

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA

VINICIUS SCHENK MICHAELSEN

*EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *erbB-3/HER3* EM CÂNCER DE PULMÃO  
PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E SUA CORRELAÇÃO  
COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS*

*Porto Alegre*

*2008*

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

TESE DE DOUTORADO

***EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
erbB-3/HER3 EM CÂNCER DE PULMÃO  
PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA  
E SUA CORRELAÇÃO  
COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-  
PATOLÓGICAS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como pré-requisito para obtenção do grau de DOUTOR.

VINICIUS SCHENK MICHAELSEN

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, PhD  
Orientadora.

Prof.Dr.Vinicius Duval da Silva, PhD  
Co-orientador.

Porto Alegre, março de 2008

M622e Michaelsen, Vinicius Schenk.

Expressão da proteína erbB-3/HER-3 em câncer de pulmão pela técnica de imuno-histoquímica e sua correlação com características clínico-patológicas / Vinicius Schenk Michaelsen; orient. Denise Cantarelli Machado, co-orient. Vinicius Duval da Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

90 f.: gráf. il. tab.

Tese(Doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. Carcinoma Pulmonar de Células Não-Pequenas. 2. Neoplasias Pulmonares. 3. Imunoistoquímica. 4. Imuno-histoquímica. 5. Receptor erbB-3. 6. Carcinoma de Células Escamosas. 7. Adenocarcinoma. 8. Carcinoma Adenoescamoso. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

CDD 616.99424  
NLM WF 658

Bibliotecária Responsável: Sabrina Caimi Silva da Costa- CRB10/1606

VINICIUS SCHENK MICHAELSEN

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA erbB-3/HER3 EM CÂNCER DE PULMÃO  
PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E SUA CORRELAÇÃO  
COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como pré-requisito para obtenção do grau de DOUTOR.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho, PhD

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antônio Atalábio Hartmann, PhD

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal, PhD

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Lígia Bender, PhD

**Dedico essa tese aos meus familiares, os quais desde meu primeiro dia, acreditaram que eu poderia fazer a diferença, e aos colegas pesquisadores, que de forma inquestionável, tem dedicado suas vidas na descoberta de novas formas de combate ao câncer, bem como a todos aqueles que depositam em nós sua esperança de vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Denise Cantarelli Machado pela oportunidade, na condição de bolsista, no período de maio de 2000 a dezembro de 2004. Também pelo apoio, disponibilidade e senso científico na condução deste trabalho, bem como, pelos meus oito anos de aprendizado científico no Instituto de Pesquisas Biomédicas.

Ao Dr. Vínicius Duval da Silva, pelas oportunidades iniciadas já na época de Faculdade, onde fui seu monitor, bem como pelos ensinamentos na área da Patologia e pela confiança depositada, acerca de meus objetivos, assim como pela co-orientação da minha tese.

Ao Prof. Me. José Antônio L. de F. Pinto, chefe do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo importante apoio na aquisição das amostras.

Ao Dr. Marcelo Cypel, pela amizade, exemplo de conduta profissional e oportunidade de acompanhar seus pacientes.

Ao Dr. Marner Lopes da Silveira, pelas palavras de estímulo, bem como pelos momentos de discussão em relação ao tema.

Ao Dr. Maurício Pipkin, pela presteza e contribuição no acompanhamento dos resultados e na construção do banco de dados.

Ao amigo Giancarlo M. Munaretto, que compartilhou o início das minhas atividades no campo da imuno-histoquímica.

A dois estudantes da Faculdade de Medicina, exemplos de persistência e perseverança, Vinicius Ernani e Roberto Tonieto, os quais tiveram um papel fundamental na etapa inicial dessa tese.

À Dra. Josenel Maria Barcellos Marçal e Dr. Aluísio de Castro Antunes Maciel pelo apoio fornecido em muitos momentos no Laboratório de Anatomia Patológica, assim como o sábio Dr. Carlos Reichel.

Ao Prof. Dr. e também grande apoiador, Antônio A. Hartmann, grande responsável pelos momentos de docência, através da Disciplina de Patologia para o Curso de Farmácia.

Aos amigos Dr. Eder A. Hüttner, Dr. Rafael Loro e Prof. Dr. Moisés E. Bauer pelo incentivo e pelo companheirismo neste período.

À equipe do Laboratório de Anatomia patológica pelo apoio na busca de materiais e registros dos pacientes envolvidos no estudo, e em especial ao Tiago Julianni que, além do apoio técnico, por diversos momentos foi meu companheiro de diálogo científico.

À Direção do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS, que me permitiu desenvolver este trabalho.

À estatística Daniela Benzano e ao Prof. Irênio Gomes da Silva Filho, os quais me deram o importante suporte estatístico.

Ao Ir. Urbano Zilles, que desde o início do Doutorado acreditou e confiou, impulsionando minha formação nessa caminhada com suas palavras tão marcantes, a ele dirijo um agradecimento especial.

Ao amigo Luis Irineu Schenkel, o qual não mediu esforços para que eu pudesse iniciar o Doutorado.

A todos os professores responsáveis pela minha formação, através da Faculdade de Farmácia da PUCRS que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a minha formação profissional.

A todos os amigos, que durante boa parte desse tempo, sentiram minha ausência e mesmo longe permaneceram me incentivando.

À Colega Silvana Lunardini Alves, do Laboratório de Biologia Tumoral, pelo apoio na parte final do meu trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias, pela nossa amizade, companheirismo, coleguismo e pelos grandes momentos de discussão. Principalmente pelo compartilhamento de informações e por terem dado valor às minhas palestras.

Por fim, a todos os meus familiares, incluindo a família Pandolfo, os quais participaram intensamente de meus raciocínios, das minhas idéias, das minhas falhas, dos meus acertos e vitórias, dos meus resultados, das minhas idas e vindas carregando diversos artigos, dos meus muitos momentos de ausência. Também pelo incentivo, pelas palavras de estímulo, pelo esforço em tentar compreender meu assunto a fim de poder auxiliar de alguma maneira, pelo apoio incondicional aos meus estudos, pela preocupação e participação durante esse período.

Gostaria em especial agradecer aos meus pais pelo exemplo de vida, e aos meus irmãos, Lucas e Samuel, pelo carinho, respeito e auxílio.

Da mesma forma, queria agradecer a uma pessoa bastante especial, que nesses oito anos de dedicação dados a minha formação, dividiu momentos de grande alegria e felicidade. Com tantos artigos, livros, bibliotecas e noites adentro, soube esperar por algo que um dia pudesse ser melhor. Roberta, sua compreensão e estímulo foram peças fundamentais nessa etapa da vida.

"Se você pensa que pode ou sonha que pode, comece.  
Ousadia tem genialidade, poder e mágica.  
Ouse fazer e o poder lhe será dado".  
Goethe

"Somos aprendizes de uma arte na qual  
ninguém se torna mestre".  
Ernest Hemingway(1898-1961)

## **Ao pesquisador:**

“Quanto mais se caminha,  
Na busca do questionamento,  
Mais mistério se descobre,  
Do ser homem que se questiona.

Viajar por esse universo de  
surpresas e longo questionar,  
De dificuldades à interrogação  
A cada volta que se dá,  
Do muito que se quer,  
Tanto mais se descobre.  
Do muito que se sabia,  
Do tanto que se queria.

Descobre que nada mais é  
importante,  
Que saber, que do mistério  
humano,  
A cada dia tanto tem a se  
descobrir,  
E quase nada se sabe,  
Do que se pensava que se sabia”.

Liane Schenk Michaelsen, março de 2008.

## RESUMO

A família erbB é composta por quatro membros: erbB1, erbB2, erbB3 e erbB4. Essa família tem aparecido amplamente em diversos trabalhos, porém, o estudo particular da proteína erbB3 no câncer de pulmão ainda permanece muito restrito.

O objetivo desse estudo foi descrever a frequência de expressão da proteína erbB3 em amostras de câncer de pulmão não-pequenas (NSCLC) células, assim como correlacionar os achados da frequência de expressão da proteína com as seguintes características clinico-patológicas dos pacientes como: idade, gênero, tipo histológico, estadiamento patológico, grau histológico, óbito e sobrevida.

Um total de 66 espécimes foram analisados por imuno-histoquímica. A frequência de expressão da proteína erbB3 esteve presente em 57 casos (86,4%), Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a frequência de expressão da proteína e as variáveis: idade, gênero, tipo histológico, estadiamento, grau histológico, óbito e sobrevida. Entretanto, quando as amostras foram agrupadas em categorias de expressão entre 0 e 75% e 75 e 100% das células tumorais positivas para a proteína erbB3, houve significância estatística com relação ao grau histológico ( $P=0,04$ ) sendo o de maior frequência o grau histológico tipo II (72,5%).

Embora não tenha sido possível correlacionar a presença da expressão da proteína erbB3 com o prognóstico e os outros parâmetros clínicos, provavelmente devido ao pequeno número de amostras investigadas neste estudo, foi possível observar a presença desta proteína em 86,4% das amostras estudadas, comprovando que, assim como o EGFR e o erbB2, o erbB3 pode ser encontrado no NSCLC de forma bastante pronunciada. É possível que informações relativas à expressão dos outros membros desta família nestas mesmas amostras, possam trazer novas interpretações, lembrando, novamente, que seus membros, já caracterizados como proteínas participantes na oncogênese, atuam de forma sinérgica.

Palavras-Chave: Câncer de pulmão não-pequenas células, imuno-histoquímica, erbB3, carcinoma epidermóide, adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso e erbB3.

## ABSTRACT

Four members belong to the erbB family, erbB1, erbB2, erbB3, and erbB4. Several reports have investigated the expression of members from this family, however with only few regarding to the role of erbB3 on non-small cell lung cancer (NSCLC).

The aim of this study was to describe the expression frequency of erbB3 protein in NSCLC and evaluate a possible relationship with clinical parameters such as: age, gender, histological subtype, stage, histological grade, and survival.

A total of 66 samples were analyzed by immunohistochemistry. ErbB3 expression frequency was detected in 57 samples (86.4%). No statistical significance was found between expression degree and age, histological subtype, stage, histological grade, and survival. However, when samples were classified into two expression categories (0-75% and 75-100%) a statistic significance was found ( $P=0.04$ ) related to grade II (72.5%).

Although we did not found a relation between erbB3 expression and clinical and/or pathological parameters, probably due to the low sample number, it was possible to define that 86.4% of samples did express the erbB3 protein in at least 25% of the tumor cells. This result agrees with other described in the literature. Investigation of other members belonging to this family in the same sample here evaluated could improve the results obtained since they have been implicated with tumor malignancy and that their role in tumorigenesis is probably associated to a collaborative interaction.

Keywords: Non-small cell lung cancer, immunohistochemistry, squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, adenosquamous cell carcinoma and erbB3.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Diagrama esquemático dos eventos envolvidos no processo de carcinogênese.</b> .....	23
<b>Figura 2. Os dez principais tipos de câncer estimados para novos casos e mortes por câncer por sexo nos EUA, 2007.</b> .....	28
<b>Figura 3. Representação das taxas de incidência por neoplasias malignas, por 100 mil homens, segundo Unidade da Federação, em 2006.</b> .....	31
<b>Figura 4. Representatividade das mortes por câncer causadas pelo uso de cigarro nos sexos masculino e feminino.</b> .....	32
<b>Figura 5. Percentual por sexo quanto ao consumo de cigarro por capitais do Brasil.</b> .....	35
<b>Figura 6. Representação esquemática das isoformas dos receptores ErbB e os respectivos sinônimos dessa família.</b> .....	49
<b>Figura 7. Sinalização resultante da natureza dos dímeros.</b> .....	50
<b>Figura 8. Modelo de indução via ligante (NRG) dos receptores ErbB2 e ErbB3.</b> .....	52
<b>Figura 9. Modelo de construção do TMA.</b> .....	57
<b>Figura 10. Histograma da frequência de expressão da proteína erbB3 nas células tumorais das amostras de NSCLC de acordo com a categoria de expressão definida.</b> .....	65
<b>Figura 11. Fotomicrografia de amostras de doença inflamatória utilizada como controle não tumoral.</b> .....	66
<b>Figura 12. Fotomicrografia em uma amostra de NSCLC, em carcinoma de grandes células.</b> .....	68
<b>Figura 13. Fotomicrografia em uma amostra de NSCLC, em adenocarcinoma.</b> .....	69
<b>Figura 14. Histograma do número de pacientes e das diferentes categorias de expressão estudadas nos subtipos histológicos estudados.</b> .....	72
<b>Figura 15. Sobrevida dos pacientes em relação a expressão da proteína ErbB3.</b> .....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Estadiamento TNM do NSCLC</b> .....	40
<b>Tabela 2. Alterações citogenéticas freqüentes no câncer de pulmão</b> .....	45
<b>Tabela 3. Alterações genéticas e moleculares no câncer de pulmão</b> .....	46
<b>Tabela 4. Característica da amostra em estudo</b> .....	63
<b>Tabela 5. Correlações entre a freqüência de expressão da proteína erbB3 e as diferentes variáveis estudadas.*</b> .....	71

# LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	do inglês, <i>American Cancer Society</i> , traduzido como Sociedade do Câncer Americana.
AJCC	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i> , traduzido como Comitê Americano de Combate ao Câncer.
ANOVA	do inglês, <i>analysis of variance</i> , traduzido como análise de variância.
ATP	do inglês, adenosine triphosphate, traduzido como adenosina trifosfato.
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa.
CIOMS	do inglês, <i>Council for International Organizations of Medical Science</i> , traduzido como Conselho Internacional das Organizações das Ciências Médicas
CNS	Conselho Nacional de Saúde
EDTA	Do inglês, etilen diamine tetraacetic acid, traduzido como ácido etilendiamino tetraacético.
EGFR	do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i> , traduzido como receptor do fator de crescimento epidérmico.
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> , traduzido como Órgão de Regulação de Medicamentos e Alimentos.
HE	do inglês, <i>hematoxilin and eosin</i> , traduzido como hematoxilina e eosina.
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IARC	do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i> traduzido como Agência Internacional para Pesquisa em Câncer.
IASLC	do inglês, <i>International Association for the Study of Lung Cancer</i> , Associação Internacional de Estudo do Câncer de Pulmão.
Mabs	do inglês, <i>monoclonal antibodies</i> , traduzido como, anticorpos monoclonais.
MAPK	do inglês, <i>mitogen activate protein kinase</i> , traduzido como proteína quinase ativadora de mitose.
NRG	do inglês, <i>neuregulin</i> , traduzido como, neuregulina.
NSCLC	do inglês, <i>non small cell lung cancer</i> , traduzido como Câncer de Pulmão Não-Pequenas Células.
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês, <i>phosphate buffer solution</i> , traduzido como solução de tampão fosfato.
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PI3K	do inglês, phosphoinositide-3 Kinase, traduzido como fosfatidilinositol-3 quinase.
SCLC	do inglês, <i>small cell lung cancer</i> , traduzido como Câncer de Pulmão Pequenas Células.
TK	do inglês, <i>tyrosine kinase</i> , traduzido como tirosina quinase.
TMA	do inglês, <i>tissue microArray</i> , traduzido como micro-arranjo de tecido.
UICC	do inglês, <i>International Union Against on Cancer</i> , traduzido como União Internacional de Controle do Câncer.
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i> , traduzido como Organização Mundial da Saúde

# SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 A Natureza do Câncer .....	19
1.2 Epidemiologia do Câncer.....	24
1.3 Câncer de Pulmão.....	26
1.4 Tipos Histológicos das Neoplasias Pulmonares.....	36
1.5 Estadiamento Tumoral.....	38
1.6 O Câncer de Pulmão Não-Pequenas Células – NSCLC .....	41
1.7 Alterações Moleculares no Câncer de Pulmão .....	45
1.8 A família do Receptor erbB e seus Ligantes .....	48
1.9 O Receptor erbB-3 .....	51
2. OBJETIVOS .....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	56
3.1 Amostra .....	56
3.2 Construção dos Micro-arranjos de Tecidos ( <i>TMA= Tissue MicroArray</i> ) .....	56
3.3 Análise Imuno-histoquímica .....	58
3.4 Interpretação da Imuno-histoquímica .....	60
3.5 Análise Estatística .....	60
3.6 Aspectos Éticos e Avaliação da Comissão Científica .....	61
4. RESULTADOS.....	62
4.1 Características da população estudada .....	62
4.2 Frequência de expressão da proteína erbB3 nas amostras de NSCLC.....	64

<b>4.3</b>	<b>Relações clinico-patológicas e a expressão da proteína erbB3 .....</b>	<b>70</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Natureza do Câncer

O conceito de câncer está longe de ser definido por um só ponto de vista, ou por uma lógica comum, principalmente por ser uma doença extremamente complexa e possuir múltiplos mecanismos que atuam no seu desenvolvimento e na sua manifestação. As definições para o câncer em geral partem das propriedades e das características apresentadas pelas células cancerosas. Dessa forma poderíamos ter diferentes conceitos com relação ao termo câncer, porém, procuraremos nos limitar a apenas três.

Pelo enfoque da patologia, o câncer resultaria de uma proliferação anormal de qualquer tipo de célula do corpo, podendo assim ter mais de cem tipos de câncer variando substancialmente quanto ao seu comportamento e resposta ao tratamento. Importante também, é mencionar que a designação de câncer, cabe somente aos tumores classificados como malignos.<sup>1</sup>

O câncer também pode ser caracterizado por apresentar um crescimento descontrolado e por uma propagação de células que podem atingir a maioria dos tecidos do organismo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, OMS (*WHO= World Health Organization*), pode ser considerado como uma doença de saúde pública no mundo inteiro, afetando todas as pessoas, desde jovens a idosos, ricos ou pobres, homens, mulheres e crianças.<sup>2</sup>

Para a Sociedade do Câncer Americana, (*ACS= American Cancer Society*), o câncer seria considerado como um termo genérico para um grupo de doenças, podendo ter como causas: fatores externos (tabaco, agentes químicos, radiação e

infecções do organismo) e fatores internos (mutações herdadas, hormonais, condições imunes e mutações decorrentes do metabolismo), sendo que esses fatores causais podem atuar de forma simultânea ou isolada promovendo o início da carcinogênese. Ainda de forma geral, todos os cânceres se relacionam com o mau funcionamento dos genes responsáveis pelo controle do crescimento e divisão celular. Estima-se que aproximadamente 5% de todos os cânceres possuem um forte comprometimento hereditário, sendo o restante causado principalmente por dano (mutações) aos genes que são adquiridos durante a vida.<sup>3</sup>

Tendo apresentado alguns conceitos que nortearão este trabalho quanto à definição do que é o câncer, necessitamos, a partir disso, definir quais mecanismos e processos levariam à malignidade do câncer.

Diversas explicações e argumentos também poderiam nos levar a responder a esse questionamento, porém, resume-se a questão principalmente através do equilíbrio, controle e mecanismos de regulação celular que, quando desregulados, acabam levando a célula e o organismo ao desenvolvimento de uma neoplasia. Diante disso, para mantermos a integridade de determinados tecidos, assim como garantir suas funções, é necessário que se mantenha um equilíbrio entre proliferação e morte celular, ou seja, um adequado funcionamento e regulação desse processo como um todo. Este equilíbrio é mantido através de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular, mais conhecido atualmente pelo termo: sinalização celular. Caso este equilíbrio seja perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem um tumor primário. Seguindo o descontrole,

conseqüente das alterações que ocorrem no conteúdo genético da célula normal, a célula alterada, por adquirir uma maior capacidade de proliferação em relação às células vizinhas (“vantagem”), sofre uma seleção clonal seguido de uma expansão clonal, transmitindo geneticamente a alteração para todas as células que, a partir dela, se originam.<sup>4</sup> No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário ao perder a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos, caracterizando as metástases. Devido à complexidade e à existência de vias alternativas do controle da proliferação celular, e de mecanismos de reparo que a célula possui, torna-se necessário a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação de um tumor. Cada nova alteração é acompanhada de uma nova onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão, um tumor maligno.<sup>5</sup> Todos esses eventos compreendem o processo de carcinogênese, definido de forma conceitual, como sendo um processo através do qual as células normais transformam-se em células tumorais. Interessante observar que todas essas etapas ajudam a afirmar que a célula tumoral inicial não possui todas as características malignas desde sua origem, sendo esse um princípio importante da clonalidade.<sup>6</sup>

Ao nível celular, a carcinogênese deve ser vista como um processo múltiplo envolvendo mutações e seleção de células com um significativo aumento na capacidade de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. Divide-se

basicamente em quatro estágios, a saber: iniciação, promoção, conversão maligna e progressão do tumor. A Figura 1 mostra um diagrama esquemático dos processos envolvidos na carcinogênese.

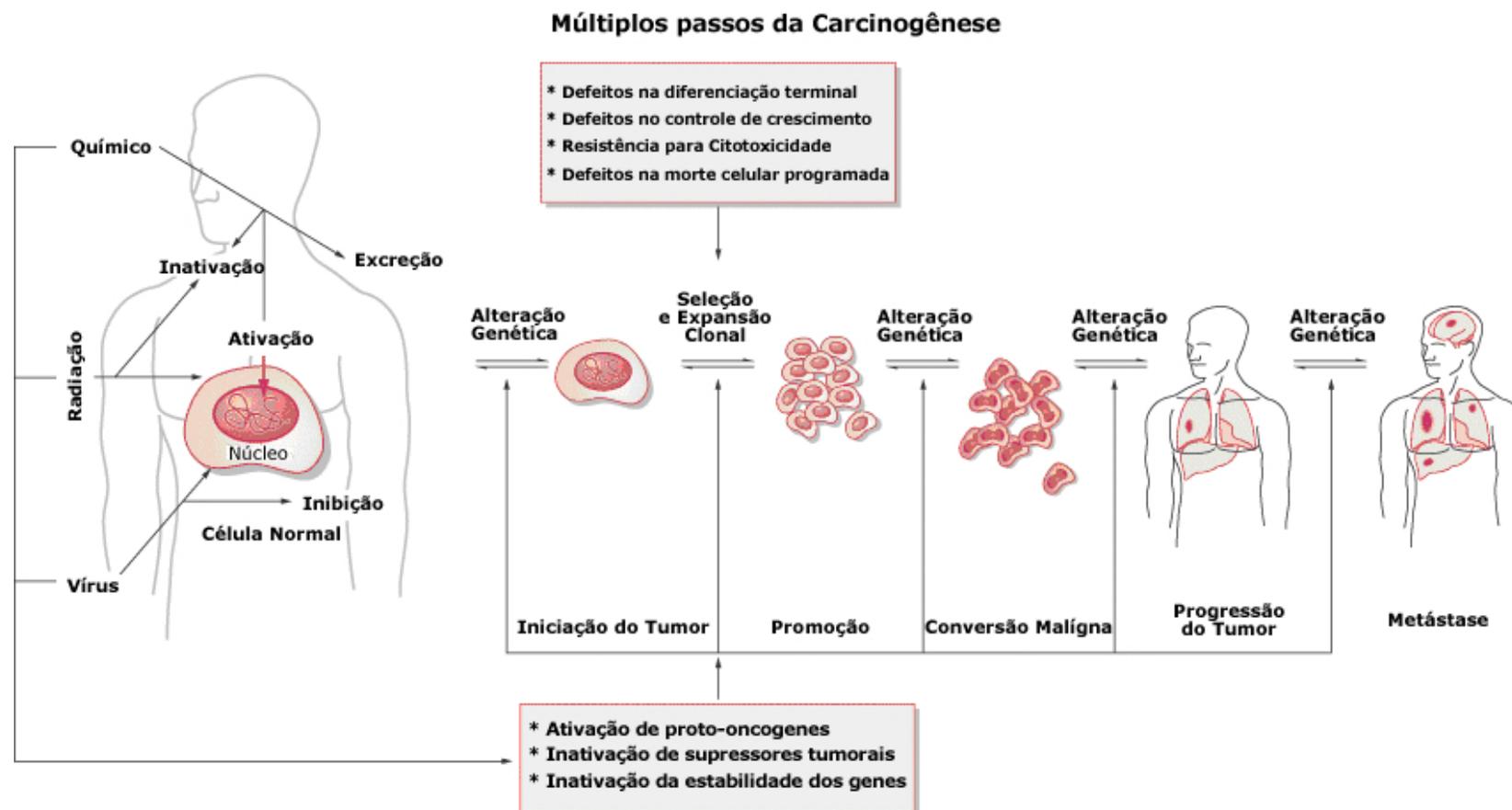


Figura 1. Diagrama esquemático dos eventos envolvidos no processo de carcinogênese.

A questão torna-se mais complexa quando olhada através dos diversos mecanismos moleculares, genéticos e cromossômicos aberrantes, presentes no processo de transformação neoplásica. A presença de alterações em oncogenes, proto-oncogenes, fatores de crescimento, proteínas de regulação do ciclo celular, proteínas supressoras tumorais<sup>7</sup> e de angiogênese<sup>8</sup>, são alguns exemplos dos marcadores encontrados no processo neoplásico. Os exemplos supracitados contribuem para a compreensão de que o câncer deve ser considerado como uma doença complexa, onde o meio ambiente e outros fatores não-genéticos possuem um papel importante no processo neoplásico. Sobretudo, deve ser encarado como uma doença que tem sua origem em alterações gênicas, sendo fundamental a sua identificação e caracterização para a compreensão das bases moleculares dessa doença.

Essa abordagem da patogênese do câncer é fundamental, pois através dessa compreensão poderemos ter uma melhora na conduta e no tratamento dos pacientes com câncer.

## **1.2 Epidemiologia do Câncer**

O câncer vem se mantendo como uma das principais causas de morte no mundo. De um total de 58 milhões de mortes ocorridas em 2005, 7.6 milhões foram relacionados ao câncer. Até 2020, segundo a OMS, estima-se que venham a ocorrer 15 milhões de novos casos de câncer, sendo que mais da metade (60%) das ocorrências serão em países em desenvolvimento. A OMS estima que a proporção seja de quatro casos de morte nos países em desenvolvimento para

uma morte nos países desenvolvidos, desmistificando a idéia de que o câncer seria uma doença de países ricos. Atualmente o câncer é responsável por 13% das mortes no mundo, lembrando que mata duas vezes mais que os casos de síndrome da imunodeficiência adquirida, (*AIDS= Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Na escala global de mortalidade por tipo de câncer, encontram-se cinco principais tipos de tumores: pulmão (1.3 milhões de mortes/ano), estômago (quase um milhão de mortes/ano), fígado (662.000 mortes/ano), cólon (655.000 mortes/ano) e mama (502.000 mortes/ano). Se fossemos analisar a frequência de câncer de pulmão em dias, teríamos aproximadamente 3.500 mortes por dia. Complementando a escala global de mortes por sexo, o câncer de pulmão encontra-se em primeiro lugar para o sexo masculino enquanto que para o sexo feminino o câncer de mama é o tipo mais freqüente.<sup>2</sup>

Segundo a ACS, a estimativa para o ano de 2007 nos Estados Unidos (EUA), era de 1.444.920 novos casos diagnosticados, e de 559.650 mortes por câncer. Esta projeção não inclui carcinoma *in situ* (carcinoma não-invasivo) em qualquer localização, com exceção de bexiga, e não inclui também cânceres de pele, como o basocelular e epidermóide. Mais de um milhão de casos de câncer de pele basocelular e epidermóide eram esperados neste ano. Nesse país estima-se que mais de 1.500 pessoas morram de câncer por dia. Também nos Estados Unidos, a ACS estima que a cada quatro mortes uma seja por câncer.<sup>3</sup> O câncer nos EUA, encontra-se na segunda posição em termos de causas de morte. Na sua frente estariam apenas as doenças relacionadas com o sistema circulatório, porém, em alguns casos, levando-se em consideração a idade do paciente, pode

atingir o primeiro lugar, fato esse relatado no último relatório da ACS, para os Estados Unidos envolvendo pacientes em torno de 85 anos.<sup>9</sup>

No Brasil, assim como no mundo inteiro, o câncer ocupa o segundo lugar de causa de morte, sendo apenas superado pelas doenças do sistema circulatório. As estatísticas mais recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimaram a ocorrência de 472.050 novos casos de câncer para o ano de 2006. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, foram o câncer de próstata e de pulmão no sexo masculino e o câncer de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada nos Estados Unidos.<sup>10</sup>

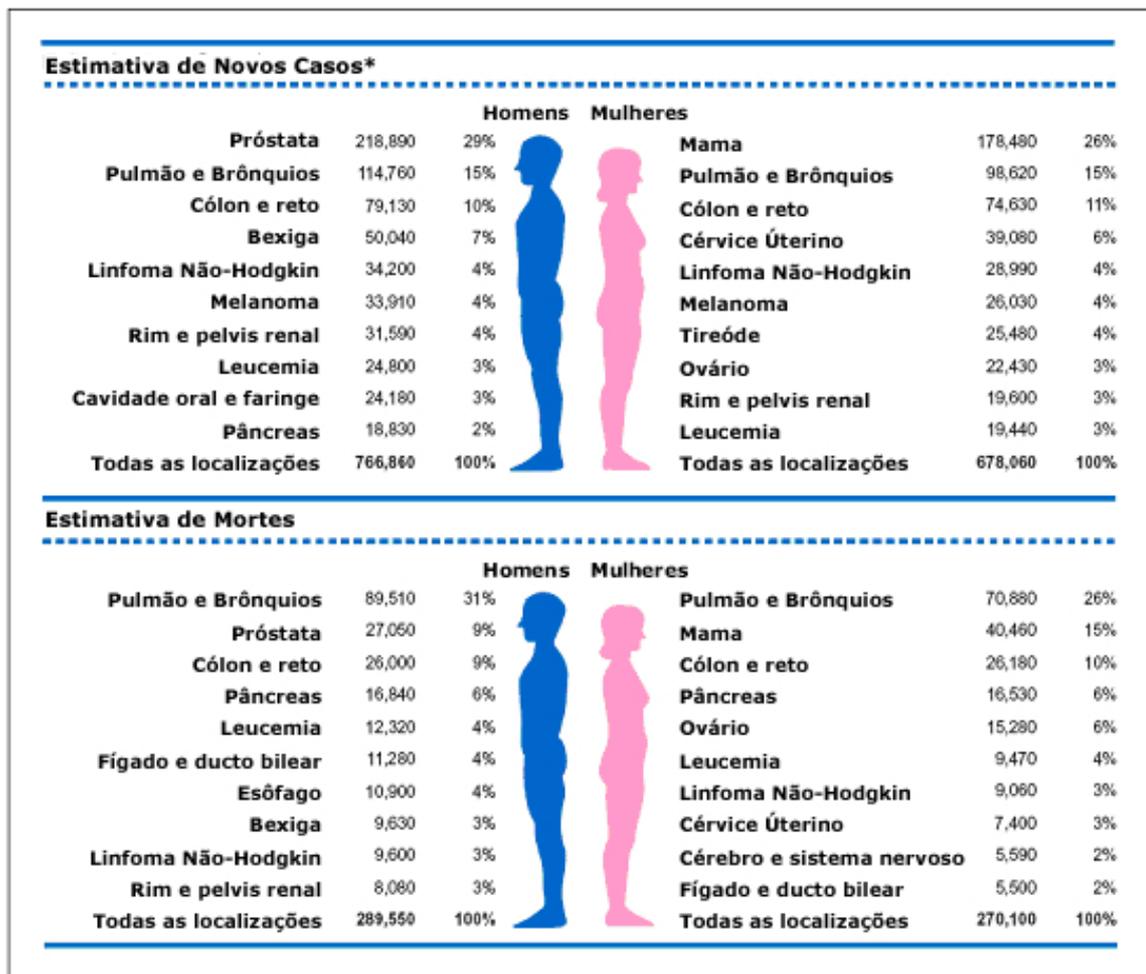
Esses dados refletem no impacto que o câncer tem causado na população mundial e alertam para a tendência do aumento do número de casos estimados para os países em desenvolvimento, entre eles o Brasil. Sendo assim, se o desenvolvimento de ações globais e locais de maior impacto na saúde pública, juntamente com medidas de diagnóstico precoce não forem urgentemente aplicadas, dificilmente estaremos revertendo esse panorama em todos os segmentos da nossa sociedade.

### **1.3 Câncer de Pulmão**

Dentre os tipos de câncer, um dos mais freqüentes e também um dos mais letais em ambos os sexos é o câncer de pulmão. Analisando os dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*IARC= International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN, 2002*), observa-se que o câncer de pulmão responde

pelos maiores índices de morte em ambos os sexos no mundo. Em termos de prevalência, no sexo feminino, só perde para o câncer de mama, e no sexo masculino, ocupa o segundo lugar atrás do câncer de próstata.<sup>11</sup>

Nos Estados Unidos, dados da ACS mostram que em termos de mortalidade o câncer de pulmão está em primeiro lugar em ambos os sexos. Ainda com relação aos dados americanos, a projeção para o ano de 2007 era de 213.380 novos casos de câncer de pulmão e de 160.390 mortes, sendo que 89.510 perfaziam o grupo masculino e 70.880 o grupo feminino. (Figura 2).



**Figura 2. Os dez principais tipos de câncer estimados para novos casos e mortes por câncer por sexo nos EUA, 2007. \* Excluído carcinoma de pele e basocelular, carcinoma *in situ*, exceto bexiga.** Adaptado de Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics 2007. CA A Cancer Journal for Clinicians. 2007; 57:43-66.

A Figura 2 apresenta a freqüência dos cânceres mais comuns que eram esperados em homens e mulheres nos EUA em 2007. Entre os homens, câncer de próstata, pulmão e brônquios, cólon e reto representam 54% de todos os novos diagnósticos de câncer e entre os tipos mais comuns que seriam diagnosticados nas mulheres em 2007 tinha-se, o câncer de mama, pulmão e brônquios, cólon e reto, representando 52% da estimativa de novos casos, bem como, os tipos mais freqüentes relacionados à mortalidade nos dois sexos,

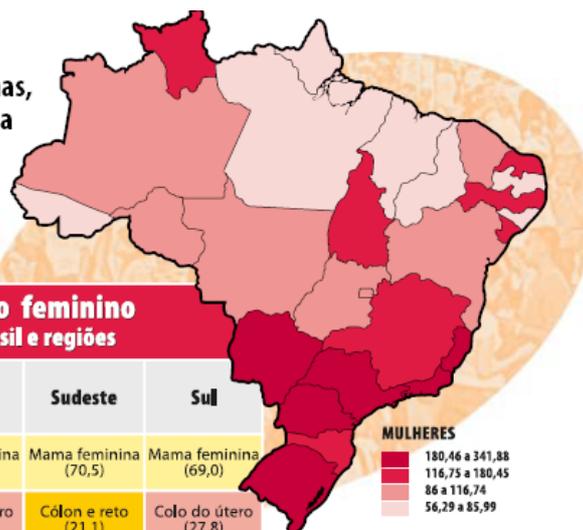
verificando mais uma vez a grande importância que o câncer de pulmão tem na população masculina e feminina. Outro dado interessante da ACS é que a incidência desta doença em homens tem diminuído, enquanto nas mulheres parece ter atingido um platô após um longo período de ascensão. Essa diminuição no número de casos de câncer no sexo masculino é surpreendente, pois conforme as estatísticas de risco de morte por câncer de pulmão, o sexo masculino e o aumento de idade são fatores consideravelmente desfavoráveis.<sup>12</sup> Semelhante a isso, são os dados relativos às taxas de morte entre homens e mulheres americanas que tem diminuído gradualmente ao ano nos principais cânceres com exceção do câncer de pulmão feminino. A diminuição nas taxas de mortalidade por câncer de pulmão entre homens deve-se ao fato ter havido uma redução no consumo de tabaco nos últimos 40 anos, enquanto que em outros tumores como mama, colorretal e próstata as diminuições nas taxas devem-se principalmente à detecção precoce e tratamento.<sup>3</sup>

No Brasil, baseado na série histórica disponível, o câncer de pulmão seria a primeira causa de morte em indivíduos do sexo masculino seguido pelo câncer de próstata, estômago, esôfago, cólon e reto. No sexo feminino, o câncer de pulmão responderia pelo segundo lugar. Com relação ao número de casos novos de câncer de pulmão estimados para o Brasil em 2006, esperava-se a ocorrência de 17.850 casos entre homens e de 9.320 nas mulheres. Valores esses que correspondem a um risco estimado de 19 novos casos a cada 100 mil homens e 10 novos casos para cada 100 mil mulheres. Analisando os dados regionais e excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Sul (37/100.000), Sudeste (24/100.000) e

Centro-Oeste (16/100.000). Sendo nas regiões Norte e Nordeste o terceiro mais freqüente. Para as mulheres é o quarto mais freqüente nas regiões Sul (16/100.000), Sudeste (12/100.000), Centro-Oeste (9/100.000) e Norte (5/100.000), sendo o quinto mais freqüente na região Nordeste. Através da representação publicada pelo Ministério da Saúde/INCA, pode-se ter uma dimensão do *ranking* nacional quanto à incidência de neoplasia maligna por unidades da federação (Figura3).

**Taxas de incidência por neoplasias malignas, por 100 mil mulheres, segundo Unidade da Federação, em 2006.**

(\*) exceto pele não melanoma



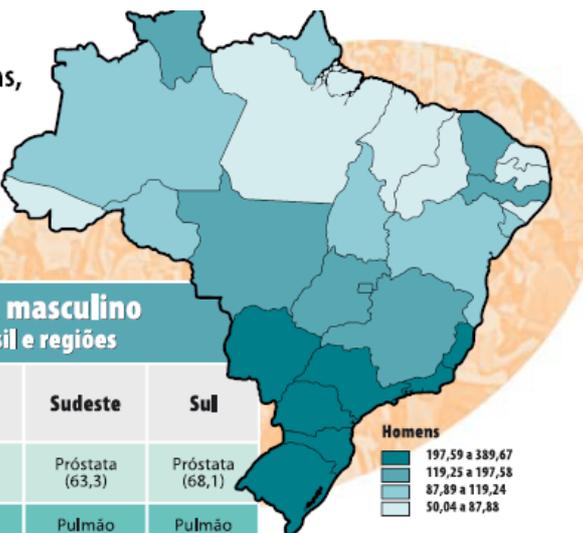
**Casos novos estimados – Sexo feminino**  
**Localizações mais frequentes – Brasil e regiões**

	Brasil	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
1ª	Mama feminina (51,7)	Colo do útero (21,8)	Mama feminina (27,2)	Mama feminina (38,0)	Mama feminina (70,5)	Mama feminina (69,0)
2ª	Colo do útero (20,3)	Mama feminina (15,2)	Colo do útero (16,7)	Colo do útero (21,4)	Cólon e reto (21,1)	Colo do útero (27,8)
3ª	Cólon e reto (14,7)	Estômago (5,8)	Cólon e reto (5,4)	Cólon e reto (10,3)	Colo do útero (19,6)	Cólon e reto (21,8)
4ª	Pulmão (9,8)	Pulmão (5,0)	Estômago (5,2)	Pulmão (8,6)	Pulmão (11,9)	Pulmão (16,2)
5ª	Estômago (8,7)	Cólon e reto (3,7)	Pulmão (4,9)	Estômago (6,5)	Estômago (10,8)	Estômago (11,4)

Fonte: MS/INCA.

**Taxas de incidência por neoplasias malignas, por 100 mil homens, segundo Unidade da Federação, em 2006.**

(\*) exceto pele não melanoma



**Casos novos estimados – Sexo masculino**  
**Localizações mais frequentes – Brasil e regiões**

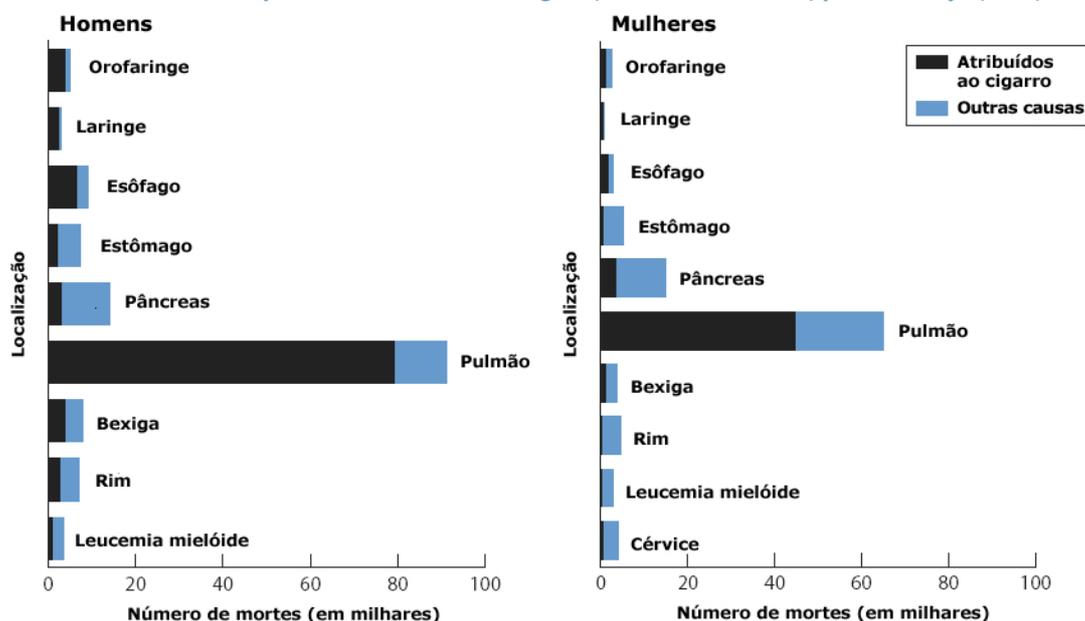
	Brasil	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
1ª	Próstata (51,4)	Próstata (22,0)	Próstata (34,5)	Próstata (46,0)	Próstata (63,3)	Próstata (68,1)
2ª	Pulmão (19,4)	Estômago (10,7)	Estômago (9,1)	Pulmão (15,5)	Pulmão (23,6)	Pulmão (37,0)
3ª	Estômago (16,3)	Pulmão (8,0)	Pulmão (8,1)	Estômago (13,3)	Estômago (20,3)	Estômago (23,0)
4ª	Cólon e reto (12,4)	Leucemias (3,9)	Cavidade oral (5,5)	Cólon e reto (9,6)	Cólon e reto (16,9)	Cólon e reto (21,5)
5ª	Cavidade oral (10,9)	Cavidade oral (3,1)	Cólon e reto (4,1)	Cavidade oral (7,3)	Cavidade oral (15,3)	Esôfago (17,4)

Fonte: MS/INCA.

**Figura 3. Representação das taxas de incidência por neoplasias malignas, por 100 mil mulheres e homens, segundo Unidade da Federação, em 2006.** MS/INCA. Disponível em: URL: [www.inca.gov.br/situacao/](http://www.inca.gov.br/situacao/) Acesso em: 14 de novembro de 2007.

Por essas razões, o câncer de pulmão é tido mundialmente como um dos tipos de câncer mais comuns a acometer a população e sua patogênese está fortemente associada ao tabagismo, uma vez que o risco de ocorrência e morte aumenta quanto maior a intensidade da exposição. Na população masculina, o hábito de fumar continua sendo o responsável pela maioria dos casos diagnosticados de câncer de pulmão (podendo chegar a mais de 90% em alguns países ou regiões). Estatísticas americanas estimavam que em 2007, 168.000 mortes seriam causadas pelo consumo de tabaco.<sup>3</sup> Nas mulheres, pode-se atribuir cerca da metade dos casos de câncer pulmonar ao tabagismo.<sup>2</sup> Podemos observar através da Figura 4, adaptada do relatório da ACS, a representatividade que o consumo de tabaco tem em associação com a morte por neoplasia de pulmão:

**Número Anual de Mortes por Câncer atribuídas ao Cigarro, Homens e Mulheres, por Localização, USA, 1997-2001**

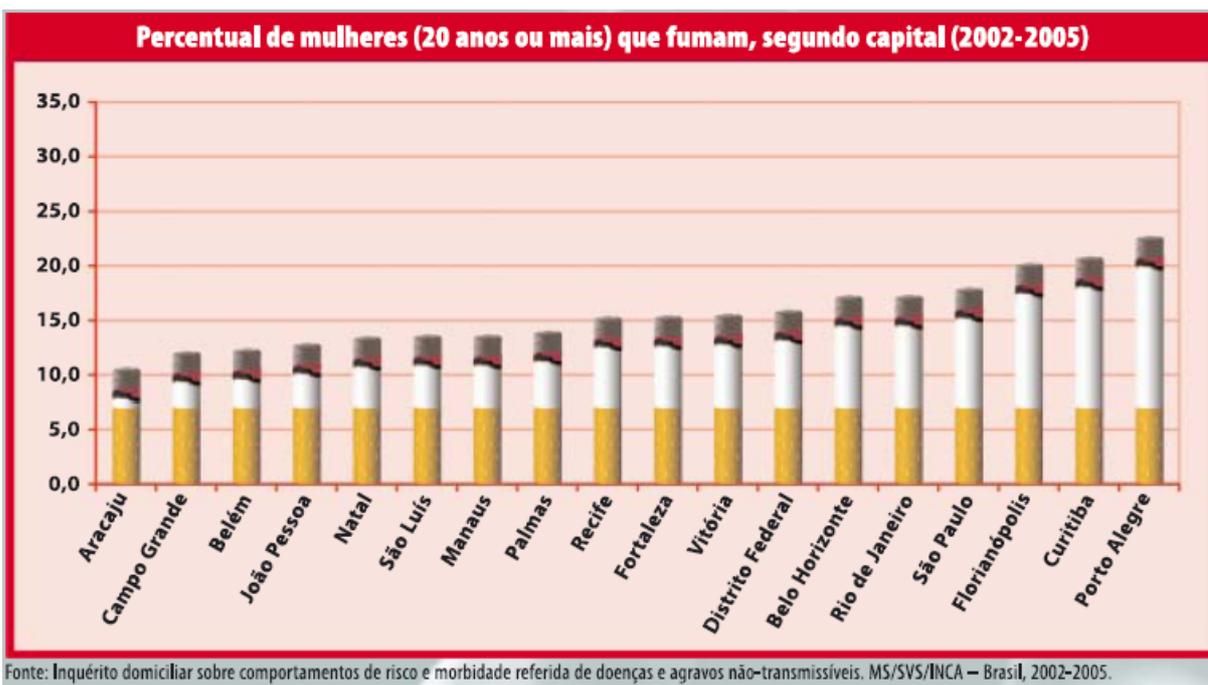
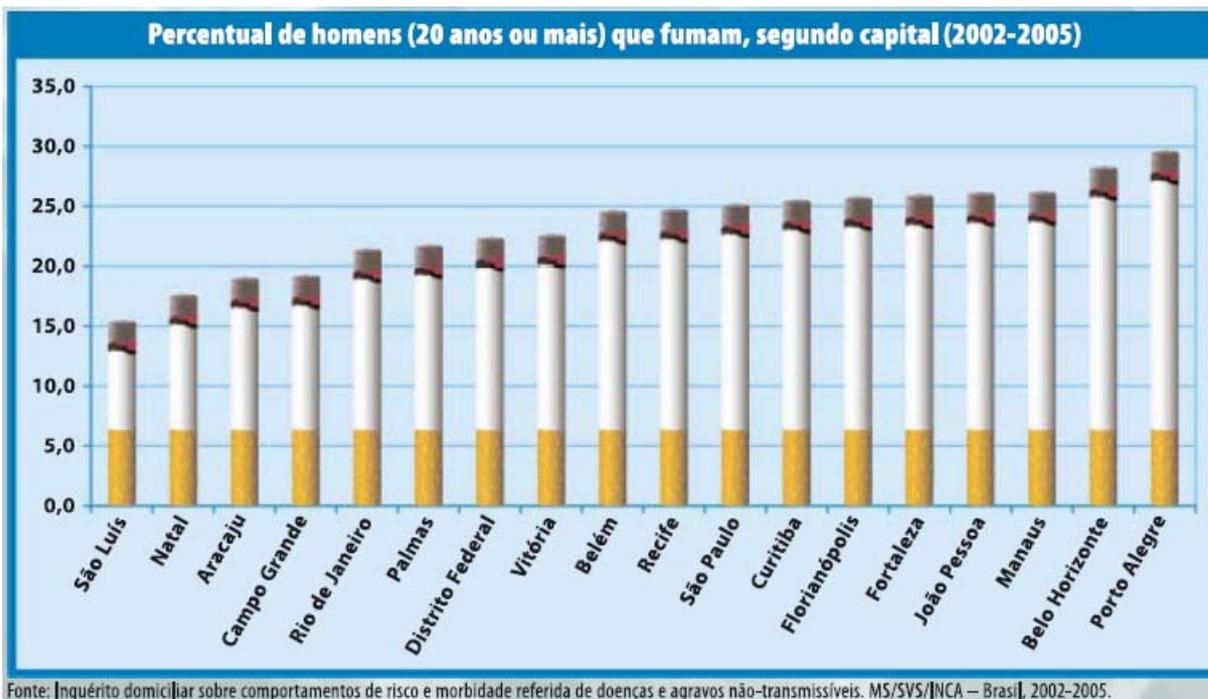


**Figura 4. Representatividade das mortes por câncer causadas pelo uso de cigarro nos sexos masculino e feminino. American Cancer Society, 2007.**

É importante ressaltar que a mortalidade por câncer de pulmão entre fumantes é cerca de 15 vezes maior do que entre pessoas que nunca fumaram, enquanto entre ex-fumantes é cerca de quatro vezes maior. Merece também importância os dados relativos aos fumantes ditos passivos, que estariam expostos a aproximadamente 4.000 substâncias, sendo que mais de 50 seriam sabidamente suspeitas de causar câncer em animais e humanos. Outro dado importante, e de grande gravidade, é que a cada ano nos EUA aproximadamente 3.000 não fumantes adultos morrem por câncer de pulmão por terem sido fumantes passivos de cigarro.<sup>13</sup>

Fumantes de 1 a 14 cigarros, 15 a 24 cigarros e mais de 25 cigarros têm, respectivamente, risco 8, 14 e 24 vezes maior de morte por este tipo de câncer do que pessoas que nunca fumaram. A cessação de fumar reduz consideravelmente o risco de morte por causas associadas ao tabaco, aumentando em nove anos a sobrevivência média da população. O tabagismo é também uma das principais causas de mortalidade precoce por doenças isquêmicas do coração, doença cerebrovascular, doença pulmonar obstrutiva crônica, e juntamente com o câncer, as doenças isquêmicas e respiratórias são as principais causas de morte no Brasil. Os dados são alarmantes, porém, existem pequenos sinais no percentual de fumantes de nosso país que têm apontado para melhoras significativas. Sabe-se que nos últimos 15 anos, provavelmente como reflexo das políticas públicas de controle do tabaco, o percentual de fumantes tenha apresentado uma diminuição significativa, no entanto, desconsiderando as heterogeneidades regionais, ainda temos cerca de 22 milhões de fumantes no país.

Avaliando uma estratificação feita por sexo em relação ao consumo de cigarro por capitais percebemos o quanto ainda precisamos modificar esse perfil, sendo o Rio Grande do Sul um forte consumidor. A Figura 5 mostra esse perfil por sexo nas diferentes capitais do Brasil.



**Figura 5. Percentual por sexo quanto ao consumo de cigarro por capitais do Brasil.** Adaptado de: A Situação do Câncer no Brasil, Tabagismo. MS/SVS/INCA. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/causalidade\\_tabagismo.pdf](http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/causalidade_tabagismo.pdf)

Ao levarmos em consideração a sobrevivência global, o câncer de pulmão permanece como uma doença altamente letal. A sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. Na realidade a estatística poderia ser muito pior, se considerarmos que a maioria dos tumores, quando diagnosticados, já se encontra em estágio avançado. Dessa forma, o câncer de pulmão tornou-se hoje um marcador do consumo de cigarro de uma população.<sup>14</sup>

Por fim, porém não menos importante é o fato de estar entre os cinco tipos de câncer em que ainda não foram observadas significativas diferenças nas suas taxas de sobrevida nos últimos 25 anos.<sup>9</sup>

## **1.4 Tipos Histológicos das Neoplasias Pulmonares**

A classificação mais completa quanto aos tipos histológicos das neoplasias pulmonares provém de um esforço conjunto entre OMS e a Associação Internacional de estudo do Câncer de Pulmão (*IASLC= International Association for the Study of Lung Cancer*). Através da série publicada por Brambilla e colaboradores em 2001, podemos ter uma dimensão do atual panorama da classificação histológica do câncer de pulmão, bem como tumores pleurais.<sup>15</sup>

As classificações do câncer de pulmão têm evoluído e têm sido reformuladas constantemente. Com a introdução de novas metodologias, o conhecimento a respeito dos diferentes tipos histológicos tem aumentado consideravelmente, trazendo melhores definições para esses tumores. Por outro

lado, na prática clínica, a diferenciação existente resume-se basicamente a dois tipos histológicos principais: câncer de pulmão não-pequenas células (*NSCLC= non-small cell lung cancer*), que representa 80% dos cânceres de pulmão e é subdividido em carcinoma epidermóide, adenocarcinoma, carcinoma de grandes células e em tipos mistos, e o câncer de pulmão de pequenas células (*SCLC= small cell lung cancer*).<sup>16</sup> Essa distinção é muito importante, pois a agressividade e o tratamento dependem do tipo de tumor que é diagnosticado. Essa simplificação está baseada na biologia e no comportamento clínico do tumor bem como nas opções de tratamento. Em relação ao SCLC, em sua grande maioria, apresenta-se bastante agressivo, e mesmo em estágios iniciais possui uma elevada taxa de metástases. Outra característica do SCLC, é que ele é considerado como doença avançada pelo sistema internacional, assim como possui mau prognóstico. Seu estadiamento é baseado apenas em: doença extensiva ou limitada.<sup>17</sup> O SCLC é tratado primariamente com quimioterapia e, ocasionalmente, com radioterapia. Com relação ao NSCLC e seus subtipos, geralmente não são tratados de forma distinta, porém, diferentemente da maioria dos SCLC, o NSCLC inclui a opção cirúrgica, principalmente nos estágios iniciais.<sup>18</sup>

Alguns tipos de câncer de pulmão crescem e disseminam-se rapidamente, por isso a detecção precoce e o tratamento são fatores essenciais para um melhor prognóstico.

Com relação aos subtipos histológicos, nos EUA, o adenocarcinoma é o subtipo histológico mais comum de câncer de pulmão, enquanto na Europa, o carcinoma epidermóide é o mais freqüente, apesar do significativo aumento da

incidência de adenocarcinoma.<sup>19</sup> Um fato interessante é que o aumento na incidência de adenocarcinoma tem sido associado ao menor consumo de cigarro.<sup>20</sup>

## 1.5 Estadiamento Tumoral

O estadiamento de um tumor é um processo importante que tem por finalidade dar uma descrição do envolvimento que o tumor representa no corpo de um paciente, e qual sua localização, podendo se caracterizar basicamente de duas formas: estadiamento clínico, baseado principalmente nos resultados de exames clínicos, e o patológico, definido após o processo cirúrgico e da análise das biópsias removidas do paciente.

O estadiamento tumoral é considerado como um sistema internacional, e para Watanabe Yoh, esse sistema seria a “linguagem internacional” no diagnóstico e tratamento do câncer.<sup>21</sup>

O estadiamento auxilia na descrição da extensão ou disseminação da doença no momento do diagnóstico. É considerado essencial na determinação da escolha da terapia e na avaliação prognóstica. Uma das classificações mais aceitas foi estabelecida pelo comitê Americano, o (AJCC= *American Joint Committee on Cancer*), o qual desenvolveu um sistema designado “TNM” que serve como ferramenta para os médicos no estadiamento patológico de diferentes tipos de câncer baseados em critérios padrões.

Segundo o AJCC, o estadiamento patológico do câncer está baseado no tamanho do tumor primário, na sua localização e se ele está disseminado a outras

áreas do corpo. O sistema TNM permite a avaliação em três caminhos: pela extensão do tumor primário (T), presença ou ausência de envolvimento de linfonodos regionais (N) e pela presença ou ausência de metástases (M). Uma vez feita a avaliação TNM, atribui-se uma graduação de I, II, III, IV, sendo o estágio I o mais precoce e o IV o mais avançado. Uma sistemática ainda utilizada compreende as classificações (*in situ*, local, regional ou distante), principalmente utilizada para as avaliações estatísticas, e para as descrições dos registros dos tumores.<sup>3</sup>

No relatório publicado em 2007, por Jemal e colaboradores para ACS, pode-se ter uma idéia da importância atual do estadiamento do câncer com relação à sobrevida em relação ao estágio de diagnóstico. Pode-se verificar através deste relatório o quanto representa na sobrevida o estágio diagnóstico, caracterizando sempre a agressividade do padrão metastático em todos os tipos de câncer, assim como o câncer de pulmão representado pelas menores taxas de sobrevida nos diferentes estágios de diagnóstico.<sup>9</sup>

Outro sistema frequentemente utilizado foi estabelecido pela União Internacional de Controle do Câncer (*UICC= International Union Against Cancer*).<sup>22</sup> Em referência as recomendações da AJCC, em 1997, um novo sistema internacional de estadiamento foi proposto por Mountain.<sup>23</sup> Através da revisão feita por Grondin e colaboradores, podemos ter uma idéia resumida das modificações propostas por Mountain, conforme exemplificado na Tabela 1.<sup>24</sup>

**Tabela 1. Estadiamento TNM do NSCLC**

<b>Tumor primário (T)</b>	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado, ou tumor comprovado pela presença de células malignas no escarro ou lavados brônquicos, mas não visualizado pelos métodos de imagem ou broncoscopia.
T0	Nenhuma evidência do tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor ≤ 3cm na maior dimensão, circundado por pulmão ou pleura visceral, sem evidências broncoscópicas de invasão do brônquio principal <sup>a</sup>
T2	Tumor com qualquer das seguintes características de tamanho ou extensão: > 3 cm no maior diâmetro; com envolvimento do brônquio principal a mais de 2 cm da carina; com invasão da pleura visceral; associado a atelectasia ou pneumonia obstrutiva estendendo-se até a região hilar mas não afetando todo o pulmão.
T3	Tumor de qualquer tamanho invadindo diretamente alguma das seguintes estruturas: parede torácica (inclusive tumores do sulco superior), diafragma, pleura mediastinal, pericárdio parietal; ou tumor no brônquio principal a menos de 2 cm da carina, mas sem envolvimento da mesma; ou atelectasia ou pneumonia obstrutiva associada de todo o pulmão.
T4	Tumor de qualquer tamanho que invada qualquer das seguintes estruturas: mediastino, coração, grandes vasos, traquéia, esôfago, corpo vertebral, carina; ou tumor com derrame pleural ou pericárdico maligno <sup>b</sup> , ou com um ou mais nódulos tumorais satélites no mesmo lobo pulmonar do tumor primário.
<b>Linfonodos regionais (N)</b>	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Nenhuma metástase para linfonodos regionais.
N1	Metástases para linfonodos peribrônquicos, intrapulmonares e/ou hilares homolaterais.
N2	Metástases para linfonodos mediastinais e/ou subcarinais homolaterais.
N3	Metástases para linfonodos mediastinais e/ou hilares contralaterais, escalenos e/ou supraclaviculares homolaterais ou contralaterais.
<b>Metástases à distância (M)</b>	
Mx	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância presentes <sup>c</sup>
<b>Estágio de classificação</b>	<b>Classificação TNM</b>
Estágio 0	TIS
Estágio IA	T1, N0, M0
Estágio IB	T2, N0, M0
Estágio IIA	T1, N1, M0
Estágio IIB	T2, N1, M0; T3, N0, M0
Estágio IIIA	T1-3, N2, M0; T3, N1, M0
Estágio IIIB	T4, qualquer N, M0; qualquer T, N3, M0
Estágio IV	Qualquer T, qualquer N, M1

TIS, tumor *in situ*; T, tumor; N, linfonodos; M, metástases.

\* Adaptado de: Grondin SC, Liptay MJ. Current concepts in the staging of non-small lung cancer. *Surgical Oncology*: 11 (2002) 181–190.

Atualmente novas formas de abordagem têm sido adicionadas ao sistema TNM, incluindo novas modalidades, como a tomografia de emissão de pósitrons e do mapeamento dos linfonodos sentinelas no trans-operatório. Num futuro próximo, com a utilização desses recursos juntamente com novos marcadores tumorais, poderemos estar estadiando com maior precisão, e direcionando melhor os tratamentos na tentativa de diminuir o impacto dessa doença.<sup>24</sup>

## **1.6 O Câncer de Pulmão Não-Pequenas Células – NSCLC**

A melhor forma de conceituarmos o câncer de pulmão não-pequenas células é caracterizando-o como um grupo heterogêneo de entidades clínicas que compartilham origens moleculares e celulares, porém, com comportamentos clínicos diferentes, tornando seu diagnóstico extremamente complicado. Mais de 90% dos pacientes apresentam uma constelação de um ou mais sinais clínicos ou sintomas, podendo evoluir por inúmeros caminhos. Sob esse aspecto, um esforço tremendo da clínica e da ciência básica tem sido aplicado, focando nos fatores prognósticos para os pacientes com câncer de pulmão. Existe na literatura uma crescente relevância e interesse por parte dos pesquisadores nesta área. Em 1990 havia, por exemplo, aproximadamente 50 artigos publicados, e no ano 2000, mais de 200 estudos nessa área.<sup>25</sup>

O interesse em elucidar as prováveis diferenças existentes nos diferentes grupos do câncer de pulmão não-pequenas células levou a descoberta de múltiplas proteínas, genes e vias relacionadas ao processo tumoral. Diante disso,

se por um lado existe uma constelação de sinais clínicos, por outro existe uma miríade de marcadores moleculares que têm sido gradativamente incluídos ao painel do câncer de pulmão não-pequenas células a fim de se tentar encontrar indicadores prognósticos, preditivos, perspectivas e a identificação de indivíduos de alto risco, bem como para definição de parâmetros adicionais que nos auxiliem na explicação para a variabilidade na sobrevida.<sup>26-28</sup>

Por outro lado, diante de um tipo tumoral bastante heterogêneo e distinto, é curioso não haver uma forma de tratamento que leve em consideração a variabilidade tumoral existente. Possivelmente, esteja nessa questão uma das perspectivas para a evolução do tratamento do câncer de pulmão não-pequenas células.

Em relação às possibilidades de tratamento, sejam eles quimioterápicos, radioterápicos ou cirúrgicos, houve uma pequena evolução em relação à sobrevida dos pacientes com NSCLC. Nesse mesmo contexto, permanecem invariáveis e sem grandes perspectivas os estádios mais avançados, que de maneira geral, são inoperáveis e praticamente incuráveis. A exemplo disso, Spira e colaboradores citam em sua revisão, o caso dos pacientes em estágio IIIB ou IV, os quais possuem em cinco anos uma sobrevida próximo a 2%. Para os outros estádios, felizmente, quando precocemente detectados, o prognóstico é significativamente melhor e as opções de tratamento oferecem melhores chances de cura.<sup>18</sup>

Vimos até aqui que o câncer de pulmão, e em especial o câncer de pulmão não-pequenas células, tem acometido a população mundial de forma significativa e que a pesquisa tem contribuído enormemente nas últimas décadas. Diversas

melhorias têm sido relatadas principalmente aquelas relacionadas às modalidades de tratamento combinado. Entretanto, se considerarmos a sobrevida, observamos que não houve um aumento significativo, e que ainda há muito a ser feito. Igualmente, os tratamentos hoje existentes geram efeitos tóxicos e, conseqüentemente, podem causar uma queda na qualidade de vida dos pacientes. Na realidade os pacientes querem não somente uma sobrevida mais longa, mas também a melhora de seus sintomas, ou seja, qualidade de vida acima de tudo.<sup>29</sup> Isso significa que novas modalidades de terapia com menores efeitos colaterais teriam possivelmente maior impacto na adesão dos pacientes a esses tratamentos.

Novos métodos para detecção precoce, identificação de pacientes de alto risco e o desenvolvimento de novas drogas baseadas em alvos racionais são alguns exemplos apontados por Zöchbauer-Müller e Hirsh, como futuras soluções para o tratamento do câncer.<sup>16,30</sup> Entretanto, os avanços no entendimento da biologia molecular e celular do câncer de pulmão ainda são incipientes.

Por essas razões, tem-se tentado também identificar vias chaves na regulação deste processo com suas respectivas seqüências e proteínas envolvidas. As drogas inteligentes, também chamadas de terapia alvo-direcionadas, utilizam pequenas moléculas ou anticorpos monoclonais humanizados no combate ao câncer instalado. Essas drogas, geralmente por bloquearem moléculas, sítios ou regiões importantes e que se encontram desregulados ou super-expressos, têm contribuído para a redução da progressão e crescimento do tumor. Poderíamos citar como exemplo a via de sinalização dos fatores de crescimento, que tem sido o principal foco da pesquisa de novos alvos,

principalmente por seu papel na regulação de funções celulares que, incluem a proliferação, diferenciação, metástase e sobrevivência. Um importante mediador da via de sinalização dos fatores de crescimento é o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma glicoproteína de 170 kDa expressa na maioria dos tecidos humanos e super-expressa na maioria dos tumores sólidos. Ela faz parte de uma família mais ampla, composta por quatro membros, a família dos receptores dos fatores de crescimento epidérmicos, onde um dos membros dessa família é alvo deste estudo (c-erbB-3). É importante destacarmos essa família, pois alguns de seus membros foram alvo de drogas direcionadas. Como exemplo, citamos o Gefitinibe (Iressa; AstraZeneca<sup>®</sup>), que é um inibidor da tirosina quinase (TK) do EGFR. Nesse caso, a molécula chave seria a região de tirosina quinase, que é bloqueada por esta pequena molécula inibidora. O Gefitinibe foi a primeira droga alvo a ser aprovada pelo órgão americano de regulação de alimentos e medicamentos (*FDA= Food and Drug Administration*) para o tratamento do NSCLC. Atualmente, os agentes contra o câncer que utilizam essas estratégias podem ser categorizados em duas classes principais. Uma categoria compreende as pequenas moléculas inibidoras da TK do EGFR, que compete com a ligação do ATP pelo domínio TK do receptor. A outra família é composta por anticorpos monoclonais (*Mabs= monoclonal antibodies*) que se ligam às regiões extracelulares do receptor inibindo seu ligante competitivamente. Por fim, coube aos pesquisadores identificar os perfis moleculares existentes nos diferentes tecidos tumorais, através de tecnologias como a imuno-histoquímica, para posteriormente aplicar este conhecimento para o desenvolvimento de drogas de bloqueio específico.<sup>31,32</sup>

Dessa forma, alterações moleculares e citogenéticas que ocorrem durante o processo tumoral passam a receber grande atenção. A exemplo disso, a Tabela 2 apresenta algumas diferenças nas alterações cromossômicas observadas entre o NSCLC e o SCLC.<sup>33</sup>

**Tabela 2. Alterações citogenéticas freqüentes no câncer de pulmão.**

	Cromossoma	
	Deleção	Ganho
<b>NSCLCs</b>	<b>3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q, 22q</b>	<b>1p, 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12q</b>
<b>SCLCs</b>	<b>3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17p</b>	<b>3q, 5p, 8q, 19q, Xq</b>

Adaptado de: Panani A.D, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Letters*. 239; 1-9, 2006.

## 1.7 Alterações Moleculares no Câncer de Pulmão

Uma grande quantidade de novos marcadores têm sido descobertos e relacionados com o prognóstico, diagnóstico e sobrevida do câncer de pulmão. Entretanto, resultados controversos e conflitantes, ou heterogêneos, têm sido descritos, devido à dificuldade na padronização dessas metodologias entre os diferentes grupos de pesquisa.<sup>34</sup>

A Tabela 3 descreve alguns genes, suas respectivas alterações e freqüência entre o NSCLC e o SCLC.

**Tabela 3. Alterações genéticas e moleculares no câncer de pulmão.**

Genes	Anormalidades	Frequência %	
		NSCLCs	SCLCs
<b>FHIT</b>	<b>Deleção/ Mutação</b>	<b>~ 40</b>	<b>~ 80</b>
<b>K-RAS</b>	<b>Mutação</b>	<b>~ 20</b>	<b>Raro</b>
<b>ERBB1/EGFR</b>	<b>Super-expressão</b>	<b>~ 60</b>	<b>-</b>
<b>ERBB2/HER2/NEU</b>	<b>Super-expressão</b>	<b>~ 20</b>	<b>-</b>
<b>Família MYC</b>	<b>Super-expressão</b>	<b>5-10</b>	<b>15-30</b>
<b>BCL-2</b>	<b>Super-expressão</b>	<b>10-35</b>	<b>75-95</b>
<b>Ciclinas</b>	<b>Super-expressão</b>	<b>?</b>	<b>?</b>
<b>P1BINK4<math>\alpha</math></b>	<b>Inativação(deleção/ mutação/ hipermetilação</b>	<b>~ 70</b>	<b>Raro</b>
<b>Rb</b>	<b>Inativação (deleção/ mutação)</b>	<b>15-30</b>	<b>~ 90</b>
<b>P53</b>	<b>Inativação (deleção/ mutação)</b>	<b>~ 50</b>	<b>80-90</b>

Adaptado de: Panani A.D, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. Cancer Letters. 239; 1-9, 2006.

As proteínas tirosina quinases ganham especial atenção, em virtude da proteína deste estudo, o c-erbB-3, possuir suas atividades diretamente relacionadas com os mecanismos de transdução de sinais, através das TK, isto é, através dos mecanismos de transfosforilação.<sup>35</sup>

A família das proteínas tirosina quinases (TK), são pertencentes a um grande grupo de proteínas conhecidas como proteínas quinases, uma super-família<sup>36-40</sup> de mais de 500 proteínas até então mapeadas e catalogadas.<sup>40</sup>

As quinases são enzimas que catalisam reações de fosforilação e possuem suas atividades relacionadas ao controle e regulação da proliferação celular, aparecendo de forma abundante nas células alteradas, justificando sua associação como uma via crítica no processo neoplásico. Em se tratando das tirosinas quinases, a fosforilação ocorreria então principalmente nos resíduos de tirosina.<sup>41</sup> As proteínas tirosina quinases possuem um domínio catalítico extremamente conservado entre os membros desta família, sugerindo que estes receptores desempenham uma função extremamente importante e fundamental no processo de sinalização intra-celular.<sup>42</sup>

As proteínas quinases também são reconhecidas por participar da maioria dos processos de transdução de sinal nas células eucarióticas através da modificação da atividade de substratos, controlando muitos processos celulares, incluindo o metabolismo, a transcrição, a progressão do ciclo celular, o rearranjo do citoesqueleto, o movimento celular, a apoptose e a diferenciação. A fosforilação das proteínas também estaria relacionada a uma função crítica na comunicação intercelular durante o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune e nervoso. As proteínas quinases são consideradas uma das maiores famílias de genes em eucariotos<sup>36,38</sup>, e têm sido intensamente estudadas.

O diferencial proposto no presente estudo está na proteína alvo, a proteína c-erbB-3, uma proteína pertencente ao importante grupo dos receptores da família erbB, a qual possui uma atividade intrínseca de tirosina quinase<sup>30</sup> e que tem sido

apontada como um potente alvo para o tratamento do câncer de pulmão,<sup>43</sup> bem como de outros tipos de câncer.<sup>44</sup> Porém, esses estudos tem, geralmente, avaliado apenas duas proteínas da família erbB, a c-erbB-1 e c-erbB-2, enquanto o papel dos dois outros membros da família, o c-erbB-3 e o c-erbB-4 têm recebido pouca atenção. Sabe-se apenas que anormalidades nesses receptores de superfície celular têm sido relacionadas com o desenvolvimento e a progressão do câncer, baixa resposta aos agentes quimioterápicos e baixa taxa de sobrevida.<sup>45</sup>

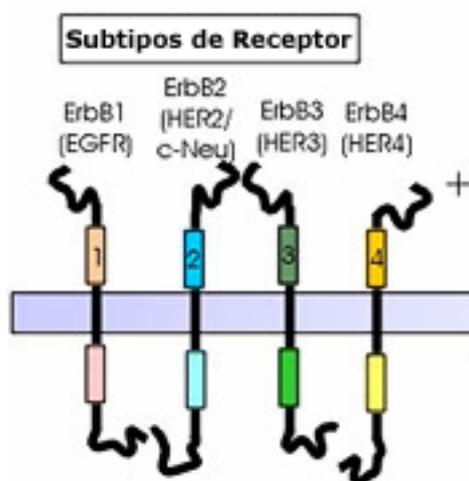
Sendo assim, existe a possibilidade de outros membros da família erbB exercerem um papel importante na progressão do câncer. O-charoenrat e colaboradores estudaram o papel dos receptores c-erbB em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sugerindo que o papel dos receptores de superfície celular da família erbB poderão ter importante repercussão clínica e contribuir para o entendimento da patogênese do câncer e na identificação de melhores marcadores biológicos para prognósticos e tratamentos individualizados.<sup>46</sup>

## **1.8 A família do Receptor erbB e seus Ligantes**

Como mencionado anteriormente, diversos estudos descritos na literatura apontam para a importância dos receptores da família erbB e seus respectivos ligantes como alvos terapêuticos importantes no tratamento do câncer.<sup>43,45</sup>

A partir da identificação da família erbB por Ulrich e colegas em 1984, o conhecimento a respeito dos fatores de crescimento evoluiu. Atualmente sabe-se

que não existe apenas uma isoforma codificada.<sup>43</sup> Essa família compreende receptores transmembrana de tirosina quinase tipo I, consistindo de quatro membros: o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR/c-erbB-1/ HER-1 para o receptor do EGF humano-1), o c-erbB-2 (Neu/HER-2), o c-erbB-3 (HER-3) e o c-erbB-4 (HER-4), os quais estão representados diagramaticamente na Figura 6.<sup>47</sup>

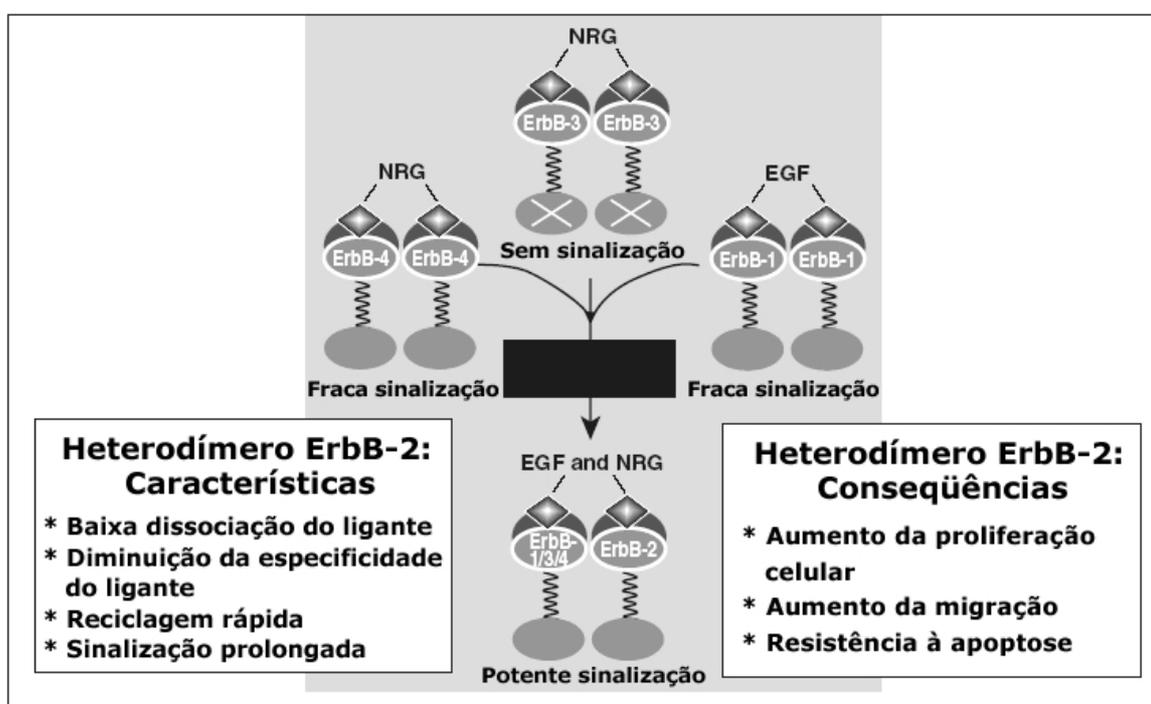


**Figura 6. Representação esquemática das isoformas dos receptores ErbB e os respectivos sinônimos dessa família.** Soler RP. HER1/EGFR Targeting: Refining the Strategy. *The Oncologist* 2004; 9: 58-67.

A família de ligantes desses receptores tem sido sugerida como sendo o produto de distintos genes, composta por mais de trinta membros.<sup>46</sup> Atualmente, sabe-se que através da inserção do ligante ao receptor há ativação da proliferação celular e o estímulo a sobrevivência celular.<sup>45</sup>

A proteína c-erbB-3, vem sendo citada por inúmeros autores e em diversos tipos de câncer <sup>48-57</sup>, mas nunca como alvo direto de pesquisa. Qual seria a justificativa por não ser pesquisada? Uma explicação para isso pode ser o fato de

que o receptor erbB-2 forma dímeros com outros membros do grupo, por exemplo: erbB-3 e erbB-4, tendo se dado prioridade apenas a proteína de ligação em relação a proteína colaboradora de dimerização.<sup>46</sup> Apesar de se saber que com a união do ligante e a conseqüente heterodimerização com outros membros da família ErbB um potente sinal celular pode ser ativado<sup>52</sup> A Figura 7 apresenta um diagrama esquemático das dimerizações dos receptores da família ERBB e possíveis conseqüências.<sup>58</sup>



**Figura 7. Sinalização resultante da natureza dos dímeros.** Rowinsky EK. Signal Events: cell signal transduction and its inhibition in cancer. The Oncologist 2003; 8(3):5-17.

Estudos prévios em câncer de cabeça e pescoço indicaram uma forte associação entre a sua expressão e a recidiva da doença.<sup>59</sup>

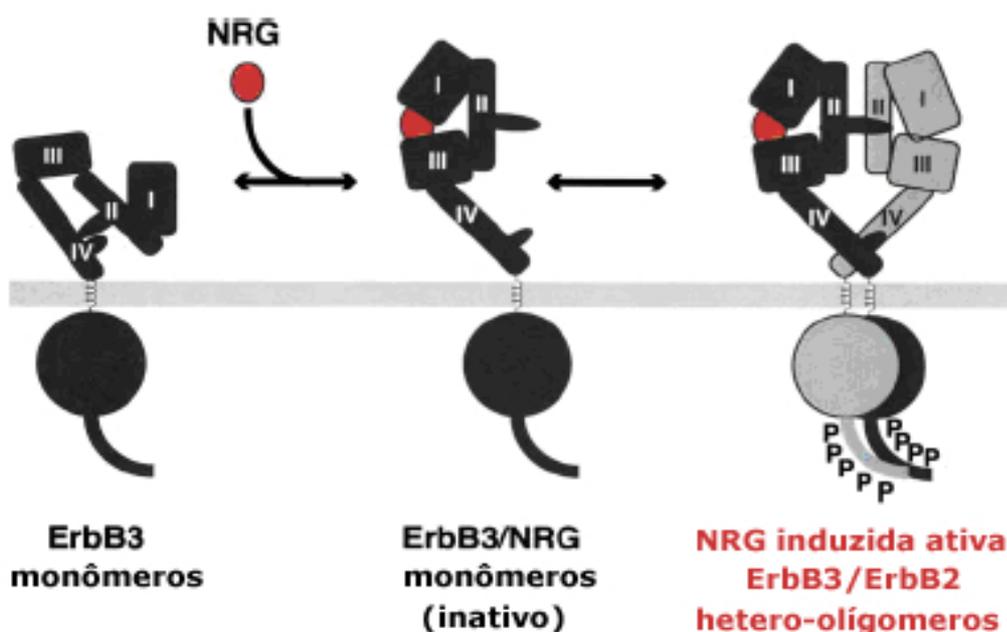
## 1.9 O Receptor erbB-3

Em 1989, Kraus e colaboradores, isolaram e identificaram um novo membro da família do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico *EGFR* ou *ERBB* (por ter homologia com o oncogene da leucemia eritroblástica viral aviária, v-erbB-2).<sup>60</sup> Tratava-se na realidade, do terceiro membro da família, prontamente designado pelos pesquisadores de gene *ERBB3*. Através desse estudo, ficou caracterizado que a família do gene *EGFR* poderia ser um pouco maior do que se pensava até então, e que a proteína correspondente ao gene *ERBB3*, poderia estar relacionada ao desenvolvimento de neoplasias. Segundo esses autores, o ERBB3 possui uma grande homologia com as outras proteínas da sua família, bem como com outras famílias distintas codificadas por proto-oncogenes, apresentando maior grau de homologia entre os domínios catalíticos, essenciais para a atividade intrínseca das proteínas TK. O ERBB3, possui uma seqüência de 4.080 nucleotídeos, e peso molecular de 148 kDa. Com relação ao *locus* gênico, o *ERBB3*, está localizado na região do cromossoma 12q13 humano, passando assim a receber também a denominação, HER-3 (*HER= Human Epidermal Receptor*). A seqüência de nucleotídeos do gene *ERBB3* encontra-se na base de dados do GeneBank sob o número de acesso M29366.<sup>61</sup>

Seguindo a evolução das descobertas, Cho e colaboradores trouxeram importantes achados com relação à estrutura tridimensional do erbB3. Baseados em dados de cristalografia de raios-x, Cho e colaboradores puderam descrever as possibilidades de ligação, as modificações de conformação na região extracelular da proteína assim como pela sugestão de futuros moduladores dessas regiões.<sup>62</sup>

Outro achado importante para o erbB3 foi descrito por Guy e colaboradores que encontraram importantes alterações nesta proteína nos resíduos da região relacionada com a atividade da TK sugerindo a inatividade para a proteína. Por outro lado, apontam uma questão que futuramente seria comprovada: a proteína erbB3, mesmo com sua atividade de TK inexistente, poderia ser ativada quando associada com outros membros da mesma família.<sup>63</sup>

Coube a Rubin e colaboradores a comprovação da hipótese sugerida por Guy e colaboradores. Nesse sentido, Rubin e colaboradores descreveram que, mesmo na ausência de atividade de TK em seu receptor, o HER3 poderia se ligar a outro membro da família, mais frequentemente com o HER2, e gerar um forte sinal estimulando a proliferação celular, num processo chamado de dimerização. (Figura 8)<sup>64</sup>



**Figura 8. Modelo de indução via ligante (NRG) dos receptores ErbB2 e ErbB3.** Adaptado de Burgess e col. Molecular Cell, 2003.

No caso da proteína erbB3, que seria considerada uma proteína defeituosa para a atividade de TK, a heterodimerização seria considerada a forma alternativa a compensar essa deficiência. De forma geral, podemos observar que os receptores erbB possuem três regiões importantes, e que em seu domínio extracelular são caracterizados por uma estrutura tetramérica. Essas considerações ganham bastante importância pelo fato de sua estrutura estar implicada nos mecanismos de hetero e homodimerização (Figura 7), fato esse comprovado por Burgess e colaboradores, que sugeriram mecanismos pelos quais seus ligantes induzem dramáticos rearranjos em seus domínios extracelulares ativando seu domínio intracelular de TK. As distintas possibilidades de dimerização fornecem novos alvos terapêuticos inibidores da ativação desses receptores.<sup>65</sup>

Atualmente, para diversos pesquisadores, o receptor erbB3 ou HER-3, está diretamente associado ao desenvolvimento tumoral devido à formação de um potente sinal de transdução para o núcleo quando da formação de um heterodímero entre erbB3/erbB2.<sup>52,58,66</sup> Essa transdução de sinais se refere ao processo de comunicação usado para a regulação de moléculas mediadoras dos processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. Sabe-se também que a maioria das neoplasias humanas possuem esses sinais aberrantes e que os receptores da família de crescimento epidérmico estariam logicamente muito comprometidos por estarem associados a esses sinais. Mais especificamente, o ERBB3 ativa a cascata do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que está implicada na promoção da proliferação celular e da sobrevivência.<sup>60</sup>

A expressão dos heterodímeros de HER-1 e HER-2 já foi descrita em muitos tumores como citado na revisão feita por Rowinsky, 2004.<sup>67</sup> Por outro lado, Casalini e colaboradores sugerem que somente a super-expressão do HER-2 não seria suficiente para a manutenção e progressão do tumor.<sup>68</sup> No entanto, Berger e colegas afirmam que o receptor erbB3 não faz homodimerização mas, por outro lado, quando associado com outro membro da família erbB possui uma importante atividade de tirosina quinase capaz de responder aos diversos ligantes e formar potentes respostas pela via MAPK (*mitogen activate protein kinase*).<sup>66</sup> Tem-se apontado também, que quando o HER-3 está presente em altos níveis, acompanhando da expressão de HER-2, há uma grande resistência aos tratamentos convencionais<sup>69</sup> bem como para os inibidores de EGF significando que o erbB3 poderia exercer um importante papel no desenvolvimento e resistência de diversos tumores.

Assim, com base nas evidências apontadas por diversos pesquisadores e pelo fato de não se ter um entendimento ainda muito claro do papel do erbB3, bem como seu padrão de expressão e suas implicações no câncer de pulmão, o presente estudo pretende verificar sua expressão, o valor prognóstico e a possível correlação desta proteína com parâmetros clínicos nos NSCLC.

## 2. OBJETIVOS

1. Descrever a frequência de expressão da proteína c-erbB-3 em amostras de câncer de pulmão não-pequenas células pela técnica de imuno-histoquímica.
2. Verificar se há relação entre a frequência da expressão da proteína c-erbB-3 com as variáveis clinico-patológicas: óbito, tipo histológico, idade, gênero, estadiamento patológico, grau histológico e sobrevida.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra**

Foram analisadas, através da técnica de imuno-histoquímica, 66 amostras de câncer de pulmão não-pequenas células (NSCLC), incluídas em blocos de parafina, obtidos após a ressecção cirúrgica de pacientes, operados pela Equipe de Cirurgia Torácica do Hospital São Lucas da PUCRS, no período compreendido entre janeiro de 2002 até dezembro de 2004. O diagnóstico de NSCLC e a descrição do tipo celular foram realizados de acordo com os critérios convencionais morfológicos da OMS<sup>15</sup>, e o estágio patológico de cada tumor foi determinado de acordo com o sistema de classificação TNM.<sup>23</sup>, pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, em um estudo retrospectivo aninhado num estudo de coorte.

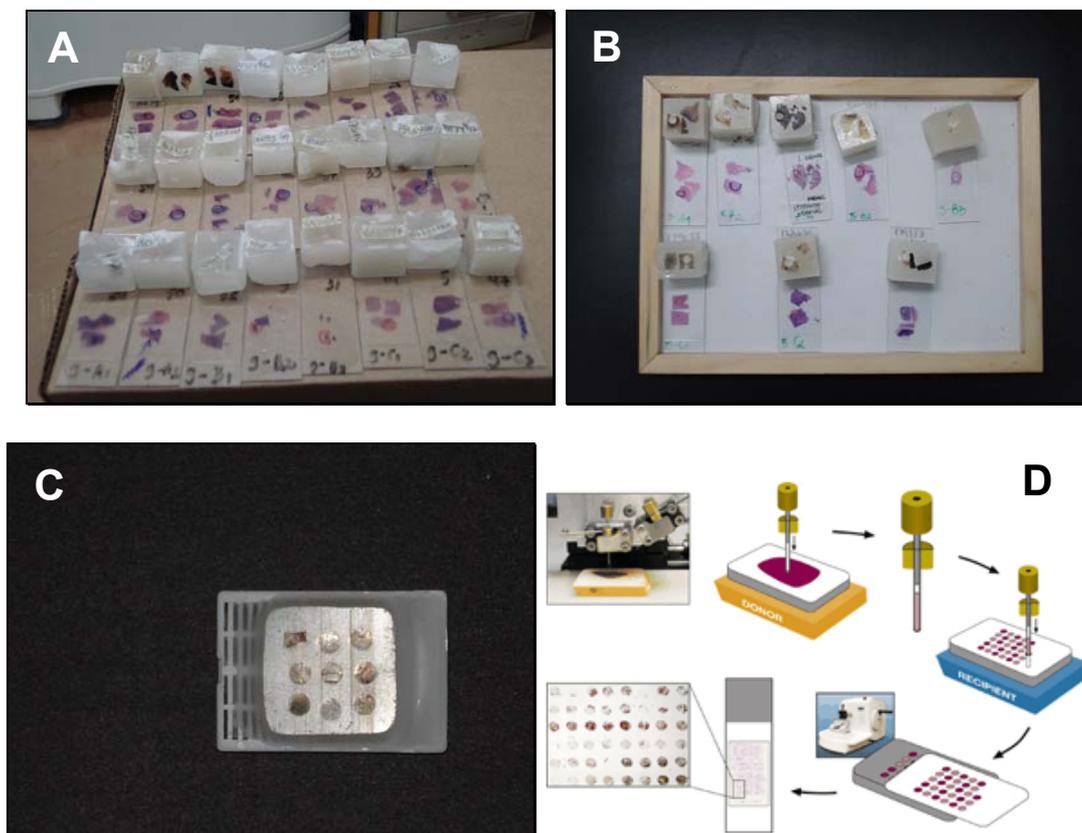
#### **3.2 Construção dos Micro-arranjos de Tecidos (TMA= *Tissue MicroArray*)**

Para uma análise mais rápida, econômica e com menor variabilidade intra-teste, foram construídos micro-arranjos dos tecidos tumorais. A construção dos TMA (Tissue Microarrays) foi realizada após ter sido escolhida uma área representativa da região do tumor, em lâmina previamente corada pela metodologia Hematoxilina e Eosina (HE).

Essas metodologias foram estabelecidas pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS juntamente com o pesquisador,

sendo confeccionadas de forma manual e econômica diferentemente da metodologia semi-automatizada frequentemente descrita na literatura que, de forma geral, torna-se extremamente onerosa e inviável.

Posteriormente, foi coletado uma amostra de 3 mm de diâmetro para a re-inclusão em membrana de colágeno para assegurar o correto posicionamento das amostras, contendo 10 amostras por bloco, incluindo, entre elas um controle positivo. A Figura 9c, representa a disposição de um TMA utilizado em nosso estudo. Por fim, foi estabelecido um mapa de localização das amostras, para orientação na análise posterior do material.



**Figura 9. Modelo de construção do TMA.** Seleção da área representativa do tumor através da visualização em HE (A), retirada de 3mm de diâmetro da região tumoral no bloco de parafina (B), representação esquemática do bloco TMA e representação esquemática do processo mecânico envolvido na confecção do TMA (D).

### 3.3 Análise Imuno-histoquímica

Para o preparo das lâminas e posterior análise imuno-histoquímica, foram feitas secções de 4 µm de espessura nos blocos de TMA, obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com Histogrip (Zymed, USA) e levados à estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes foram desparafinizados por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da re-hidratação dos cortes em seqüência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por 3 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura sob pressão, foi realizada pela incubação das lâminas em cubas de Coplin, com tampão 20 mM Tris/0.65 mM EDTA/0.05% Tween 20 (pH 9.0) dispostos em ângulo de 90°, colocados dentro de panela de pressão para microondas (NordicWare® Microwave Tender Cooker/ Biogenex, USA) em potência máxima (LG 1.050 W, BRA) até atingir a pressão do recipiente e, a partir desse ponto, as lâminas foram aí mantidas por 5 minutos para recuperação antigênica.

Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS (pH 7.2). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS (pH 7.2).

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com uma solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS (pH 7.2) por 30 minutos em temperatura ambiente (Molico, BRA) seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS (pH 7.2).

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imuno-coloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) por 24 horas em temperatura de 2 a 8°C com o anticorpo primário para a oncoproteína c-erbB-3 (NCL-c-erbB-3 clone RTJ1, Novocastra Laboratories, Ltd, UK) diluído em solução diluente (Dako, USA) na concentração de 1:50. Após o período de incubação, as lâminas passaram por três lavagens com tampão PBS (pH 7.2). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o sistema NovoLink Polymer, (Novocastra, Ltd, UK), de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7.2) e incubadas em uma solução com diaminobenzidina líquida (Dako® Liquid DAB Substrate Chromogen system, USA) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos. Após lavagem em três banhos de água, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de amônia 37 mM. Para a contra-coloração, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e absoluto, respectivamente) por 3 minutos em cada diluição, e após dois tratamentos por 5 minutos em xileno, as lâminas foram montadas em Entellan® (Merck, Alemanha).

Para todos os TMAS, foi incluído um controle positivo validado previamente, de forma a excluir a possibilidade de uma reação expúria. Com relação ao controle negativo, as próprias lâminas foram utilizadas como controle

da reação nas áreas onde a proteína não estava expressa. Adicionalmente, dez controles obtidos de doenças inflamatórias previamente diagnosticadas pelo laboratório de patologia foram também incluídos, como controle de um tecido não tumoral de pulmão.

### **3.4 Interpretação da Imuno-histoquímica**

As lâminas foram analisadas e interpretadas simultaneamente por dois observadores (V.D.S e V.S.M) em microscópio óptico convencional.

Foi estabelecido que, para os cortes histológicos com menos de 25% das células tumorais com expressão da proteína, o padrão de expressão negativo (-). Para os casos com positividade, atribuiu-se uma escala de marcação que variou entre 25 e 50% (+), 50 e 75% (++) e 75 e 100% (+++) das células tumorais positivas para a proteína. Apenas os casos que tiveram marcação de membrana, foram considerados positivos, sendo excluídos aqueles com reatividade citoplasmática. Para as marcações com frequência superior a 75%, atribuiu-se o caráter de super-expressão para a proteína.

### **3.5 Análise Estatística**

Os dados foram descritos por frequência absoluta e percentagem. A significância estatística dos achados foi determinada pelo teste de qui-quadrado, análise da variância de uma via (ANOVA) e teste t de Student no caso das amostras independentes.

A avaliação da sobrevida foi calculada a partir da data da cirurgia e a data do óbito ou do último registro com confirmação por contato telefônico, sendo analisada de acordo com o método de Kaplan-Meier, e as diferenças nas distribuições, avaliadas através do teste de Log-rank. O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$  e os dados foram analisados com o auxílio dos programas SPSS versão 11.

### **3.6 Aspectos Éticos e Avaliação da Comissão Científica**

O presente estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como com a diretriz número 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS, 1993).

Esta investigação faz parte de um estudo aprovado pela Comissão Científica do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (361/04-PG) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS (CEP 06/03244), após análise do seu projeto de pesquisa. (Anexo I)

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características da população estudada

Dos 66 pacientes incluídos nesse estudo, 24 (36,4%) haviam falecido até o momento da conclusão deste estudo. Os 42 (63,6%) pacientes restantes permaneciam em acompanhamento pelo Serviço de Oncologia e Cirurgia Torácica.

A idade média dos pacientes foi de 64,57 anos variando entre 39 a 84 anos. A média de idade por categorias de expressão observada nos pacientes foi de 66,00 anos nos tumores classificados como (-), 59,60 com classificação (+), 59,00 com (++) e 65,79 com (+++).

Com relação ao gênero, houve uma maior incidência de NSCLC nos pacientes masculinos representando uma frequência de 75,8% (n= 50) das amostras. Os tipos histológicos, como o adenocarcinoma e o carcinoma epidermóide tiveram uma frequência de 80,3%, superior aos tipos especiais, os quais estavam representados pelo adenoescamoso (10,6%), bronquíolo-alveolar (4,5%) e o de grandes células (4,5%). Para o adenocarcinoma a frequência observada foi de 39,4% e para o carcinoma epidermóide de 40,9% das amostras. As frequências relativas ao estadiamento patológico, foram de 15,2%, 28,8%, 24,2%, 10,6%, 6,1% e 15,2% para os grupos IA, IB, IIB, IIIA, IIIB e IV, respectivamente. Não foi obtida amostra com estadiamento patológico do grupo IIA. Com relação ao grau histológico, o tipo II foi observado em 77,3% dos casos, valor superior ao grupo I (3%) e III (19,7%). A idade e gênero dos pacientes,

estadiamento patológico, tipo e grau histológico dos tumores, estão sumarizadas na Tabela 4.

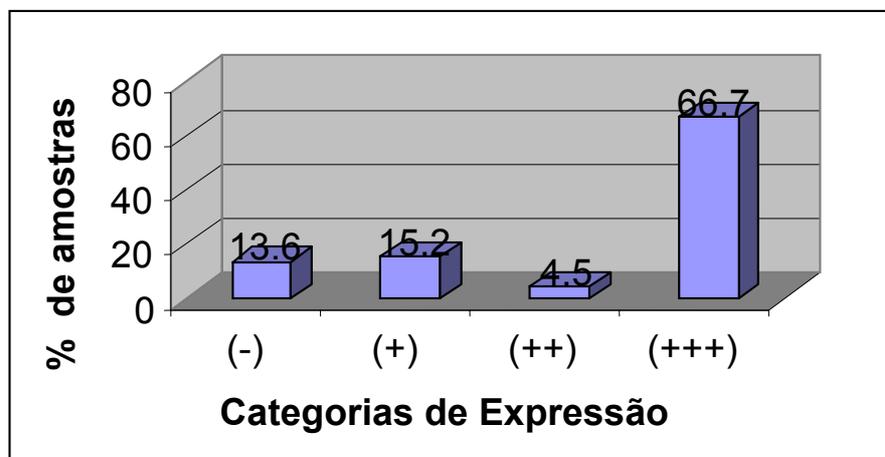
**Tabela 4. Característica da amostra em estudo.**

	n	%
<b>Número total de pacientes</b>	<b>66</b>	
<b>Idade</b>		
Média	<b>64,57 anos</b>	
Variação	<b>(39-84)</b>	
<b>Gênero</b>		
Masculino	<b>50</b>	<b>75,8</b>
Feminino	<b>16</b>	<b>24,2</b>
<b>Tipo Histológico</b>		
Adenocarcinoma	<b>26</b>	<b>39,4</b>
Carcinoma Epidermóide	<b>27</b>	<b>40,9</b>
Tipos Especiais	<b>13</b>	<b>19,6</b>
<b>Estádio Patológico</b>		
IA	<b>10</b>	<b>15,2</b>
IB	<b>19</b>	<b>28,8</b>
IIA	<b>0</b>	<b>0,0</b>
IIB	<b>16</b>	<b>24,2</b>
IIIA	<b>7</b>	<b>10,6</b>
IIIB	<b>4</b>	<b>6,1</b>
IV	<b>10</b>	<b>15,2</b>
<b>Grau Histológico</b>		
I	<b>2</b>	<b>3,0</b>
II	<b>51</b>	<b>77,3</b>
III	<b>13</b>	<b>19,7</b>

## **4.2 Freqüência de expressão da proteína erbB3 nas amostras de NSCLC**

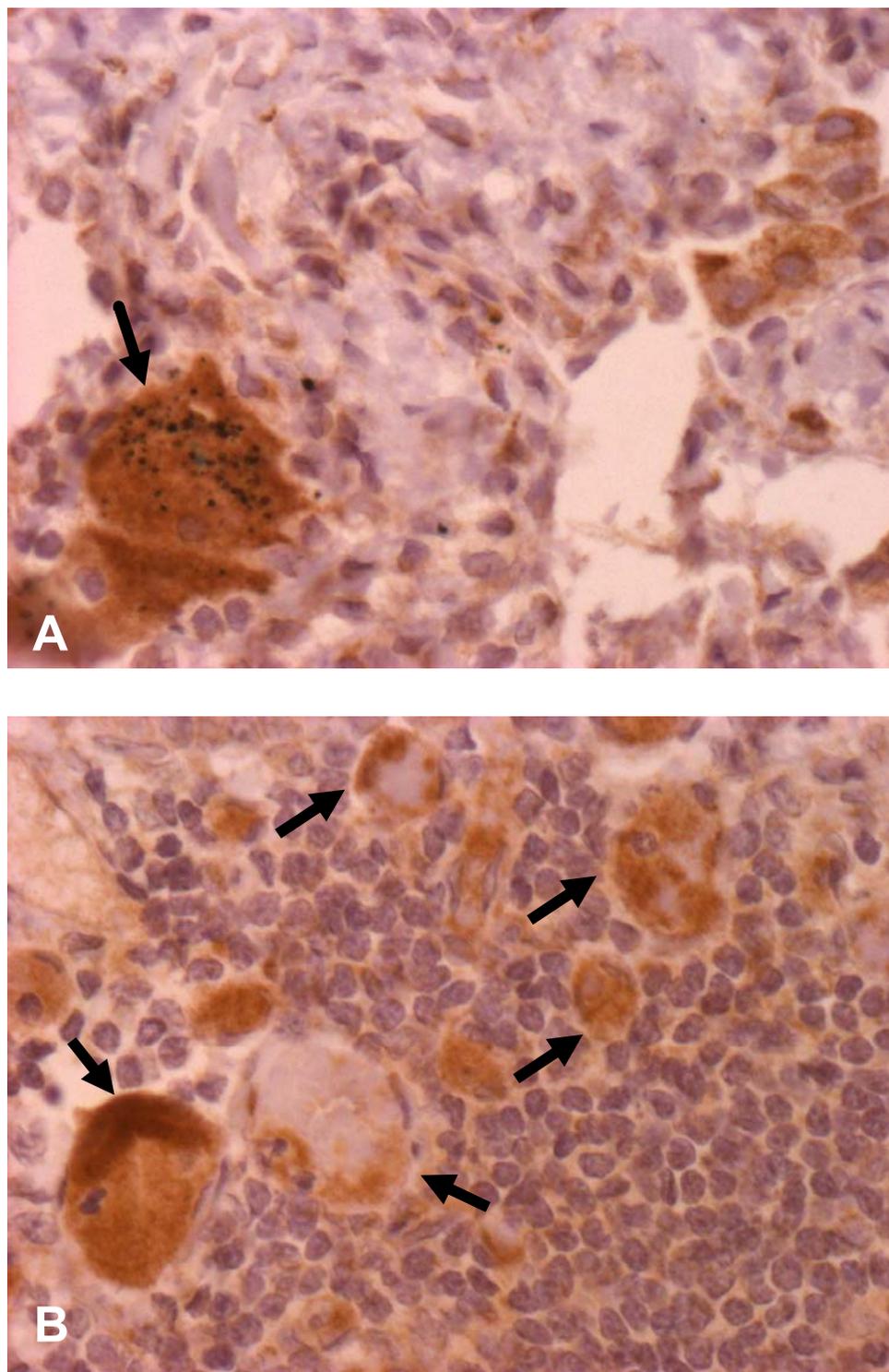
A Figura 10 mostra o histograma da freqüência de expressão do erbB3 nas diferentes categorias de expressão das amostras incluídas no estudo.

Em apenas 9 (13,6%) dos tumores observou-se ausência completa de marcação ou positividade em níveis considerados negativos. Na grande maioria das amostras (66,7%) foi observada uma super-expressão (+++) da proteína erbB3 de acordo com os critérios de classificação definidos para este estudo. A expressão da proteína erbB3, detectada pela técnica de imuno-histoquímica, foi de 13,6%, 15,2%, 4,5% e 66,7% das amostras com expressão em 0 a 25%, 25 a 50%, 50 a 75% e  $\geq 75\%$  das células tumorais, respectivamente. Mais de 70% das amostras tiveram uma marcação acima de 50%.



**Figura 10. Histograma da frequência de expressão da proteína erbB3 nas células tumorais das amostras de NSCLC de acordo com a categoria de expressão definida.**

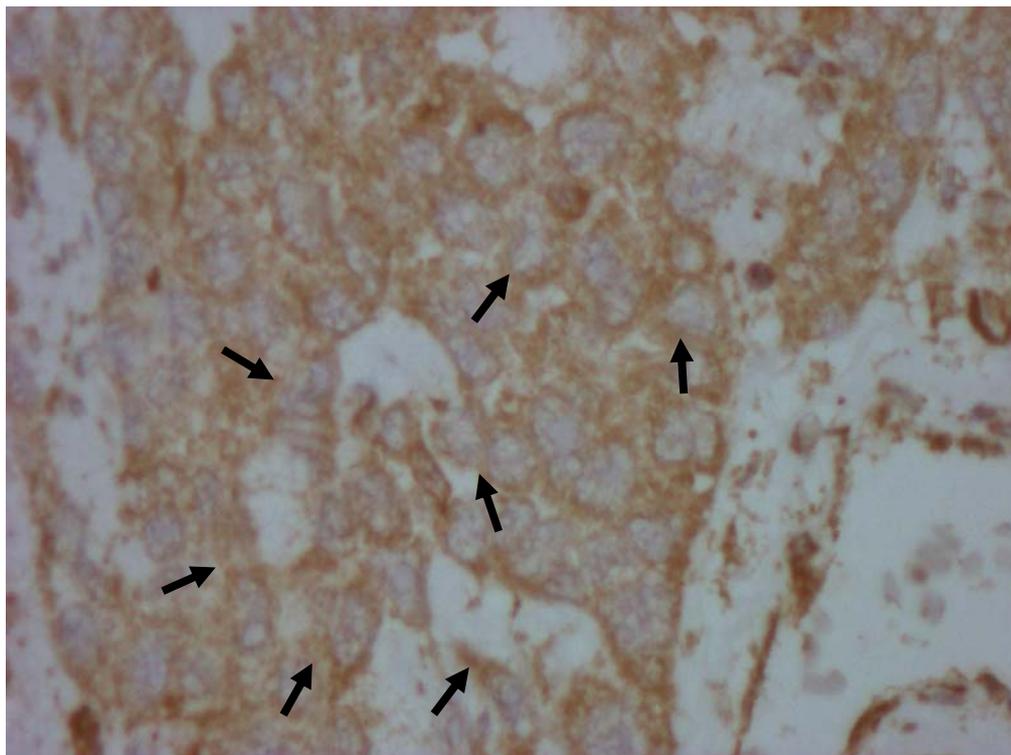
Nas dez amostras incluídas como controle não tumoral para o erbB3, observou-se apenas a expressão desta proteína em macrófagos e em células alveolares, validando as reações. (Figura 11)



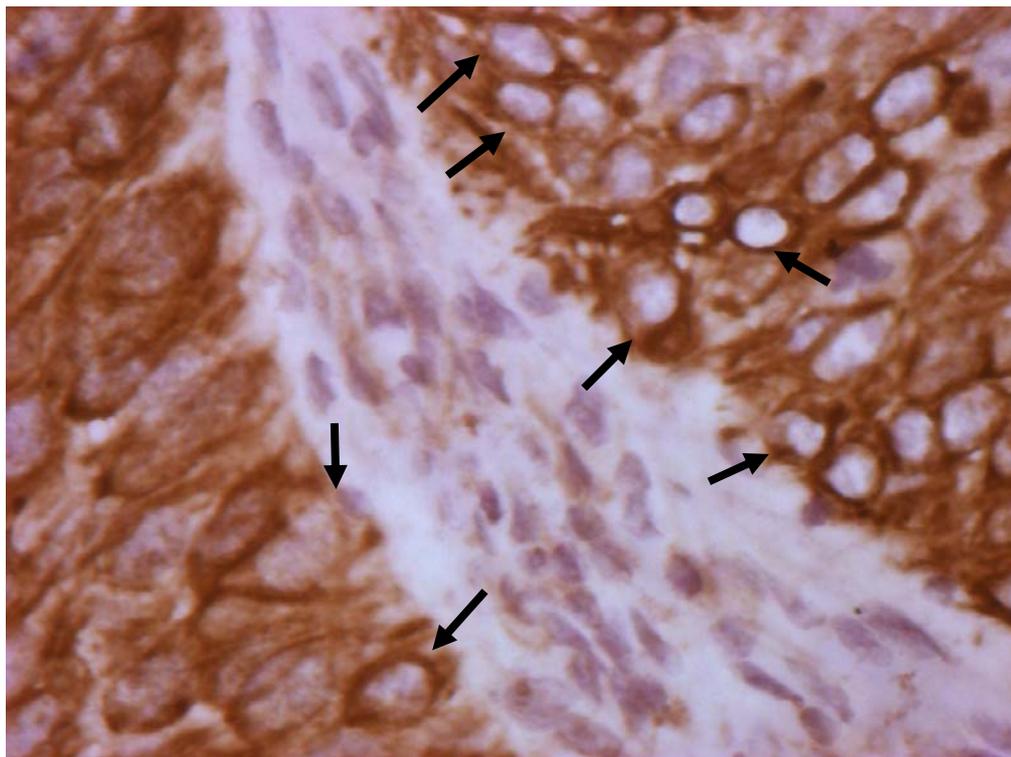
**Figura 11. Fotomicrografia de amostras de doença inflamatória utilizada como controle não tumoral. As setas indicam marcação para a proteína erbB3 apenas nos macrófagos (A) e células alveolares e macrófagos (B). Na figura 11A pode ser visto um macrófago após ter fagocitado partículas de carvão. (Aumento A e B 400X).**

As Figuras 12 e 13 mostram o padrão de expressão do erbB3 nos diferentes extremos das graduações analisadas: negativa (-) (Figura 12) e super-expresssa (+++) (Figura 13). A forte coloração marrom denota marcação positiva, podendo-se perceber a nítida marcação da proteína na membrana.

Nas Figuras 12 e 13, estão apresentadas duas fotomicrografias de NSCLC dos subgrupos histológicos carcinoma de grandes células e adenocarcinoma respectivamente. A fraca marcação exemplificada na Figura 12 representa a classificação (-), isto é, 0 a 25% das células tumorais positivas para a proteína erbB3. Por outro lado, na Figura 13 observa-se uma super-expressão da proteína, classificada como (+++), isto é, 75% ou mais das células tumorais encontravam-se marcadas.



**Figura 12. Fotomicrografia em uma amostra de NSCLC, em carcinoma de grandes células.** As setas indicam as células com marcação positiva para a expressão da proteína erbB3. De acordo com o critério de classificação da expressão da proteína, esta amostra é (-), isto é, apresenta de 0 a 25% das células tumorais marcadas.



**Figura 13. Fotomicrografia em uma amostra de NSCLC, em adenocarcinoma.** As setas indicam as células com marcação positiva para a expressão da proteína erbB3. De acordo com o critério de classificação da expressão da proteína, esta amostra é (+++), isto é, apresenta de 75 ou mais das células tumorais marcadas.

### **4.3 Relações clinico-patológicas e a expressão da proteína erbB3**

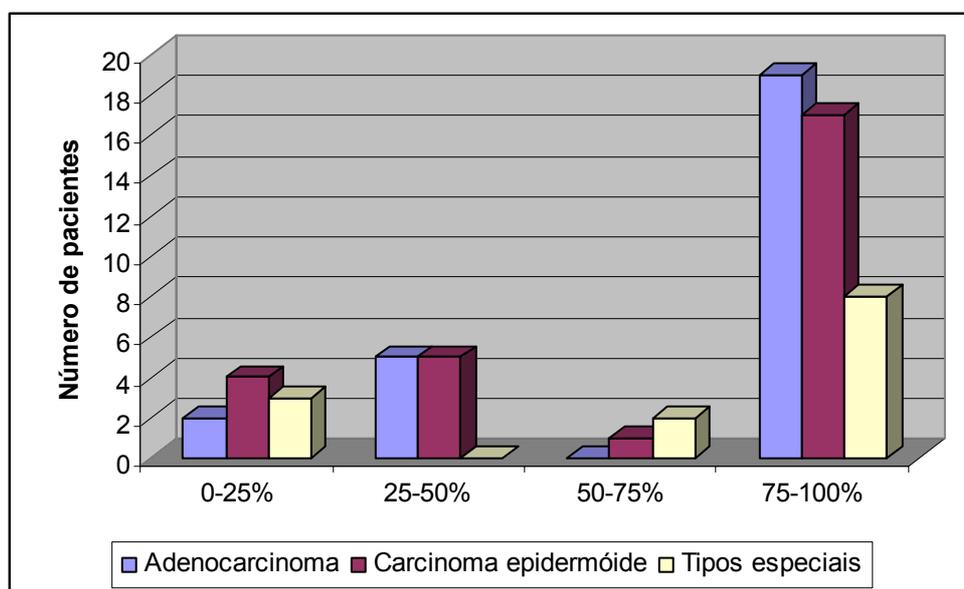
Entre os 66 espécimes analisados não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a frequência de expressão da proteína e as variáveis: idade, gênero, tipo histológico, estadiamento, grau histológico e óbito ( $P=0,177$ ,  $P=0,148$ ,  $P=0,521$  e  $P=0,691$ , respectivamente), como descrito na Tabela 5. Entretanto, quando as amostras foram agrupadas em categorias de expressão entre 0 e 75% e 75 e 100% das células tumorais positivas para a proteína erbB3, houve significância estatística com relação ao grau histológico ( $P=0,04$ ). Ainda, cabe salientar que a maior frequência foi encontrada nas amostras de grau histológico tipo II (72,5%). Com relação às outras variáveis analisadas, não foi observada significância estatística quando as amostras foram classificadas em 0-75% e 75-100%, 0-25% e 25-100%, 0-50% e 50-100% das células tumorais positivas.

**Tabela 5. Correlações entre a frequência de expressão da proteína erbB3 e as diferentes variáveis estudadas.\***

Variáveis	Categorias de frequência para a expressão da proteína erbB3				P
	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%	
<b>Idade</b>	9 (13,63%)	10 (15,5%)	3 (4,54%)	44 (66,6%)	<b>P= 0,177</b>
Média das idades (anos)	66,00	59,60	59,00	65,79	
<b>Sexo</b>					
Masculino	5 (55,6%)	10 (100%)	2 (66,7%)	33 (75%)	<b>P= 0,148</b>
Feminino	4 (44,4%)	0	1 (33,3%)	11 (25%)	
<b>Tipo Histológico</b>					
Adenocarcinoma	2 (22,2%)	5 (50%)	0	19 (43,2%)	<b>P= 0,182</b>
Carc.Epidermóide	4 (44,4%)	5 (50%)	1 (33,3%)	17 (38,6%)	
Tipos Especiais	3 (33,3%)	0	2 (66,7%)	8 (18,2%)	
<b>Estadiamento Patológico</b>					
IA	0	1 (10%)	0	9 (90%)	<b>P= 0,521</b>
IB	3 (15,78%)	4 (21,05%)	1 (5,25%)	11 (57,89%)	
IIA	0	0	0	0	
IIB	2 (12,5%)	3 (18,75%)	0	11 (68,75%)	
IIIA	1 (14,28%)	0	0	6 (85,7%)	
IIIB	0	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	
IV	3 (30%)	1 (10%)	1 (10%)	5 (50%)	
<b>Grau Histológico</b>					
I	0	0	0	2 (3%)	<b>P= 0,113</b>
II	5 (55,6%)	8 (80%)	1 (33,3%)	37 (84,1%)	
III	4 (44,4%)	2 (20%)	2 (66,7%)	5 (11,4%)	
<b>Óbito</b>					
Vivo	5 (55,6%)	5 (50%)	2 (66,7%)	30 (68,2%)	<b>P= 0,691</b>
Falecido	4 (44,4%)	5 (50%)	1 (33,3%)	14 (31,8%)	

\* Variáveis= (n/%)

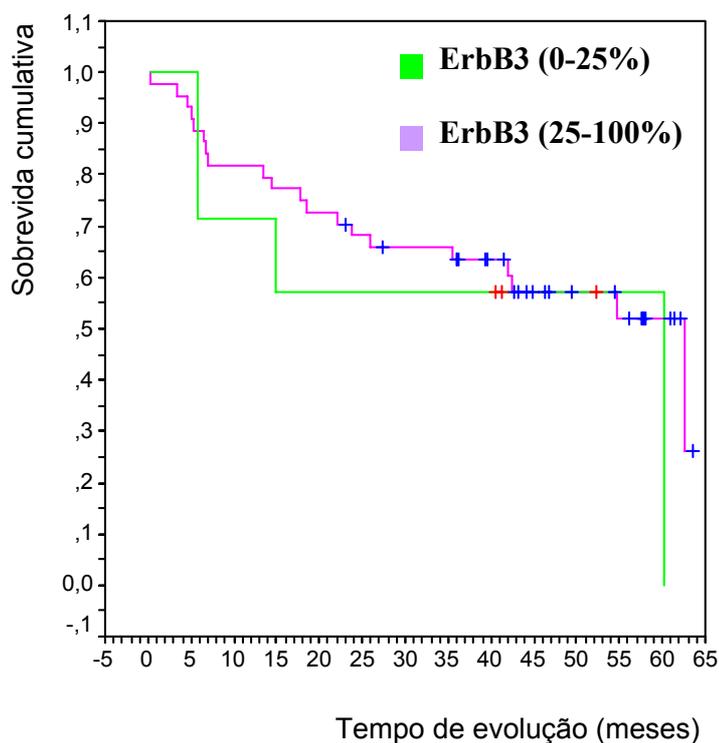
O histograma da Figura 14 representa o número de pacientes com tumores de tipo histológico em cada uma das categorias de expressão da proteína erbB3 onde 19 amostras correspondiam a adenocarcinomas (43,2%), 17 a carcinomas epidermóides (38,6%) e as oito restantes aos tipos especiais (18,2%). Embora 62,7% das amostras tenham apresentado uma expressão muito acentuada, isto é, entre 75 e 100% das células tumorais marcadas, isto é, super-expressão, não houve significância estatística entre a expressão da proteína erbB3 e o tipo histológico ( $P= 0,182$ ).



**Figura 14. Histograma do número de pacientes e das diferentes categorias de expressão estudadas nos subtipos histológicos estudados.**

Foi possível realizar a análise da sobrevida em 51 pacientes para os quais este dado estava disponível após confirmação por contato telefônico. A expressão da proteína erbB3 não apresentou relação com a sobrevida ( $P= 0,471$ ) desses pacientes mesmo após o agrupamento das amostras em duas categorias de

expressão, como representado na Figura 15. A linha verde representa a curva de sobrevida dos pacientes com tumores com 0 a 25% de células positivas e a linha lilás a curva de sobrevida obtida para os pacientes com tumores com mais de 25% da célula tumorais expressando a proteína erbB3. Embora sem significância estatística, estes últimos apresentaram uma sobrevida um pouco maior.



**Figura 15. Sobrevida dos pacientes em relação a expressão da proteína ErbB3.**

## 5. DISCUSSÃO

Considerando que diversos artigos da literatura apontavam para a possibilidade de um novo membro da família erbB poder atuar de forma sinérgica com os outros membros desta família de proteínas tirosina quinases nos NSCLC, juntamente com a falta de dados descritos na literatura, buscou-se descrever a expressão da proteína erbB3 em amostras de NSCLC pela técnica de imunohistoquímica.

Ainda, Engelman e colaboradores já haviam relatado que o erbB3 poderia ser um importante fator na ativação de alguns tipos celulares do câncer de pulmão, principalmente devido à falha em muitos estudos, os quais demonstraram apenas respostas parciais com relação a tratamentos de bloqueio específico do receptor do EGF, freqüentemente encontrado na maioria dos NSCLC.<sup>70</sup>

Independente dessas considerações, uma pergunta permanece: Porque o erbB3 não teria tido maior repercussão, uma vez que esta família tem recebido tamanha atenção e principalmente, por ter sido descrita desde 1989?<sup>61</sup> Os poucos estudos disponíveis não respondiam adequadamente esta pergunta, embora Yi e colaboradores, em 1997,<sup>71</sup> e Hilbe e seus colegas já apresentavam estas questões em seus relatos.<sup>72</sup> Em resumo, quatorze anos se passaram e muitas perguntas relacionadas com a função do erbB3 na carcinogênese ainda não foram respondidas.

Comparando os dados obtidos neste estudo com os dados já existentes na literatura<sup>71,72</sup>, foi possível verificar que a proteína erbB3 possui uma freqüência de expressão bastante elevada em amostras de NSCLC. O estudo descrito por Yi e colaboradores, os quais avaliaram uma amostra superior (n= 549) as do presente

estudo (n=66), encontraram uma alta taxa de positividade da proteína erbB3 em todos os estádios patológicos e que pacientes com super-expressão desta proteína possuíam menor sobrevida, porém somente aqueles com tumores estágio III e IV, enquanto que nos pacientes com tumores estágio I e II esta característica não foi observada. Assim, os autores sugerem que a expressão da proteína erbB3 em NSCLC avançado poderia estar relacionada a um prognóstico desfavorável. Esses autores observaram ainda uma marcação em membrana, assim como, um padrão citoplasmático da proteína erbB3 e consideraram as duas formas para a avaliação da positividade.<sup>71</sup> Semelhante ao padrão de membrana por eles descrito, identificamos um padrão bastante característico nas amostras investigadas, entretanto, optamos em descartar as marcações citoplasmáticas indo de encontro ao consenso de marcação para a proteína erbB2, seguindo as recomendações do HercepTest<sup>®</sup>, aprovado pelo FDA, uma vez que não existe um critério uniforme e padronizado para os outros membros da família. Além disso, consideramos o fato de que o erbB3 é uma proteína transmembrana.

Hilbe e colaboradores, num estudo envolvendo 79 amostras de NSCLC, além de verificar o valor prognóstico da expressão da proteína erbB3, empregaram um painel de proteínas relevantes no processo tumoral. Uma das questões levantadas por Hilbe, refere-se ao uso de cortes congelados na avaliação da expressão de proteínas pela técnica de imuno-histoquímica. Esses autores encontraram uma frequência de expressão em 46 casos (58 %), com uma correlação significativa para o carcinoma de subtipo histológico epidermóide. Assim como Yi e colegas, Hilbe de forma semelhante encontrou uma probabilidade de sobrevida significativamente menor nos pacientes que

apresentavam um aumento da expressão da erbB3. Porém, na análise univariada, não encontraram uma diferença estatisticamente significativa em relação a todos os parâmetros testados, obtendo significância somente quando agrupados. Outro dado relevante, e pela primeira vez relatado na literatura, foi de que a expressão do Ki67, estava relacionada com a expressão do erbB3, sugerindo um tipo tumoral mais agressivo.<sup>72</sup>

Embora não tenha sido possível correlacionar a presença da expressão da proteína erbB3 com o prognóstico e as outras variáveis clínicas, provavelmente devido ao pequeno número de amostras investigadas neste estudo, foi possível observar a presença desta proteína em 86,4% das amostras estudadas, comprovando que, assim como o EGFR e o erbB2, o erbB3 pode ser encontrado no NSCLC e de forma bastante pronunciada. É possível que informações relativas à expressão dos outros membros desta família, nestas mesmas amostras, possam trazer novas interpretações, lembrando novamente, que seus membros já são consagrados como proteínas de perfil maligno na oncogênese e atuam de forma sinérgica.

Nesse sentido, Holbro e colaboradores sugerem que o erbB3 estaria freqüentemente relacionado com a expressão do erbB2 e, de forma dependente, o erbB2 necessitaria da presença do erbB3 para fazer a sinalização. O ponto alto do estudo de Holbro foi que, ao bloquearem a expressão do erbB3 em tumores de mama, puderam impedir a sinalização de erbB2 que estava super-expresso. Por fim, esses investigadores sugerem a possibilidade do desenvolvimento, para tumores de mama que possuem uma super-expressão de erbB2/erbB3, de um bloqueio específico do erbB3 visando diminuir o sinal de proliferação celular,

conferindo ao erbB3 uma importante repercussão clínica, e uma futura possibilidade de exercer o papel de marcador de diagnóstico, juntamente com os outros membros, EGFR e erbB2.<sup>73</sup>

Semelhante a esses achados, Krähn e colaboradores, analisando o padrão de expressão de todos os membros da família erbB, encontraram no câncer de pele não melanoma, a presença do erbB3, seja como heterodímero (erbB2/erbB3) ou heterotrímero (erbB1/erbB2/erbB3), estando ausentes nas amostras de tecido normal de pele. Assim, esses autores sugerem que o erbB3 possa, futuramente, distinguir as lesões de pele malignas das benignas. Ainda, semelhante ao ocorrido no presente estudo, Krähn e colegas, por razões de tamanho amostral não puderam confirmar esses dados.<sup>74</sup>

De forma semelhante a Krähn, na presente investigação foi utilizado amostras de tecido não tumoral de pulmão com doença inflamatória, como forma de verificar a expressão do erbB3 em tecido não tumoral. Igualmente não foi observada a expressão dessa proteína nas células pulmonares, mas sim em macrófagos e células alveolares, como descrito no Atlas de Proteínas Humanas (*HPA= Human Protein Atlas*).<sup>75</sup>

Assim, pelo fato de não ter sido avaliada a expressão do erbB2 e erbB1, não se pode descartar a possibilidade da expressão do erbB3 detectada nesse estudo esteja implicada com uma baixa frequência de expressão dos outros membros da família. Essa possibilidade poderia explicar a maior sobrevida nas amostras que possuíam uma maior frequência de expressão da proteína erbB3, provavelmente decorrente da ausência de heterodímeros ou heterotrímeros.

Com relação aos achados relacionados aos subtipos histológicos e gênero, segundo a OMS, existe uma proporção maior de carcinoma epidermóide em homens, próximo a 44% enquanto que para os adenocarcinomas o percentual seria de 28%. Esses dados são provenientes de um estudo realizado nos cinco continentes e refletem as diferenças nos perfis histológicos existentes, fortemente influenciados pela evolução da epidemia do câncer de pulmão relacionada ao uso do cigarro.<sup>76</sup>

No presente estudo, não houve uma disparidade na proporção entre homens e mulheres com relação aos dois tipos histológicos citados pela OMS e, portanto, não foi possível confirmar esta característica neste estudo.

Iyengar e colaboradores, em sua revisão a respeito da relevância clínica de marcadores moleculares no câncer de pulmão, abordaram a dificuldade existente na diferenciação histopatológica dos tumores pouco diferenciados. Esses autores também mostraram que tanto o erbB1 como o erbB2 permanecem com dados controversos não tendo ainda valor prognóstico.<sup>77</sup>

Recentemente, Engelman e colaboradores, avaliando a resposta relacionada ao tratamento com Gefitinibe, encontraram uma importante resistência em linhagens celulares de cânceres de pulmão à essa droga, indicando para a sinalização exercida pelo erbB3 (PI3K/Akt), uma das razões para essa forma de resistência. Na realidade, esses autores sugeriram que o erbB3 quando presente, estimulado pelo proto-oncogene *MET*, mesmo com o bloqueio do Gefitinibe ao erbB1, a sinalização através da via do PI3k/Akt, exercida pelo erbB3, acaba desequilibrando o sinal, impedindo o sucesso no tratamento. Ainda, sugerem a necessidade da continuidade da pesquisa sobre esses mecanismos

como uma forma de ampliar o conhecimento dos mecanismos de resistência nos tratamentos com alvos direcionados.<sup>78</sup>

Koutsopoulos e colaboradores, em detrimento das especulações feitas em relação à importância da pesquisa que envolve a proteína erbB3, descreveram importantes demonstrações que confirmam o relevante papel dessa proteína na carcinogênese. O diferencial, em relação ao presente estudo, foi que além do tamanho amostral estudado (n= 209), possuíam um grande número de tumores em estádios mais avançados como o IIIB (28,2%) e IV (50,7%). Outra divergência foi em relação à baixa frequência de expressão da proteína erbB3, presente somente em 6,5% dos casos. Igualmente, não encontraram uma relação entre a presença da proteína erbB3 e idade, gênero, subtipo de tumor, diferenciação e estágio clínico. Relatando ainda, surpreendentemente, a detecção de uma marcação nuclear em muitas amostras. Por outro lado, encontraram uma diminuição estatisticamente significativa na sobrevida quando o erbB3 estava super-expresso, diferindo dos dados obtidos na presente investigação.<sup>79</sup>

Alguns aspectos avaliados no estudo de Koutsopoulos e colegas, ainda diferem dos nossos resultados, principalmente em relação à frequência de expressão encontrada para a proteína erbB3, bem como a ausência de expressão nuclear. Também contradizem os relatos previamente descritos por Yi e colaboradores, os quais avaliaram uma população em estágio avançado. Koutsopoulos e colegas apontam para a falta de padronização nas técnicas empregadas pelos diferentes grupos de investigação a causa dessa possível divergência.

Diversos estudos sugerem que a presença do erbB3 está relacionada com um desfecho de um pior prognóstico, em razão da sua presença desestabilizar o bloqueio direcionado. A razão para isso é o potencial de sinalização do erbB3 na ativação da via PI3K/Akt. Assim, muitos autores permanecem na busca do real papel dessa proteína na carcinogênese e suas implicações com o prognóstico e tratamentos.<sup>80</sup>

Nesse sentido, a grande quantidade de informações moleculares, novas possibilidades de tratamento, aliados à inexistência de padrões de resposta bem definidos sobre o papel da proteína em estudo, sensibilizam para a gravidade do tema em questão, e pretendem estimular a comunidade científica na busca de soluções com o objetivo de reduzir as taxas de mortalidade e aumentar a sobrevida do pacientes com câncer. No caso particular do câncer de pulmão, boa parte desses casos poderia ser evitada simplesmente, com melhores hábitos de vida.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que nas amostras de câncer de pulmão não-pequenas células investigadas neste estudo:

- A proteína erbB3 esteve presente em 86,4% dos casos, caracterizando uma frequência de expressão acentuada no NSCLC, com padrão predominante de marcação de membrana.
- A frequência de expressão da proteína erbB3 quando comparada com as variáveis do estudo: idade, gênero, tipo histológico, estadiamento patológico, grau histológico, óbito e sobrevida, não apresentou relação significativa, não tendo mostrado um possível valor prognóstico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. Second Edition. USA: Sinauer Associates, Inc. 2000. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=Cancer&rid=cooper.section.2603#2612>. Acesso em: 26 setembro 2007.
2. WHO. World Health Organization. Disponível em: URL: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 30 maio 2007.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.
4. Baylin SB, Gann DS, and Hsu SH. Clonal origin of inherited medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. Science. 1976;193,Issue 4250,321-323.
5. Parmigiani RB, Camargo AA. O Genoma e o Câncer. In: Ferreira CG, Rocha JC. Oncologia Molecular. Atheneu; 2004; 3-4.
6. Fialkow PJ. Clonal Origin of Human Tumors. Annu Rev Med. February 1979; Vol(30):35-143.
7. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. Respir Res. 2003 Oct; Vol(4):12,1-15.
8. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature. 1989; 339:58–61.
9. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics 2007. CA A Cancer J Clin. 2007; 57:43-66.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da Incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2006.
11. IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: URL: <http://www-dep.iarc.fr/>. Acesso em: 30 maio 2007.
12. National Center for Health Statistics. Mortality Data, Multiple Cause-of-Death Public-Use Data Files. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 2005. Disponível em: URL: [www.cdc.gov/nchs/products/elec\\_prods/subject/mortmcd.htm#content](http://www.cdc.gov/nchs/products/elec_prods/subject/mortmcd.htm#content). Acesso em: 05 outubro 2007.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Annual Smoking-Attributable Mortality, Years of Potencial Life Lost, and Productivity Losses – United States, 1997-2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005; 54(25):625-628.

14. Brasil.Ministério da Saúde e Instituto Nacional do Câncer. A Situação do Câncer no Brasil, Tabagismo. MS/SVS/INCA. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/causalidade\\_tabagismo.pdf](http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/causalidade_tabagismo.pdf)  
Acesso em: 14 novembro 2007.
15. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The New World Health Organization. Classification of Lung Tumours. *Eur Respir J.* 2001; 18:1059-1068.
16. Zöchbauer-Müller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Annual Rev Physiol.* 2002; 64:681-708.
17. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. WHO Classification of Tumours and IARC. Clinical features and staging. Pag:16-19. Lyon 2004.
18. Spira A, Ettinger D. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350:349-392.
19. Harkness EF, Brewster DH, Kerr KM, Fergusson RJ, MacFarlane GJ. Changing trends in incidence of lung cancer by histologic type in Scotland. *Int J Cancer.* 2002; 102(2):179-83.
20. Franceschi S, and Bidoli E. The epidemiology of lung cancer. *Ann Oncol,* 1999; 10 Suppl (5):S3-6.
21. Watanabe Y. TNM Classification for Lung Cancer. *Ann Thorac. Cardiovasc Surg.* 2003; Vol.9 (6)343-350.
22. UICC. TNM Classification of Malignant Tomours, 5th and 6th eds. Geneva: UICC, 1997 and 2002.
23. Mountain CF.Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest.* 1997; 111:1710-7.
24. Grondin SC, Liptay MJ. Current concepts in the staging of non-small lung cancer. *Surg Oncol.* 2002; 11:181–190.
25. Brundage M.D, Davies D, Mackillop W.J. Prognostic Factors in Non-Small Cell Lung Cancer – A Decade of Progress. *Chest.* 2002; 122:1037-1057.
26. Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2001; (34):S53-S58.
27. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Characteristics of long-term survivors of untreated lung cancer. *Lung Cancer.* 2001; (36):277-282.

28. Gugger M, Kappeler A, Vonlanthen S, Altermatt, H.J, Ris H.B, Lardinois D, et al. Alterations of cell cycle regulators are less frequent in advanced non-small cell lung cancer than in resectable tumours. *Lung Cancer*. 2001; (33):229-239.
29. Silvestri G, Pritchard R, Welch HG. Preferences for chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: descriptive study based on scripted interviews. *BMJ*. 1998; 317:771-5.
30. Hirsh FR, Fischer JR, Niklinski J, Zöchbauer-Müller S. Future developments in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 38:S81-S85.5,6
31. Herbst SR, Fukuoka M, Baselga J. Gefitinib, A Novel Targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec; Vol(4)12:956-65.
32. Weiner LM. Building better magic bullets – improving unconjugated monoclonal antibody therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Set; Vol(7)9:701-6.
33. Panani A.D, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett*. 2006; 239:1-9.
34. MacDonald C, Michael A, Colston K, Mansi J. Heterogeneity of immunostaining for tumor markers in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*. 2003; (40):461-466.
35. Menendez JA, Lupu R. Transphosphorylation of kinase-dead HER3 and breast cancer progression: a new standpoint or an old concept revisited? *Breast Cancer Res*. 2007; (9)5:111.
36. Hunter T. and Plowman GD. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*. 1997 Jan; 22(1):18-22.
37. Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 2000; 287(5461):2204-15.
38. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb; 409(6822):860-921. Erratum in: *Nature* 2001 Aug 2;412(6846):565. *Nature* 2001 Jun 7;411(6838):720. Szustakowki, J [corrected to Szustakowski, J].
39. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb; 291(5507):1304-51. Erratum in: *Science* 2001 Jun 5;292(5523):1838.

40. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 2002 Oct; 27(10): 514-20.
41. Hunter T and Seftom BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980 Mar; 77(3):1311–1315.
42. Bafico A and Aaronson AS. Cancer Biology: Growth Factors and Signal Transduction in Cancer. In: Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J, III Frei E. *Cancer Medicine*. Sixth Ed. Canada: BC Decker, 2003. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=Tyrosine%20Kinase,Growth%20Factor%20Receptors,Activity&rid=cmed6.section.1059>. Acesso em: 06 junho 2006.
43. Dy K.G, Adjei A.A. Novel Targets for Lung Cancer Therapy: Part I. *JCO.* 2002; 20(12): 2881-94.
44. Green MR. Targeting Targeted Therapy. *N Engl J Med* 2004; 350(21): 2191-3.
45. Hamid O. Emerging Treatments in Oncology: Focus on Tyrosine Kinase (erbB) Receptors Inhibitors. *J Am Pharm Assoc.* 2004; 44(1):52-58.
46. O-charoenrat P, Rhys-Evans H.P, Modjtahedi H, Eccles A.S. The role c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2002; 38:627-640.
47. Soler RP. HER1/EGFR Targeting: Refining the Strategy. *Oncologist.* 2004; 9: 58-67.
48. Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat.* 1995; 35(1): 115-32.
49. Ciardiello F, Kim N, Saeki T, Dono R, Persico MG, Plowman GD, et al. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(17):7792-6.
50. Krahn G, Greulich KM, Bezold G, Dieterle C, Wolff H, Peter RU. Receptor tyrosine kinase and p16/CDKN2 expression in a case of tripe palms associated with non-small-cell lung cancer. *Dermatology.* 1999; 199(4):290-5.
51. Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene.* 1999 Jan; 18(2):305-14.

52. Srinivasan R, Leverton KE, Sheldon H, Hurst HC, Sarraf C, Gullick WJ. Intracellular expression of the truncated extracellular domain of c-erbB-3/HER3. *Cell Signal*. 2001 May; 13(5):321-30.
53. Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol*. 2001; 12(1):S9-13.
54. Czerwenka KF, Manavi M, Hosmann J, Jelincic D, Pischinger KI, Battistutti WB et al. Comparative analysis of two-dimensional protein patterns in malignant and normal human breast tissue. *Cancer Detect Prev*. 2001; 25(3): 268-79.
55. Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascón P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 532:253-68.
56. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003 Feb; 421(6924): 756-60.
57. Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H, et al. Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Mol Cancer Ther*. 2004 Apr; 3(4):465-72.
58. Rowinsky EK. Signal Events: cell signal transduction and its inhibition in cancer. *Oncologist*. 2003; 8(3):5-17.
59. Carpes OLF. Avaliação da expressão de marcadores biológicos em carcinoma epidermóide de cavidade oral e sua relação com achados clínicos e patológicos. Porto Alegre, 2003. 11p. Tese de Doutorado em Clínica Médica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
60. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul; 7(7):505-516.
61. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/ epidermal growth factor receptor family: Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumours. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Dec; 86(23):9193-9197.
62. Cho S, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER-3 reveals an interdomain tether. *Science*. 2002; 297:1330-1333.
63. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Aug; 91(17):8132-8136.

64. Rubin I and Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001; 12,Sup1, 3-8.
65. Burgess AW, Cho H, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, et al. An Open-and-Shut Case? Recent Insight into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Molecular Cell.* 2003 Sep; 12(3):541-552.
66. Berger MB, Mendrola JM, Lemmon MA. ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett.* 2004; 569:332-336.
67. Rowinsky EK. The ERBB FAMILY: Targets for therapeutic Development Against Cancer and Therapeutic Strategies Using Monoclonal Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors. *Ann Rev Med* 2004; 55:433-457.
68. Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Ménard S. Role of HER Receptors Family in Development and Differentiation. *J Cell Physiol.* 2004; 200:343-350.
69. Chen X, Yeung TK, Wang Z. Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Nov; 277(3),757-763.
70. Engelman J.A, Cantley L.C. The Role of the ErbB Family Members in Non-Small Cell Lung Cancer Sensitive to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 Supl.14.
71. Yi ES, Harclerode D, Gondo M, Stephenson M, Brown RW, Younes M, Cagle PT. High c-erbB-3 protein expression is associated with shorter survival in advanced non-small cell lung carcinomas. *Mod Pathol.* 1997 Feb;10(2):142-8.
72. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Eisterer W, Ammann K, Schmid T, et al. Immunohistochemical typing of non-small cell lung cancer on cryostat sections: correlation with clinical parameters and prognosis. *J Clin Pathol.* 2003; 56:736-741.
73. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas III CF, Hynes N. The ErbB2/ ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jul; 100(15):8933-8938.
74. Krähn G, Leiter U, Kaskel P, Udart M, Utikal J, Bezold G, et al. Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer. *Eur J Cancer.* 2001; (37):251-259.
75. Human Protein Atlas: Disponível em: URL: <http://www.proteinatlas.org/>. Acesso em: 4 março 2007.

76. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer Incidence in Five Continents. IARC Scientific Publication. 2002; Vol.VIII, 155.
77. Iyengar P, Tsao MS. Clinical relevance of molecular markers in lung cancer. *Surg Oncol*. 2002 Dec; 11(4):167-179.
78. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science*. 2007 May; 316(5827):1039-1043.
79. Koutsopoulos AV, Mavroudis D, Dambaki KI, Souglakos J, Tzortzaki EG, Drositis J, et al. Simultaneous expression of c-erbB-1, c-erbB-2, c-erbB-3 and c-erbB-4 receptors in non-small-cell lung carcinomas: Correlation with clinical outcome. *Lung Cancer*. 2007 Aug; 57(2):193-200.
80. Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*. 2007 Jan; 445(7126): 437-441.

## 8. ANEXOS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS

Ofício 912/06-CEP

Porto Alegre, 11 de agosto de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03244, intitulado: **"Análise da expressão da proteína C-erbB-3 em câncer de pulmão pela técnica de imunohistoquímica e sua correlação com características clínico-patológicas"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dr(a) Denise Cantarelli Machado 93178231  
N/Universidade



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA



361/04-PG

Porto Alegre, 22 de outubro de 2004.

Ao Pós-Graduando  
Vinícius Schenk Michaelsen  
N/Faculdade

Prezado Pós-Graduando:

Comunicamos que a proposta de tese intitulada "Expressão da proteína erbB-3 em câncer de pulmão pela técnica de imunohistoquímica" foi **aprovada** pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Informamos que a mesma deve ser encaminhada ao comitê de Ética em Pesquisa, através do CINAPE, 2º andar do HSL, ramal 2687. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Carlos Cezar Fritscher  
Coordenador Geral dos Cursos de  
Pós-Graduação em Medicina

C/c: **Profa. Dr. Denise Cantarelli Machado**