

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA CHRISTINA DE OLIVEIRA DIAS

TESE DE DOUTORADO
EXPRESSÃO DOS GENES COX-2 E HER-3 EM CÂNCER DE PULMÃO
POR PCR EM TEMPO REAL

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 DOS GENES COX-2 E HER-3 EM
CÂNCER DE PULMÃO POR PCR EM TEMPO
REAL***

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 parte dos requisitos para obtenção do grau de DOUTOR.

ANA CHRISTINA DE OLIVEIRA DIAS

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, PhD
Orientadora

Porto Alegre, dezembro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

D541e Dias, Ana Christina de Oliveira
Expressão dos genes COX-2 e HER-3 em câncer de pulmão por
PCR em tempo real / Ana Christina de Oliveira Dias. Porto Alegre:
PUCRS, 2008.

70 f.: il. gráf. tab.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

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. NEOPLASIAS PULMONARES/cirurgia. 2. CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS. 3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 4. CICLOOXIGENASE-2. 5. PROTEÍNAS ONCOGÊNICAS. 6. ADULTO. 7. HUMANOS. 8. ESTUDOS PROSPECTIVOS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

ANA CHRISTINA DE OLIVEIRA DIAS

EXPRESSÃO DOS GENES COX-2 E HER-3 EM CÂNCER DE PULMÃO POR
PCR EM TEMPO REAL

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 parte dos requisitos para obtenção do grau de DOUTOR.

Aprovada em ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ana Cristina Arámburu

Profa. Dra. Daniela Cavalet Blanco

Profa. Dra. Florência Barbé Tuana

Prof. Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido e a minha filha

– Daniel e Isabela –

vocês são a expressão da minha felicidade.

Amo vocês com todo meu coração e toda a minha alma.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, por te me dado a oportunidade de percorrer novos caminhos. Pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos turbulentos pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse. Pela satisfação de trabalharmos juntas.

Ao Dr. Marner Lopes da Silveira, pela disponibilidade irrestrita. Pelo seu interesse, sua forma exigente, crítica e criativa de discutir as idéias apresentadas. Creio que deram norte a este trabalho. A ti, minha admiração e gratidão por tudo.

Ao Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital São Lucas da PUCRS, pela disponibilidade e comprometimento em fornecer as amostras.

À CAPES pelo apoio da bolsa concedida.

À Direção do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde pela oportunidade.

À Ana Paula Constantin, pela disponibilidade e incansável tarefa de coletar e organizar nossas amostras.

À minha grande amiga Dra. Jocelei Maria Chies, que em sua imensa generosidade presenteou-me com grande parte dos reagentes para esta pesquisa. Orgulho-me muito de ter sido merecedora de tão grande confiança, apoio e amizade. Agradeço acima de tudo pela preocupação e carinho maternal.

Aos amigos do IPB, em especial a Silvana Alves, Christian Viezzer e Gustavo Barbosa, pelo apoio constante no laboratório.

Ao Dr. Vinícius Michaelson, companheiro de caminhada, obrigada pelo incentivo e bom humor de sempre.

Ao amigo Prof. Dr. Paulo Márcio Pitrez, pela grande amizade, por seu exemplo de liderança, chefia, dedicação médica e busca incessante por novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos por manter as portas de seu laboratório sempre abertas ao nosso grupo.

Ao Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior, pela disponibilidade em prestar esclarecimentos sobre a técnica utilizada neste estudo.

À minha super amiga Gabriela Devenz, pela amizade incondicional, pela confiança, pelo apoio não só nesse momento, mas em muitos da minha vida. Jamais me esquecerei disso.

À Corina, por ter sido meus olhos e minhas mãos nos últimos três anos. Obrigada pela dedicação com a Isabela, tratando dela como se fosse eu (tenho certeza disso!). Obrigada por tudo!

Aos meus pais, que mesmo distantes estiveram sempre presentes no pensamento. Esse é o fruto da semente que vocês plantaram.

Aos meus sogros Elias e Júlia, fontes inesgotáveis de generosidade. Vocês fizeram com que os dias mais difíceis parecessem mais fáceis. Obrigada por me tratarem como filha e por me apoiarem sempre.

À minha família, por todo apoio, carinho e amor, especialmente à Isabela e ao Daniel, por suportar pacientemente minhas horas distante da vida familiar. No entanto, são vocês mesmo as razões disto tudo, e é a vocês que ofereço a minha tese.

**“Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a
vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
e que valeu a pena.”**

Mário Quintana

RESUMO

O câncer de pulmão é o mais comum entre os tumores malignos, apresentando um aumento de 2% na sua incidência anual mundial. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 14.715 óbitos em 2000 e as estimativas de incidência de câncer de pulmão em 2008 deverá atingir 27.270 pessoas (17.810 homens e 9.460 mulheres). Este estudo analisa quantitativamente, pela técnica da PCR em tempo real, a expressão de dois importantes genes: a cicloxigenase-2 (*COX-2*) uma enzima regulatória chave na produção de prostaglandina e a oncoproteína *HER-3* que parece estar associada com transformações neoplásicas. Para avaliar se há relação com os achados clínicos de pacientes submetidos à cirurgia de ressecção por câncer de pulmão, foram obtidas 16 amostras de tecido tumoral e tecido normal de pacientes com indicação de ressecção por câncer de pulmão não-pequenas células (NSCLC). Empregou-se a técnica da PCR quantitativa baseado na química LUX (Light Upon Extension). Além dos dois genes de interesse foi avaliada também a expressão do gene da β -actina como controle endógeno. A idade dos pacientes variou entre 40 e 73 anos (média de 62 anos). Quanto ao gênero 68,8% dos pacientes eram do sexo masculino e 31,2% do sexo feminino. Em relação ao estadiamento, 81,3% dos pacientes apresentavam doença local (IA-IIIB) e 18,7% doença avançada (IIIA-IV), sendo que 75% dos 16 tumores era carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma e 25% de outros tipos. Uma maior expressão de *COX-2* nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais foi verificada em 11 (68,5%) pacientes. Da mesma forma, *HER-3* apresentou maior expressão em 13 (81,3%) pacientes. A razão entre o tecido tumoral e o tecido normal $<0,6$, foi usada para definir a superexpressão das proteínas estudadas. Segundo este critério, encontramos *COX-2* e *HER-3* superexpressas em dois (12,5%) e três (18,75%) dos pacientes, respectivamente, resultado este, sem significância estatística. Verificou-se uma correlação forte entre os marcadores estudados ($r^2 = 0,61$; $p = 0,01$). Foi possível observar a presença de *COX-2* e *HER-3* em 100% das amostras analisadas.

ABSTRACT

The lung cancer is the commonest among malignant tumors, showing an increase of 2% in its annual incidence worldwide. In Brazil, the lung cancer was responsible for 14,715 deaths in the year 2,000 and its incidence for the year 2008 should reach 27,270 people (17,810 men and 9,460 women). This study examines quantitatively by real time PCR, the expression of two major genes: the cyclooxygenase-2 (*COX-2*) a key regulatory enzyme in the prostaglandin production, and *HER-3* an oncoprotein that seems to be associated with neoplastic transformation, to assess whether there is a relationship between *COX-2* and *HER-3* expression and the clinical features of patients undergoing resection for lung cancer. Tumor and normal tissue were obtained from 16 patients undergoing lung resection for non-small cell lung cancer (NSCLC). We applied quantitative PCR technique based on chemical LUX (Light Upon Extension). In addition, the expression of the β -*actin* gene was also evaluated as an endogenous control. The patients age ranged between 40 and 73 years (mean 62 years). Regarding gender 68.8% of the patients were male and 31.2% female. Regarding the stage, 81.3% of patients had local disease (IA-IIIB) and 18.7% presented with advanced disease (III-IV), and 75% were epidermoid or adenocarcinoma and 25% of other types. Increased expression of *COX-2* in tumor tissues compared to normal tissue was found in 11 (68.5%) patients. Similarly, *HER-3* showed higher expression in 13 (81.3%) patients. The ratio of the tumor tissue and normal tissue <0.6 was used to define protein over expression, and according to this criteria *COX-2* and *HER-3* were super expressed in 2 (12.5%) and 3 (18.75%) patients, respectively, although this result does not have statistical significance. We also found a high correlation between gene expression ($r^2 = 0.61$, $p = 0.01$). Moreover, *COX-2* and *HER-3* genes were expressed in all samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição geográfica das taxas brutas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano 2008, segundo a Unidade da Federação21
- Figura 2. Distribuição geográfica das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2008, segundo a Unidade da Federação.....22
- Figura 3. Curva de reação da PCR em tempo real e definição de Ct (Cycle Threshold).....37
- Figura 4. Histograma do número e a idade dos pacientes das amostras analisadas45
- Figura 5. Histograma do número e o gênero dos pacientes das amostras analisadas46
- Figura 6. Histograma do número de pacientes e tipo histológico dos tumores analisados.....47
- Figura 7. Histograma do número de pacientes e o estadiamento dos tumores analisados.....48
- Figura 8. Diagrama de dispersão da razão da expressão de *COX-2* e *HER-3* das amostras analisadas neste estudo49
- Figura 9. Histograma da expressão do gene *COX-2* no tecido tumoral (t) e no tecido normal (n), nas 16 amostras analisadas neste estudo50
- Figura 10. Histograma da expressão do gene *HER-3* no tecido tumoral (t) e no tecido normal (n), nas 16 amostras analisadas neste estudo.....51
- Figura 11. Histograma da expressão das proteínas *COX-2* e *HER-3* em função da razão entre o tecido tumoral/ tecido normal, das amostras analisadas neste estudo52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas de novos casos de câncer para o ano de 2008	20
Tabela 2. Características do tumor primário (T), comprometimento dos linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M)	26
Tabela 3. Estadiamento dos tumores malignos. Classificação TNM	27
Tabela 4. Principais marcadores moleculares encontrados no câncer de pulmão e suas funções.....	28
Tabela 5. Freqüências dos marcadores moleculares no câncer de pulmão..	29
Tabela 6. Seqüência dos iniciadores do genes <i>COX-2</i> , <i>HER-3</i> e <i>β-actina</i> utilizados neste estudo.....	42
Tabela 7. Sub-tipos histológicos e freqüência dos tumores analisados neste estudo	47
Tabela 8. Freqüência por estadiamento das amostras investigadas neste estudo	48
Tabela 9. Freqüência de expressão dos genes <i>COX-2</i> e <i>HER-3</i> e as diferentes variáveis estudadas	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	do inglês, <i>American Cancer Society</i> .
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais.
cDNA	do inglês, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como, ácido desoxirribonucléico complementar.
CEA	do inglês, <i>Carcinoembryonic antigen</i> , traduzido como, antígeno carcinoembrionário
Chr A	do inglês, <i>chromogranin A</i> , traduzido como, cromogranina A.
COX-2	do inglês, <i>cyclooxygenase-2</i> , traduzido como, cicloxigenase-2.
CPK-BB	do inglês, <i>creatine phosphokinase isoenzyme</i> , traduzido como, creatina fosfoquinase BB.
Ct	do inglês, <i>Cycle Threshold</i> .
CYFRA21.1	do inglês, <i>Serum fragment of cytokeratin</i> , traduzido como, fragmento de citoqueratina.
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como, ácido desoxirribonucléico.
dNTPs	do inglês, <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> , traduzido como, desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> , traduzido como, ácido etilendiamino tetra-acético.
EGFR	do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i> , traduzido como, receptor do fator de crescimento epidérmico.
FAM	Fluorescência 6-carboxifluoresceína
HER-3	do inglês, <i>Human epidermal growth factor receptor-3</i> , traduzido como, receptor do fator de crescimento epitelial-3.
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LUX	do inglês, <i>Light Upon Extension</i> .
µL	microlitro

M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mRNA	do inglês, <i>messenger ribonucleic acid</i> , traduzido como, ácido ribonucléico mensageiro.
NCAM	do inglês, <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> , traduzido como, molécula de adesão celular neural .
ng	nanogramas
NSCLC	do inglês, <i>Non Small Cell Lung Cancer</i> , traduzido como, Câncer de Pulmão de não-Pequeñas Células.
NSE	do inglês, <i>neuron-specific enolase</i> , traduzido como, enolase neuro-específica.
PCR	do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> , traduzido como, Reação em cadeia da polimerase.
PEG2	Prostagladina 2.
pH	Potencial hidrogeniônico
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
r ²	Coeficiente de correlação.
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic acid</i> , traduzido como, ácido ribonucléico.
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	do inglês, <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> , traduzido como, Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa.
SSC	do inglês, <i>squamous cell carcinoma</i> , traduzido como carcinoma de células escamosas.
SCC-Ag	do inglês, <i>squamous cell carcinoma antigen</i> , traduzido como, antígeno do carcinoma de células escamosas.
SCLC	do inglês, <i>small cell lung cancer</i> , traduzido como, Câncer de Pulmão Pequenas Células.
sIL-2R	do inglês, <i>soluble interleukin 2 receptors</i> , traduzido como, receptor de interleucina solúvel-2.

TK	do inglês, <i>tyrosine kinase</i> , traduzido como, tirosina quinase.
TNF	do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i> , traduzido como, fator de necrose tumoral.
TPA	do inglês, <i>tissue polipeptidic antigen</i> , traduzido como, antígeno polipeptídico tecidual.
U	Unidade.
IUAC	do inglês, <i>International Union Against Cancer</i> , traduzido como, União Internacional de Controle do Câncer (UACC).
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i> , traduzido como, Organização Mundial da Saúde.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia do Câncer de Pulmão.....	19
1.2 Câncer de Pulmão	23
1.3 Estadiamento do Câncer	25
1.4 Alterações Moleculares no Câncer de Pulmão	27
1.4.1 Cicloxigenase-2 (COX-2)	30
1.4.2 Oncoproteína HER-3.....	33
1.5 PCR em tempo real	34
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 População e amostras do estudo.....	39
3.2 Extração de RNA total.....	39
3.3 Síntese de DNA complementar	40
3.4 PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão dos genes <i>COX-2</i> e <i>HER-3</i>	41
3.5 Análise Estatística.....	43
3.6 Aspectos Éticos e Administrativos.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Características dos pacientes	45
4.2 Expressão dos genes <i>COX-2</i> e <i>HER-3</i>	49
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônica e degenerativa de etiologia multifatorial onde fatores ambientais, como os raios UV e o consumo de tabaco e álcool, têm seus efeitos carcinogênicos comprovados. Entretanto, muitos fatores genéticos e epigenéticos estão envolvidos no processo de forma complexa e dinâmica. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer 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.¹

Ainda de forma geral, todos os cânceres se relacionam com o mau funcionamento dos genes responsáveis pelo controle do crescimento e divisão celular e estima-se que aproximadamente 5% de todos os cânceres possuam um forte componente hereditário, sendo o restante causado principalmente por mutações gênicas que são adquiridas durante a vida.²

A presença de alterações em oncogenes, proto-oncogenes, fatores de crescimento, proteínas de regulação do ciclo celular, supressoras tumorais³ e angiogênicas⁴, são alguns exemplos de genes e suas alterações envolvidas no processo neoplásico.

Considerando a complexidade dos eventos que regulam o ciclo celular – metabolismo do DNA, mitose, segregação dos cromossomos – percebe-se que muitos genes importantes podem estar envolvidos neste processo atuando em um mecanismo de interação complexa. Podemos apontar genes como o p53, p21

(envolvidos no controle do ciclo celular e recombinação gênica), a família dos genes bcl-2 (reguladores da apoptose) e o p16 (*"ponto de verificação na mitose"*). Uma cascata de eventos que ativam sinais bioquímicos em cadeia resulta na ativação ou repressão de diversos coordenadores do ciclo, divisão e diferenciação celular, através de fatores de crescimento e seus receptores, citocinas, fatores de transcrição e enzimas de controle de replicação de DNA.⁵

O aumento dos conhecimentos básicos nessa área ocorreu em proporção geométrica a partir da década de oitenta. Mesmo assim, a aplicação prática na clínica diária se restringe praticamente ao diagnóstico diferencial de lesões com histologia dúbia (através da imuno-histoquímica) e de seguimento de lesões previamente diagnosticadas por outros métodos (através dos marcadores tumorais). Embora recentemente, os microarranjos de DNA tenham trazido novas esperanças para a aplicação clínica da biologia molecular.

Muitos dados disponíveis na literatura relacionam alterações em diversas proteínas, no entanto ainda não existem resultados conclusivos com relação aos marcadores, ou a combinação de marcadores para a identificação, classificação, prognóstico e acompanhamento pós-cirúrgico ou pós-quimioterapia ou radioterapia desses tumores. Assim, propõe-se a análise quantitativa de algumas proteínas envolvidas nos processos de apoptose e no controle e regulação do ciclo celular, numa tentativa de avaliar a possível relação de seus níveis de expressão com o desfecho observado para cada paciente. Igualmente, propõe-se avaliar seu emprego na determinação dos diferentes graus de diferenciação

maligna, definindo seu valor prognóstico e fornecendo indicações para um melhor acompanhamento pós-cirúrgico e/ou pós-tratamento.

A combinação de todos os fatores envolvidos no câncer de pulmão, como a alta incidência, alta mortalidade, alto custo dos tratamentos e o impacto no trabalho e na qualidade de vida dos cidadãos é o argumento que sinaliza para a relevância do tema em estudo.

1.1 Epidemiologia do Câncer de Pulmão

Ao longo do século XX, as neoplasias configuraram-se como um dos mais importantes problemas de saúde no mundo. Em 2002 havia 24,6 milhões de pessoas vivendo com câncer no mundo e, no mesmo ano, surgiram 10,9 milhões de casos novos da doença. Para os próximos anos, a expectativa é de um aumento na incidência das neoplasias, chegando-se ao surgimento de 16 milhões de novos casos em 2020.⁶ O número de óbitos decorrentes de neoplasias também é elevado. De um total de 58 milhões de mortes ocorridas em 2005, 7,6 milhões (13%) foram devido ao câncer, sendo que mais de 70% dos óbitos ocorreram em países de média e baixa renda⁷. No Brasil, as neoplasias respondem pela segunda causa de morte desde 2000 e, para o ano de 2008, espera-se o surgimento de 242 mil novos casos de câncer em todo o país, conforme observado Tabela 1.

O câncer de pulmão é o mais comum entre todos os tumores malignos, apresentando um aumento de 2% na sua incidência anual mundial. Em 90% dos casos diagnosticados encontra-se uma associação com o consumo de derivados de tabaco. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 14.715 óbitos em 2000, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas.⁸

Tabela 1. Estimativas de novos casos de câncer para o ano de 2008.⁸

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Mama Feminina	1.210	7.630	2.630	9.500	28.430
Traquéia, Brônquio e Pulmão	1.020	3.630	1.690	7.210	13.720
Estômago	1.200	3.840	1.250	4.360	11.150
Próstata	1.750	9.820	3.200	9.500	25.260
Colo do Útero	1.700	4.720	1.350	3.470	7.440
Cólon e Reto	550	2.680	1.430	5.950	16.380
Esôfago	230	1.360	560	3.110	5.290
Leucemias	530	1.900	650	1.820	4.640
Cavidade Oral	400	2.500	750	2.500	8.010
Pele Melanoma	150	450	250	1.950	3.120
Outras Localizações	4.550	14.190	7.260	27.270	64.610
Subtotal	13.290	52.720	21.020	76.640	188.050
Pele não Melanoma	4.330	26.240	7.490	22.940	54.010
TOTAL	17.620	78.960	28.510	99.580	242.060

Fonte: INCA, 2008. <http://www.inca.com.br>. Acesso em 10/2008

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Este tipo de câncer está entre os mais freqüentes tipos de neoplasias, tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento. Apenas no ano 2000, surgiram aproximadamente 1,2 milhões de casos novos no mundo, sendo 75% em homens.⁹ No mesmo ano, cerca de 1 milhão de pessoas morreram por câncer de pulmão. De todos esses óbitos, 45% ocorreram em países menos desenvolvidos.¹⁰

O Instituto Nacional do Câncer estimou, para o Brasil, o surgimento de 27.270 novos casos de câncer de pulmão, sendo 17.810 entre os homens e 9.460 entre as mulheres em 2008. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19 novos casos a cada 100 mil homens e 10 novos casos a cada 100 mil mulheres. No Rio Grande do Sul são esperados 2.770 novos casos em homens e 1.220 novos casos em mulheres para este mesmo ano.⁸

As Figuras 1 e 2 apresentam as estimativas de novos casos de câncer de pulmão em homens e mulheres no Brasil, para o ano de 2008, sendo que o Rio Grande do Sul tem uma taxa estimada de até 50,46 casos para cada 100.000 homens e 21,42 casos para cada 100.000 mulheres.⁸

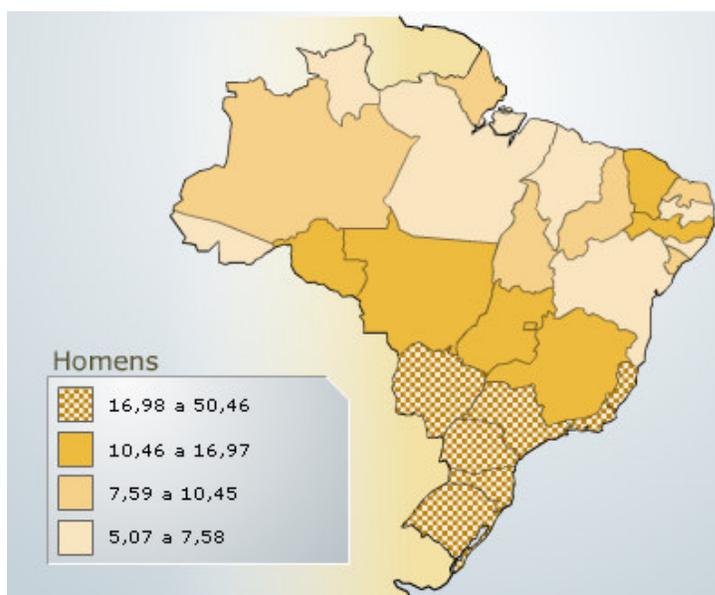


Figura 1 – Distribuição geográfica das taxas brutas de incidência por 100.000 homens estimadas para o ano 2008, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da traquéia, dos brônquios e dos pulmões). Fonte: INCA, 2008. <http://www.inca.com.br>. Acesso em 10/2008

Além de altas taxas de incidência e de mortalidade, o câncer de pulmão apresenta elevada letalidade. A taxa de sobrevivência de 5 anos de pacientes com câncer de pulmão varia entre 13% e 21% em países desenvolvidos e entre 7% a 10% em países em desenvolvimento⁸, com médias inferiores às taxas de sobrevivência de outras neoplasias, como o câncer de cólon, de mama e de próstata.¹¹

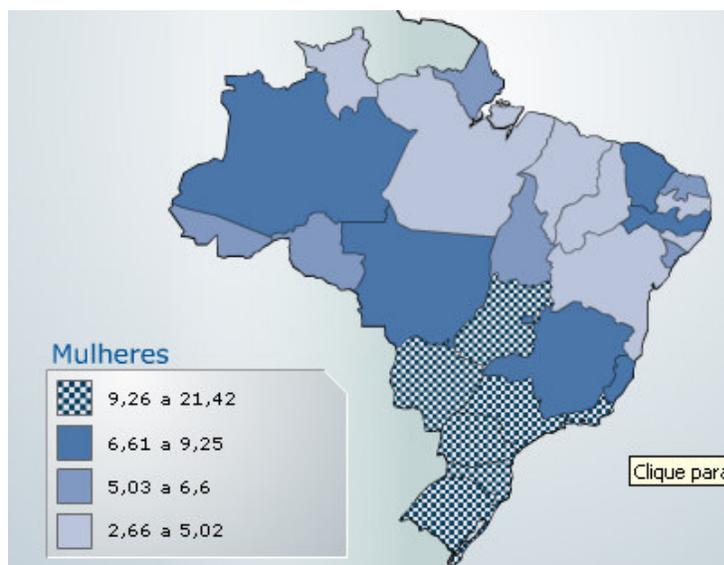


Figura 2. Distribuição geográfica das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano 2008, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da traquéia, dos brônquios e dos pulmões). Fonte: INCA, 2008. <http://www.inca.com.br>. Acesso em 10/2008

Nos Estados Unidos, dados da ACS (*American Cancer Society*) 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.

É importante ressaltar que a mortalidade por câncer de pulmão entre indivíduos fumantes é cerca de 15 vezes maior do que entre pessoas que nunca fumaram, enquanto entre os ex-fumantes é cerca de quatro vezes maior. Merece também destaque, os dados relativos aos fumantes ditos passivos, que estariam expostos a aproximadamente 4.700 substâncias, sendo que mais de 50 seriam sabidamente suspeitas de causar câncer tanto no homem quanto em animais. Outro dado relevante e de grande gravidade, é que a cada ano aproximadamente 3.000 não-fumantes adultos morrem por câncer de pulmão por terem sido fumantes passivos.¹³

1.2 Câncer de Pulmão

Histológica e clinicamente, os cânceres de pulmão são classificados em câncer de pulmão não-pequenas células (NSCLC) e câncer de pulmão de pequenas células (SCLC). O NSCLC é o mais freqüente, entre 75 a 80% de todos casos.^(14,15) Nestes pacientes o estadiamento é fundamental para estabelecer a estratégia terapêutica.

O câncer de pulmão de não-pequenas células corresponde a um grupo heterogêneo composto de 4 tipos histológicos principais e distintos: o carcinoma

epidermóide, o adenocarcinoma, o carcinoma de grandes células e os tipos mistos.

Com relação ao tratamento do 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 estádios iniciais.¹⁶

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.¹⁷ Um fato interessante é que o aumento na incidência de adenocarcinoma tem sido associado ao menor consumo de cigarro.¹⁸ Em um estudo realizado em Pelotas/RS, por Menezes¹⁹ e colaboradores, em 2000, os riscos atribuíveis ao cigarro indicaram que a eliminação total do tabagismo levaria à prevenção de 71% do câncer de pulmão, 54% do câncer de esôfago e 86% do câncer de laringe.

O câncer de pulmão vem representando um grande desafio para os oncologistas, uma vez que, apesar de todos os avanços diagnósticos e terapêuticos, a taxa de sobrevida global em cinco anos permanece inalterada em 13% ao longo das últimas décadas.¹⁴

O interesse em elucidar as prováveis diferenças existentes nos distintos grupos de câncer de pulmão não-pequenas células levou à 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 identificar indicadores prognósticos e perspectivas para a identificação de indivíduos de alto risco, bem como para a definição de parâmetros adicionais que nos auxiliem na explicação para a variabilidade na sobrevida.⁽²⁰⁻²²⁾

1.3 Estadiamento do Câncer

A necessidade de se classificar os casos de câncer em estádios baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevida são diferentes quando a doença está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros órgãos.

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela International Union Against Cancer (IUAC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos²³. Conforme descrito nas Tabelas 2 e 3, este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de TX a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente.

O estadiamento pode ser clínico e patológico. O estadiamento clínico é estabelecido a partir dos dados do exame físico e dos exames complementares pertinentes ao caso. O estadiamento patológico baseia-se nos achados cirúrgicos

e no exame anatomopatológico da peça operatória. Este último é estabelecido após o tratamento cirúrgico e determina a extensão da doença com maior precisão. O estadiamento patológico pode ou não coincidir com o estadiamento clínico e não é aplicável a todos os tumores.

A indicação terapêutica para o tratamento do câncer depende do estadiamento da doença, e um estadiamento bem conduzido leva a condutas terapêuticas corretamente aplicadas.

Tabela 2. Características do tumor primário (T), comprometimento dos linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M).

TX	Somente citologia positiva
T1	≤ 3 cm
T2	> 3cm, brônquio principal ≥2 cm da Carina, invade pleura visceral, atelectasia parcial
T3	Parede torácica, diafragma, pericárdio, pleura mediastinal, brônquio principal <2 cm da Carina, atelectasia total
T4	Mediastino, coração, grandes vasos, Carina, traquéia, esôfago, vértebra; nódulos distintos no mesmo lobo, derrame pleural maligno
N1	Peribrônquico homolateral, hilar homolateral
N2	Mediastinal homolateral, subcarinal
N3	Hilar ou mediastinal contralateral, escaleno ou supra-clavicular
M1	Inclui nódulo distinto em lobo diferente

Fonte: TNM: classificação de tumores malignos, 6ª edição – Rio de Janeiro: INCA, 2004.

Tabela 3. Estadiamento dos tumores malignos. Classificação TNM.

Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T2	N0	M0
Estádio IIA	T1	N1	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio IIIB	Qualquer T	N3	M0
	T4	Qualquer N	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: TNM: classificação de tumores malignos, 6ª edição – Rio de Janeiro: INCA, 2004.

1.4 Alterações Moleculares no Câncer de Pulmão

Várias proteínas consideradas como marcadores diagnósticos já foram estudadas em pacientes com NSCLC. Entre eles, destacamos o CEA (antígeno carcino-embrionário), o TPA (antígeno polipeptídeo tecidual), o SCC-Ag (antígeno do carcinoma de células escamosas), o Chr A (cromogranina A), a NSE (enolase neurônio-específica), o CYFRA21.1 (fragmentos de citoqueratina), a NCAM (molécula de adesão celular neural), a CPK-BB (creatina fosfoquinase BB) e o sIL-2R (receptor de interleucina solúvel-2). As principais aplicações clínicas para esses marcadores são o seu papel auxiliar no estadiamento e na avaliação prognóstica.²⁴

Substâncias presentes no tabaco podem atuar como carcinógenos ou, geralmente, pró-carcinógenos. As enzimas envolvidas na ativação e conjugação de constituintes do tabaco são o citocromo P450 (CYP1A1, CYP2E1) e enzimas como a glutathione S-transferase (GST), e as N-acetiltransferases. Vários estudos já comprovaram a associação entre o tabagismo e as alterações moleculares relacionadas ao câncer de pulmão. Na Tabela 4 estão descritos os principais marcadores moleculares encontrados no câncer de pulmão e suas respectivas funções. A Tabela 5 apresenta a frequência desses marcadores nos dois tipos de câncer de pulmão.

Tabela 4. Principais marcadores moleculares encontrados no câncer de pulmão e suas funções.²⁵

Genes de supressão tumoral	p53, Rb, p16, p21
Proto-oncogenes	K- <i>ras</i> , c- <i>myc</i> , c-erB-1 e 2, HGF, HER-2
Telomerasas	hTERT
Hipermetilação e fatores de crescimento	GRP/BN, TGF- β , FCGF, PTHrP, IGF-I e II
Apoptose e angiogênese	BCL-2, VEGF
Amplificação gênica	HER-2

Os avanços da biologia molecular permitiram demonstrar que a carcinogênese é decorrente de uma série de alterações progressivas e particulares em cada neoplasia, com grande variabilidade mesmo em tumores distintos de um mesmo paciente.

Tabela 5. Frequências dos marcadores moleculares no câncer de pulmão.²⁵

Marcador molecular	NSCLC (%)	SCLC (%)
p53	40-60	40-70
Rb	30	~ 100
p16	10-40	<1
K- <i>ras</i>	15-20	<1
<i>c-myc</i>	10	80-90
BCL-2	12-25	75-80
c-erB-2	25	<5
FHIT	40	80
Telomerasas	80-85	~ 100
GRP/BN	Raro	20-60

A seguir serão apresentadas uma breve descrição das características e funções dos genes *COX-2* e *HER-3*, que foram eleitos por nós para serem analisados neste estudo, em função da alta evidência em recentes trabalhos científicos: *COX-2* inúmeras vezes citado como alvo de tratamentos preventivos e também pela hipótese de sua alta expressão estar envolvida no aumento do risco de câncer em geral e *HER-3* por já ser uma proteína largamente estudada pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos de imunohistoquímica e agora analisada quantitativamente.

1.4.1 Cicloxigenase-2 (COX-2)

A Cicloxigenase-2 (COX-2), é uma enzima reguladora chave na produção de prostaglandina, cujos níveis apresentam-se alterados em diversos tipos de cânceres. Esta enzima aumenta os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl2, levando a resistência à apoptose e, conseqüentemente, prolongando a sobrevivência de células com DNA danificado.

A Cicloxigenase-2 foi isolada pela primeira vez por Hemler em 1976²⁶, e é um homodímero com peso molecular de 71 kD, tratando-se de um ácido graxo desidrogenase que possui um átomo de ferro formando parte do grupo heme, cofator fundamental para o funcionamento da enzima.

Duas isoformas (COX-1 e COX-2) foram clonadas, e compartilham mais de 60% dos seus aminoácidos, com atividade enzimática similar, mas diferem na sua regulação, distribuição e expressão.⁽²⁷⁻³⁰⁾ A COX-2 é a enzima responsável pela conversão do ácido aracdônico em prostanóides e pode ser induzida por vários estímulos, como hormônios, citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais.⁽³⁰⁻³³⁾

A expressão da COX-2 pode ocorrer em vários tipos celulares e tecidos especializados onde desempenha funções biológicas, tais como imunidade, fisiologia renal, reabsorção óssea e secreção pancreática. Estas funções são reguladas especificamente para cada processo e tecido envolvido.³⁴

A expressão da COX-2 é regulada por mediadores envolvidos na inflamação. Lipopolissacarídeos e citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 β , fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento) podem induzir a produção da COX-2. Glicocorticóides, interleucina-4, interleucina-13 e a citocina antiinflamatória interleucina-10 podem inibir a expressão de COX-2.⁽³⁵⁻³⁷⁾

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm relacionado à expressão da COX-2 com as neoplasias malignas. A expressão elevada da COX-2 tem sido observada em diferentes tipos de câncer. O prognóstico dessas neoplasias parece estar diretamente relacionado com a expressão da COX-2, o que nos faz acreditar em um efeito terapêutico das drogas anti-COX-2 no tratamento do câncer.^(30, 38-41)

Alguns autores, avaliando adenocarcinomas colorretais nos diferentes estágios, verificaram uma piora significativa no prognóstico daqueles pacientes com expressão elevada de COX-2 quando comparados com os indivíduos com tumores no mesmo estágio e com baixa expressão desta proteína.⁴²

Uma marcação forte a moderada da COX-2 foi observada no tecido neoplásico de pacientes com carcinoma epidermóide em comparação com o tecido normal dos mesmos pacientes, sugerindo sua possível participação da etiopatogenia do câncer epidermóide.⁴³

Da mesma forma, a superexpressão da COX-2 tem sido descrita em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão. Brabender e colaboradores (2002) analisaram por PCR em tempo real amostras de tumor de

89 pacientes com NSCLC submetidos a ressecção curativa e detectaram a expressão de COX-2 em 100% dos casos, verificando ainda uma associação entre a alta expressão desta proteína e a baixa sobrevida dos pacientes.

Estudos epidemiológicos mostram que o uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais reduz o risco de câncer de colon^(45,46) e outros estudos sugerem que o ácido acetilsalicílico pode reduzir a incidência de câncer de pulmão.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ O efeito antineoplásico dos AINEs pode estar na inibição da COX-2, provavelmente responsável por restaurar a atividade apoptótica das células neoplásicas e reduzir a mitogênese e a angiogênese tumoral. A COX-2 é altamente induzível por estímulos pró-inflamatórios, e as prostaglandinas produzidas por ela possuem papel central na cascata da inflamação.⁵⁰

Na tentativa de compreender e identificar a forma como a COX-2 atua nas neoplasias malignas, os pesquisadores encontraram uma importante correlação entre a expressão da COX-2 e a apoptose, associado ao aumento nos níveis de PGE2 à modulação de fatores anti e pró-apoptóticos, como o *Bcl2* e o *Bax*, respectivamente.^(51,52)

Sob esse ponto de vista, a tecnologia de análise do perfil de expressão gênica tem se tornado uma ferramenta importantíssima na busca de marcadores diagnósticos e determinação de potenciais alvos terapêuticos.

1.4.2 Oncoproteína HER-3

A oncoproteína HER-3 parece estar associada com transformações neoplásicas e de acordo com estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, parece estar relacionada com recidiva tumoral e a sobrevida dos pacientes com carcinoma de células escamosas (SCC) de cabeça e pescoço.⁵³

É uma proteína pertencente ao grupo da família erbB, a erbB-3 (HER-3), possui uma importante atividade de tirosina quinase.^(54,55) Em diversas investigações essa proteína tem sido apontada como um potente alvo para o tratamento do câncer de pulmão⁵⁶ bem como de outros tipos de câncer⁽⁵⁷⁻⁶⁶⁾ como a leucemia.⁶⁷

As proteínas tirosina quinases (TK), pertencem a um grande grupo de proteínas conhecidas como proteínas quinases, uma super-família⁽⁶⁸⁻⁷²⁾ de mais de 500 proteínas mapeadas e catalogadas.⁷² 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. 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. Em se tratando das tirosinas quinases, a fosforilação ocorreria então principalmente nos

resíduos de tirosina.⁷³ Por outro lado, anormalidades nesses receptores de superfície celular têm sido correlacionadas com o desenvolvimento e a progressão do câncer, baixa resposta aos agentes quimioterápicos, baixas taxas de sobrevida⁷⁴ e recidiva da doença.⁵³

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 HER-3/HER-2.^(61,75,76) Mais especificamente, o HER-3 ativa a cascata do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que está implicado na promoção da proliferação celular e da sobrevivência.⁷⁷

1.5 PCR em tempo real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma tecnologia comum, rápida e eficiente para amplificar seqüências específicas de ácidos nucléicos e, com o rápido avanço da biologia molecular, surgiu também a necessidade de quantificar o DNA amplificado.

A nova tecnologia da PCR em tempo real permite a quantificação com precisão de moléculas de DNA em um curto período de tempo, baseado no uso de uma sonda ou iniciadores fluorescentes que permitem correlacionar a intensidade do sinal coletado com a quantidade de produto amplificado. Além disso, esta nova técnica dispensa os procedimentos pós PCR, eliminando a

necessidade do uso de géis de agarose, possibilitando a visualização direta dos produtos amplificados e diminuindo o tempo de análise dos resultados. As principais vantagens desta técnica são: a amplificação e a análise do produto no mesmo tubo de reação, evitando a contaminação e, os resultados são padronizados pela quantificação de genes.

Entre os principais sistemas de detecção utilizados na PCR em tempo real estão os sistemas LUX™ (Light Upon Extension), TaqMan® e Sybr Green. No sistema LUX utiliza-se um par de oligonucleotídeos, que irá definir o alvo de amplificação, sendo que um dos oligonucleotídeos apresenta um fluoróforo ligado no terminal 3'. Este oligonucleotídeo é denominado de fluorogênico e apresenta uma pequena cauda de 4 a 6 nucleotídeos no terminal 5', que é complementar ao terminal 3' formando uma estrutura em forma de alça no próprio oligonucleotídeo que, nesta conformação, não emite fluorescência. Durante a reação de PCR esta estrutura é desfeita com o aumento da temperatura, sendo possível o anelamento dos oligonucleotídeos com a sua seqüência alvo. À medida que esta estrutura vai se tornando linear há um aumento na quantidade de fluorescência emitida. O aumento da quantidade de fluorescência emitida no decorrer dos ciclos da PCR pode ser correlacionado com o aumento da quantidade do fragmento amplificado. As principais vantagens deste tipo de detecção é a alta especificidade, pelo fato de que o próprio oligonucleotídeo é marcado com fluorescência e a possibilidade de realizar reações múltiplas na mesma reação de PCR, utilizando diferentes fluoróforos. O sistema TaqMan® também aumenta a especificidade da reação, mas apresenta um maior custo pela utilização de um oligonucleotídeo modificado

além dos habituais para PCR. O sistema Sybr Green é um agente intercalante de DNA, inespecífico e revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. Em decorrência desse fato, os ensaios que utilizam esse agente devem ter desenho cauteloso para evitar possíveis resultados espúrios.

Muitos parâmetros devem ser controlados para se obter uma medida de expressão quantitativa confiável: quantidades iniciais de amostra, qualidade da extração do RNA e eficiência da síntese de cDNA. A técnica freqüentemente utilizada para normalizar os parâmetros citados é a utilização de um gene de controle interno. De acordo com critérios geralmente aceitáveis, um gene de normalização adequado é um gene que não apresente variação na sua expressão em todas as amostras investigadas.⁷⁸

Dois são os procedimentos de quantificação padrão utilizados na PCR em tempo real: relativo e absoluto. A quantificação relativa compara a expressão de um ou mais genes de referência dentro de uma mesma amostra. A quantificação absoluta requer um padrão apropriado de uma concentração conhecida para fazer diluições seriadas e estabelecer uma curva padrão. Esta fornecerá uma relação linear entre valores do ciclo limiar e quantidades iniciais do gene molde, permitindo determinar a concentração exata das amostras desconhecidas.^(79,80) A quantificação absoluta é considerada mais trabalhosa devido à necessidade de criar padrões de confiança.⁸¹

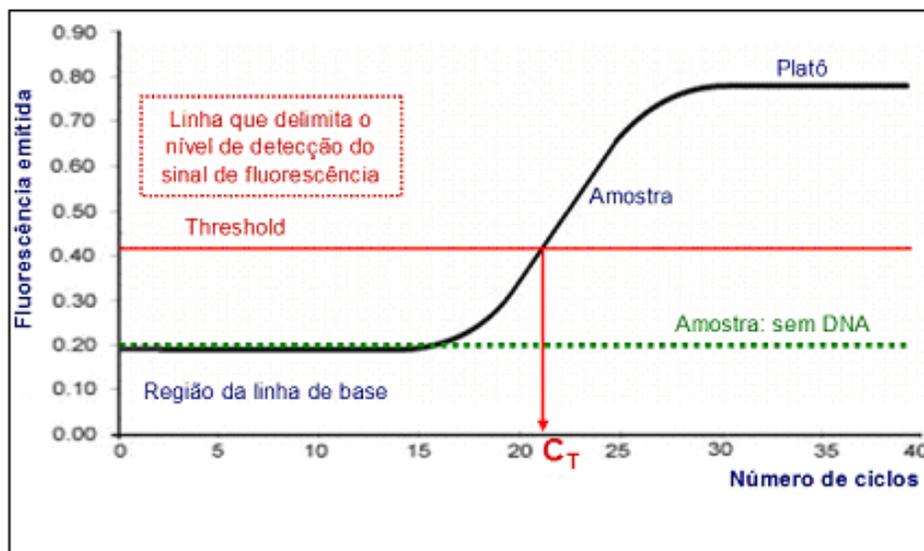


Figura 3. Curva de reação da PCR em Tempo Real e definição de C_T (*Cycle Threshold*)

A Figura 3 mostra o ponto de detecção do ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial que é denominado “*Cycle Threshold*” (C_T). Este ponto permite a quantificação exata e reproduzível baseado na fluorescência.

A PCR em tempo real tem sido adotada em estudos de expressão de genes que requerem alta sensibilidade e exatidão na quantificação dos níveis de mRNA de uma pequena amostra de tecido.^(79,82) Esta tecnologia tem sido utilizada na quantificação da expressão de genes em tumores, tendo grande importância na investigação de genes responsáveis pelo desenvolvimento do câncer, progressão da doença e resposta a tratamentos.

2. OBJETIVOS

Considerando a incidência crescente do câncer de pulmão e a necessidade de se identificar marcadores diagnósticos e prognósticos para esta doença, propomos este estudo com os seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

- Quantificar a expressão dos genes *COX-2* e *HER-3*, em câncer de pulmão, pela técnica da PCR em tempo real.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar e comparar a expressão da *COX-2* em amostras de câncer de pulmão e tecido normal;

- Quantificar e comparar a expressão da *HER-3* em amostras de câncer de pulmão e tecido normal;

- Avaliar a relação da expressão (tecido tumoral/ tecido normal) dos genes *COX-2* e *HER-3* com as características clínico-patológicas de pacientes com câncer de pulmão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População e amostras do estudo

Amostras de tecido tumoral (T) e de tecido normal (N) foram obtidas de 16 pacientes com indicação de ressecção por câncer de pulmão, através do Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital São Lucas da PUCRS, no período de 2004 a 2007. Imediatamente após a retirada cirúrgica da peça anatômica, as amostras foram armazenadas em frascos estéreis a -80°C .

Os pacientes não possuíam diagnóstico prévio de outra neoplasia e não haviam recebido nenhuma forma de tratamento antineoplásico.

3.2 Extração do RNA total

O RNA total das células foi isolado utilizando-se 1 mL de TRIZOL Reagent (Invitrogen, USA) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para a destruição da membrana celular e nuclear e liberação dos ácidos nucleicos. Após o período de incubação, as suspensões foram transferidas para um tubo *ependorf* seguidas da adição de 200 μL /tubo de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C . Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo

onde foram adicionados 500 μL de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas por, pelo menos, 2 horas a -20°C e centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições. Os precipitados foram lavados com 500 μL de etanol 75% gelado e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi aspirado e os tubos permaneceram a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 20 μL de H_2O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1 %, Invitrogen, USA) contendo 1 μL de inibidor de RNase (40 U/ μL ; Invitrogen, USA). A integridade do RNA total extraído das amostras foi analisada por espectrofotometria (OD260/280).

Para evitar uma possível contaminação com DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxiribonuclease I (DNase I 124 U/ μL , Invitrogen, USA). Esta enzima cliva DNA de fita simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período, a enzima foi inativada pela adição de 1 μL de 25 mM de EDTA e incubadas por 10 minutos a 65°C .

3.3 Síntese de DNA complementar

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA

complementar (cDNA) para subsequente PCR, utilizando-se a enzima *Superscript* II (Invitrogen, USA) e Oligo-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, USA). Para cada reação foram utilizados 100 ng de RNA total, 0,5 µL da enzima *Superscript* II (200 U/µL; Invitrogen, USA), 0,2 µL de Oligo d_T, 4,5 µL de DTT (0,1 M; Invitrogen, USA), 4,5 µL de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 9 µL de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA), completando 45 µL de solução de reação. As reações foram incubadas no termociclador (Peltier Termocycler, MJ Research) e submetidas ao seguinte programa: 10 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C, e 3 minutos a 99°C. Após o término da transcrição reversa foi adicionado a cada tubo, 5 U de inibidor de RNase (10 U/µL; Invitrogen, USA) e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20 °C até o uso para a reação da PCR em tempo real.

3.4 PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão dos genes *COX-2* e *HER-3*

Para avaliar a expressão relativa de *COX-2* e *HER-3* nas amostras, empregou-se a técnica da PCR quantitativa baseado na química LUX (Light Upon Extension).

Para cada amostra avaliada, além dos dois genes de interesse, foi analisada também a expressão do gene da *β-actina*, como controle endógeno para calibração da eficiência da reação de transcrição reversa das amostras.

Foram preparadas duplicatas contendo 10 ng de cDNA, produto resultante da transcrição reversa, e uma mistura previamente preparada contendo Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, USA), iniciadores específicos com marcador de fluorescência (LUX-primer), incluindo também, iniciadores marcados para *β-actina* (controle endógeno), desenhados previamente (Invitrogen, USA) e contendo fluoróforos FAM. O volume final da reação foi de 25 µL.

Tabela 6. Seqüência dos iniciadores dos genes *COX-2*, *HER-3* e *β-actina* utilizados neste estudo.

Gene	Acesso	Senso 5'→3'	Anti-senso 3'→5'
<i>COX-2</i>	NM_0009631	CGGGAGTATAAGTGCATTGTACC[FAM]G	AAATTCCGGTGTTGAGCAGTTT
<i>HER-3</i>	NM_0019822	CGGGTCAAAGGTACTCCCTCCTCC[FAM]G	CCAGGACAGAACTGAGACCCACT
<i>β-actina</i>	NM_0011012	CGGATAAGTGTGACGTGGACATC[FAM]G	GATCTCCTTCTGCATCCTGTCC

Um ciclo inicial de 50°C por 2 min e 95 °C por 1 min foi realizado para todas as amostras. Após este primeiro ciclo, as misturas de reação foram submetidas a 40 ciclos como segue: 95 °C por 15 segundos e 60°C por 45 segundos. Estes ciclos foram realizados no sistema de detecção contínua de fluorescência iCycler (Bio-RAD, USA) e os dados relativos à fluorescência acumulada foram analisados com o software específico para este equipamento.

Para análise efetiva das amostras, o sistema de amplificação usando *COX-2*, *HER-3* e *β-actina* foram validados e a eficiência calculada a partir de uma diluição seriada de ambos os genes e controle negativo (sem cDNA). Os valores foram plotados e analisados por regressão linear levando-se em consideração o

coeficiente de determinação (r^2), sendo valores iguais ou superiores a 98% estabelecidos como padrão. Através dos dados gerados em tempo real identificou-se o ciclo no qual a fluorescência começa a aumentar exponencialmente acima da fluorescência intrínseca do fluoróforo, referida como Ct (*Cycle Threshold*). Para cálculo dos valores de expressão foi utilizada a técnica de Brabender (2002), baseada na razão entre o Ct da amostra tumoral e tecido normal do mesmo paciente.

3.5 Análise Estatística

Os níveis de expressão dos genes foram comparados, em relação as variáveis utilizadas no estudo, através dos testes clássicos, teste t de Student e Anova e os testes não paramétricos Mann-whitney e Kruskal-Wallis.

O nível de significância utilizado foi de 0,05.

3.6 Aspectos administrativos e éticos

O presente trabalho baseou-se nos dados obtidos dos arquivos médicos dos pacientes incluídos. Para verificar os dados pertinentes e relacioná-los com os achados desta pesquisa, os pacientes foram identificados pelas iniciais e pelo número do registro.

Os pacientes foram incluídos, após assinatura do Termo de Consentimento Informado (ANEXO I).

A versão final do projeto e o termo de consentimento informado foram revisados e aprovados pela Comissão Científica do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (ANEXOII).

4. RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

Das 16 amostras analisadas, 100% tinham diagnóstico de câncer de pulmão não-pequenas células.

A idade dos pacientes variou entre 40 a 73 anos – mediana de 62 anos. O histograma da Figura 4 representa a idade dos pacientes segregados em < de 60 anos e \geq 60 anos de idade.

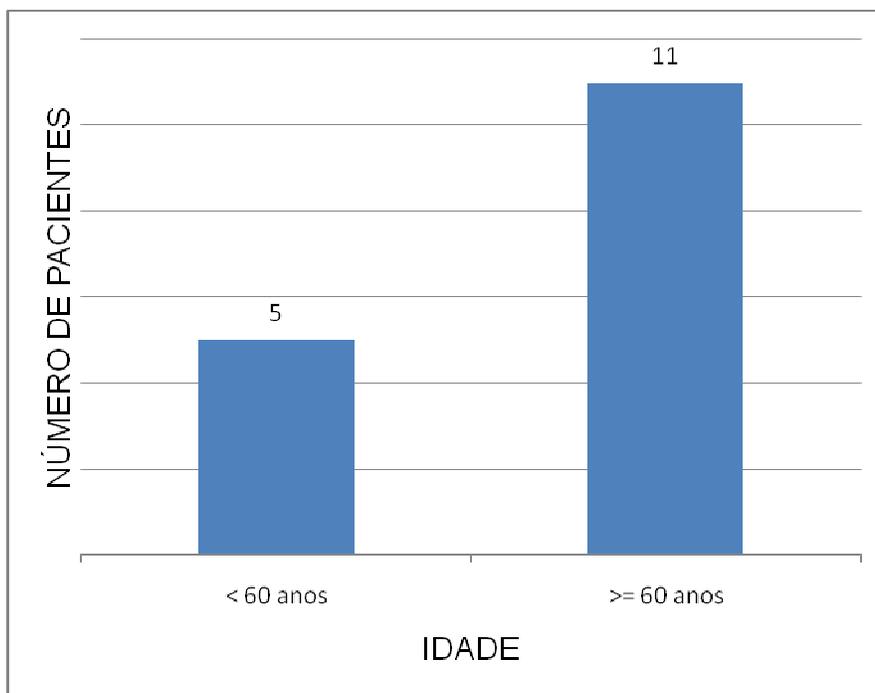


Figura 4. Histograma do número e a idade dos pacientes das amostras analisadas.

Quanto ao gênero, 11 (68,8%) pacientes eram do sexo masculino e 5 (31,2%) do sexo feminino (Figura 5).

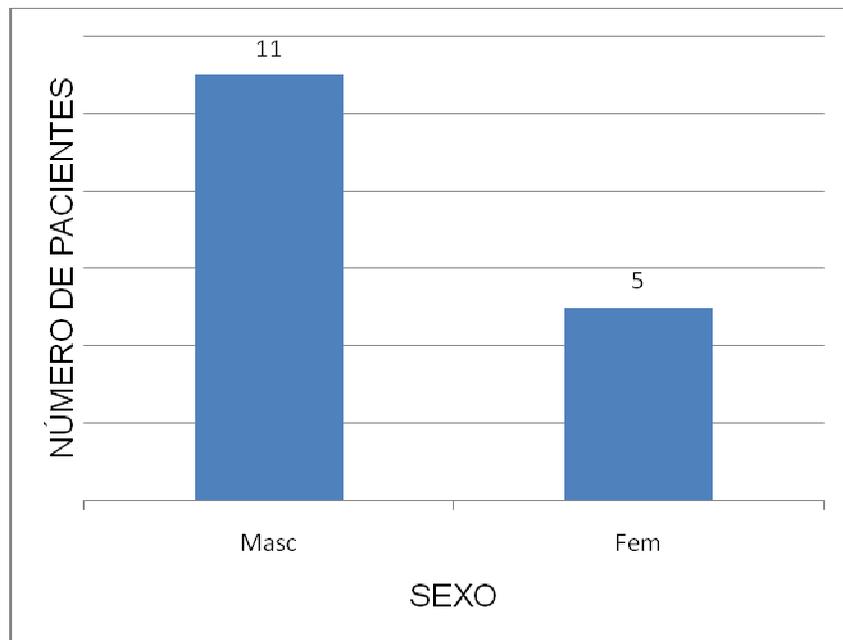


Figura 5. Histograma do número e o gênero dos pacientes das amostras analisadas (Masc = Masculino, Fem = Feminino).

Os subtipos histológicos predominantes neste estudo foram carcinomas epidermóides e adenocarcinomas, abrangendo 75% dos tumores analisados. Apenas um paciente (6,2%) apresentou carcinoma de células claras e carcinoma adenoescamoso foi verificado em 3 pacientes (18,8%), como representado na Tabela 7 e na Figura 6.

Tabela 7. Sub-tipos histológicos e frequência dos tumores analisados neste estudo.

<i>Sub-tipo Histológico</i>	<i>Número de Pacientes</i>
Carcinoma epidermóide	06 (37,5%)
Adenocarcinoma	06 (37,5%)
Carcinoma adenoescamoso	03 (18,8%)
Carcinoma de células claras	01 (6,2%)
Total	16 (100%)

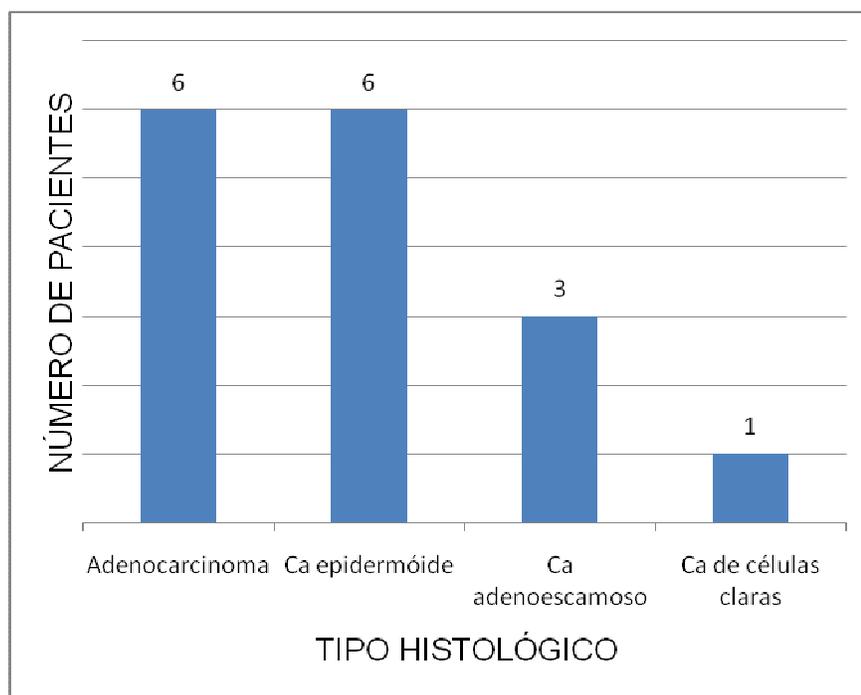


Figura 6. Histograma do número de pacientes e tipo histológico dos tumores analisados.

A Tabela 8 e o histograma da Figura 7 representam a distribuição do estadiamento da doença nas amostras estudadas, onde 13 (81,3%) pacientes

com neoplasia de pulmão apresentaram doença local (IA a IIB) e 3 (18,7%) pacientes apresentaram a doença em estágio avançado (IIIA a IV) (Tabela 5).

Tabela 8 – Frequência por estadiamento das amostras investigadas neste estudo.

<i>Estadiamento</i>	<i>Número de Pacientes</i>
IA	02 (12,5%)
IB	06 (37,5%)
IIA	01 (6,25%)
IIB	04 (25,0%)
IIIA	01 (6,25%)
IIIB	01 (6,25%)
IV	01 (6,25%)
Total	16 (100%)

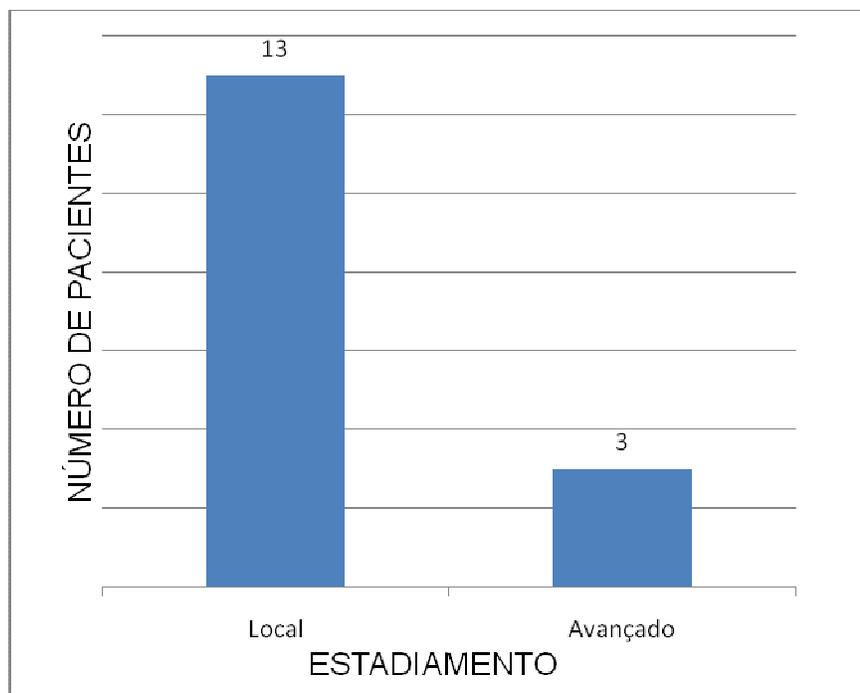


Figura 7. Histograma do número de pacientes e o estadiamento dos tumores analisados (Local = IA a IIB, Avançados = IIIA a IV).

4.2 Expressão dos genes *COX-2* E *HER-3*

As expressões de *COX-2* e *HER-3* foram detectadas nas 16 (100%) amostras analisadas. A média da expressão destes marcadores, dada pela razão entre a expressão no tecido tumoral e a expressão no tecido normal do mesmo paciente⁴⁴, foi de 0,92 (desvio padrão 0,24) e 0,82 (desvio padrão 0,34) respectivamente, para *COX-2* e *HER-3*.

Utilizando o teste de correlação de Pearson encontrou-se um r^2 0,61 ($r = 0,78$) com $p = 0,01$, verificando-se correlação forte entre a expressão da *COX-2* e *HER-3* (Figura 8).

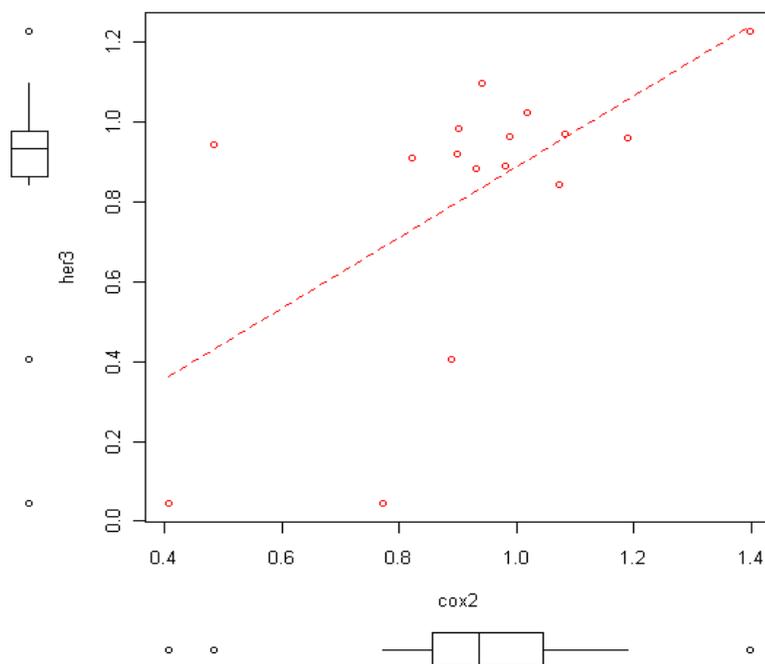


Figura 8. Diagrama de dispersão da razão de expressão da *COX-2* e *HER-3* das amostras analisadas neste estudo.

De acordo com o método utilizado por Brabender (2002), a expressão $>0,6$ foi usada para definir superexpressão de COX-2. Considerando as características da PCR em tempo real, onde a maior expressão de um gene é definida por um baixo Ct, ou seja, a fluorescência é emitida mais cedo do que para um gene pouco expresso, definimos que as amostras mais expressas foram aquelas que apresentaram uma razão (tecido tumoral/tecido normal) $<$ que 0,6.

Como melhor ilustra o histograma da figura 9, encontramos uma maior expressão de COX-2 no tecido tumoral de 11 (68,75%) pacientes.

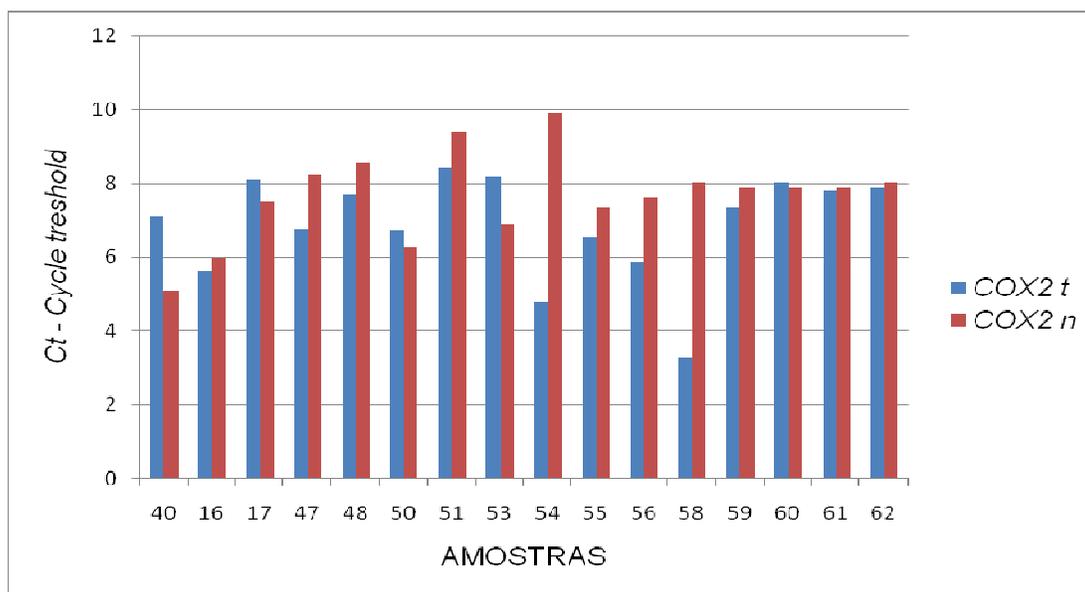


Figura 9. Histograma da expressão do gene COX-2 no tecido tumoral (t) e no tecido normal (n), nas 16 amostras analisadas neste estudo.

Em 13 (81,3%) pacientes, o gene *HER-3* encontrou-se com uma expressão mais elevada no tecido tumoral quando comparada com o tecido normal, como pode ser observado no histograma da Figura 10.

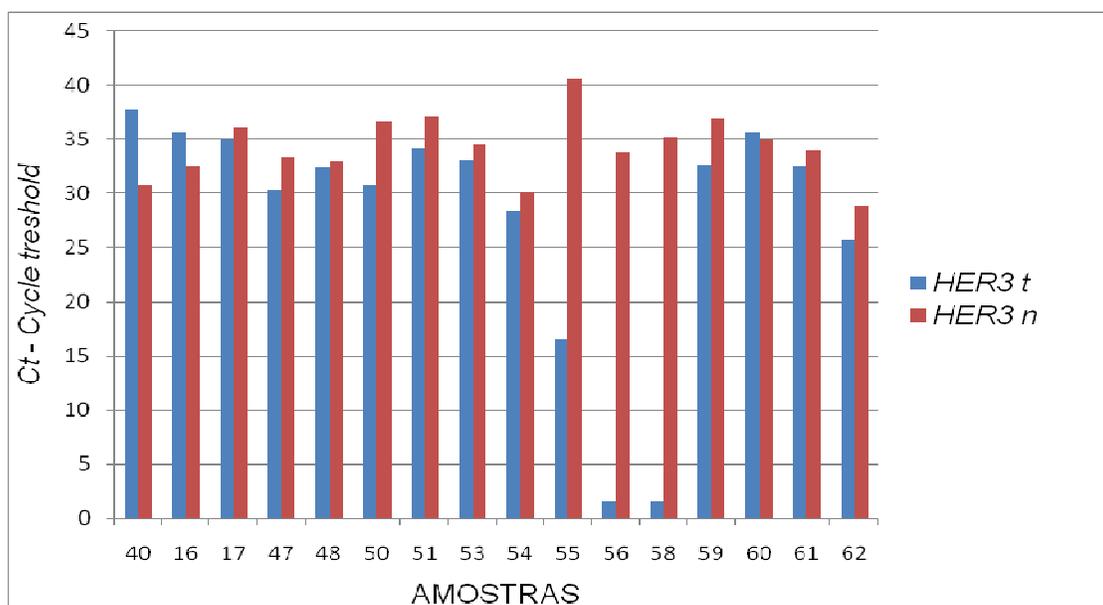


Figura 10. Histograma da expressão do gene *HER-3* no tecido tumoral (t) e no tecido normal (n), nas 16 amostras analisadas neste estudo.

Segundo nosso critério, de acordo com nosso ponto de corte (razão <0,6) para alto grau de expressão, como pode ser melhor visualizado no histograma da Figura 11, verificou-se superexpressão de *COX-2* em 2 (12,5%) pacientes, sendo um deles portador de Ca epidermóide (estádio IA) e outro de Ca de células claras (estádio IIB). Para o gene *HER-3*, a superexpressão foi verificada em 3 (18,75%) pacientes, cujos tipos histológicos eram Ca adenoescamoso (estádio IIA), Ca bronquioalveolar (estádio IB) e Ca de células claras (estádio IIB).

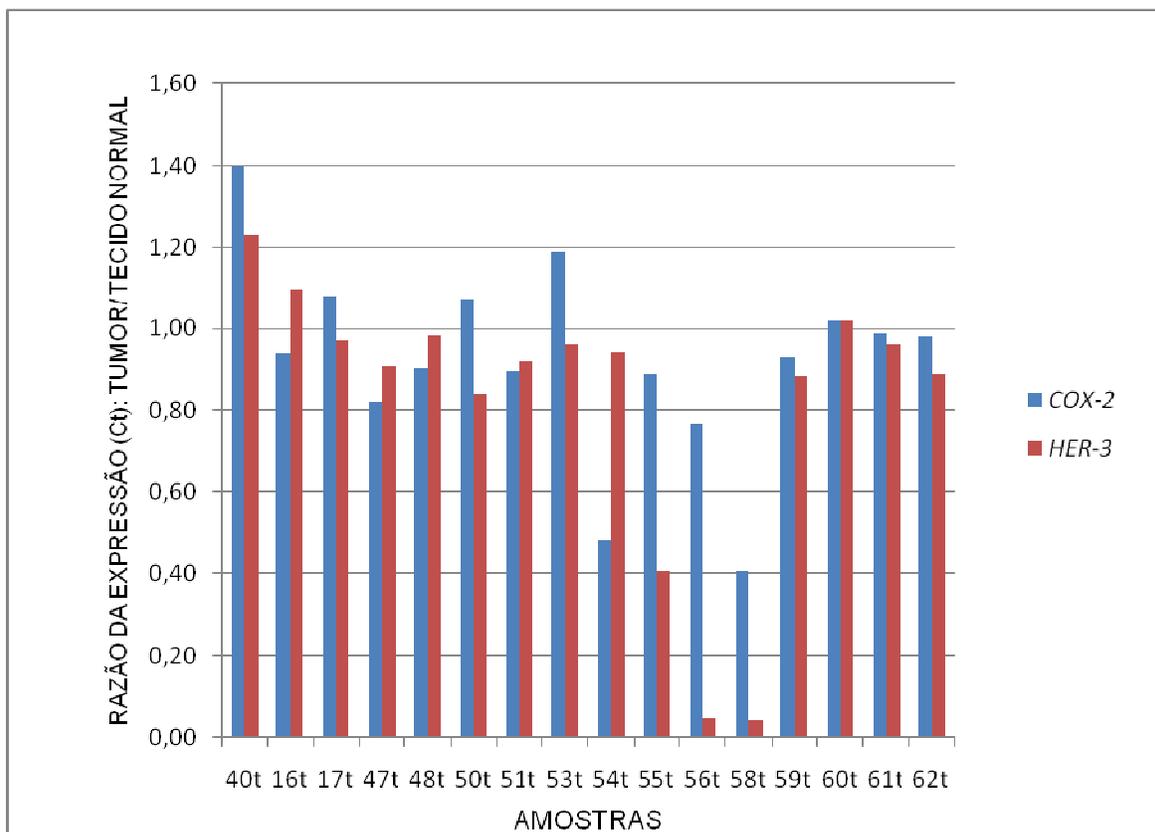


Figura 11. Histograma da expressão das proteínas COX-2 e HER-3 em função da razão entre o tecido tumoral/ tecido normal, das amostras analisadas neste estudo.

Para relacionar a freqüência de expressão das proteínas COX-2 e HER-3 e as variáveis estudadas, primeiramente foi feito o teste de normalidade para cada marcador analisado.

Através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para COX-2, chegou-se a um $p = 0,26$, representando uma distribuição normal, e portanto para as variáveis em estudo utilizamos testes clássicos como teste t e Anova. Para o

marcador HER-3, os testes não paramétricos, Mann-whitney e Kruskal-Wallis, foram utilizados por não ter sido obtida uma curva normal ($p = 0,0005$).

Tabela 9 – Frequência de expressão dos genes COX-2 e HER-3 e as diferentes variáveis estudadas.

<i>Variável</i>	<i>n</i>	<i>COX-2*</i>	<i>p</i>	<i>HER-3*</i>	<i>p</i>
		<i>Média ± DP</i>		<i>Média ± DP</i>	
Total de Pacientes	16				
Idade					
<60 anos	05	0,85 ± 0,25	0,46	0,82 ± 0,44	0,22
≥60 anos	11	0,96 ± 0,24		0,82 ± 0,29	
Sexo					
Masculino	11	0,92 ± 0,29	0,99	0,82 ± 0,32	0,18
Feminino	05	0,92 ± 0,1		0,82 ± 0,44	
Tipo Histológico					
Adenocarcinoma	06	0,94 ± 0,1	0,98	0,82 ± 0,39	0,70
Epidermóide	06	0,91 ± 0,24		0,91 ± 0,04	
Outros	04	0,93 ± 0,41		0,67 ± 0,55	
Estádio					
Local (IA-IIIB)	13	0,89 ± 0,25	0,10	0,78 ± 0,37	0,11
Avançados (IIIA-IV)	03	1,07 ± 0,11		0,98 ± 0,03	

n = número de amostras, p = nível de significância ($\alpha = 0,05$).

***Expressão dada pela razão entre o tecido tumoral e o tecido normal.**

Como descrito na Tabela 9, entre as 16 amostras analisadas não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a frequência de expressão das proteínas COX-2 e HER-3 e as variáveis idade (COX-2 $p = 0,46$; HER-3 $p = 0,22$), sexo (COX-2 $p = 0,99$; HER-3 $p = 0,18$), tipo histológico (COX-2 $p = 0,98$; HER-3 $p = 0,70$) e estadiamento (COX-2 $p = 0,10$; HER-3 $p = 0,11$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós analisamos a expressão dos genes *COX-2* e *HER-3* em tecido normal e tumoral obtidos de pacientes com NSCLC submetidos a ressecção cirúrgica, através da técnica da PCR em tempo real.

Com a utilização deste método foi possível identificar não só a expressão da *COX-2* e *HER-3* em amostras de câncer de pulmão, como também a superexpressão destes transcritos no tecido tumoral quando comparadas com o tecido normal.

Como já descrito, a superexpressão de cicloxigenase-2 é encontrada em muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão.^(48,83,84) Em NSCLC, *COX-2* é mais expressa em adenocarcinomas e carcinoma de células escamosas.⁸⁵ Muitos estudos indicam que a *COX-2* parece desempenhar um importante papel na carcinogênese e tumorigênese. Esta superexpressão da *COX-2* tem mostrado seu envolvimento na invasão, angiogênese e anti-apoptose através da produção da prostaglandina E_2 .⁸⁵ Além disso, outros estudos relatam que os AINES reduzem significativamente o risco, tamanho e disseminação de diferentes tipos de câncer.⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾ Alguns pesquisadores também sugerem que os AINES possuem efeito sobre o carcinoma epidermóide em diferentes regiões do corpo.^(51,90)

Hida e colaboradores (1998), através da técnica de imuno-histoquímica de amostras de tumores colorretal, verificaram que a expressão da *COX-2* estava associada com o grau invasivo e fenótipos mais agressivos da doença,

especialmente em adenocarcinomas, o que reforça nossos resultados em câncer de pulmão, onde utilizando técnica quantitativa, 82% das amostras que apresentaram maior expressão de COX-2 em relação a tecido normal eram de adenocarcinomas e carcinomas epidermóides. Aliado a estes resultados, Achiwa e colaboradores (1999) também reportaram aumento da expressão de COX-2 em adenocarcinomas de pulmão. Quanto ao estadiamento, 91% das amostras que tiveram maior expressão de COX-2, possuíam a doença localizada.

Em 1999, Ochiai e colaboradores, também mediram a expressão de COX-2, por PCR em tempo real, em 76 amostras, incluindo tumores primários de NSCLC, tecido normal e linfonodos, e verificou que a expressão de COX-2 no tecido tumoral foi significativamente maior do que no tecido normal, principalmente em adenocarcinomas e carcinoma escamoso. Já em relação aos linfonodos correspondentes ao tumor não houve diferença significativa, indicando que a COX-2 pode estar associada com a carcinogênese do NSCLC.

Em 1999, Achiwa e colaboradores foram os primeiros a mostrarem um prognóstico significativo associado à elevada expressão de COX-2 em cânceres humanos. Em contraste Marrogi (2000), não encontrou associação entre a elevada expressão de COX-2 em pacientes com NSCLC e seus resultados clínicos.

A produção de COX-2 pela ativação de EGFR, ativação do promotor de COX-2 pela ativação do heterodímeros HER2/HER3 e a estimulação da transcrição de COX-2 pela formação do complexo HER2, tem proposto uma

ligação entre COX-2 e o sistema EGFR.^(60,93-95) Estes dados se assemelham com os dados obtidos no nosso estudo, onde encontramos uma correlação forte de 78% entre esses marcadores.

Em um trabalho recente, Kawano (2008), verificou a expressão de HER-3 em câncer de pulmão, através da PCR em tempo real, encontrando diferença significativa em pacientes do sexo feminino, não-fumantes e o desenvolvimento de adenocarcinomas, mas não encontrou diferença entre a expressão desse gene no tecido normal e tecido tumoral. Em contraste com os resultados obtidos nesse trabalho, *HER-3* teve maior expressão em 81,3% das amostras de tecidos tumorais em relação ao tecido normal, e, embora tenhamos encontrado uma maior expressão desse gene em carcinomas epidermóides e adenocarcinomas (77%) e em pacientes do sexo masculino, nossos dados não foram estatisticamente significativos. Interessantemente, neste mesmo estudo de Kawano (2008) os níveis de *HER-3* foram sensivelmente maiores em pacientes com mutações no *EGFR* do que em pacientes sem mutação, dado que não comparamos nesta pesquisa, mas que seria de grande interesse, para que talvez estas discrepâncias fossem elucidadas.

Pawlowski e colaboradores (2000), em um estudo em câncer de mama, quantificaram a expressão de *HER-3* e de outros marcadores por PCR em tempo real e verificou que a expressão de *HER-3* está associada a um pior prognóstico.^(96,98) Segundo Travis e colaboradores (2004), esta alta expressão aumentaria a chance de recorrência local, e Carsten e colaboradores (2005), afirmam que a expressão de *HER-3* está intimamente associada com metástases

em NSCLC. Em contraste a estes dados, os resultados de Knowlden e colaboradores (1998) apontam a expressão elevada de *HER-3* para um prognóstico favorável.

Holbro e colaboradores (2003) sugerem que o *HER-3* estaria freqüentemente relacionado com a expressão do *HER-2* e, de forma dependente, o *HER-2* necessitaria da presença do *HER-3* para fazer a sinalização. O ponto alto do estudo de Holbro foi que, ao bloquearem a expressão de *HER-3* em tumores de mama, puderam impedir a sinalização de *HER-2* que estava superexpresso. Por fim, esses investigadores sugerem a possibilidade do desenvolvimento, para tumores de mama que possuem uma superexpressão de *HER-2/HER-3*, de um bloqueio específico do *HER-3* visando diminuir o sinal de proliferação celular, conferindo ao *HER-3* uma importante repercussão clínica, e uma futura possibilidade de exercer o papel de marcador de diagnóstico, juntamente com os outros membros, como o *EGFR* e o *HER-2*.

Não foi possível calcularmos a curva de sobrevida destes pacientes, uma vez que o trabalho é prospectivo, e não houve nenhum óbito até o momento, e os pacientes continuam em acompanhamento no Hospital São Lucas da PUCRS, dado este atualizado em novembro de 2008.

Essas discrepâncias podem estar relacionadas a várias hipóteses, entre elas os métodos utilizados (semiquantitativo x quantitativo) e também a população analisada por diferentes autores no que diz respeito ao grau de diferenciação da doença do paciente no momento da cirurgia.

Acreditamos ter demonstrado o valor da *COX-2* e *HER3* como potenciais marcadores para neoplasia pulmonar a serem melhor estudados e a importância da implementação da técnica da PCR em tempo real na nossa rotina, o que tornaria mais precisa a identificação de biomarcadores que possam ter utilidade clínica através da quantificação dos mesmos.

Sabemos que nosso estudo tem limitações, principalmente no que diz respeito ao tamanho da amostra, pois iniciamos as análises com aproximadamente 40 amostras. Variáveis como: ausência de amostras de tecido normal do mesmo paciente, o que não foi obtido no início das coletas, exclusão de pacientes com metástases à distância ou recidiva tumoral e a padronização do método de análise, foram as principais causas de perdas de amostras. No entanto, nossos resultados apontam para uma significativa relação entre a alta expressão dos genes estudados e o NSCLC principalmente em direção ao estadiamento da doença.

Porém, fica claro que a utilização de sistemas de amplificação de genes baseados em fluorescência tem aumentado significativamente a rapidez e sensibilidade dos testes de expressão gênica. A análise de genes tem sido utilizada experimentalmente na compreensão de fenômenos celulares relacionados à diferenciação, proliferação e apoptose e pode também gerar dados importantes na análise clínica e diagnósticos de lesões neoplásicas.

Diversos estudos continuam e sugerem diferentes desfechos da doença em relação à expressão de *COX-2* e *HER-3*. Assim, muitos autores permanecem na

busca do real papel destas proteínas na carcinogênese e suas implicações com o prognóstico e tratamento.

6. CONCLUSÕES

A investigação da expressão da *COX-2* e *HER-3* em amostras de tecido tumoral e tecido normal obtidos de pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células (NSCLC) através da técnica de PCR em tempo real permitiu concluir que:

- a expressão da *COX-2* encontra-se mais elevada no tecido tumoral quando comparada ao tecido normal em 68,75% das amostras analisadas nesse estudo.

- a expressão de *HER-3* encontra-se mais elevada no tecido tumoral quando comparada ao tecido normal em 81,3% das amostras analisadas nesse estudo.

- Não foi encontrada uma relação significativa entre a expressão dos genes *COX-2* e *HER-3* e as variáveis clínicas dos pacientes cujas amostras foram analisadas nesse estudo.

- Foi encontrada forte correlação entre a expressão da *COX-2* e *HER-3*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. World Health Organization. Disponível em: URL: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: nov 2008.
2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.
3. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res.* 2003 Oct; Vol(4):12,1-15.
4. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature.* 1989; 339:58–61.
5. Louro ID. Proto-oncogene e gene supressor de tumor. In: Louro ID, Herena Júnior JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Contorti-Froes N. *Genética Molecular do Câncer.* São Paulo: MSG; 2002. cap. 6, pt. 2ª, p. 63-79.
6. World Health Organization. Global actions against cancer. WHO, 2005; 1-24p.
7. World Health Organization. Cancer control: knowledge into action. WHO, 2006; 1-40p.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2008.
9. World Health Organization. National cancer control programs: policies and managerial guidelines. WHO, 2002; 1-180p.
10. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide.* Lyon: IARC PRESS; 2001.
11. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003; 123(1 Suppl):21S-49S.
12. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2008.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Annual Smoking-Attributable Mortality, Years of Potential Life Lost, and Productivity Losses – United States, 1997-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2005; 54(25):625-628.

14. Ginsberg RJ, Vokes EE, Raben A. Cancer of the lung. In: Devita JR, et al, eds. Cancer: principles and practices of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997;658-677.
15. Zöchbauer-Müller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. Annual Rev Physiol. 2002; 64:681-708.
16. Spira A, Ettinger D. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. N Engl J Med. 2004; 350:349-392.
17. 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.
18. Franceschi S, and Bidoli E. The epidemiology of lung cancer. Ann Oncol, 1999; 10 Suppl (5):S3-6.
19. Menezes, AB, Horta, BL, Oliveira AB, Kaufmann, RC, Duquia, R, Dinis, A, Motta, LH, Centeno MS, Estanislau G, Gomes L. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. Ver Saúde Pública 2000;36(2):129-34.
20. 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.
21. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Characteristics of long-term survivors of untreated lung cancer. Lung Cancer. 2001; (36):277-282.
22. Gugger M, Kappeler A, Vonlanthen S, Altermatt, HJ, Ris HB, 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.
23. TNM: classificação de tumores malignos, 6ª edição – Rio de Janeiro: INCA, 2004.
24. CAPELOZZI, VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. J Pneumologia Nov/Dec 2001;27(6):321-328
25. Duarte, LM; Paschoal, MM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. J. bras. pneumol. v.32 n.1 jan./fev.2006. Artigo de revisão
26. Hemler, M, Lands, W. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. J Biol Chem. 1976, 251:5575-9.

27. Hilmi I, Goh KL. Chemoprevention of colorectal cancer with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chin J Dig Dis*. 2006;7(1):1-6.
28. Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, Fleischer B, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2006; 66(14):7059-66.
29. Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detect Prev*. 2004;.28(2):147-42.
30. Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GNJ, Drillenburger P, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach, *J Pathology*. 2002; 196(2):171-9.
31. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, et al. Celecoxib, a Selective Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitor, Enhances the Preoperative Paclitaxel and Carboplatin in Early-Stage Response to Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Oncol*. 2003; 21(14):2645-50.
32. Dvory-Sobol H, Cohen-Noyman E, Kazanov D, Figer A, Birkenfeld S, Madar-Shapiro L, et al. Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Eur J Cancer*. 2006;.42(3):422-6.
33. Ye F, Wu J, Dunn T, Yi J, Tong X, Zhang D. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein. *Cancer Letters*. 2004; 21(1):39-46.
34. Smith, WL; Dewitt, DL; Garavito, RM. Cyclooxygenase: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69: 145-82.
35. Lee EJ, Kim SH, Kwark YE, Kim J. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein C is increased in the celecoxib-induced growth inhibition of human oral squamous cell Carcinoma. *Exper Mol Med*. 2006; 38(3):203-9.
36. Niiron H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T et al. Regulation by Interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*. 1997; 89(5):1621-8.
37. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol*. 1996; 156(2):758-64.

38. O'Connor JK, Avent J, Lee RJ, Fischbach J, Gaffney DK. Cyclooxygenase-2 correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*. 2004; 58(4):1034-40.
39. Seo SS, Song YS, Kang DH, Park IA, Kang SB, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2004; 92(3):927-35.
40. Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, Gudis K, Tsukui T, Kishida T, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. *Hum Pathol*. 2004; 35(4):488-95.
41. Yu HP, Shi LY, Lu WH, Su YH, Li YY, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 19(6):638-42.
42. Sheehan, KM et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA*. 1999; 282:1254-7.
43. Jiang JC, Tang JB, Chen CH, Liu BX, Fu XN, Zhu ZH, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human esophageal squamous cell carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004;10(15):2168-73.
44. Brabender J, Park J, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Holscher AH, Danenberg KD, Danenberg PV. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann Surg*. 2002 Mar; 235(3):440-3.
45. Thun MJ. Aspirin, NSAIDs, and digestive tract cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 1994 Dec; 13(3-4):269-77.
46. Giardello FM, Offerhaus GA, DuBois RN. The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. *Eur J Cancer*. 1995; 31A:1071-1076.
47. Schreinemachers DM, Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology*. 1994 Mar; 5(2):138-46.
48. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, Pairolero P, Trastek V, Jett J, Caporaso NE, Liotta LA, Harris CC. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Dec; 6(12):4739-44.
49. Castela JE, Bart RD 3rd, DiPerna CA, Sievers EM, Bremner RM. Lung cancer and cyclooxygenase-2. *Ann Thorac Surg*. 2003 Oct; 76(4):1327-35.

50. Fosslie, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clinical Laboratory Science*. 2000; 30:3-21.
51. Altorki N. COX-2 a target for prevention and treatment of esophageal cancer. *J Surg Res*. 2004; 117(1):114-20.
52. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, Dubois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 1998; 52(2):362-6.
53. 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.
54. Hirsh FR, Fischer JR, Niklinski J, Zöchbauer-Müller S. Future developments in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 38:S81-S85.
55. Hirsh FR, Fischer JR, Niklinski J, Zöchbauer-Müller S. Future developments in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 38:S81-S85.
56. Dy KG, Adjei AA. Novel Targets for Lung Cancer Therapy: Part I. *JCO*. 2002; 20(12):2881-94.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.

62. Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol.* 2001; 12(1):S9-13.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Mark RG. Targeting Targeted Therapy. *N Engl J Med* 2004; 350(21): 2191-97.
68. Hunter T. and Plowman GD. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci.* 1997 Jan; 22(1):18-22.
69. 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.
70. 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].
71. 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.
72. 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.
73. 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.

74. Hamid O. Emerging Treatments in Oncology: Focus on Tyrosine Kinase (erbB) Receptors Inhibitors. *J Am Pharm Assoc.* 2004; 44(1):52-58.
75. Rowinsky EK. Signal Events: cell signal transduction and its inhibition in cancer. *Oncologist.* 2003; 8(3):5-17.
76. Berger MB, Mendrola JM, Lemmon MA. ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett.* 2004; 569:332-336.
77. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jul; 7(7):505-516.
78. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64(15):5245-50.
79. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25(2):169-93.
80. Dhar AK, Roux MM, Klimpel KR. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *J Virol Methods.* 2002; 104(1):69-82.
81. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004; 26(6):509-15.
82. Sellars MJ, Vuocolo T, Leeton LA, Coman GJ, Degnan BM, Preston NP. Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: A comparison of relative and absolute quantification procedures. *J Biotechnol.* 2007; 129(3):391-9.
83. Wolff, H, Saukkonen, K, Antilla, S et al. Expression of Cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58:4997-5001.
84. Ochiai, M, Oguri, T, Isobe, T et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression levels in normal lung tissues an non-small cell lung cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1999; 90:1338-43.
85. Sandler, AB, Dubinett, SM. COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin Oncol.* 2004; 31(7):45:52.

86. Campa, D, Zienolddiny, S, Maggini, V, Skaug, V, Haugen, A, Canzian, F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2004; 25(2):229-235.
87. SL, Wu, YI, Zhang, YP, Qiao, MM, Chen, Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(13):1971-4.
88. Patel, MI, Subbaramaiah, K, Du, B, Chang, M, Yang, P, Newman, RA, et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(5):1999-2007.
89. Zhang GS, Liu, DS, Dai, CW, Li, RJ. Antitumor effects of celecoxib on k562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib. *Am J Hematol*. 2006; 81(4):242-55.
90. Chan, CM, Ma, BB, Wong, SC, Chan, AT. Celecoxib induces dose dependent growth inhibition in nasopharyngeal carcinoma cell lines independent of cyclooxygenase-2 expression. *Biomed Pharmacot*. 2005; 59(supl 2):268-71.
91. Hida, T, Yatabe, Y, Achiwa, H, Muramatsu, H, Kosaki, K, Nakamura, S et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1998; 58:3761-3764.
92. Achiwa, H, Yatabe, Y, Hida, T, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999; 5:1001-5.
93. Coffey, RJ, Hawkey, CJ, Damstrup, L, et al. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:657-62.
94. Wang, SC, Lien, HC, Xia, W et al. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell*. 2004; 6:251-61.
95. Steffensen, KD, Waldstrom, M, Jeppesen, U, Jakobsen, E, Brandslund, I, Jakobsen, A. The prognostic importance of cyclooxygenase 2 and HER2 expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007; 17:798-807.
96. Kawano, O, Sasaki, H, Endo, K, Suzuki, E, Haneda, H, Yukiue, H et al. ErbB3 mRNA expression correlated with specific clinicopathologic features of Japanese lung cancers. *J Surg Res*. 2008; 146(1):43-8.

97. Pawlowski, V, Révillion, F, Hebbar, M, Hornez, L, Payrat, J. Prognostic value of the type I Growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:4217-4225.
98. 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.
99. 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. 2004:16-19. Lyon.
100. Carsten, T, Diederichs, S, Bulk, E, Pohle, T, Steffen, B, Schwable, J et al. Identification of Metastasis-associated receptor tyrosina kinases in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(5):1778-1782.
101. Knowlden, JM, Gee, JM, Seery, LT, Farrow, L, Gullick, WJ, Ellis, IO et al. c-erbB-3 and c-erbB-4 expression is afeatura of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene.* 1998; 17:1949-57.
102. 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.

ANEXOS

ANEXO I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	52
ANEXO II. Carta de aprovação do projeto.....	54

ANEXO I – Termo de Consentimento Informado

Título da pesquisa: EXPRESSÃO DOS GENES COX-2 E HER-3 EM CÂNCER
DE PULMÃO POR PCR EM TEMPO REAL

I – O câncer de Pulmão é uma doença muito freqüente em nosso meio, atingindo um grande número de pessoas. A determinação de fatores relacionados a biologia desta doença podem trazer informações sobre sua agressividade e a capacidade da doença de se espalhar pelo corpo.

O objetivo deste estudo é quantificar em uma parte do tumor que será retirado na cirurgia, alguns elementos da biologia do tumor, chamados de marcadores biológicos.

II - Será coletado, na cirurgia, uma parte do tumor, que será retirado independente da sua disposição ou não em participar deste estudo. Este procedimento é sempre realizado.

III - Nenhum desconforto, além do esperado no período pós-cirúrgico, poderá ocorrer.

IV - A sua participação neste estudo certamente contribuirá para um passo na pesquisa contra o câncer de pulmão, visto que após este estudo pretendemos conhecer mais sobre o comportamento desta doença.

V - É importante ressaltar que nenhum risco pode existir e esses exames serão de grande importância para estudar o câncer de mama, conforme descrito anteriormente.

VI - Qualquer dúvida quanto a este trabalho, tanto por parte do paciente, como de qualquer familiar, será prontamente fornecida por um dos membros da equipe deste estudo.

VII - Caso seja de sua vontade, poderá em qualquer momento, mesmo após ter concordado (em um primeiro instante), desistir da participação no trabalho, sem qualquer comprometimento no seu tratamento.

VIII - Garantimos que os resultados e as informações obtidas no estudo serão de total sigilo. Garantimos também que a participação ou não neste estudo não

influenciará em nada qualquer modificação no tratamento e atenção proposto por seu médico assistente

IX - Os resultados da pesquisa na medida que forem sendo obtidos poderão ser informados a você.

X - Não há nenhum custo financeiro para a participação neste estudo.

XI - O material coletado, será congelado e guardado após a realização dos testes deste estudo e poderão servir, no futuro, para novas pesquisas ou eventuais reavaliações que seu médico assistente julgar necessário.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo poderá ser chamado o Dr(a) _____,

no telefone _____. Para qualquer pergunta sobre os direitos como participante deste estudo, ou se há dúvida quanto a qualquer prejuízo que ele possa ter oferecido poderá ser chamado _____

Declaro que recebi cópia do presente termo de consentimento e estou de acordo com as explicações nele contidas e informada pelo Dr(a) _____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Data ___/___/___

ANEXO II

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



Ofício nº 086/05-CEP

Porto Alegre, 14 de janeiro de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Quantificação por PCR em tempo real de marcadores biológicos em câncer de pulmão".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente


Prof. Dr. Délio José Kipper
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dout Ana Christina de Oliveira Dias
N/Universidade