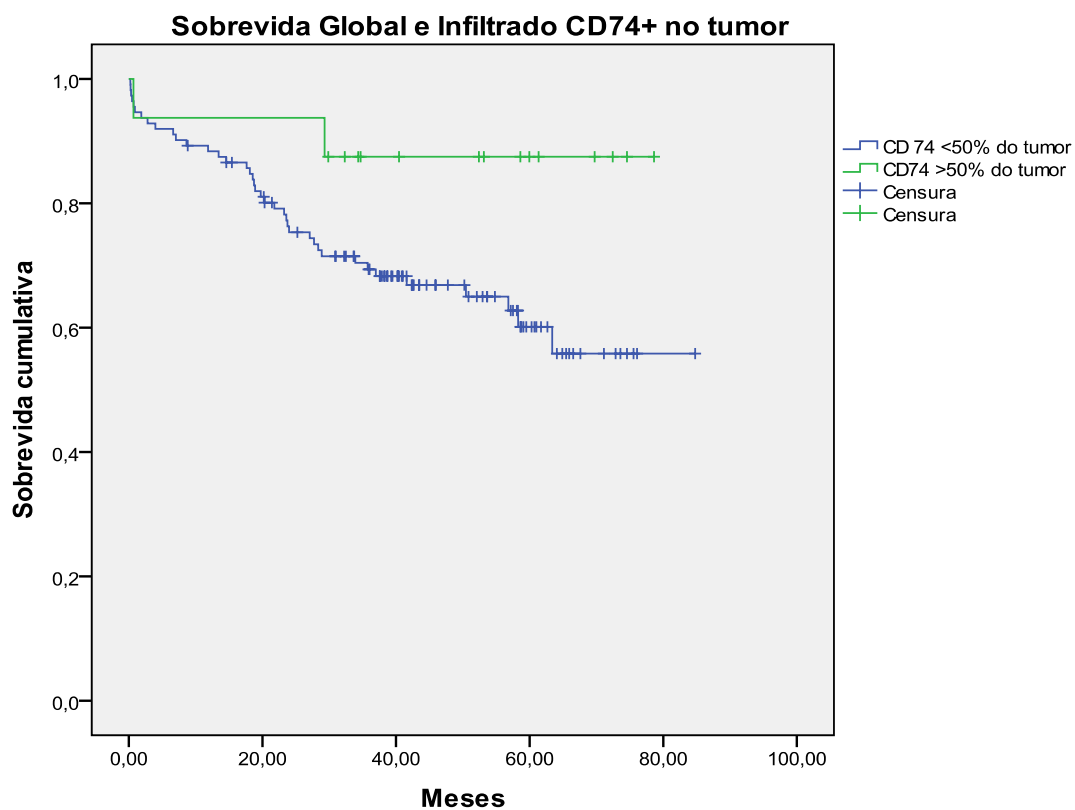
| Variável                   | N   | SG em 3 anos (%) | Valor de p |
|----------------------------|-----|------------------|------------|
| <b>Índice-tumor</b>        |     |                  |            |
| Índice abaixo da média     | 99  | 71,7             | 0,507      |
| Índice acima da média      | 29  | 71               |            |
| <b>Intensidade-estroma</b> |     |                  |            |
| Negativo                   | 2   | 50               | 0,298      |
| Fraco                      | 16  | 75               |            |
| Moderado                   | 34  | 71,9             |            |
| Forte                      | 76  | 71,7             |            |
| <b>Percentagem-estroma</b> |     |                  |            |
| Negativo                   | 2   | 50               | 0,131      |
| 1-20%                      | 18  | 83,3             |            |
| 21-50%                     | 36  | 65,2             |            |
| >50%                       | 72  | 73               |            |
| <50%                       | 56  | 70               | 0,581      |
| >50%                       | 72  | 73               |            |
| <b>Índice-estroma</b>      |     |                  |            |
| Índice abaixo da média     | 37  | 71,7             | 0,909      |
| Índice acima da média      | 91  | 72               |            |
| <b>TGFB1</b>               |     |                  |            |
| <b>Intensidade-tumor</b>   |     |                  |            |
| Negativo                   | 74  | 70,5             | 0,578      |
| Fraco                      | 9   | 66,7             |            |
| Moderado                   | 13  | 76,2             |            |
| Forte                      | 32  | 74,4             |            |
| <b>Percentagem-tumor</b>   |     |                  |            |
| Negativo                   | 74  | 70,5             | 0,68       |
| 1-20%                      | 15  | 80               |            |
| 21-50%                     | 12  | 73,3             |            |
| >50%                       | 27  | 69,6             |            |
| <50%                       | 101 | 72,2             | 0,93       |
| >50%                       | 27  | 69,6             |            |
| <b>Índice-tumor</b>        |     |                  |            |
| Índice abaixo da média     | 74  | 70,5             | 0,321      |
| Índice acima da média      | 54  | 73,4             |            |

Cont/ Tabela 22

| Variável                   | N   | SG em 3 anos (%) | Valor de p |
|----------------------------|-----|------------------|------------|
| <b>Intensidade-estroma</b> |     |                  |            |
| Negativo                   | 85  | 75,7             | 0,754      |
| Fraco                      | 15  | 62,8             |            |
| Moderado                   | 12  | 58,3             |            |
| Forte                      | 16  | 67,7             |            |
| <b>Percentagem-estroma</b> |     |                  |            |
| Negativo                   | 85  | 75,7             | 0,284      |
| 1-20%                      | 21  | 70,7             |            |
| 21-50%                     | 9   | 38,9             |            |
| >50%                       | 13  | 68,4             |            |
| <50%                       | 115 | 72,1             | 0,912      |
| >50%                       | 13  | 68,4             |            |
| <b>Índice-estroma</b>      |     |                  |            |
| Índice abaixo da média     | 74  | 70,5             | 0,321      |
| Índice acima da média      | 54  | 73,4             |            |
| <b>TGFB2</b>               |     |                  |            |
| <b>Intensidade-tumor</b>   |     |                  |            |
| Negativo                   | 21  | 76,2             | 0,26       |
| Fraco                      | 22  | 72,4             |            |
| Moderado                   | 58  | 64,6             |            |
| Forte                      | 26  | 83,5             |            |
| <b>Percentagem-tumor</b>   |     |                  |            |
| Negativo                   | 21  | 76,2             | 0,447      |
| 1-20%                      | 8   | 50               |            |
| 21-50%                     | 31  | 70               |            |
| >50%                       | 67  | 73,6             |            |
| <50%                       | 60  | 69,2             | 0,281      |
| >50%                       | 67  | 73,6             |            |
| <b>Índice-tumor</b>        |     |                  |            |
| Índice abaixo da média     | 35  | 67,9             | 0,394      |
| Índice acima da média      | 92  | 73               |            |
| <b>Intensidade-estroma</b> |     |                  |            |
| Negativo                   | 24  | 73,7             | 0,656      |
| Fraco                      | 55  | 72,7             |            |
| Moderado                   | 37  | 66,2             |            |
| Forte                      | 11  | 78,8             |            |

Cont/ Tabela 22

| Variável               | N  | SG em 3 anos (%) | Valor de p |
|------------------------|----|------------------|------------|
| Percentagem-estroma    |    |                  |            |
| Negativo               | 24 | 73,7             | 0,412      |
| 1-20%                  | 34 | 79,1             |            |
| 21-50%                 | 30 | 61,6             |            |
| >50%                   | 39 | 71,4             |            |
| <50%                   | 88 | 70,1             | 0,937      |
| >50%                   | 39 | 71,4             |            |
| Índice-estroma         |    |                  |            |
| Índice abaixo da média | 52 | 78,5             | 0,382      |
| Índice acima da média  | 75 | 66,8             |            |



**Figura 9** - Sobrevida Global e marcação para CD74 nas células tumorais avaliada em marcação maior ou menor do que 50% das células. ( $p=0,074$ )

### 5.8.6 Análise Multivariada para Sobrevida Global

Em relação a análise multivariada para sobrevida global, foram utilizados as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e as variáveis que atingiram valor de p de até 0,20. Através da análise pela técnica de riscos proporcionais de Cox, apenas Estadiamento (HR: 3,0; IC 95% [1,4-6,5],  $p=0.004$ ) e idade (HR: 2,3; IC 95% [1,2-4,4],  $p=0,01$ ) foram fatores de risco independentes para o óbito (Tabela 23).

**Tabela 23** - Análise Multivariada para Sobrevida Global.

| Variável                   | HR  | IC 95%     | p     |
|----------------------------|-----|------------|-------|
| Estadiamento               |     |            |       |
| I                          | 1   | Referência | 0,04  |
| II                         | 2,4 | (1,1-5,2)  |       |
| III                        | 3   | (1,4-6,5)  |       |
| Sexo                       |     |            |       |
| Feminino                   | 1   | Referência | 0,131 |
| Masculino                  | 1,7 | (0,8-3,4)  |       |
| Idade                      |     |            |       |
| <65 anos                   | 1   | Referência | 0,01  |
| >65 anos                   | 2,3 | (1,2-4,4)  |       |
| Positividade CD74 no tumor |     |            |       |
| > 50%                      | 1   | Referência | 0,36  |
| < 50%                      | 2   | (0,4-9,3)  |       |

## 5 DISCUSSÃO

A importância do câncer de pulmão de células não-pequenas se baseia em dois pilares: frequência e taxa de mortalidade. Esta neoplasia representa a neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em todo o mundo, excetuando-se tumores de pele não-melanoma, e possui a maior taxa de mortalidade relacionada à neoplasia em ambos os sexos. Portanto, representa um sério problema na política de saúde mundial. Mesmo nos estádios mais precoces, de acordo com o estadiamento proposto pela AJCC, observa-se taxas elevadas de recidiva após a ressecção cirúrgica.

Durante décadas os tumores de pulmão de células não-pequenas foram tratados de forma semelhante, entretanto, cada vez mais se conhece a respeito das diferenças entre os diversos tipos celulares que constituem esse subgrupo e, principalmente, cada vez mais se conhece a respeito das bases moleculares envolvidas na gênese desses tumores.

Existe na literatura uma busca crescente do entendimento dos mecanismos relacionados à fisiopatologia desse grupo heterogêneo de neoplasias na tentativa de descobrir novos alvos terapêuticos e fatores prognósticos. Recentemente, estudos vêm avaliando determinadas características do infiltrado inflamatório e citocinas relacionadas com inflamação e correlacionando esses achados com a evolução das mais diversas neoplasias, possibilitando, em alguns casos, a distinção de evoluções diferentes de pacientes agrupados sob o mesmo estágio.

Entretanto, ainda se sabe muito pouco sobre todos os aspectos do processo inflamatório e sua relação com a promoção tumoral.

Foi optado, nesse estudo, pela análise do CD74 (receptor do MIF), e pela análise do TGF $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 devido a importância central que essas moléculas exercem na regulação do processo inflamatório.

A casuística deste estudo foi composta por 129 casos de câncer de pulmão de células não-pequenas, operados no período compreendido entre 01/2003 e 12/2007. Os dados epidemiológicos estão, em sua maioria, em concordância com a literatura nacional e mundial em se tratando de uma população de pacientes candidatos à ressecção cirúrgica.

Observamos um discreto predomínio do sexo masculino (54,3%), média de idade de 58,6 anos (54,2% dos indivíduos apresentando menos 65 anos) e com a maior parte dos pacientes apresentando história de exposição atual ou pregressa ao tabaco (82,8%).

Ao contrário do que observamos nos estudos iniciais de tratamento adjuvante, encontramos, neste estudo, um predomínio de tumores no estágio inicial (60,4% estágio patológico I). Isso se deve, em parte, à melhor seleção de pacientes para o procedimento cirúrgico, decorrente do melhor entendimento da evolução da doença com comprometimento linfonodal no mediastino (EC IIIA- N2) e da otimização dos exames utilizados no estadiamento, como a mediastinoscopia e o PET-CT. Houve o predomínio de lobectomias sobre pneumectomias (78,3% x 17,9%), o que é esperado visto o grande número de estágios I na amostra considerada.

O adenocarcinoma foi o subtipo histológico mais comum (51,9%), seguido pelo carcinoma epidermóide (34,8%), estando de acordo com os dados epidemiológicos atuais. O tratamento adjuvante mais realizado foi a quimioterapia baseada em platina, terapia padrão para esta situação, sendo a cisplatina e o etoposide o esquema mais utilizado.

Quanto à análise do CD74, foi observado que a percentagem de marcação em >50% das células no compartimento tumoral foi associada a sobrevida livre de recidiva na análise univariada. Esse padrão de marcação foi associado com sexo feminino, não-fumantes, histologia (bronquíolo-alveolar e adenocarcinoma) e estadiamento (estádio I) quando avaliado no tumor. Coincidentemente, essas características estão associadas com um melhor prognóstico em câncer de pulmão. Três dessas características também estão associadas com presença de mutações no gene *EGFR*, e seria interessante avaliar a presença destas nesta amostra e a eventual interação com expressão ou não de CD74, posto que não há dados descritos na literatura para esta associação em câncer de pulmão. Neste estudo não observamos associação da percentagem do infiltrado CD74+ no estroma e sobrevida livre de recidiva.

Na avaliação da intensidade não foi observado associação da intensidade de marcação do CD74 com sobrevida livre de recaída. Durante a leitura dos marcadores houve dificuldade significativa na diferenciação entre os diversos graus de intensidade, principalmente no estroma. Por esse mesmo motivo, acreditamos que a análise do índice também esteja

prejudicada, já que este é formado pela associação da intensidade e percentagem de células marcadas.

Considerando que a expressão do CD74 avaliada por imunohistoquímica se correlaciona com a atividade do MIF, fator relacionado com pior prognóstico devido à sua capacidade de estímulo à angiogênese, invasão, metastatização e modulação da resposta imune, era de se esperar que os pacientes que apresentaram maior percentagem de expressão de CD74 no tumor tivessem apresentado pior evolução, como demonstrado em um estudo em câncer de pâncreas submetidos à terapia multimodal, em que os pacientes que apresentavam marcação de CD74 em >70% das células do tumor apresentavam maiores de taxas de invasão vascular linfática, invasão perineural e pior sobrevida (NAGATA et al. 2009).

Entretanto, a exata função do CD74 e sua correlação com o MIF ainda não está totalmente estabelecida e a sua contribuição para carcinogênese é complexa e pode variar de acordo com o estágio de evolução da doença. O MIF é um mediador crítico da defesa do hospedeiro e é envolvido tanto na resposta inflamatória aguda quanto na crônica. O MIF tem sido relacionado com a capacidade de recrutar leucócitos ao sítio de inflamação através de ligação com os receptores CXCR2 e CXCR4, devido às suas propriedades quimiocinas-símile, e alguns estudos têm demonstrado evidências que exerce propriedades relacionadas com resposta inflamatória tipo Th1, dessa forma, se produzido nas fases iniciais da resposta inflamatória em volta do tumor poderia estar associado tanto a mecanismos pró-tumorais, quanto anti-tumorais (SCHWARTZ et al. 2009).

Em pulmão de modelos animais, a neutralização do MIF reduziu o acúmulo de neutrófilos no sítio de inflamação (TAKAHASHI et al. 2009). Em outros estudos, culturas de macrófagos/monócitos foram tratados com MIF e estes se tornaram mais fagocíticos e capazes de destruir patógenos intracelulares (NATHAN et al. 1973; JUTTNER et al. 1998). Em um estudo com linhagem celular de câncer de mama, foi sugerido que o MIF é determinante para a diferenciação dos macrófagos no subtipo M1. Neste estudo as células tumorais induziam à polarização M2 através da inibição da ação do MIF nos macrófagos associados ao tumor do tipo M1 (BURNETT et al. 2008). Outro estudo demonstrou falha nas células TCD4+ em se diferenciar no fenótipo Th1 na ausência do MIF (WONG et al 2009). Outras funções também atribuídas ao MIF são a capacidade de aumentar a expressão de receptores TLR4 em células apresentadoras de antígenos e antagonizar os efeitos de glicocorticóides. Logo tais atividades de MIF, que dependem pelo menos parcialmente de sua interação com seu receptor CD74, poderiam desempenhar um papel antitumoral, particularmente nas fases mais iniciais da progressão tumoral (ROGER et al. 2001).

A população do nosso estudo foi composta na sua grande maioria por tumores em estágio inicial e a maior expressão de CD74 no tumor se correlacionou com melhor sobrevida livre de recidiva. Não se sabe qual é a exata relação biológica desse achado com a marcação pelo CD74 acontecendo no estroma neste momento. Nem com a presença do infiltrado por TAM do tipo M1 que pode conferir um melhor prognóstico. Também não sabemos da relação desse achado com relação à predição de resposta ao

tratamento, visto que esses pacientes em estágio I não são candidatos à terapia adjuvante. Portanto, seria interessante realizar essa análise sob a ótica da expressão do CD44 (co-fator para o CD74), do MIF e do infiltrado por macrófagos M1 para que se possa tirar maiores conclusões.

Outra importante consideração para o entendimento dos achados é que a precisa função do MIF pode depender de onde está ocorrendo a expressão celular (intracelular, extracelular, no tumor, ou nas células do estroma). O MIF é expresso em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo células T, monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células tumorais. Diferente de outras citocinas, ele é armazenado no citosol dessas células. No ambiente extracelular liga-se com afinidade ao domínio extramembranar do CD74, e com o auxílio do CD44, leva à ativação da via ERK1/2 MAPK e AKT/PI3K, relacionada com progressão tumoral. Níveis elevados de MIF extracelular se correlacionam com maior quantidade de citocinas angiogênicas, maior microdensidade vascular e pior prognóstico (McCLELLAND et al. 2009).

Quanto à sua função no compartimento intracelular, estudos observam que o MIF contribui para a sobrevivência celular, controle do ciclo celular e da homeostase. Este aparente benefício, quando no compartimento intracelular, parece estar relacionado à via JAB1/CSN5 que promove a degradação de p27 e sofre regulação pelo MIF (KLEEMANN et al. 1999). Em linhagens de células de câncer de mama a expressão abundante de MIF intratumoral foi associado com tumores de tamanhos menores, receptor de progesterona e estrogênio e melhor evolução. Nestas linhagens, tumores

invasivos, quando comparados com tumores in situ, apresentavam níveis menores de MIF intracelular e maior expressão de CD74 (VERJANS et al. 2009).

Os efeitos do MIF acontecem tanto de forma parácrina do tumor para o estroma, quanto do estroma para o tumor. Em um estudo foi observado aumento da secreção de MIF por células de câncer de mama após estímulo com MIF recombinante, levantando a hipótese que o MIF oriundo dos TAMs pode desencadear aumento sustentado de MIF pelas células tumorais, sugerindo uma alça de amplificação. Além disso, ocorre também o efeito do estímulo do MIF do tumor de forma autócrina (VERJANS et al. 2009).

Entretanto, a sequência de eventos não é totalmente conhecida. Em estudo que avaliou a expressão de quimiocinas angiogênicas em relação com a expressão do CD74, foi observado aumento crescente da expressão dessas quimiocinas quando avaliadas em pacientes com marcação negativa, seguido por marcação apenas estromal e com os maiores níveis detectados em pacientes com marcação estromal e tumoral concomitante, sugerindo talvez, que a influência se dê no sentido do tumor para o estroma e esse, por sua vez, após ativação, passasse a estimular ainda mais o tumor (MCCLELLAND et al. 2009).

No presente estudo, a marcação de CD74 em >50% das células se correlacionou com sobrevida livre de progressão apenas quando avaliada no tumor, sem correlação com o estroma. Interessante foi o fato de que apenas pacientes do estágio patológico I apresentaram marcação >50% das células do tumor, com nenhum paciente nos estágios II e III apresentando esse

achado. Quando avaliamos o estroma em relação a percentagem de marcação >50%, observamos marcação nos três estádios, sem diferença estatística. Dos 16 casos onde a marcação para CD74 no tumor foi >50%, 10 (62,5%) aconteceram em pacientes com marcação no estroma <50% para CD74. Esse achado pode representar uma fase ainda inicial na relação entre CD74/MIF do tumor e estroma, onde se encontra, por exemplo, uma maior concentração do MIF intracelular no tumor, justificando assim uma melhor evolução. Entretanto, não é possível afirmar baseado nos dados disponíveis, uma vez que não realizamos imunoistoquímica para MIF.

Outro ponto a ser ressaltado é em relação a ativação do CD74. O padrão de marcação neste estudo foi semelhante ao que é reportado na literatura, com a maior concentração ocorrendo no compartimento intracelular. Sabendo-se que o CD74 é um receptor de superfície de membrana, seria interessante saber se a sinalização do MIF/CD74 origina-se da superfície celular ou é ativada por endossomos, por exemplo.

Foi observado que a marcação por CD74 em > 50% das células no tumor foi associado com sexo feminino, não-tabagistas e subtipos histológicos adenocarcinoma e bronquíolo-alveolar. Como referido inicialmente, em conjunto, esses fatores se associam com maior chance de se encontrar mutação ativadora no gene do EGFR, que confere melhor prognóstico. Em estudos com linhagem celular de câncer de mama, níveis elevados de MIF intracelular apresentou correlação positiva, moderada e significativa com a expressão aumentada do EGFR (XU et al. 2008).

Em relação ao TGFB, nenhuma das duas isoformas avaliadas (TGFB1 e TGFB2) evidenciou associação com a sobrevida livre de recidiva ou sobrevida global. Neste estudo observamos que a marcação para TGFB no tumor variou entre as duas isoformas. Foi visto que TGFB2 marcou a maior parte das células do tumor e essa marcação foi forte ou moderada na maioria dos casos. Quanto ao TGFB1, no tumor, a marcação foi negativa na maioria dos casos.

Entretanto, semelhante ao ocorrido na avaliação da intensidade de marcação pelo CD74, houve muita dificuldade em se estabelecer limites precisos entre os diversos graus de intensidade, dificultando assim também a utilização do escore formado pela intensidade e percentagem de células.

Muitos autores focam suas análises na avaliação do TGFB no tumor e dados da marcação em células do estroma são escassos. Semelhante ao estudo de BACMAN et al (2007) que avaliou a expressão de TGFB1 no estroma de tumores colorretais, não encontramos marcação nas células do estroma na maioria dos casos para TGFB1. Nosso estudo acrescenta dados à literatura, visto que dados do padrão de expressão de TGFB1 e B2 no estroma de tumores de pulmão de células não-pequenas é escasso.

Assim como CD74, a marcação por TGFB2 em >50% das células do tumor se correlacionou com os subtipos histológicos adenocarcinoma e bronquíolo-alveolar. Entretanto, em 80,5% dos casos onde TGFB2 marcou >50% das células tumorais a marcação para CD74 ocorreu em menos da metade das células do tumor, ou seja, não houve associação entre as duas marcações. Em relação ao estadiamento, apenas o TGFB1 mostrou

associação, onde a marcação das células do estroma em >50% se associou com estágio I. Diferente do observado em um estudo em câncer colorretal, a marcação do TGFB1 não aumentou sucessivamente com a progressão dos estádios (BELLONE et al. 2001).

Contudo, a correta interpretação desses resultados é complicada pelas dificuldades associadas com a distinção da forma biologicamente latente, inativa do TGFB da sua forma ativa. Os dados na literatura ainda são muito conflitantes em relação ao papel prognóstico dessas moléculas. Existe, sabidamente, muitos mecanismos pelos quais a via do TGFB pode estar alterada, sem necessariamente existir alteração no próprio TGFB, como por exemplo, a redução da expressão dos receptores no estroma ou tumor por mutação ou *downregulation* ou por alterações na via de sinalização intracelular mediada pelas moléculas Smad 2,3 e 4 (YANG e YANG 2009).

A despeito das análises feitas com os marcadores neste estudo, na análise multivariada para sobrevida livre de recidiva, apenas a variável estágio patológico se mostrou independente.

Assim, acreditamos que o CD74 tenha um papel importante na biologia do CPCNP inicial e sua interação com o hospedeiro, embora precisemos esclarecer melhor o seu significado, tanto pela avaliação da expressão de moléculas coadjuvantes e reguladoras (MIF, CD44), quanto da melhor caracterização do microambiente celular onde estamos observando esta expressão, bem como através da avaliação de modelos animais de câncer de pulmão controlados para esta variável, principalmente pelo

conjunto crescente de evidências da sua relevância em outros tumores e a existência inclusive de ensaios clínicos com drogas (anticorpos monoclonais) dirigidas contra este alvo.

## 6 CONCLUSÕES

1. A marcação para CD74 no tumor se associou com sexo feminino, com não-tabagistas, com os tipos histológicos adenocarcinoma e bronquíolo-alveolar e com estágio I.
2. A marcação para CD74 em mais de 50% das células do tumor se associou de forma significativa com melhor sobrevida livre de recidiva em 3 anos quando comparado com tumores que expressavam CD74 em menos de 50% das suas células.
3. A marcação para TGFB1 foi negativa na maioria dos casos tanto no tumor quanto no estroma. TGFB2 foi positiva na maioria dos casos, com intensidade maior observado no tumor.
4. TGFB2 apresentou associação com DPOC e tabagismo.
5. Neste estudo as isoformas do TGFB, B1 e B2, não se associaram com sobrevida livre de recidiva e sobrevida global.
6. Estádio patológico foi fator independente para o desfecho sobrevida livre de recidiva.
7. Estádio patológico e idade foram fatores independentes para sobrevida global.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Crit Rev Oncol/Hematol** 2008; 66:1-9.

Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:5220-7.

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.

Bacman D, Merkel S, Croner R, et al. TGFB receptor 2 downregulation in tumor-associated stroma worsens prognosis and high-grade tumors show more tumor-associated macrophages and lower TGFB1 expression in colon carcinoma: a retrospective study. **BMC cancer** 2007; 7:156-66.

Baleeiro RB, Anselmo LB, Soares FA, et al. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in lung cancer. **Cancer Immunol Immunother** 2008; 57:1335-45.

Bell D, Chomart P, Broyles D, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. **J Exp Med** 1999; 190:1417-26.

Bellone G, Carbone A, Tibaudi D, et al. Differential expression of transforming growth factors B1, B2 e B3 in human colon carcinoma. **Eur J Cancer** 2001; 37:224-33.

Burnett GT, Weathersby DC, Taylor TE, et al. Regulation of inflammation-and angiogenesis-related gene expression in breast cancer cells and co-cultured macrophages. **Anticancer Res** 2008; 28:2093-99.

Cabioglu N, Sahin AA, Morandi P, et al. Chemokine receptors in advanced breast cancer: differential expression in metastatic disease sites with diagnostic and therapeutic implications. **Ann Oncol** 2010; 20:1013-9.

Colonna M, Trinchieri G, Lyu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat Immunol** 2004; 5:1219-26.

Coussens LM, Werb Z. Review article Inflammation and cancer. **Nature** 2002; 420: 860-7.

Douillard JY, Rosell R, De Lena M, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. **Lancet Oncol** 2006; 7:719-27.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol** 2002; 3:991-8.

Fukuyama T, Ichiki Y, Yamada S, et al. Cytokine production of lung cancer cell lines: correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both *in vivo* and *in vitro*. **Cancer Sci** 2007; 98:1048-54.

Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. **Cancer Res** 1992; 52:6949-52.

Hsuan-Yu Chen, Sung-Liang Yu, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. **N Eng J Med** 2007; 356:11-20.

Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, et al. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non- small- cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3480-6.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hăo Y, et al. Cancer statistics 2009. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:225-49.

Juttner SJ, Bernhagen CN, Metz M, et al. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNFA. **J Immunol** 1998; 161:2383-90.

Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. **Cancer** 2008; 113:1387-95.

Kleemann R, Hausser A, Geiger G, et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. **Nature** 2000; 408:211-16.

Klim SO, Jeong JY, Kim MR, et al. Efficacy of gemcitabine in patients with non-small- cell lung cancer according to promoter polymorphisms of the ribonucleotide reductase m1 gene. **Clin Cancer Res** 2008; 14:3083-8.

Koizumi K, Kozawa Y, Ohashi Y, et al. CCL21 promotes the migration and adhesion of highly lymph node metastatic human non-small cell lung cancer Lu-99 in vitro. **Oncol Rep** 2007; 17:1511-6.

Laverty HG, Wakefield LM, Occleston NL, et al. TGFB3 and cancer: A review. **Cytokine Growth Factor Rev** 2009; 19:305-17.

Lee H, Baek S, Joe SJ, Pyo SN. Modulation of IFN-gamma production by TNF-alpha in macrophages from the tumor environment: significance as an angiogenic switch. **Int Immunopharmacol** 2006; 6:71-8.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 2002; 23:549-55.

McClelland M, Zhao L, CarsKadon S, et al. Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer. **Am J Pathol** 2009; 174:638-46.

Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGFB in cancer. **J Pathol** 2011; 223:205-18.

Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. **Chest** 1997; 111:1710-7.

Nagata S, Jin YF, Yoshizato K, et al. CD74 Is a Novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer receiving multimodal therapy. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:2531-38.

Nathan CF, Remold HG, David JR, et al. Characterization of a lymphocyte factor witch alters macrophage function. **J Exp Med** 1973; 137:275-88.

Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, et al. Clinical significance of VEGF-C status in tumor cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. **Br J Cancer** 2004; 91:498-503.

Ohri MA, Shikotra RH, Green DA, Bradding WP. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. **Eur Respir J** 2009; 33:118-26.

Ono M. Review article: molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci** 2008; 99:1501-6.

Paiva CE, Drigo SA, Rosa FE, et al. Absence of transforming growth factorB type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumors. **Ann Oncol** 2010; 21:734-40.

Perrot I, Blanchard D, Freymond N, et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. **J Immunol** 2007; 178:2763-9.

Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. **Semin Cancer Biol** 2004; 14:443-9.

Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. **Am J Respir Crit Care Med** 2003; 167:1676-86.

Ren Y, Law S, Huang X, et al. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg** 2005; 242:55-63.

Rendon B, Willer S, Zundel W, et al. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)- dependent tumor microenvironmental adaptation. **Exp Mol Pathol** 2009; 86:180-5.

Roger T, David J, Glauser MP, et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. **Nature** 2001; 414:920-24.

Schwartz V, Lue H, Kraemer S, et al. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. **FEBS Lett** 2009; 583:2749-57.

Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Harber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:587-95.

Shi X, Leng L, Wang T, et al. CD44 Is the signaling Component of the macrophage migration factor-CD74 receptor complex. **Immunity** 2006; 25:595-606.

Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer Lett** 2008; 267:204-15.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. **Eur J Cancer** 2006; 42:717-27.

Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with no-small-cell lung cancer. **Chest** 2005; 127:978-83.

Soufla G, Porichis F, Sourvinos G, et al. Transcriptional deregulation of VEGF, FGF2, TGFB1,2,3 and cognate receptors in breast tumorigenesis. **Cancer Lett** 2006; 235:100-13.

Starlets D, Gore Y, Binsky I, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. **Blood** 2006; 107:4807-16.

Su L, Jinping Zhang J, Huanbin Xu H, et al. Differential expression of cxcr4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. **Clin Cancer Res** 2005; 11:8273-80.

Takahashi K, Koga K, Linge HM, et al. Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. **Respir Res** 2009; 10:33-44.

Treilleux I, Blay JY, Bendriss- Vermare N, et al. Dendritic Cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:7466-74.

Van Ginderachter JO, Movahedi K, Ghassabeh GH, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology** 2006; 211:487-501.

Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer Lett** 2008; 267:226-44.

Verjans E, Noetzel E, Bektas N, et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. **BMC Cancer** 2009; 9:230-48.

Wagner PL, Hyjek E, Vazquez MF, et al. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: Association with metastasis and survival. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2009;137:615-21.

Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, et al. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. **Cancer Sci** 2003; 94:1003-9.

Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O Byrne KJ, Bradding P. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:8959-67.

White ES, Scott RB, Strom NL, Wys DA. Arenberg non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. **J Immunol** 2001; 166:7549-55.

Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, et al. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group; National Cancer Institute of the United States Intergroup JBR.10 Trial Investigators Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2005; 352:2589-97.

Wong BLW, Zhu SL, Huang XR, et al. Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in Gastritis Induced by *Helicobacter pylori*. **Am J Pathol** 2009; 174:1319-28.

Xu X, Wang B, Te C, et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. **Cancer Lett** 2008; 261:147-57.

Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGFB signaling in tumorigenesis. **Int J Biol Sci** 2010; 6:1-7.

Yang L, Moses H. Transforming growth factor b: tumor suppressor or promoter? are host immune cells the answer? **Cancer Res** 2008; 22:9107-9111.

Yang L. TGFB and cancer metastasis: a inflammation link. **Cancer Metastasis Rev** 2010; 29:263-71.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer Despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nat Rev Immunol** 2006; 6:715-27.

***ANEXO***

---

**Anexo 1 - Ficha de Coleta de Dados**

Ficha nº: \_\_\_\_\_

**Projeto: Banco de Dados de Câncer de Pulmão**

**FICHA CÂNCER de PULMÃO**

Nome:

RGH:

Data de nascimento: ..... / ..... / .....

Sexo: (1)M (2)F

Data admissão no Tórax: ..... / ..... / .....

Medico responsável:

Hospital:

Manifestações iniciais: (1)Assintomático (2)Dispnéia (3)Dor torácica  
(4)Hemoptise (5)Tosse (6)Infecção pulmonar recorrente (6)Outros Quais? .....

Tabagismo: (1)Nunca fumou (2)Passivo (3)Ativo. Maços/ano: .....  
(4)Ex-fumante. Tempo de abandono: \_\_\_\_\_ anos.

ECOG na admissão: (0)0 (1)1 (2)2 (3)≥3

Karnofsky na admissão:..... %.

Emagrecimento (1)Não (2)Sim. Qtos ..... kg/ .....meses. Peso habitual: ..... Kg

Comorbidades: (1)Não (2)Sim Quais? .....

Uso de medicação: (1)Não (2)Sim Quais? .....

Modo diagnóstico histológico: (1)broncoscopia (2)punção guiada por TC

(3)Biópsia de linfonodo cervical/FSC (4)VATS (5)Toracotomia

(6)Outros: .....

Exames de imagem realizados na avaliação do paciente(qualquer tempo)(1)Não  
(2)Sim

Mapeamento com FDG PET (1)Não (2)Sim

Indicação do PET: (1)Estadiamento (2)Aval. Resposta (3)Seguimento

Tipo histológico (biópsia): (1)CEC (2)Adenoca (3)Bronquioloalveolar

(4)Grandes células (5)Carc. não pequenas cels (6)Carc. de pequenas cels

(7)Neuroendócrino (carcinóide) (8)Outro. Qual: .....

Número do AP da biópsia: \_\_\_\_\_ .

Estadio Clínico na Admissão: T ( ) N ( ) M ( ) Local de metas.

Estadio Clínico na Admissão: (1)IA (2)IB (3)IIA (4)IIB (5)IIIA (6)IIIB (7)IV

Tratamento principal inicial: Cirurgia(1)Sim (2)Não QT(1)Sim (2)Não

RXT(1)Sim (2)Não QT+RXT(1)Sim (2)Não

Tratamentos oncológicos realizados neste paciente (qualquer tempo)( )sim ( ) não

Cirurgia (1)Não (2)Sim Radioterapia externa (1)Não (2)Sim

Braquiterapia (1)Não (2)Sim Quimioterapia 1a linha (1)Não (2)Sim

Tratamento neoadjuvante (1)Não (2)Sim Qual: (1)QT (2)RXT

Cirurgia (0)N (1)S Data da cirurgia: ...../...../.....

Tipo de Cirurgia: (0)Toracot Expl (1)Cunha (2)Segment (3)Lobectomia

(4)Bilobectomia (5)Pnemectomia (6) VATS (7) Outras .....

Ressecção Completa (1)Não (2)Sim Irressecável (1)Não (2)Sim

Motivo da

irressecabilidade.....

Número do AP da peça .....

Tipo Histológico: (1) CEC (2) Adenoca (3) Grandes Células (4) Pequenas células

(5) outro, qual .....

Tamanho do tumor: .....cm Lado do pulmão: (1)direito (2)esquerdo

Localização do tumor primário: (1)lobo superior (2)lobo médio (3)lobo inferior

Margem brônquica (1)positiva (2)negativa (3)ca "in situ"

Inv vascular (1)Não (2)Sim Inv. linfática (1)Não (2)Sim

Inv neural (1)Não (2)Sim Inv pleura visceral (1)Não (2)Sim

Inv de estruturas adjacentes: (1)Não (2)Sim Qual: .....

Número de LN mediastinais: Dissecados: .....Comprometidos: .....

Localização dos LN mediast comprometidos: (0)mediast sup (1)subcarinal

(2)mediast inf (3) Outro:.....

Número de LN hilares: Dissecados: ..... Comprometidos: .....

Estadio Cirúrgico: T cir( ) Ncir ( ) M cir ( )

Estad Cirúrgico (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7) IV

Tratamento adjuvante (1)Não (2)Sim. Data início Adjuvância: ..... / ..... / .....

Tipo de tto adjuvante: (1)QT. Drogas: ..... N ciclos:.....

(2)RXT . Dose: ..... Gy.

Data do final da adjuvância: ..... / ..... / .....

RXT como tratamento principal (1)Não (2)Sim. Dose: .....Gy

Data início RXT: ..... / ..... / ..... Data fim RXT ..... / ..... / .....

QT como tto principal: (1)Não (2)Sim

Tipo de QT de primeira linha: platino (1)Não (2)Sim taxano(1)Não (2)Sim

gemcitabina (1)Não (2)Sim vinorelbina(1)Não (2)Sim VP16(1)Não (2)Sim

Irinotecano (1)Não (2)Sim Outro: .....

Data início QT primeira linha: ..... / ..... / ..... Data fim QT primeira linha: ..... / ..... / .....

Número de ciclos de QT de primeira linha \_\_\_\_ intervalo entre as aplicações \_\_\_\_ dias

Tipo de QT de segunda linha: platino(1)Não (2)Sim paclitaxel(1)Não (2)Sim

docetaxel(1)Não (2)Sim gemcitabina(1)Não (2)Sim vinorelbina(1)Não

(2)Sim VP16(1)Não (2)Sim pemetrexato(1)Não (2)Sim inibidor de

EGFR(1)Não (2)Sim Irinotecano(1)Não (2)Sim Outro: .....

Data início QT primeira linha: ..... / ..... / ..... Data fim QT primeira linha: ..... / ..... / .....

Número de ciclos de QT de segunda linha \_\_\_\_ intervalo entre as aplicações \_\_\_\_ dias

Recorrência pós tratamento: (1)Não (2)Sim Data: ..... / ..... / .....

Local da recorrência: (1)Local (2)Distância.

Sítio da recorrência sistêmica: (1)Ossos (2)Cérebro (3)Pulmão (4)Fígado

(5)Adrenal (6)Outros: .....

Tratamento da recorrência: (1)QT (2)RXT (3)Cirurgia (4)Sem tto oncológico

Data da última informação sobre o paciente: ..... / ..... / .....

Estado na última avaliação:

(1)Vivo sem evidência de tumor (2)Vivo com evidência de tumor

(3)Morto por câncer (4)Morto por outras causas. Qual: .....

Segunda neoplasia primária: (1)Não (2)Sim. Data seg. primário: ..... / ..... / .....

Local da segunda neoplasia primária: .....

Nome de quem preencheu a ficha: