

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAFAEL LONGHI SAMPAIO DE BARROS

**VALIDAÇÃO DO USO DA PROTEÍNA COFILINA COMO
BIOMARCADOR PREDITIVO DO PROGNÓSTICO DE
CARCINOMA DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS**

ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO KLAMT

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAEL LONGHI SAMPAIO DE BARROS

**VALIDAÇÃO DO USO DA PROTEÍNA COFILINA COMO
BIOMARCADOR PREDITIVO DO PROGNÓSTICO DE
CARCINOMA DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Porto Alegre

2010

B277v Barros, Rafael Longhi Sampaio de

Validação do uso da proteína cofilina como biomarcador preditivo do prognóstico de carcinoma de pulmão de não-pequenas células / Rafael Longhi Sampaio de Barros ;

orient. Fábio Klamt. - 2010.

102 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Neoplasias pulmonares 2. Carcinoma pulmonar de células não pequenas 3. Prognóstico 4. Marcadores biológicos de tumor 5. Cofilina 1 I. Klamt, Fábio II. Título.

NLM: WF 658

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAEL LONGHI SAMPAIO DE BARROS

**VALIDAÇÃO DO USO DA PROTEÍNA COFILINA COMO
BIOMARCADOR PREDITIVO DO PROGNÓSTICO DE
CARCINOMA DE PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS**

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Banca Examinadora

Correlator: Prof. Dr. Rafael Roesler - Professor Adjunto e coordenador do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS e coordenador do Laboratório de Pesquisas em Câncer do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Prof. Dr. Guido Lenz - Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Departamento de Biofísica.

Prof. Dr. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna - Professor Associado II da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Flávio Pereira Kapczinski - Diretor do Laboratório de Psiquiatria Molecular e coordenador geral do INCT em Medicina Translacional no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Dedico essa dissertação de Mestrado a minha esposa Juliana Brasil Zardo Longhi e aos sogros que se tornaram meus pais. E a minha mãe que sempre me estimulou a nunca parar de estudar.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. CÂNCER DE PULMÃO: DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	12
2.2. FATORES DE RISCO	13
2.3. TIPOS HISTOLÓGICOS	15
2.3.1 Carcinoma Epidermóide	17
2.3.2. Adenocarcinoma	18
2.3.3. Carcinoma de Células Grandes	19
2.4. DIAGNÓSTICO	19
2.4.1 Sistema TNM	21
2.4.2. <i>Performance Status</i>	24
2.5. TRATAMENTO	27
2.5.1 Tratamento de Segunda e Terceira Linhas	30
2.6. BIOMARCADORES	32
2.6.1 Cofilina	35
2.7. IMUNOISTOQUÍMICA	40
3. OBJETIVOS	42

4. ARTIGO CIENTÍFICO	43
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO/PERSPECTIVAS	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	86
Anexo 1 Artigo publicado como co-autor	87

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, pelo seu amor incondicional e apoio a todas minhas decisões. Sua lealdade só me fortaleceu nesses anos de pesquisa. EU TE AMO!!

Aos meus sogros Júlio e Carla, um presente que recebi, juntamente com minha esposa, sempre fiéis e companheiros, me apoiaram e me incentivaram nessa caminhada.

Ao meu orientador, amigo e padrinho Fábio Klamt, um exemplo de profissional, mostrou-me o melhor caminho da pesquisa, suas sábias palavras colaboraram para esse excelente resultado que será visto nas próximas páginas e, sem dúvida, tornou-se um divisor de águas em minha vida profissional.

A minha irmã Débora e vó Celina, que mesmo não estando em Porto Alegre, torceram e torcem, pelo meu sucesso.

A Carolina Beatriz Muller, minha companheira de pesquisa, esteve comigo em todas as etapas desse trabalho, sempre disposta e pronta a colaborar com o desfecho dessa dissertação.

A Prof. Dr. Jane Maria Ulbrich-kulczynski, pela colaboração com a parte de coleta de dados, através do serviço de Patologia desta instituição.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, que sem dúvida, foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Aos alunos, professores e todos que fazem parte do laboratório 32, que colaboraram com o enriquecimento dessa pesquisa, disponibilizando dados, referências e críticas que foram essenciais para a confecção dessa dissertação.

A Coordenadoria de Segurança Alimentar e Nutricional Sustentável (COSANS), minha segunda casa, meu local de trabalho, onde tive pleno apoio de meu coordenador, Carlos Antônio da Silva, para poder concluir a pesquisa sem prejuízo em minha carreira profissional na COSANS.

A todos que trabalham no SAMIS, pela paciência e colaboração na aquisição dos dados para essa pesquisa.

Às demais pessoas que contribuíram e incentivaram de alguma forma a realização desse trabalho,

A TODOS, MEU SINCERO, MUITO OBRIGADO!!

“Somos repetidamente o que fazemos. A excelência, portanto, não é um feito,
mas sim um hábito”

Aristóteles

RESUMO

Câncer de Pulmão de Não-pequenas células (CPNPC) é o maior problema de saúde pública atualmente no mundo. Encontramos em nossas pesquisas que os níveis de mRNA da *CFL-1* (cofilina) podem ser usados como um biomarcador prognóstico em biópsias de tumores de CPNPC. Em nossos estudos, estabelecemos e otimizamos um método simples de imunohistoquímica semiquantitativa (SQ-IHC) para quantificar em biópsias de tumores sua aplicação em uma coorte retrospectiva de pacientes diagnosticados com CPNPC, para explorar seu papel prognóstico. Tivemos acesso a uma coleção de arquivos médicos bem delineada de 50 tumores de pacientes, juntamente com informações relevantes clinicopatológicas de 5 anos de acompanhamento hospitalar. A análise imunohistoquímica e semiquantitativa da cofilina foi realizada em um estudo cego para confiabilidade do resultado clínico. A associação entre imunoconteúdo de cofilina e resultado clínico foi assegurada utilizando as curvas de mortalidade de Kaplan-Meier e o teste log-rank. Pacientes foram agrupados pela expressão do biomarcador ou pelo seu estadiamento. Imunoconteúdo de cofilina (em densidade óptica) em biópsias de tumor foram capazes de determinar entre bom e mau prognóstico, onde altos níveis de cofilina foram correlacionados com baixa razão de sobrevida. Um método simples de imunohistoquímica semiquantitativa foi bem desenvolvido para avaliação quantitativa de cofilina em CPNPC. Nosso método mostrou boa sensibilidade/especificidade para indicar resultado em pacientes e por isso deve ser empregado em estudo prospectivo, de larga escala, com triagens clínicas randomizadas para estabelecer o valor prognóstico do imunoconteúdo de cofilina em CPNPC.

Palavras-chave: prognóstico, biomarcador, câncer de pulmão de não-pequenas células, cofilina, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Nonsmall cell lung cancer (NSCLC) is a major public health problem worldwide. Previously we found that *CFL1* (cofilin-1) mRNA levels can be used as a prognostic biomarker in NSCLC tumor biopsies. In this study, we established and optimized a simple semi-quantitative immunohistochemistry (SQ-IHC) method for cofilin quantification in tumor biopsies and applied it in a retrospective cohort of NSCLC patients, to exploit prognostic role. We accessed a well-defined archival collection of tumor samples from 50 patients with relevant clinicopathologic information and 5 years follow-up. Immunohistochemistry and semi-quantitative analysis of cofilin were performed blinded to clinical outcome. Association between cofilin immunocontent and clinical outcome was assessed using standard Kaplan-Meier mortality curves and the log-rank test. Patients were clustered according to either biomarker expression level or NSCLC stage grouping. Cofilin immunocontent (in optical densities) in tumor biopsies was able to discriminate between good and bad prognosis, where high cofilin levels are correlated with lower overall survival rate ($P < .05$). A simple semi-quantitative immunohistochemical method has been developed for quantitative evaluation of cofilin in NSCLC. Our method showed good sensitivity/specificity to indicate the outcome of patients and should be further employed in a prospective, large-scale, randomized clinical trial to establish the prognostic value of cofilin immunocontent in NSCLC.

Keywords: prognosis, biomarker, nonsmall cell lung cancer, cofilin, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Corte histológico de câncer epidermóide, adenocarcinoma e de células grandes, aumentados em 20x.	16
Figura 2	Mecanismo de ação da Cofilina-1	35
Figure (artigo)	1A The healthy human alveolar tissue obtained from free resection margins of biopsies represents the basal levels of cofilin, and macrophages were considered positive controls (1000X magnification).	55
Figure (artigo)	1B Representative cofilin immunohistochemistry stain and the tumor optical density (OD) values are presented (400X magnification).	55
Figure (artigo)	2A Cohort data grouped according to the International Staging System for Lung Cancer and plotted as survival probabilities using the Kaplan-Meier method. Red line represent patient in early tumor stages (IA-IIIB); gray line represent patient in stages IIIA-IIIB and black line represent patients in late tumor stage (IV)	59
Figure (artigo)	2B Cohort data grouped according cofilin immunocontent, as optical density values (OD) (<i>ie</i> , upper fifth vs lower fifth). Black lines represent patients with low cofilin immunocontent; red lines indicate high cofilin immunocontent. Differences in survival rates were assessed with the log-rank test. <i>P</i> value <.05 was considered significant.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupamento por Estádios	22
Tabela 2	Resumo Esquemático do Estadiamento	22
Tabela 3	Escalas de Performance Karnofsky e ECOG	24
Tabela 4	Recomendações de Tratamento de Primeira Linha do Hospital Sírio Libanês	27
Tabela 5	Resposta ao tratamento quimioterápico associado no câncer de não-pequenas células	31
Table 1 (artigo)	Epidemiological and Clinical Characteristics of the NSCLC Cohort	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADF	Fator de Despolimerização da Cofilina
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AUA	Associação Americana de Urologia
BSA	Albumina de Soro Bovino
CPNPC	Câncer de Pulmão de Não-pequenas Células
CPPC	Câncer de Pulmão de Pequenas Células
cDNA	Ácido Dexosirribonucleico Complementar
CFL1	Cofilina
DO	Densitometria Óptica
ECOG OS	Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPASS	Iressa Pan-Asia Study
KPS	Escala Karnofsky
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NCI	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
OS	Performance Status
PSA	Antígeno Prostático Específico
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
SAMIS	Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde
SQ-IHC	Imunohistoquímica Semiquantitativa
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia Computadorizada
TNM	Sistema de Estadiamento
UICC	União Internacional contra o Câncer

1. INTRODUÇÃO

A mortalidade “epidêmica” por câncer de pulmão tem sido identificada como um dos maiores problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos como os em desenvolvimento (OMS, 2005). Até 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) contabilizou 1 milhão e 300 mil mortes por ano referentes a esta neoplasia (OMS, 2010).

No Brasil, foi responsável por mais de 18.000 óbitos em 2006, dos quais 2627 no estado do Rio Grande do Sul, contabilizando mais de 55% dos casos diagnosticados de toda a região sul e assegurando o segundo lugar no *ranking* nacional (DATASUS, 2010). Segundo estimativas do INCA para 2010, a entidade prevê, em torno de 17.800 entre homens e de 9.830 nas mulheres de novos casos. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais frequente no Sul (35/100.000) e entre as mulheres é o quarto (INCA, 2010).

Muitos estudos têm focado no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, incluindo marcadores tumorais séricos. Até agora, muitos biomarcadores têm sido analisados para CPNPC, incluindo SCC antígeno, antígeno carcinoembrionário, enolase neurônio-específica, fragmento de citoqueratina 19, CA-125 e antígeno de polipeptídeo tecidual. Entretanto, a expressão desses antígenos não são suficientemente sensíveis e específicas para tornarem-se confiáveis para a maioria dos diagnósticos de malignidades pulmonares (Planque, et al., 2008).

Sabendo que nenhum dos biomarcadores supracitados demonstrou ser superior ao padrão-ouro (estadiamento clínico) e que até o momento não há um biomarcador preditivo para CPNPC, nosso grupo de pesquisa desenvolveu

um protocolo de avaliação retrospectivo de pacientes diagnosticados pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com câncer de pulmão de não-pequenas células, protocolo este confeccionado através de critérios de inclusão, dados pessoais (idade, gênero, tabagismo) e dados clínicos (tipo histológico, estadiamento, *performance status*, desfecho). As respectivas peças histológicas da coorte foram avaliadas segundo método padronizado por nosso laboratório; uma técnica de quantificação de um antígeno celular (cofilina) que previamente demonstramos ter um papel importante como biomarcador prognóstico para essa neoplasia (Castro et al., 2010).

Assim, a validação clínica de um biomarcador para câncer de pulmão de não-pequenas células poderia adicionar potenciais benefícios para diagnóstico precoce, prognóstico e assim guiar a importantes aplicações, como o uso correto de drogas no prognóstico da doença (Chi-Shing, 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PULMÃO: DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de pulmão é a neoplasia mais comum no mundo atualmente, 12,6% dos novos casos diagnosticados e 17,8% das mortes são atribuídas a essa doença (OMS, 2005). É a principal causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos, em 2008 foi responsável por mais óbitos em comparação com os cânceres de próstata, mama e colorretal combinados (Stinchcombe, Socinski, 2009). Especificamente o câncer de pulmão é predominante em homens a partir dos 40 anos e em mulheres a partir de 60 anos. Quando comparados aos demais casos de câncer, a neoplasia de pulmão se torna a mais prevalente, com 88.331 casos em 2007, seguido dos cânceres de próstata (29.093), colorretal (27.005), pancreático (17.132) e leucemia (12.435) em homens e 70.355 nas mulheres seguidos por mama (40.599), colorretal (26.216), pâncreas (16.985) e ovários (14.621) (Jemal, et al., 2010). As estimativas para 2010 apontam para a neoplasia de pulmão como a segunda em número de casos, tanto para homens quanto para mulheres, 15% e 14% respectivamente, mas quando estimados os óbitos, o câncer de pulmão é o mais incidente em ambos os sexos, 29% e 26% respectivamente (Jemal, et al., 2010)

No Brasil, para os registros de câncer de base populacional (RCBP) analisados, os maiores valores das taxas médias anuais de incidência ajustadas por idade por 100 mil homens foram encontrados em Porto Alegre (período de 1993-1997: 54,9), seguidos por São Paulo (1997-1998: 39,2) e Distrito Federal (1996-1998: 34,2). Com relação às mulheres, as taxas médias

anuais de incidência ajustadas por idade por 100 mil mais elevadas foram observadas em Porto Alegre (1993-1997: 16,1); Distrito Federal (1996-1998: 14,8) e São Paulo (1997-1998: 12,6) (INCA, 2010).

Para o ano de 2010, o INCA prevê Porto Alegre como ainda sendo a capital com a maior taxa bruta de representação espacial de incidência de neoplasia maligna da traquéia, dos brônquios e dos pulmões em homens e mulheres, com 48,33 casos/100.000 e 21,43 casos/100.000, respectivamente (INCA, 2010).

De todos os casos diagnosticados, mais de 80% refere-se ao câncer de pulmão de não-pequenas-células onde a maioria apresenta estágio avançado e inoperável (Chang, et al., 2009).

Como resultado do aumento da expectativa de vida, a incidência de câncer de pulmão diagnosticado na população jovem está aumentando. Em torno de 50% dos novos casos diagnosticados com CPNPC ocorre em pacientes com idade acima de 65 anos, enquanto 30%-40% em pacientes com mais de 70 anos (Pallis, et al., 2010). Segundo pesquisa de Gridelli e Sheperd (2005), a razão ajustada por idade para incidência de CPNPC por 100.000 habitantes é de 20.2 para população abaixo de 65 anos enquanto para a população a partir de 65 anos é de 306.1.

2.2 FATORES DE RISCO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o fumo como o maior problema da saúde pública da história da humanidade. O fumo pode aumentar o risco de morte em 20 a 30 vezes em fumantes de ativos e em 30 a 50% em

fumantes passivos. A taxa de incidência de câncer de pulmão em alguns países está diretamente relacionada ao consumo de cigarros. Na população masculina, o hábito de fumar continua sendo o responsável pela maioria dos casos diagnosticados de câncer de pulmão, o qual permanece classificado como uma doença altamente letal (Malta, et al., 2007). O tabaco é um fator de risco para seis das oito principais causas de morte no mundo e mata uma pessoa a cada seis segundos (INCA, 2010).

Apesar de todos os tipos de câncer de pulmão apresentarem dificuldades para diagnóstico precoce e sucesso no tratamento, a causa da maioria desses cânceres é bem conhecida. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o tabaco é o maior fator de risco para o desenvolvimento dessa patologia, sendo uma relação dose-resposta surpreendente. É estimado que 80-90% da incidência de câncer de pulmão pode ser atribuído ao hábito de fumar (Schwartz, et al., 2007). Há uma grande evidência que o tabagismo é a maior causa de câncer de pulmão na maioria da população mundial. Associado ao seu efeito térmico, a fumaça inalada pelos fumantes e outros produtos derivados do tabaco contém numerosos cancerígenos além de agentes pró-inflamatórios (OMS, 2004).

Há diferenças, como já citado anteriormente, na incidência dessa neoplasia entre homens e mulheres, na qual segundo Jemal e colaboradores (2008), reflete em tendências temporais onde mulheres iniciaram o tabagismo tardiamente em comparação com os homens, ou seja, predominantemente tiveram início durante a segunda guerra mundial, ao contrário dos homens que iniciaram já no início do século 20 com picos de iniciação durante as duas guerras mundiais.

Independente dos dados da OMS mostrando que a razão de fumantes está caindo ao longo dos anos, a própria entidade mostra que a queda ocorre de forma lenta, segundo seus dados 35% dos homens fumam em países desenvolvidos e nos em desenvolvimento esse número chega a 50%, já com as mulheres, 22% e 9% respectivamente (OMS, 2010).

2.3 TIPOS HISTOLÓGICOS

A riqueza na composição celular do trato respiratório representa uma “faca de dois gumes”, por um lado diversificada para atender à formação do parênquima respiratório, com células estruturais de defesa, de secreção, por outro quando iniciada na carcinogênese, responsável pelo aparecimento de vários tipos histológicos de câncer de pulmão, o que lhe confere uma alta heterogeneidade não encontrada em outros cânceres humanos (Zamboni e Carvalho, 2005, p.61).

Especificamente, o câncer de pulmão de não-pequenas células é melhor contextualizado como um grupo de entidades heterogêneas clínicas que se origina pela divisão molecular e celular mas tendo diferentes comportamentos clínicos, e dessa forma, diferentes prognósticos (Brundage, Davies, Mackillop, 2002). Corresponde a um grupo heterogêneo composto de três tipos histológicos principais e distintos: carcinoma epidermóide (ou de células escamosas), adenocarcinoma e carcinoma de células grandes, ocorrendo em cerca de 80% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão (INCA, 2010). Estudos demonstram que esses diferentes tipos celulares apresentam, em alguns casos, diferentes cursos clínicos; entretanto,

a sobrevivência do paciente está mais diretamente relacionada com o estágio da doença do que propriamente com o tipo histológico do CPNPC (Müller, 2010).

São classificados segundo classificação da OMS em tumores de pequenas células (CPPC) e os tumores de não-pequenas células (CPNPC). Neste último grupo estão incluídos três subtipos histológicos: o carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma de células grandes. Os carcinomas de células escamosas e os adenocarcinomas são os subtipos mais comuns, respondendo cada um por cerca de 30 a 35% dos carcinomas primários de pulmão. O terceiro subtipo morfológico mais comum é o carcinoma de pequenas células (CPPC) que corresponde a 20-25% dos tumores primários de pulmão e que tem grande importância por seu enorme potencial de agressividade e pela produção de marcadores neuroendócrinos. O quarto subtipo é o carcinoma de células grandes que corresponde a 15% dos carcinomas primários de pulmão, podendo apresentar localização central ou periférica e também expressar marcadores neuroendócrinos (OMS, 1999). Apesar das constantes pesquisas acerca desta neoplasia, especificamente CPNPC, o desfecho continua tendo como característica a detecção em estágio avançado, curso agressivo e evolução fatal na maioria dos pacientes (Mohamed, et al., 2005). A taxa de sobrevivência para esta neoplasia é de 10 meses e apenas 15% dos pacientes sobrevivem por 5 anos (Castro, et al., 2010) Esse modesto avanço na melhora da sobrevivência reflete os limitados achados no rastreamento e tratamento desse câncer (Schwartz, et al., 2007). Abaixo, na figura 1, é mostrado o corte histológico dos três tipos de câncer de pulmão de não-pequenas células, cortes estes retirados de nossas análises para pesquisa.

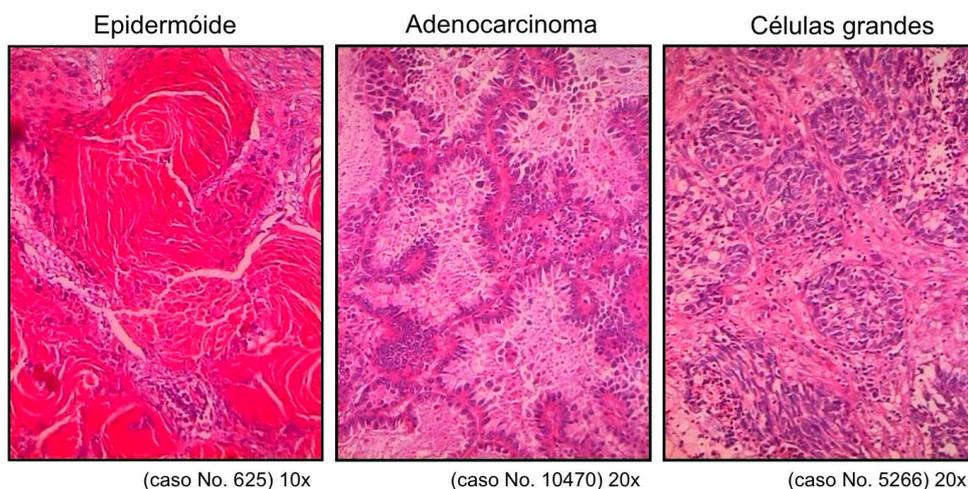


Figura 1: Diferentes tipos histológicos de câncer de pulmão de não-pequenas células. As imagens são derivadas da análise de biopsias utilizadas no presente estudo. (Técnica de coloração HE – hematoxilina/eosina).

2.3.1 Carcinoma Epidermóide

É uma neoplasia que se inicia com células escamosas, de característica celular fina, com células justapostas como escamas de peixe. São encontradas em tecidos que formam a superfície da pele, além recobrirem os órgãos ocultos do corpo, e as passagens dos tratos respiratório e digestório. Também chamados de células epidermóides (*Nacional Cancer Institute, 2010*).

Dos quatro tipos de câncer de pulmão, é o mais frequente, o menos heterogêneo do ponto de vista morfológico e o mais associado ao tabagismo. É mais comum em homens. O tumor tem localização usualmente central, isto é, tende a aparecer nos grandes brônquios. Seu crescimento é mais lento do que os demais; suas metástases são para os linfonodos regionais, sendo tardia a disseminação hematogênica. É o de melhor prognóstico (Brasileiro Filho, 2006, p. 399). Em nível microscópico, variam desde neoplasias queratinizantes (daí o

nome epidermóides) bem diferenciadas a tumores anaplásicos com diferenciação queratinizante apenas focal (Zamboni e Carvalho, 2005, p.64).

2.3.2 Adenocarcinoma

É o tipo histológico predominante de carcinoma pulmonar na maioria dos países. Na Europa sua incidência tem aumentado em 10% nos últimos 25 anos. É a mais prevalente forma de câncer de pulmão em adultos jovens (abaixo de 50 anos) e em mulheres de todas as idades, em não fumantes e em ex-fumantes (Brambilla, et al., 2001).

Localiza-se predominantemente na periferia dos pulmões, muitas vezes envolve a pleura visceral e frequentemente se associa a lesões destrutivas ou cicatrizes no parênquima pulmonar (fibrose, espaços aéreos não-funcionantes, etc.) ou hiperplasia dos pneumócitos, que são os locais de origem de focos adenomatosos (figura 2). A maioria dos adenocarcinomas origina-se nas vias aéreas periféricas, a partir das *células de Clara* (células epiteliais colunares não-ciliadas) ou de pneumócitos tipo II (Brasileiro Filho, 2006, p. 400). Seus aspectos microscópicos característicos incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina. Com frequência observa-se uma resposta tecidual desmoplásica adjacente (Zamboni e Carvalho, 2005, p 63).

Sua subclassificação é difícil de ser feita pelo fato dos adenocarcinomas terem características histológicas bem heterogêneas, com uma minoria de casos mostrando um padrão histológico genuíno. Padrões variados desse carcinoma são mais comuns do que tumores com padrão simples (acinar, papilar, bronquioalveolar e adenocarcinoma sólido com formação de mucina) (Brambilla, et al., 2001).

2.3.3 Carcinoma de Células Grandes

É um carcinoma de não-pequenas células indiferenciado com ausência de arquitetura citológica de carcinoma de pequenas células e diferenciação granular ou escamosa (OMS, 2004). São descritos como tendo até 3 vezes o tamanho de um carcinoma de pequenas células, padrão de crescimento organóide, células paliçadas ou em forma de roseta, alta taxa mitótica e um padrão variável granular de cromatina (Figura 1) (Fernandez, Battafarano, 2006).

Em diversas estatísticas, é o tipo menos frequente de carcinoma broncopulmonar; tem comportamento altamente agressivo, evoluindo rapidamente para o óbito (Brasileiro Filho, 2006, p. 401).

Segundo Fernandez e Battafarano (2006), o carcinoma de grandes células é um tipo incomum, mas agressivo e com prognóstico ruim. Dada a agressividade biológica além das características patológicas e moleculares, esses tumores devem ser classificados separadamente a partir da classificação de CPNPC. Qualquer evidência de diferenciação neuroendócrina em CPNPC parece estar associado a um aumento do risco de recorrência ou decréscimo a expectativa de vida (5 anos).

2.4 DIAGNÓSTICO

A OMS propõe um sistema internacional de classificação tumoral o qual torna-se importante ferramenta para um consistente tratamento aos pacientes além de providenciar bases epidemiológicas e biológicas para estudos (Brambilla, et al., 2001).

O exame diagnóstico deve incluir confirmação histológica do diagnóstico, avaliação de quanto o tumor se disseminou (estadiamento) e uma análise do *performance status* do paciente para que haja uma visão das possibilidades de tratamento. O protocolo dos exames deve ser sempre direcionado pela situação geral do paciente para que seu prognóstico seja alcançado (Hammerschmidt, Wirtz, 2009).

Nos cânceres de não-pequenas células, em particular, aspectos importantes da terapia dependem, sobretudo, do correto estadiamento e da correta avaliação do *performance status* do paciente (Hammerschmidt, Wirtz, 2009).

O histórico e o exame físico promovem testes diagnósticos diretos, os quais são usados com a intenção de se diagnosticar o câncer de pulmão com a maior precisão possível. Sintomas presentes em uma revisão com 7.539 pacientes mostraram tosse (45%-75%), perda de peso (8%-68%), dispnéia (37%-58%), hemoptise (27%-57%), dor torácica (27%-49%), e rouquidão (2%-18%) como os mais prevalentes. Sintomas locais são achados mais comumente em carcinomas escamosos, enquanto que carcinomas de células grandes e adenocarcinomas causam sintomas devido a metástase à distância que muitas vezes são relacionados a síndromes paraneoplásicas. A presença de sintomas torna o prognóstico menos favorável. Shimizu reportou uma sobrevivência de 5 anos em 25% dos casos sintomáticos comparado com 56% dos assintomáticos (Olak, Ng, 1996). Colaborando com o supracitado, Braunwald e colaboradores (2002, p. 596) mostram em seu tratado de Medicina Interna que 15% dos pacientes têm doença local ao diagnóstico; 25% têm doença disseminada para os linfonodos regionais e mais de 55% têm

metástases à distância, mostrando ainda que a taxa de sobrevida após cinco anos dos pacientes com doença local é de 50%, para os pacientes com doença regional é de 20% e o índice geral é de 14%.

A triagem de pessoas assintomáticas com alto risco (homens acima de 45 anos que fumam 40 cigarros ou mais por dia) por citologia de escarro e radiografias de tórax não melhorou a taxa de sobrevida. Embora 90% dos pacientes cujo câncer pulmonar é detectado pela triagem sejam assintomáticos, não foi observada diferença nas taxas de sobrevida dos grupos que tiveram e não tiveram triagem. O uso da tomografia computadorizada (TC) helicoidal do pulmão pode ser mais sensível, particularmente para as lesões periféricas. No entanto, as taxas de falsos positivos são altas (25% têm testes anormais, dos quais apenas 10% são câncer) e o benefício desse teste para a sobrevida ainda não foi determinado (Braunwald, et al., 2002, p. 599). Vale ressaltar que pacientes assintomáticos candidatos à cirurgia curativa têm uma probabilidade de identificação de metástase de 5% para o cérebro, 3% para os ossos, 2% para o fígado e 8% para as supra-renais, nos estádios clínicos I e II, a possibilidade de metástase cerebral varia de acordo com a histologia, sendo 2% para o carcinoma epidermóide e 8% para o adenocarcinoma (Buzzaid, Hoff, 2007, p. 53).

2.4.1 Sistema TNM

O prognóstico e o direcionamento do tratamento são determinados pelo médico, através do estadiamento do carcinoma, procedimento considerado o padrão-ouro entre os profissionais de saúde. O conceito desse sistema deriva da significativa relação existente entre a extensão da doença no paciente e a

possibilidade de predição do prognóstico. O sistema de estadiamento mais usado pelos oncologistas é o TNM, cuja classificação é recomendada pela AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) e pela UICC (*Union Internationale Contre Cancer*). “T” seguido de sufixo (1-4) indica o tamanho e a extensão do tumor primário, “N” seguido de sufixo (0-3) indica acometimento de linfonodos locais e “M” (0 ou 1) indica se há presença de metástase; dessa forma, esse sistema proporciona uma descrição da extensão anatômica e do avanço da doença (Müller, 2010).

O estadiamento do câncer é consagrado por tradição, e para o propósito de análise de grupos de pacientes é frequentemente necessário usar tal método. A UICC acredita que é importante alcançar a concordância no registro da informação precisa da extensão da doença para cada localização anatômica, porque a descrição clínica precisa e a classificação histopatológica das neoplasias malignas podem interessar a um número de objetivos correlatos, a saber:

1. Ajudar o médico no planejamento do tratamento
2. Dar alguma indicação do prognóstico
3. Ajudar na avaliação dos resultados de tratamento
4. Facilitar a troca de informações entre os centros de tratamento
5. Contribuir para a pesquisa contínua sobre o câncer humano (INCA, 2004)

Segundo o INCA, a avaliação das categorias T, N e M são as seguintes:

- *Categorias T*: Exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia e/ou exploração cirúrgica
- *Categorias N*: Exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia e/ou exploração cirúrgica

Categoria M: Exame físico, diagnóstico por imagem e/ ou exploração cirúrgica

Portanto, o carcinoma é classificado segundo grupamento por estádios, mostrado na tabela abaixo (tabela 1). Na tabela 2, um resumo esquemático para decisão de diagnóstico:

Tabela 1: Grupamento por Estádios

Estadiamento	T	N	M
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estádio 0	Tis (<i>in situ</i>)	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: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004

Tabela 2: Resumo Esquemático

Classificação Clínica	Descrição Patológica
TX	Citologia positiva, somente
T1	≤ 3cm
T2	> 3cm, brônquio principal ≥ 2cm da Carina, invade pleura visceral, atelectasia parcial
T3	Parede torácica, diafragma, pericárdio, pleura mediastinal, brônquio parcial < 2cm 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 supraclavicular
M1	Inclui nódulo distinto em lobo diferente

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.

2.4.2 Performance Status

Performance Status (PS) em linhas gerais é uma medida bruta de *status* de funcionalidade do paciente. Mede o impacto dos sintomas tumorais, juntos com outros problemas médicos pré-existentes e comorbidades, sobre as funções cotidianas do paciente e sua habilidade de auto-cuidado. Diversas escalas de PS são disponíveis para uso clínico: dentre elas, as mais comumente usadas são a escala de Karnofsky, criada no início da era da quimioterapia e a escala de PS da *Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status* (ECOG PS), uma escala de 5 pontos (evolução para óbito segue escala crescente de 0 a 5) baseada nos níveis em que os sintomas interferem com as atividades normais e a proporção sobre horas de vigília gastas sobre o leito (Gridelli, et al., 2004).

As escalas abaixo (tabela 3) são usadas por oncologistas e pesquisadores para avaliar como a doença do paciente está progredindo, para avaliar como a doença afeta a qualidade de vida e para determinar apropriado tratamento e prognóstico (Oken, et al., 1982).

Gridelli e colaboradores (2004) salientam em seu estudo que o PS tem se mostrado um parâmetro de prognóstico independente. Em uma série de mais de 5000 pacientes com câncer de pulmão inoperáveis analisados por mais de duas décadas, foi investigado o impacto sobre a sobrevivência de 50 fatores prognósticos, *performance status*, extensão da doença e perda de peso estão entre os mais importantes fatores prognósticos.

Tabela 3: Escalas de Performance Karnofsky e ECOG

Status	Karnofsky	Grau	ECOG
Normal, sem queixas Capaz de conduzir atividades normais, mínimos sinais ou sintomas da doença	100	0	Totalmente ativo, sem restrições
Atividade normal sem esforço	90	1	Atividades físicas pesadas são restritas, mas ainda capaz de conduzir atividades de leves ou naturalmente sedentárias, por exemplo, em escritórios ou trabalho leve em casa
Cuida de si mesmo. Incapaz praticar atividades normais ou trabalhos ativos	80		
Necessita de assistência ocasional, mas ainda consegue realizar a maioria de suas necessidades	70	2	Ambulatorial e capaz de todos os cuidados próprios, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho. Até 50% ou mais de horas de vigília
Requer considerável assistência e cuidados médicos frequentes	60		
Deficiente. Requer cuidados especiais e assistência	50	3	Ambulatorial e capaz de todos os cuidados próprios, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho. Até 50% ou mais de horas de vigília
	40		
	30		
Severa deficiência. Hospitalização indicada embora		4	Completamente deficiente. Não é capaz de cuidados

óbito não iminente				próprios.
Muito doente.	20			Totalmente
Hospitalização necessária.				confinado a cama
Suporte ativo de tratamento.				ou cadeira.
Moribundo	10			
Óbito	0	5		Óbito

Fonte: Oken MM, et al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982, 5:649-655.

Ainda há dúvidas na comunidade científica a respeito de qual escala se adequa melhor as neoplasias pulmonares, em trabalho publicado por Buccheri, Ferrigno e Tamburini (1996), os autores fizeram um comparativo entre as duas escalas a partir de 536 pacientes, onde 45% eram de carcinoma de células escamosas, 16% eram adenocarcinomas, 13% câncer de pequenas células, 6% carcinomas anaplásicos de células grandes e 20% indefinidos ou como carcinomas adenoescamosos e concluíram que Karnofsky mostrou-se menos hábil do que o ECOG para discriminar pacientes com diferentes prognósticos.

Por outro lado, Hollen e colaboradores (2005) avaliaram 75 pacientes diagnosticados com CPNPC e descrevem em sua conclusão que ambos métodos tem alto grau de sensibilidade, entretanto, a maior sensibilidade do KPS indica que este seja a melhor escolha para tomada de decisão e para maior acurácia na identificação patológica.

2.5 TRATAMENTO

Segundo as observações internacionais, as características evolutivas do câncer de pulmão apenas tardiamente levam ao aparecimento de sintomas, conseqüentemente cerca de 2/3 dos pacientes apresentam-se com doença avançada no momento do diagnóstico. Entretanto, no Brasil o quadro é pior, pois em um grupo de pacientes matriculados no INCA, durante um ano, apenas 11% deles eram aptos a receberem tratamento cirúrgico inicial, demonstrando assim a alta morbidade e letalidade desta doença, além de uma dificuldade de acesso ao sistema de saúde, confirmada pelo longo período de tempo transcorrido entre o aparecimento dos sintomas e a apresentação para cuidado no INCA (Cordeiro, 2009).

Basicamente, a cirurgia é o tratamento de escolha para estágios precoces da doença em estágio localizado. Em estágios avançados ou metastáticos, as terapias multimodais permanecem como norma para esse grupo de pacientes, mesmo levando a benefícios paliativos a partir da quimioterapia (Thatcher, 2008).

Historicamente, o uso da quimioterapia paliativa teve início na década de 70, com regimes que não geravam impacto na sobrevida global. Com o surgimento da cisplatina, vários estudos, que comparavam quimioterapia com o melhor suporte clínico, passaram a demonstrar melhora na sobrevida. Pelo menos três metanálises concluíram que a quimioterapia baseada em agentes alquilantes proporciona aumento de sobrevida para pacientes com CPNPC e bom *performance status*. A mais recente avaliou 2714 pacientes em 16 ensaios clínicos e mostrou diferença de 29% versus 20% de sobrevida global em 1 ano.

A combinação de dois agentes quimioterápicos, embora aumente a toxicidade, proporciona maior taxa de resposta e sobrevida, se comparada ao uso de agente isolado (Baldotto, Moreira Júnior, Ferreira, 2009).

Abaixo (tabela 4) é mostrado o tratamento adjuvante segundo o Manual Prático de Oncologia Clínica do Hospital Sírio Libanês (2007) para tratamento de primeira linha:

Tabela 4: Recomendações de Tratamento de Primeira Linha do Hospital Sírio Libanês

Tratamento Adjuvante	Recomendação
Estádios patológicos I a IIIA	Quimioterapia adjuvante para pacientes operados com estágio patológico IB e IIIA, por um total de 4 ciclos, baseada em cisplatina e vinorelbina (cisplatina 50mg/m ² EV D1 e D8 a cada 4 semanas e vinorelbina, 25mg/m ² EV semanalmente). Não há evidências em estudos randomizados que outros esquemas sejam eficazes. Entretanto, em analogia à equivalência dos vários esquemas na doença metastática, podem ser usados: cisplatina, 40mg/m ² EV e gencitabina, 1000mg/m ² Ev durante 30 minutos D1 e D8 a cada 3 semanas; cisplatina, 75mg/m ² EV e docetaxel, 75mg/m ² EV a cada 3 semanas. Discutir individualmente quimioterapia adjuvante para pacientes com estágio patológico IA, quando o tumor tiver diâmetro entre 1 e 3cm.
Estádios clínicos “N2 volumoso” e IIIB (sem derrame pleural ou envolvimento pericárdico)	Pacientes com bom <i>status performance</i> e relativamente jovens: quimioterapia concomitante com radioterapia, seguida de 3 ciclos de quimioterapia de consolidação, após o término da radioterapia. No nosso serviço adotamos o esquema do SWOG S9504, que consiste de cisplatina, 50mg/m ² EV D1, D8, D29 e D36 e etoposida, 50mg/m ² EV D1 a D5

Estádio IIIB com derrame pleural neoplásico ou estágio IV

e D29 a D33 (concomitante à radioterapia 61 Gy), seguido, após 4 a 6 semanas do término da radioterapia, de 3 ciclos de consolidação com docetaxel, $75\text{mg}/\text{m}^2$ EV no ciclo 1, e depois $100\text{mg}/\text{m}^2$ EV nos ciclos 2 e 3 (todos com intervalo de 3 semanas). Pacientes com baixo *status performance* ou idosos: quimioterapia de indução, seguida de radioterapia de consolidação ou radioterapia isolada. Pacientes com bom índice de desempenho (ECOG 0 a 1) e idade < 70 anos. Sugerimos 3 a 4 ciclos de um dos seguintes regimes: cisplatina, $75\text{mg}/\text{m}^2$ EV em 3 horas D1 e gencitabina, $1000\text{mg}/\text{m}^2$ EV em 30 minutos D1 e D8 a cada 3 semanas; cisplatina, $75\text{mg}/\text{m}^2$ EV em 3 horas e docetaxel, $75\text{mg}/\text{m}^2$ EV D1 a cada 3 semanas; carboplatina, AUC 6 EV D1 e paclitaxel, $225\text{mg}/\text{m}^2$ EV em 3 horas D1 a cada 3 semanas; ou carboplatina, AUC 6 EV D1 e docetaxel, $75\text{mg}/\text{m}^2$ EV D1 a cada 3 semanas. Se possível, adicionar bevacizumabe, $15\text{mg}/\text{m}^2$ EV, a cada 3 semanas, a um dos esquemas de quimioterapia de primeira linha aos pacientes sem hemoptise, sem evidência de metástase cerebral e com tipo não-escamoso (embora tenha sido originalmente estudado em combinação com carboplatina e paclitaxel).

Pacientes com baixo índice de desempenho, idade superior a 70 anos ou contra-indicação para o uso de análogos da platina

Quimioterapia com agente isolado ou combinações sem cisplatina. Os agentes e esquemas mais frequentemente utilizados são: docetaxel, 60mg/m² EV a cada 3 semanas, gencitabina, 1000 a 1250mg/m² EV nos D1, D8 e D15 a cada 28 dias; vinorelbina, 25 a 30mg/m² /semana EV; vinorelbina, 25 a 30mg/m² EV, seguida de gencitabina, 1000 a 1200mg/m² EV nos D1 e D8 a cada 21 dias ou vinorelbina, 20mg/m² EV, seguida de gencitabina, 800mg/m² EV nos D1, D8 e D15 a cada 4 semanas; carboplatina, AUC 6 EV e paclitaxel, 225mg/m² EV a cada 3 semanas (sugerimos o uso de G-CSF nesta combinação); carboplatina, AUC 2 e paclitaxel, 80mg/m² EV D1, D8 e D15 a cada 4 semanas

Fonte: Buzaid e Hoff, 2007, p54-57-59-62.

2.5.1 Tratamento de Segunda e Terceira Linhas

Atualmente, três drogas são aprovadas para tratamento, após falha da terapia de primeira linha: dois quimioterápicos e um agente com alvo molecular. O docetaxel (na dose de 75 mg/m²) foi a primeira droga a mostrar ganho de sobrevida. Em seguida, o pemetrexede foi aprovado, com resultados de sobrevida não inferiores ao docetaxel e melhor perfil de toxicidade. Análises retrospectivas destes estudos também sugerem maior benefício para adenocarcinoma com o uso do pemetrexede. A última droga, o erlotinibe (inibidor do fator de crescimento epidérmico, com atividade anti tirosina quinase) também é aprovada como terceira linha. O estudo do erlotinibe trazia o dado de que esta droga teria maior atividade no subgrupo de mulheres com

adenocarcinoma (principalmente tipo bronquioloalveolar), não-fumantes e asiáticas. No último Congresso da ASCO, foi apresentado o estudo asiático IPASS, que usou o gefitinibe (droga com mecanismo de ação semelhante ao erlotinibe) em primeira linha, somente em mulheres não-fumantes, comparada a quimioterapia. O dado interessante foi que o fenótipo não parece ser o mais importante. A presença de mutações específicas no gene do EGFR (que são mais prevalentes nesta população) foi o fator determinante para resultados superiores com o uso do gefitinibe. Embora os números relativos à sobrevida dos pacientes com CPNPC ainda sejam desapontadores, a quantidade de pesquisas é crescente. Os dados recentes, sugerindo a possibilidade de direcionar a terapia a características moleculares específicas, são encorajadores (Baldotto, Moreira Júnior, Ferreira, 2009).

Dentro dessa pesquisa molecular, a cofilina está sendo largamente estudada por diversos pesquisadores, sugerindo que sua desregulação interage com actinas subjacentes a deficiência imune que ocorre em neoplasias (Bernstein e Bamburg, 2010). É uma das mais abundantes e conservadas proteínas eucarióticas, envolvida em uma variedade de funções celulares, ligadas a divisão celular e migração para transporte intracelular além de endo e exocitose (Kudryashov, et al., 2010).

Estudos sugerem que a produção e liberação de peróxido proveniente dos macrófagos seja intensa o bastante para oxidar cofilina nas células T; essa oxidação significativamente aumenta os níveis de actina-F (actina filamentosa), reduzindo motilidade a qual é, provavelmente, a base para a supressão da resposta do sistema imune associada ao câncer (Bernstein e Bamburg, 2010).

A tabela abaixo (tabela 5) colabora com os dados supracitados, mostrando resultados desapontadores frente ao tratamento quimioterápico direcionado a esses pacientes. Tratamento este que é dependente do tipo de câncer e de seu estágio, da possibilidade de intervenção cirúrgica ou ainda da terapia radioativa, quimioterapia ou terapias com alvos biológicos (Visvanathan, et al., 2009).

Tabela 5: Resposta ao tratamento quimioterápico associado no câncer de não-pequenas células

Tratamento Quimioterápico em pacientes com CPNPC	
Taxa de Regressão Geral	40-60%
Taxa de Regressão Total	5%

Fonte (adaptado): Braunwald, et al. Harrison: Tratado de Medicina Interna, pg. 597

Dessa forma, cada vez mais torna-se aparente a necessidade de se padronizar uma técnica que possa colaborar com diagnóstico precoce e decisão terapêutica, tendo em vista as dúvidas existentes na literatura quanto a melhor forma de diagnóstico, dificuldades no tratamento somada ao mal prognóstico da doença.

2.6 BIOMARCADORES

Como já citado, o CPNPC é altamente letal e possui baixa sobrevida, dessa forma, há uma urgente necessidade para terapias mais efetivas, drogas ou tratamentos que possam colaborar com a diminuição da incidência dessa neoplasia. Como alternativa, biomarcadores proporcionam boas orientações em diversas áreas na biologia do câncer. Ao contrário da uniformidade do

sistema TNM, biomarcadores são considerados mais adequados para cânceres de natureza heterogênea (Müller, et al., 2010). Biomarcadores podem ser usados para prognóstico, para predição do curso natural do tumor, indicando bom ou mal prognóstico ao paciente (Müller, et al., 2010). Também podem ser usados na predição, ajudando na decisão terapêutica de qual droga e dose será mais efetiva. Um biomarcador para CPNPC poderia providenciar potenciais benefícios em estágio precoce, considerando que essa doença é normalmente detectada em estágio avançado onde a remoção cirúrgica do tumor deixou de ser uma opção, e adicionalmente, poderia levar a outras importantes aplicações como prognóstico e decisão terapêutica (Müller, et al., 2010).

Análises sistemáticas de bancos de expressão gênica usando bibliotecas de microarranjo de cDNA têm sido consideradas como uma efetiva abordagem para identificação e validação de potenciais biomarcadores para CPNPC. Entretanto, a validação final deve ser feita por uma coleção de testes com amostras clínicas bem definidas. Dessa forma, nosso grupo descreveu recentemente uma ferramenta de bioinformática baseada em metanálise de dados de uma coorte clínica (*Duke cohort*) para testar e validar o valor prognóstico de potenciais biomarcadores propostos pela comunidade científica para CPNPC (Müller, et al., 2010). Nosso enfoque correlaciona dados coletados a partir da literatura com dados de expressão gênica de uma grande coleção de biópsias de CPNPC contendo informações sobre *status* clínico do paciente e patologia. Validações por triagem clínica em uma grande coorte de pacientes é necessária antes de relacionar fenótipos relacionados ao câncer,

os quais possam ser transpostos para a prática clínica como confiáveis biomarcadores (Müller, et al., 2010).

Em nossa pesquisa, feita a partir da base de dados PubMed, entre janeiro de 1985 a dezembro de 2008 com artigos publicados em língua inglesa, utilizando termos como “biomarker”, “prognosis”, “gene expression” e “lung cancer”, encontramos um total de 60 biomarcadores testados (Müller, et al., 2010).

Em resumo, a partir de uma coorte acompanhada por um período de 72 meses, totalizando 111 pacientes obtidos a partir da base de dados GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>; Series GSE3141) e a partir do Duke Institute for Genome Sciences & Policy website (<http://data.cgt.duke.edu/oncogene.php>) nossa pesquisa descreve uma confiável ferramenta disponível para discriminar a performance de biomarcadores; do mesmo modo, revela que nenhum dos 60 genes individualmente testados mostraram poder suficientemente estatístico para ser, seguramente, incluído na prática clínica, quando comparado ao sistema TNM, o qual é considerado padrão-ouro na medicina.

Desse modo, a pesquisa deve fortalecer o desenvolvimento de novos biomarcadores, porque desde o presente momento, não há ainda um biomarcador prognóstico (baseado na expressão gênica) disponível para CPNPC (Müller, et al., 2010).

2.6.1 Cofilina

A dinâmica dos filamentos de actina é essencial para várias atividades celulares, incluindo migração celular, trocas morfológicas e formação de polaridade. Esses eventos são regulados por uma variedade de proteínas ligadas à actina, as quais agem cooperativamente na montagem/desmontagem e reorganização dos filamentos de actina nas células (Kiuchi, et al., 2007).

A cofilina é uma proteína citosólica de 18 kDa, expressa em todos os tipos celulares humanos, descrita como responsável pelo controle da dinâmica de polimerização dos filamentos de actina, sendo assim considerada fator principal na rota de migração e invasividade tumoral (Wang, et al., 2006).

Existem duas isoformas de cofilina, a cofilina-1 (*CFL1*, *cofilina não-muscular* ou *cofilina-n*) e a cofilina-2 (*CFL2*, *cofilina muscular* ou *cofilina-m*). Durante o desenvolvimento, a isoforma predominante é a *CFL1*, que se mantém amplamente expressa na maioria dos tecidos adultos (Müller, 2010). Mesmo que a superexpressão de *CFL1* esteja correlacionada com agressividade em tumores mamários, seu papel como biomarcador molecular em câncer de pulmão de células não-pequenas ainda não foi sugerido (Wang, et al., 2006).

A chave do mecanismo para a regulação da cofilina envolve a fosforilação e desfosforilação do resíduo Ser 3; cofilina é inibida pela fosforilação e translocada para mitocôndria apenas na forma desfosforilada (inativa) (Klamt, et al., 2009). Esse mecanismo regulatório pode ser feito através de diferentes efetores; LIMK 1 e 2, TESK- 1 e 2 quinases que

fosforilam a cofilina no resíduo 3 da serina, conferindo sua inativação (Sidani, et al., 2007).

Cofilina é um substrato de LIMK1, e está diretamente responsável pela regulação da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina durante migração celular, sendo requerida para motilidade celular; quando seus níveis expressados são reduzidos, correlaciona-se com a inibição da locomoção, enquanto que o aumento de sua expressão correlaciona-se com reforçada motilidade (Wang, et al., 2006) (Figura 2).

Interessantemente, a cofilina é um dos efetores da rota de sinalização ativada pela estimulação ao EGFR, sendo este receptor um dos principais alvos terapêuticos de drogas de uso no tratamento de CPNPC (Wang et al., 2007; Linardou et al., 2009; Hirsch, 2009; Rosel et al., 2008).

Portanto, a cofilina é indiscutivelmente a chave efetora na via que determina a migração e invasão celular, enquanto que LIMK1 deve apenas servir como um modulador dos níveis de sua atividade (Wang, et al., 2006).

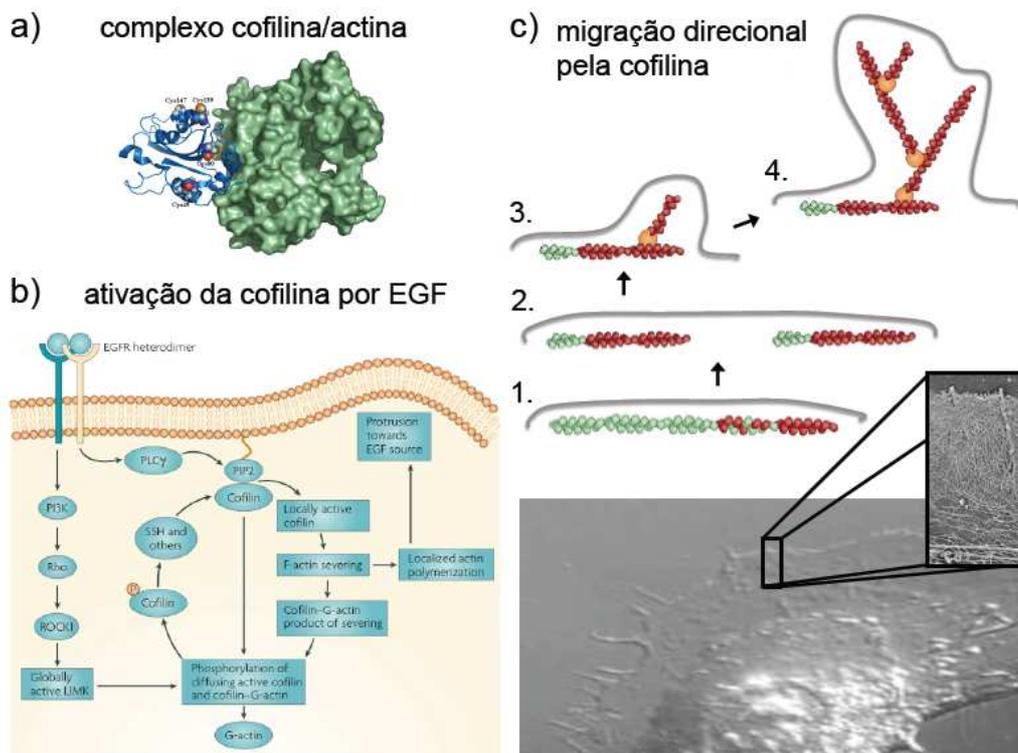


Figura 2: Mecanismo de ação da proteína cofilina. (a) Interação entre a proteína cofilina (azul) com a actina monomérica (actina G) (verde) (imagem cedida pelo Prof. Dr. Hugo Verli/UFRGS). (b) A rota de sinalização da cofilina em resposta a estimulação do receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR). Repare a ativação local da cofilina (defosforilação e liberação da âncora de fosfatidil-inositol bi-fosfato), levando a modulação do citoesqueleto de actina (adaptado de Wang et al., 2007). (c) Imagem de microscopia de contraste de fase de uma célula em cultivo, destacando a presença do citoesqueleto de actina (no detalhe em microscopia eletrônica) na periferia onde, uma vez ativada, a cofilina induz quebra do filamento de actina (1-2), e a rápida e direcional repolimerização dos filamentos (3-4), levando a expansão da membrana plasmática e a migração celular.

O fator de despolimerização da actina (ADF)/cofilina é uma família ubiquamente presente em todos os eucariontes e envolvida em vários processos celulares que dependem das dinâmicas de actina (Figura 2A). Em células não musculares, 2 isoformas são expressas: cofilina-1 e ADF. ADF/cofilina são moduladores multipotentes de actina. Eles interagem com actinas monoméricas (G) e filamentosas (F) e são reportadas para nucleação, separação e despolimerização de filamentos (Leyman, et al., 2009).

Sua ativação local causa polimerização local da actina e, conseqüentemente, a protusão da membrana celular. Sob estímulo de EGF (Figura 2B), células cancerosas formam protusões celulares críticas para a quimiotaxia, como lamelipódios e invadopódios. Essas alterações na morfologia da célula são, assim, diretamente dirigidas pela reestruturação da rede de actina do citoesqueleto celular, regulada pela cofilina (Müller, 2010).

Essa migração celular (Figura 2C) é importante na fisiologia normal e na doença. A aquisição da habilidade migratória por células cancerígenas é uma característica que contribui para a propagação de tumores celulares metastáticos a órgãos distantes (Meira, et al., 2009).

Resultados prévios de nosso grupo mostram que os níveis de expressão de cofilina têm correlação direta com a sobrevida dos pacientes em estágios precoces da doença, onde, maiores níveis de expressão indicam pior prognóstico, ou seja, pacientes que possuem maior conteúdo de cofilina (upper 50), apresentam menor sobrevida, caracterizando pior prognóstico. Colaborando com esses dados, nossas pesquisas indicam que a cofilina pode estar relacionada a agressividade tumoral, para tanto, realizamos ensaios *in vitro*, determinando a concentração de droga que inibe 50% do crescimento celular a partir de 6 linhagens tumorais de CPNPC em humanos (H-460, HOP-92, H-23, A549, H-226 e EKVX, que apresentavam, nesta ordem, uma variação de níveis de expressão do gene *CFL1* e, conseqüentemente, de conteúdo de cofilina). Esses testes demonstraram que as linhagens que apresentavam maior conteúdo de cofilina, quando comparadas dentro de seus grupos histológicos, tinham maior poder invasivo e eram mais resistentes aos quimioterápicos (Castro, et al., 2010).

Colaborando com o supracitado, nosso grupo verificou, através da bioinformática, que os níveis de expressão do gene *CFL1* podem ser utilizados como biomarcador preditivo quanto ao desfecho de pacientes com câncer de pulmão de não-pequenas células, onde pacientes que possuem alto nível de expressão de *CFL1* apresentaram significativa ($p < 0.01$) diminuição na sua sobrevida (mal prognóstico) (Castro, et al., 2010). Baseado nestes dados nós encaminhamos à Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico - SEDETEC/UFRGS em 12 de dezembro de 2007 (protocolo número 23078.033441/07-01) os documentos a fim de dar início a avaliação de pertinência do pedido de depósito da Patente de invenção denominada “MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO E/OU PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE PULMÃO”, de autoria de nosso grupo de pesquisa, sendo portanto os demais resultados sigilosos.

Embora promissora, os presentes resultados foram obtidos analisando-se os níveis de expressão gênica de *CFL1* pela ferramenta de bibliotecas de cDNA, o que limita a sua aplicação clínica. A padronização e utilização de técnicas de rotina em serviços de patologia, como a imunohistoquímica aumentaria a aplicabilidade desse biomarcador, tornando-se uma ferramenta de baixo custo e de grande acessibilidade para decisão terapêutica não apenas em grandes centros, como o HCPA, mas também em localidades mais distantes dos grandes centros do país.

2.7 IMUNOISTOQUÍMICA

Imunoistoquímica é uma técnica que não apenas garante a detecção de antígenos, mas também assegura a determinação de sua localização morfológica e suas relações espaciais entre diferentes antígenos (Honig, et al., 2005).

Análise imunoistoquímica de expressão gênica é padrão para câncer de pulmão de não-pequenas células e pode informar importantes dados relacionados com o curso biológico da doença. Esses marcadores podem providenciar informações da atividade proliferativa, potencial metastático, resposta a quimioterapia e prognóstico do paciente (Hilbe, et al., 2003). Além disso, a identificação de marcadores específicos tumorais pode colaborar com desenvolvimento de novos diagnósticos e potencializar estratégias terapêuticas. Comparando com outros métodos, a análise imunoistoquímica é largamente utilizada, pelo fato de ser uma técnica de fácil confecção em qualquer laboratório com o mínimo de equipamentos e dessa forma, tornando-se uma ferramenta valiosa para aplicação na rotia diagnóstica (Hilbe, et al., 2003). Esta técnica para avaliação da expressão de antígenos é uma metodologia de alta resolução para análise citogenética de procedimentos padronizados para diagnóstico e prognóstico de cânceres e outras doenças (Pham, et al., 2007).

A técnica compreende duas fases: (1) preparação de slides e estágios envolvidos para a reação; (2) interpretação e quantificação da expressão obtida (Matos, et al., 2010).

Segundo Capelozzi (2009), a imunoistoquímica representa uma ferramenta que pode providenciar uma clara distinção entre os vários tipos de carcinomas pulmonares colaborando com a identificação dos diferentes tipos histológicos e importantes fatores prognósticos os quais colaboram para tomada de decisão na seleção dos pacientes para receberem tratamento apropriado, além disso, ajudando na identificação de tumores com maior risco de recorrência.

Como técnicas de quantificação por imunoistoquímica são amplamente utilizadas e bem estabelecidas, seria de grande interesse para a oncologia clínica a possibilidade de validação do papel preditivo do gene *CFL1* quanto ao desfecho de pacientes, através da quantificação do seu imunoconteúdo. Importante ressaltar que nosso grupo de pesquisa já padronizou a técnica de imunoistoquímica para a proteína cofilina e que nossos resultados preliminares sugerem uma reatividade positiva apenas no tecido tumoral.

3. OBJETIVOS

- Analisar o banco de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e desenvolver uma coorte retrospectiva de casos diagnosticados de CPNPC com cinco anos de acompanhamento dos pacientes além de outras informações relevantes como idade, sexo, tipo histológico, estadiamento clínico, e grau de diferenciação;
- Padronizar as condições experimentais adequadas para a detecção do imunocontéudo da proteína cofilina 1 pela técnica de imunoistoquímica em CPNPC;
- Avaliar o imunocontéudo da proteína cofilina em peças histológicas de carcinomas de pulmão de não-pequenas células provenientes do serviço de patologia do HCPA através de estudo imunoistoquímico e compará-los com o parênquima pulmonar circunjacente não-tumoral;
- Quantificar o imunocontéudo da proteína cofilina presente em estudo imunoistoquímico de carcinomas de não-pequenas células do pulmão através de método semiquantitativo digital assistido por computador;
- Avaliar as possíveis correlações (cofilina/sobrevida; cofilina/estadiamento) pela análise do prontuário dos pacientes, verificar se é possível correlacionar os valores obtidos pela análise semiquantitativa do imunocontéudo da proteína cofilina com o desfecho do paciente, através de curva de sobrevida tipo Kaplan-Meier.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo confeccionado segundo as normas do periódico *Journal of Clinical Oncology*, como um “Original Report” para sessão “Translational Oncology”.

**SEMI-QUANTITATIVE IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF COFILIN IN TUMOR
BIOPSIES AND IT APPLICATION AS A PROGNOSTIC BIOMARKER IN
NONSMALL CELL LUNG CANCER**

Rafael L. S. de Barros^{1,2}; Carolina B. Müller^{1,2}; Mauro A. A. Castro¹; Rosalva T. Meurer³; Fernanda M. Lopes^{1,2}; Adriana Roehe³; Guilherme Mazzini¹; Felipe Dal-Pizzol⁴; Marilda C. Fernandes³; Léder L. Xavier⁵; José C. F. Moreira¹; Fábio Klamt^{1,2,*}.

¹Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, Porto Alegre (RS) 90035-003, Brazil;

²National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre/RS, Brazil;

³Laboratory of Pathology Research, UFCSPA, Porto Alegre (RS) 90050-170, Brazil;

⁴Laboratory of Experimental Physiopathology, UNESC, Criciúma (SC) 88806-000,

Brazil; ⁵Department of Morphological and Physiological Sciences, PUCRS, Porto Alegre (RS) 90619-900, Brazil.

*Correspondence to: Prof. Fábio Klamt, Ph.D. Department of Biochemistry, ICBS/Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2600 Ramiro Barcelos St., Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil. Phone: +55 51 3308-5577; Fax: +55 51 3308-5535; e-mail: 00025267@ufrgs.br

ABSTRACT

Purpose

Nonsmall cell lung cancer (NSCLC) is a major public health problem worldwide. Previously we found that *CFL1* (cofilin-1) mRNA levels can be used as a prognostic biomarker in NSCLC tumor biopsies. In this study, we established and optimized a simple semi-quantitative immunohistochemistry (SQ-IHC) method for cofilin quantification in tumor biopsies and applied it in a retrospective cohort of NSCLC patients, to exploit prognostic role.

Patient and Methods

We accessed a well-defined archival collection of tumor samples from 50 patients with relevant clinicopathologic information and 5 years follow-up. Immunohistochemistry and semi-quantitative analysis of cofilin were performed blinded to clinical outcome. Association between cofilin immunocontent and clinical outcome was assessed using standard Kaplan-Meier mortality curves and the log-rank test. Patients were clustered according to either biomarker expression level or NSCLC stage grouping.

Results

Cofilin immunocontent (in optical densities) in tumor biopsies was able to discriminate between good and bad prognosis, where high cofilin levels are correlated with lower overall survival rate ($P < .05$).

Conclusions

A simple semi-quantitative immunohistochemical method has been developed for quantitative evaluation of cofilin in NSCLC. Our method showed good sensitivity/specificity to indicate the outcome of patients and should be further employed in a prospective, large-scale, randomized clinical trial to establish the prognostic value of cofilin immunocontent in NSCLC.

Keywords: prognosis, biomarker, lung cancer, nonsmall cell lung cancer, cofilin, immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Lung cancer is the most frequently diagnosed cancer and the most common cause of cancer mortality worldwide¹, corresponding alone in mortality to all other major types of cancer such as colon, prostate, and breast cancers. Although it is the most easily preventable type of cancer, since smoking accounts approximately 90% of cases, it presents itself as the most difficult to cure, due to the later stage of presenting symptoms, the high presence of metastasis and the development of chemotherapy resistance². Approximately 85% of lung cancer cases are non-small cell lung cancers (NSCLC).

Currently, decisions about prognosis and treatment of NSCLC are still based almost exclusively on patient performance status and the anatomical extent of disease, being considered the gold standard among health professionals³. However, accumulating data have shown that these have unsatisfactory power in predicting patient outcome or in guiding physicians on the best course of action for each patient.⁴ Advances in molecular pathology underwent to the development of an impressive number of biomarkers that can provide important information about cancer heterogeneity and could have important applications such as prediction and planning of the treatment; however none are in use in clinics.⁵

Cofilin (*CFL1* gene product; cofilin-1, non-muscle isoform; Gene ID: 1072) is one of the major proteins responsible for cell migration processes⁶ and apoptosis induced by oxidants.⁷ Under EGF (Endothelial Growth Factor) stimulation, cancer cells use cofilin to locally restructure the actin cytoskeleton network, leading to normal cell migration and tumor invasion. Cofilin is overexpressed in the highly invasive C6 rat glioblastoma cell line, A549 human lung cancer cells and human pancreatic cancer

cells. The spontaneous overexpression of cofilin can also be detected in invasive sub-populations of breast tumor cells in rats, as well as in biopsies of oral, renal and ovarian carcinoma⁶. Based on this biological information, we recently described, using two independent clinical cohorts, that *CFL1* levels in NSCLC biopsies can discriminate between good and bad prognosis, where high *CFL1* levels are correlated with lower overall survival rate and resistance to several alkylating drugs.⁸ Even though promising, these findings were obtained based on high throughput microarray data analysis of tumor biopsies, which limits a more broad application in health services.

In contrast, immunohistochemistry (IHC) is a standard procedure widely used for diagnosis and prognosis of cancer and other diseases in hospital services. In surgical pathology, is used both as a diagnostic tool to differentiate malignant from benign tissue, as a prognostic tool to study the presence of molecules involved in tumor aggressiveness. More than identifying the presence or absence of a biomarker, immunohistochemistry can be used to quantify its expression⁹. Unfortunately, abundances of antigens have so far relied primarily on visual scoring. The combination of IHC with computer-assisted image processing techniques potentially decreases the effects of observer biases and increases the sensitivity and the throughput of IHC as a tissue-based procedure for the evaluation and quantification of biomarkers.

Aiming to pursuit use of cofilin levels as a potential biomarker for NSCLC, we established and optimized the experimental conditions for a semi-quantitative immunohistochemistry (SQ-IHC) analysis of cofilin in NSCLC biopsies and evaluated the correlation of cofilin levels – as optical densities (OD) – and patient outcome, using clinical data from a homogeneous and well-defined retrospective cohort of NSCLC cases.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The study was performed with archival specimens from the Pathology Service at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) in Porto Alegre, Brazil. The type and grade of disease were derived from these records, reviewed for the blocks studied and classified by two independent pathologists according to World Health Organization criteria. The study subjects consisted of 50 sequential patients seen between 2003 and 2005. Relevant clinical and pathologic information such as age, sex, cancer histological type, and NSCLC staging are presented in table 1. The research programme, including studies on archival and stored materials, was approved by the Research Ethics Committee of the HCPA.

Semi-Quantitative immunohistochemistry staining

The corresponding archived paraffin-embedded specimens were sectioned into 4 µm slices, deparaffinized and antigen retrieval was performed in a water bath for 30 minutes with sodium citrate buffer (pH 6.0). Endogenous peroxidases were blocked with 5% hydrogen peroxide in methanol. For nonspecific background staining, slides were incubated for one hour with 1% bovine serum albumin (BSA)(Sigma®) in PBS. Rabbit polyclonal anti-cofilin primary antibody (ab42823) (Abcam®)(diluted 1:200 in 1% BSA) was incubated overnight at 4°C. After incubation, HRP-labeled polymer conjugated (Invitrogen®) was added and incubated for 45 minutes, rinsed, exposed to a solution of diaminobenzidine (0,06%) for 5 minutes and then rinsed in running water. Next, they were dehydrated with alcohol, cleared in xylene and mounted. Negative controls were obtained performing the same protocol above described, with the omission of primary antibody, representing in optical density (OD) measurements the background staining value¹⁰. The brownish-color was considered to be a positive

expression of cofilin in cells (Figure 1). The intensity of cofilin IHC reaction was quantitatively measured using a Zeiss® Imager AI (200X) microscope coupled to Image Pro Plus® Software 6.1. For each case, at least 5 images were analyzed. Images were converted to gray scale 8, and the OD generated by the immunoreaction was measured in equidistant areas of interest (AOI).¹¹ Immunoreactivity was based in the Beer-Lambert Law and the OD was calculated using the following formula: $A(x,y) = -\log \left[\frac{\text{intensity}(x,y) - \text{black}}{\text{incident} - \text{black}} \right]$, where: A is absorbance, intensity (x,y) is the intensity at pixel (x,y), black is the intensity generated when no light goes through the material, and incident is the intensity of the incident light. Additionally, to reduce the time required to perform OD measurements, some macros were created using Auto Pro Language.

Survival data analysis

Standard Kaplan-Meier mortality curves and their significance levels were generated for clusters of patients using SPSS software (SPSS for Windows, release 14.0.0, SPSS Inc., Chicago, Ill). The survival curves are compared using the log-rank test, and patients are clustered according to either biomarker expression level or NSCLC stage grouping.

RESULTS

In this study, we established and optimized the experimental conditions for a semi-quantitative immunohistochemistry (SQ-IHC) analysis of cofilin in NSCLC biopsies. This is the first description of SQ-IHC evaluation of cofilin using optical densitometry. Using the SQ-IHC protocol described here, we found different cofilin amount in each tumor case (Figure 1) and evaluated the correlation of cofilin levels –

as optical densities (OD) – and patient outcome, using clinical data from a homogeneous and well-defined retrospective cohort of NSCLC cases. Based on the stratification of patients by tumor stages (IA-IIIB, IIIA-IIIB and IV) and following the cumulative survival for 5 years, we found that our cohort is well equilibrated and represent the natural course of disease (Figure 2A). Data on cofilin levels and patient information such as age, sex, cancer histological type, and NSCLC staging were considered (cohort description can be found in Table 1). Kaplan-Meier estimates of patient cumulative survival by time (months) according to the immunocontent of cofilin showed that when patients are grouped by cofilin level (upper fifth vs lower fifth of optical density values), the expression levels can be used to discriminate patients between good or bad outcome (Fig. 2B). The data presented in Figure 2 suggest that the semiquantitative immunohistochemistry protocol described here for cofilin can be used to predict patient outcome.

DISCUSSION

Nonsmall cell lung cancer (NSCLC) is the major determinant of overall cancer mortality worldwide. Despite progress in molecular research current treatments offer limited benefits. A biomarker for NSCLC could provide the potential benefits of early diagnosis, prognosis and could lead to important applications such as drug targeting. In 2008, Sawyers discussed the three types of cancer biomarkers. These can be used for prognosis, to predict the natural course of a tumor, indicating whether the outcome for the patient is likely to be good or poor. They can also be used in prediction, helping to decide which patients are likely to respond to a given drug and at what dose it might be most effective¹³. A biomarker for NSCLC could provide the potential benefits of early diagnosis, considering that the disease is usually detected in late stages when surgical removal of the tumor is no longer an option, and additionally, could lead to other

important applications such as prognosis and drug targeting¹⁴. An impressive number of molecular markers have been implicated in the prognosis of NSCLC; however, the results reported in literature are conflicting and none are in use in clinics. Thus, further investigation, newer molecular assays and the development of appropriate panel of molecular markers are still required¹⁵.

In research on the pathogenesis and treatment of lung tumors, it is increasingly acknowledged that tissue specimens as obtained from biopsy specimens or resection material can provide valuable data for both hypotheses-generation and hypothesis-testing for the clinical validation of potential biomarkers.

The growing application (e.g. immunohistochemistry and *in situ* hybridization) in histological sections of bronchial or parenchymal tissue requires carefully validated, quantitative analysis. At present, there are multiple options, varying between traditional manual counting to digital image analysis systems. Traditional techniques for image analysis include the quite laborious – but validated – manual scoring using the semi-quantitative approach using a score ranging from 0 (no staining) to, for example, 4 (very intense staining), which is widely used by pathologists. In order to obtain more objective, informative and easier measurements as well as more easily accessible archives, video-assisted digital image analysis techniques have been introduced during the past decade.

Previously, we proposed the use of *CFL1* gene expression levels as a prognostic and predictive NSCLC biomarker based on the following findings: 1) *CFL1* mRNA levels are highly sensitive and specific in discriminating between good and bad patient outcome in 2 independent cohorts—specially in early stage disease—where tumors with low expression of the *CFL1* gene are associated with high overall survival; 2) an association exists between cofilin immunocontent and tumor invasion; 3) cells with high cofilin mRNA and protein levels are resistant to alkylating drug treatment⁸. Here we

established a SQ-IHC method to detect and quantify cofilin immunoccontent in tumor biopsies, aiming to evaluate the potential prognostic role of cofilin in NSCLC based on a more a standard procedure widely used for diagnosis and prognosis of cancer and other diseases in hospital services. So, this approach can be used to confirm, using SQ-IHC, the relationship between cofilin amount and tumor aggressiveness, as previously shown by our group using microarray data⁸.

Our SQ-IHC protocol could also resolve disagreement between two observers about the quality of staining intensity, providing a numerical value for each individual case and, thus, potentially increases the diagnostic and, above all, prognostic sensitivity of this IHC analysis. Moreover, the highest immunoreactivities among all biopsies were found in poor differentiated adeno and squamous cells carcinomas cases, which typically represent a more aggressive type of tumor (data not shown). OD analysis of macrophages showed that these cells present the highest degree of cofilin among all cases (Figure 1A, arrow). Macrophages are high mobile cells and, therefore, presenting large amounts of cofilin, since its reduced expression levels correlate with the inhibition of locomotion, whereas increased expression levels correlate with enhanced motility⁸.

In summary, the optimization protocol for SQ-IHC of cofilin in NSCLC biopsies described here enables its implementation to perform correlation studies (*i.e.*: cofilin amount vs patient outcome; histological type and/or tumor differentiation status), which may validate the role of cofilin as a prognostic biomarker in NSCLC. Our findings have clear implications for NSCLC management and therapy, as cofilin levels can be used to indicate which patients should receive a more aggressive therapy in an attempt to reverse the poor prognosis. The refinement of patient stratification with the use of SQ-IHC of cofilin provides the opportunity to design a prospective, large-scale, randomized clinical trial that would evaluate these ideas.

FUNDINGS

This work was supported by Brazilian MCT/CNPq Universal funds (No. 479860/2006-8 & 476114/2008-0) and MCT/CNPq INCT-TM (No. 573671/2008-7) fund. C.B.M. was supported by training grant from FAPERGS (No. 08511895) and F.K. received a fellowship from MCT/CNPq (No. 303613/2008-4).

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors claim for a Patent deposit (INPI #PI0802917-2 A2) related to a Prognostic kit for lung cancer based on the levels of *CFL1* gene in tumor biopsies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Fábio Klamt, José C. F. Moreira, Mauro A. A. Castro.

Collection and assembly of data: Rafael L. S. de Barros, Carolina B. Müller, Rosalva T. Meurer, Fernanda M. Lopes, Guilherme Mazzini, Marilda C. Fernandes.

Data analysis and interpretation: Felipe Dal-Pizzol, Mauro A. A. Castro, Fábio Klamt, Adriana Roehe, Léder L. Xavier.

Manuscript writing: Fábio Klamt.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 59; 1-25, 2009.
2. Breen D, Barlési F, Zermeli M, et al. Results and impact of routine assessment of comorbidity in elderly patients with non-small-cell lung cancer aged > 80 years. *Clin Lung Cancer.*8(5):331-334, 2007.
3. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 111:1710-1717,1997.
4. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nat. Rev. Cancer.*; 5; 845-856, 2005.
5. Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Rep.*41: 615-625, 2008.
6. Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.*7: 429-440, 2007.
7. Klamt F, Zdanov S, Levine RL et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat. Cell Biol.* 11:1241-1246, 2009.
8. Castro M, Dal-Pizzol F, Zdanov S et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in non-small cell lung cancer. *Cancer* .116;3645-3655, 2010
9. Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, et al. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics.*61(5): 417-424, 2006.
10. Müller C B, de Barros RLS, Moreira J C F, Klamt F. Bioinformatics Approach for the Clinical Validation of Potential Non-Small Cell Lung Cancer Prognostic Biomarkers. *Frontiers in Bioscience.* 2010 (IN Press).

11. Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC et al. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain. Res. Protoc.* 16; 58-64, 2005.
12. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature.* 452(7187):548-52, 2008.
13. Chi-Shing CW. Potentially useful biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 61(9): 515-9, 2007.
14. Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 34: 53-8, 2001
15. Honig A, Rieger L, Kapp M, Dietl J, Kämmerer U. Immunohistochemistry in human placental tissue-pitfalls of antigen detection. *J Histochem Cytochem.*53:1413-1420, 2005

Table 1: Epidemiological and Clinical Characteristics of the NSCLC Cohort.

Characteristic	Cofilin Immunocontent	
	Low	High
Cohort, n=50	25 (50%)	25 (50%)
Age, years	61.36 ± 11.67	63.58 ± 9.54
Sex		
Men	14 (56%)	17 (68%)
Women	11 (44%)	8 (32%)
Tumor type		
Adenocarcinoma	11 (44%)	19 (76%)
Squamous cell	12 (48%)	3 (12%)
Large Cell	1 (4%)	2 (8%)
Undetermined	1 (4%)	1 (4%)
Tumor Stage (TNM)		
IA/IB – IIA/IIB	11 (44%)	5 (20%)
IIIA/IIIB	8 (32%)	3 (12%)
IV	4 (16%)	16 (64%)
Undetermined	2 (8%)	1 (4%)

FIGURE LEGEND**Fig. 1: Semi Quantitative Immunohistochemistry of cofilin in NSCLC biopsies**

and its quantification by optical density. (A) The healthy human alveolar tissue obtained from free resection margins of biopsies represents the basal levels of cofilin, and macrophages were considered positive controls (1000X magnification). (B) Representative cofilin immunohistochemistry stain and the tumor optical density (OD) values are presented (400X magnification).

Fig. 2: Prognostic value of cofilin immunocontent in Nonsmall Cell Lung Cancer

cohort. (A) Cohort data grouped according to the International Staging System for Lung Cancer and plotted as survival probabilities using the Kaplan-Meier method. Red line represent patient in early tumor stages (IA-IIIB); gray line represent patient in stages IIIA-IIIIB and black line represent patients in late tumor stage (IV). (B) Cohort data grouped according cofilin immunocontent, as optical density values (OD) (*ie*, upper fifth vs lower fifth). Black lines represent patients with low cofilin immunocontent; red lines indicate high cofilin immunocontent. Differences in survival rates were assessed with the log-rank test. *P* value <.05 was considered significant.

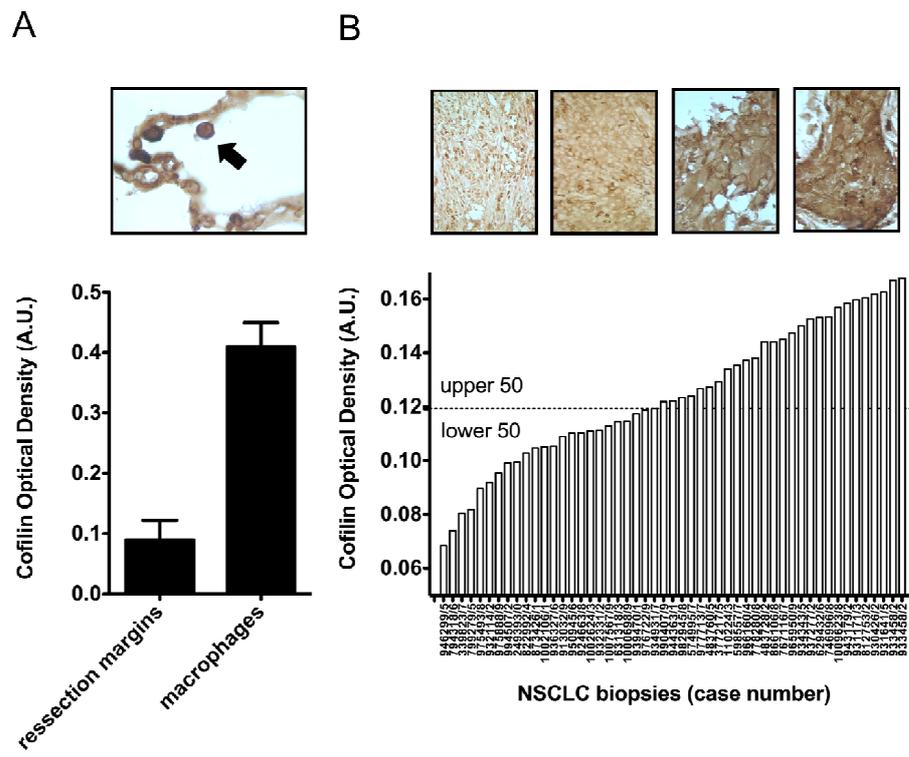


Figure 1

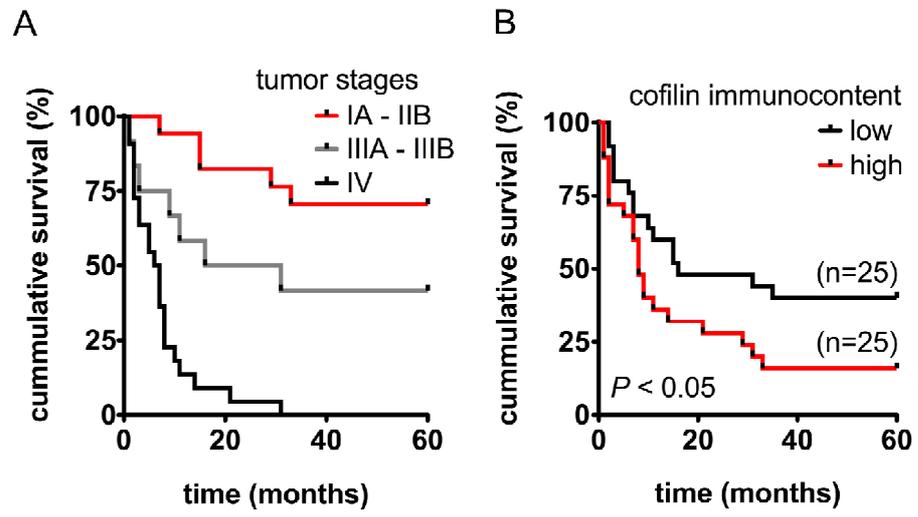


Figure 2

5. DISCUSSÃO

Cada vez mais torna-se fundamental que os recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle do câncer. Em 2008, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) e a OMS estimaram 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, o câncer de pulmão foi o mais incidente (1,52 milhões de casos novos), e principal causa de morte devido ao seu mau prognóstico (1,31 milhões de óbitos), no caso brasileiro, o INCA prevê aproximadamente 28.000 óbitos referentes a essa neoplasia para 2010.

É uma neoplasia altamente letal, segundo Novaes e colaboradores (2008), apenas 20% dos casos são diagnosticados em fases iniciais, na maioria das vezes o diagnóstico é tardio, quando a doença já se encontra em fases avançadas, o que impede o tratamento curativo. Outro problema seria o da possibilidade de pacientes mesmo com estadiamento I e sem metástases linfonodais detectadas poderem desenvolver recidivas precoces, mesmo após completa remoção cirúrgica do tumor segundo Ramos e colaboradores (Ramos, 2008).

Esses dados tornam-se ainda mais relevantes devido ao alto custo dessa doença ao Sistema Único de Saúde (SUS) e a rede hospitalar. Em pesquisa feita pelo departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde juntamente com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), as entidades contabilizaram um gasto em torno de R\$ 26.000,00 para tratamento completo de um paciente diagnosticado com câncer de pulmão (Ministério da Saúde, 2010)

A partir do exposto, muitos esforços têm sido feitos na busca de alternativas que colaborem com o melhor diagnóstico e decisão terapêutica frente a essa doença com alta heterogeneidade, mas que apresenta basicamente o mesmo tratamento para todos os pacientes onde alguns respondem ao tratamento e outros não. Um desses esforços é a pesquisa por novos marcadores biológicos que têm como objetivo colaborar com a melhor decisão para linha de ação em cada paciente com CPNPC. Como já citado anteriormente, diversos estudos têm se focado no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos incluindo marcadores tumorais séricos (SCC antígeno, antígeno carcinoembrionário, enolase neurônio-específica, fragmento de citoqueratina 19, CA-125 e antígeno de polipeptídeo tecidual), mas nenhum foi considerado sensível e específico o suficiente para tornar-se confiável para a maioria dos diagnósticos de malignidades pulmonares (Planque, et al., 2008).

Corroborando com o supracitado, nós demonstramos (anexo A) que nenhum dos 60 genes sugeridos na literatura como biomarcador para CPNPC individualmente testados em nosso trabalho a partir da base de dados GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>; Series GSE3141) e a partir do Duke Institute for Genome Sciences & Policy website (<http://data.cgt.duke.edu/oncogene.php>) mostrou poder estatístico suficiente para ser, seguramente, incluído na prática clínica, quando comparado ao padrão-ouro (TNM).

Em recente trabalho publicado por nosso grupo no periódico Cancer (Castro, et al., 2010), mostramos uma nova alternativa para ser utilizada como biomarcador prognóstico para CPNPC e possivelmente um guia para intervenções terapêuticas. Os resultados publicados referentes a uma coorte

validada de 111 pacientes suportam a idéia que níveis da proteína cofilina-1, codificada pelo gene *CFL1*, podem discriminar entre bom e mau prognóstico em estágios precoces do tumor (IA, IB e IIA/B), onde altos níveis de *CFL1* são correlacionados com a diminuição da taxa de sobrevida global.

Esses resultados apontaram que *CFL1* pode ajudar médicos a determinar o prognóstico do paciente e a identificar aqueles que necessitam de um tratamento mais agressivo.

Segundo Klamt e colaboradores, esses dados mostram uma correlação entre cofilina e sobrevida do paciente, além de constatar que os tipos com níveis mais elevados de cofilina apresentam maior potencial para invadir outros locais no corpo, o que indica um comportamento mais agressivo do tumor, na prática, indica que os níveis mais baixos de cofilina significam menores chances de desenvolver metástase, o que leva a um melhor prognóstico.

E finalmente, o grupo também descobriu que níveis elevados de cofilina se correlacionam à resistência de certas drogas anticâncer, especialmente a cisplatina e carboplatina, que têm sido muito utilizadas para o tratamento de CPNPC. A quimioterapia baseada em cisplatina é o tratamento padrão de primeira linha para pacientes em fase precoce e com bom desempenho. No entanto, apenas alguns respondem bem a este tratamento. Agora os níveis de cofilina podem ser usados para distinguir entre respondedores e não respondedores. Esta nova descoberta pode ter grande impacto sobre as taxas de sobrevida, dado que potenciais não-respondedores podem se beneficiar de diferentes opções de tratamento que não estariam disponíveis de outra forma (Triunfo, 2010).

Todos os dados supracitados de nossos trabalhos e os pesquisados em nosso referencial teórico, foram obtidos a partir da técnica de microarranjo de cDNA, baseando-se na detecção do nível de expressão gênica pelo seu mRNA, ferramenta não invasiva, de alto custo e sensibilidade reduzida, desse modo, tornando-se onerosa e inviável para ser utilizada no SUS ou em hospitais de pequeno e médio porte.

Por outro lado, há a imunistoquímica, uma técnica bem estabelecida na prática clínica que assegura a coloração de componentes celulares e da matriz extracelular através de anticorpos específicos. Na patologia cirúrgica, é usada como ferramenta diagnóstica para diferenciar tecidos benignos de malignos. Como uma ferramenta prognóstica, é usada para estudar a presença de moléculas envolvidas na agressividade dos cânceres. Mais do que identificar a presença ou ausência de um biomarcador, a imunistoquímica pode ser usada para quantificar sua expressão (Matos, et al., 2006).

A partir desse raciocínio, nosso grupo padronizou uma técnica semiquantitativa de imunistoquímica que apresenta a possibilidade na quantificação do antígeno por densitometria óptica (DO) com algumas adaptações para a proteína cofilina-1, como a utilização de citrato de sódio para recuperação antigênica, o uso de 5% de H₂O₂ para bloqueio de peroxidase endógena, BSA a 1% para bloqueio das ligações inespecíficas e incubação de anticorpo primário na proporção de 1:200 (Muller et al., 2009). Utilizamos anticorpo policlonal anti-cofilina proveniente da empresa Abcam[®] (ab42823), tendo seu imunógeno derivado de um peptídeo contendo os 150 aminoácidos do C-terminal da cofilina humana (Abcam, 2010). A própria Abcam salienta que este peptídeo tem aplicação em ensaios de *Western blot*,

imunocitoquímica/imunofluorescência e imunoistoquímica, o qual foi o alvo de nossa pesquisa (Abcam, 2010)

Através da análise de nossos dados, encontramos que amostras de tumores contêm diferentes quantidades de cofilina basal, a qual poderia ser usada para correlacionar com resultados nos pacientes, com tipo histológico e grau de diferenciação tumoral. Então, essa abordagem pode ser usada para confirmar, usando a imunoistoquímica, a relação entre a quantidade de cofilina e agressividade tumoral, como mostramos previamente através de nossos dados de microarranjo (Castro, et al., 2010).

É importante salientar que a técnica imunoistoquímica está sendo amplamente pesquisada não apenas no campo da oncologia, mas em diversas áreas da medicina. Xavier e colaboradores (2005) descrevem em detalhes, um fácil, rápido e preciso protocolo para análise de imunoreatividade de tirosina hidroxilase em degeneração de neurônios dopaminérgicos na *substancia nigra compacta* e, em menor extensão na área tegmental ventral para avaliar doença de *Parkinson*.

Enfim, a busca por alternativas que agreguem conhecimento, mas sem onerar mais a saúde do país estão sendo publicadas constantemente na comunidade científica, a partir dessa premissa é que nosso grupo desenvolveu essa ferramenta imunoistoquímica para colaborar com prognóstico e terapia medicamentosa, tendo o imunoconteúdo da cofilina como parâmetro de análise.

O próximo passo do nosso grupo foi o de avaliar, através de uma coorte retrospectiva, a validação como ferramenta clínica em pacientes

diagnosticados com CPNPC e cirurgicamente tratados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Brasil), os quais tiveram todos seus direitos preservados a partir da Declaração dos Direitos Humanos de Helsinki. Para que a coorte fosse representativa, analisamos os prontuários do HCPA, através de seu Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde (SAMIS), de pacientes entre os anos de 2003 a 2005 para que tivéssemos um desfecho controle de até 5 anos de acompanhamento. Cabe salientar que o estudo foi avaliado e aprovado pelo comitê de Ética do HCPA (anexo 1).

Utilizamos como critérios de inclusão dados pessoais, data de nascimento, gênero, *performance status*, data do diagnóstico, estadiamento (TNM) e tipo histológico, totalizando 101 casos diagnosticados com CPNPC. Tendo o auxílio de dois patologistas independentes, classificamos de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde todos os casos e iniciamos as análises dos blocos de parafina adquiridos através do serviço de Patologia do HCPA. Tendo como critérios de exclusão a falta de algum desses dados, o câncer não sendo primário, casos de repetição e interferências da técnica, chegamos a 57 casos, e por fim, excluindo os valores extremos de DO, totalizamos uma coorte equilibrada, representativa e sobretudo com o desfecho de acordo com o curso natural da doença de 50 blocos, conforme tabela 1 (artigo).

As características da amostra revelam que a maioria dos diagnosticados são do sexo masculino (68%) e com idade média de 60 anos, nossos dados estão de acordo tanto com estudos nacionais (Younes, et al., 2004; Knorst, et al., 2003; Franco, et al., 2008) quanto com publicações internacionais (Grimminger, et al., 2009; Pallis, et al., 2010; Parsons, et al., 2010). Segundo

Paschoal (2009), o câncer de pulmão é uma doença do adulto, ocorrendo dos 40 aos 80 anos, com um pico de incidência entre 55 e 65 anos de idade. Em sua pesquisa salienta que 75 a 80% dos cânceres diagnosticados são de não-pequenas células. Sua revisão de literatura mostra dois estudos americanos, um de 1961 e outro de 2009, além de um levantamento realizado no Instituto de Doenças do Tórax do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ), mostrando que os subtipos histológicos adenocarcinoma e escamoso são os mais prevalentes (61%, 57% e 69%, respectivamente) corroborando com nossos achados, onde 60% são adenocarcinoma e 30% de células escamosas.

Outro dado importante foi o da relação câncer-tabagismo. Pesquisamos inicialmente 101 pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, destes, 81,2% relataram ser fumantes ou terem fumado em algum período da vida. Por mais que não tenhamos usados esses dados em nossos resultados, vale ressaltar que o tabaco é o principal fator de risco para as doenças que mais matam no país, isquemias, obstrução crônica das vias aéreas, câncer de pulmão e acidentes vasculares (Corrêa, et al.,2009), e especificamente no caso do câncer de pulmão, das 16 capitais estudadas por Corrêa e colaboradores (2009), Porto Alegre foi a que obteve o maior razão de óbitos referentes a essa neoplasia em 2003.

Com os valores obtidos através da análise imunoistoquímica, as médias de DO foram calculadas para cada caso, descontando seus controles negativos, onde os resultados indicam a quantidade de cofilina, desse modo, ocorrendo a discriminação do desfecho em bom a mau prognóstico (Figura 2B do artigo). A tabela 1(artigo) mostra os dados estratificados após análise laboratorial.

Mesmo com um n amostral de 50 pacientes e tendo limitações referentes ao intervalo entre as variações de baixa e alta expressão ter sido pequeno (Figura 1B do artigo), nossa pesquisa revela resultados bastante promissores, a coorte mostrou-se significativa para a separação dos casos e predizer desfecho, ou seja, a sobrevida dos pacientes com menor imunoconteúdo de cofilina é maior em comparação aos seus altos níveis. Esses resultados mostram-se tão sensíveis e específicos quanto nossos resultados prévios (Castro, et al., 2010), provando que a técnica imunistoquímica nos indica ser tão eficiente quanto a técnica de microarranjo para a análise do conteúdo de *CFL1* em CPNPC, sugerindo, assim como em nossas pesquisas previamente publicadas com ensaios de microarranjo, que pacientes com maior imunoconteúdo de cofilina apresentam pior prognóstico e, provavelmente maior resistência a agentes alquilantes em comparação aos que apresentam baixo imunoconteúdo.

Torna-se relevante essa comparação, pelo fato de que os experimentos com microarranjo ainda são consideravelmente caros e trabalhosos e, como consequência, são geralmente conduzidos com tamanhos amostrais relativamente pequenos. Não obstante, tais experimentos envolvem uma série de procedimentos laboratoriais, desde a extração de RNA, transcrição reversa e marcação fluorescente, até a hibridização final, os quais invariavelmente introduzem diferentes níveis de variação adicional aos dados. Desta maneira, a condução de ensaios com microarranjos requer cuidadoso delineamento experimental e análise estatística dos dados, além de uma importante limitação, em função dos elevados custos de produção, os mesmos têm que ser confeccionados em escala industrial. Desta maneira a disponibilidade de

microarranjos com elevado número de genes deverá ficar restrita por algum tempo às espécies de maior importância econômica, para as quais existe maior volume de recursos para pesquisa (Rosa, Rocha e Furlan, 2008).

Ao contrário da imunohistoquímica, que possui ampla aplicação na patologia, fisiologia e biologia celular, sendo uma valiosa ferramenta para identificação de proteínas, visualização de componentes celulares e para o estudo de vias de sinalização. É uma técnica amplamente utilizada e bem estabelecida em serviços hospitalares (quando comparada às técnicas de biologia molecular, como *real time-PCR*), que não apenas assegura a detecção de antígenos, mas também possibilita a determinação de sua localização morfológica (Müller, 2010).

Nossa coorte também reforça a importância do estadiamento, tendo em vista que na Figura 2A (artigo), claramente é visto uma relação diretamente proporcional entre estadiamento e óbito. Coorte essa considerada significativa tanto pelo seu equilíbrio e resultados obtidos quanto pelo número de blocos analisados terem sido semelhantes às publicações do *PubMed*, inclusive na metodologia adotada.

Bae e colaboradores (2010) publicaram artigo a partir de uma coorte retrospectiva, com análise imunohistoquímica semi-quantitativa, de 26 pacientes, analisando epilepsia lobo temporal; Cui e colaboradores (2010), também tiveram a imunohistoquímica semi-quantitativa como método de análise de 54 pacientes com carcinoma hepatocelular; Ralhan e colaboradores (2010) fizeram uso da imunohistoquímica semi-quantitativa para análise de 34 blocos de parafina de câncer de tireóide.

Especificamente com CPNPC, há na literatura científica artigos que mantêm mesmo desenho metodológico que está sendo utilizado em nossa pesquisa, em publicação de Irigoyen e colaboradores (2010), os autores utilizam uma coorte retrospectiva inicial de 103 pacientes, que após seus critérios de exclusão, chegaram a 47 pacientes diagnosticados com CPNPC estágio IV, a partir de análise imunoistoquímica semi-quantitativa publicaram seus resultados utilizando curva de sobrevida tipo Kaplan-Meier. Rao e colaboradores (2010) publicaram pesquisa comparando a expressão do fator de crescimento epidermal (EGFR) entre CPNPC primário e suas metástases linfonodais, para tanto, utilizaram 51 amostras de metástases em linfonodos de CPNPC primários e a imunoistoquímica semi-quantitativa para análise de seus dados.

Essas informações usadas com outras informações já conhecidas e bem estabelecidas pela comunidade científica como o estadiamento e o *performance status* irão colaborar para melhor decisão terapêutica na área médica, ou seja, o presente estudo teve como objetivo principal propor uma nova técnica que venha a somar no diagnóstico precoce do câncer de pulmão de não pequenas células, como sugere publicação do INCA mostrando que a detecção precoce de um câncer compreende duas diferentes estratégias: aquela destinada ao diagnóstico do câncer em indivíduos que apresentam sintomas ou sinais iniciais da doença (diagnóstico precoce) e aquela, voltada para pessoas sem qualquer sinal ou sintoma e aparentemente saudáveis (rastreamento).

Sabe-se que o câncer de pulmão tem como característica ter seus estágios iniciais assintomáticos, assim, a detecção precoce, através de uma

ferramenta de baixo custo só trará benefícios a sociedade. Um exemplo de exame que colabora com diagnóstico precoce é o Antígeno Prostático Específico (PSA), com ampla utilização na avaliação dos pacientes com neoplasia de próstata, desde a década de 80, trouxe como importante consequência o aumento significativo do número de casos diagnosticados com doença clinicamente localizada e, conseqüentemente, da utilização de modalidades de tratamento com intenção curativa (Fonseca, et al., 2007). Segundo o INCA, com o advento da dosagem do PSA como um instrumento de rastreamento, os custos com o câncer de próstata aumentaram em 3 a 10 vezes. Este aumento é devido ao maior número de indivíduos sendo rastreados pelo PSA, o maior número de biópsias realizadas para os testes positivos e maior oferta de tratamento para os cânceres confirmados, sem que, nos estudos controlados, tenha sido evidenciado um impacto correspondente na mortalidade.

A discussão torna-se mais interessante quando olharmos os custos desse exame ao Sistema Único de Saúde (SUS) durante 6 meses em unidade hospitalar antes e depois da técnica padronizada. Antes da padronização os custos do PSA somavam R\$ 88.896,00, após a padronização os custos caíram para R\$ 31.200,00, ou seja, uma queda significativa de 64,9% (Ministério da Saúde, 2010).

Cabe salientar que até o momento, o teste de PSA não é recomendado como ferramenta de rastreamento do câncer de próstata pela *US Preventive Services Task Force* tampouco pela *Canadian Task Force on Preventive Health Care*. Já o *National Cancer Institute* (NCI) define o rastreamento como uma estratégia ainda sob investigação enquanto a *American Cancer Society* e

a *AUA* defendem esta conduta, associada ao exame de toque retal, como recomendável (Ferreira, 2006).

Resumindo, o protocolo de optimização para detecção de imunoconteúdo de cofilina em biópsias de CPNPC descritas aqui capacita a implementação dessa ferramenta em laboratórios de patologia e trará uma nova alternativa para detecção precoce da doença.

6. CONCLUSÃO/PERSPECTIVAS

Em resumo, a otimização da SQ-IHC para cofilina em biópsias de CPNPC descritas aqui assegura sua implementação em laboratórios de patologia para serem usadas para estudos de correlação, os quais devem ser validados tendo a cofilina como um biomarcador prognóstico para CPNPC.

O refinamento na estratificação dos pacientes com o uso dessa metodologia providencia a oportunidade para desenhar uma triagem clínica prospectiva de larga escala, randomizada para avaliação desse protocolo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abcam [homepage]. Estados Unidos, EUA. [acessado em 15 set. 2010].

Disponível em: <http://www.abcam.com/cofilin-antibody-ab42824.html>.

Bae EK, Jung KW, Chu, K, et al. Neuropathologic and clinical features of human medial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurol*. 2010; 6: 73-80.

Baldotto CS, Moreira Junior I, Ferreira CG. Tratamento do câncer de pulmão não-pequenas células estágio IV. *Pulmão RJ*. 2009; 4: S48-S50.

Bernstein BW, Bamburg, JR. ADF/Cofilin: a functional node in cell biology. *Trend in Cell Biology*. 2010; 20(4): 187-195.

Brambilla E, Travis WD, Colby B, et al. The new world health organization classification of lung tumors. *Eur Respir J*. 2001; 18: 1059-1068.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Instituto Nacional do Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6ª Edição. 2004. 254p.

Brasil, Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. Estimativa dos custos diretos da assistência médica de neoplasias e doença cardíacas tabaco-relacionadas em dois hospitais de referência nacional. 2005. [acessado em 13 jul. 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/maria_alicia_dominguez_uga.pdf

Brasileiro Filho G. Bogliolo, Patologia. Editora Guanabara Koogan; 7ª Edição. 2006. 1488 p.

Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL. Harrison. Tratado de Medicina Interna. Volume I Editora Mc Graw Hill; 15ª Edição. 2002. 1524p.

Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*. 2002; 122: 1037-1057.

Buccheri G, Ferrigo D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(7): 1135-1141.

Buzzaid AC, Hoff PM. Manual Prático de Oncologia Clínica do Hospital Sírio Libanês. Editora Dendrix Publicações; 5ª Edição. 2007. 608p.

Capelozzi VL. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(4): 375-382.

Castro M, Dal-Pizzol F, Zdanov S et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in non-small cell lung cancer. *Cancer* 2010; 116: 3645-3655.

Chang MH, Kim KH, Jun HJ, et al. Irinotecan and oxaliplatin combination as the first-line treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64: 917-924.

Ching-Shing CW. Potentially useful biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of lung cancer. *Biome Pharmacother.* 2007; 61(9): 515-519.

Chu WC. Potentially useful biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2007; 61(9): 515-519.

Cordeiro PB. Tratamento de câncer de pulmão não pequenas células no estágio IIIA. *Pulmão RJ.* 2009; 4: S43-S45.

Cui H, Wu F, Sun Y, et al. Up-regulation and subcellular localization of hnRNP A2/B1 in the development of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10: 1-44.

Fernandez FG, Bsttafarano MD. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Cancer Control.* 2006; 13(4): 270-275.

Ferreira MD. Análise da variação da dosagem sérica do antígeno prostático específico em programas de rastreamento para detecção precoce do câncer de próstata. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006. 148 p. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia.

Fonseca RP, Fernandes Junior AS, Lima VS, et al. Recidiva bioquímica em câncer de próstata: artigo de revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2006; 53(2): 167-172.

Franco MR, Parra ER, Takagaki TY, Soares FA, Capelozzi VL. Detection of micrometastases in pN0 non-small cell lung cancer: an alternative method combining tissue microarray and immunohistochemistry. *J Bras Pneumol*. 2008; 34(3):129-135.

Gridelli C, Sheperd FA. Chemotherapy for elderly patients with non-small cell lung cancer: a review of the evidence. *Chest*. 2005; 128: 947-957.

Gridelli C, Ardizzoni A, Le Chevalier T, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer patients with ECOG performance status 2: results of an European experts panel. *Ann Oncol*. 2004; 15: 419-426.

Grimminiger PP, Stöhlmacher J, Vallböhmer D, et al. Prognostic Significance and Clinicopathological Associations of COX-2 SNP in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer. *J Oncol*. 2009; 1-5.

Hammerschmidt S, Wirtz H. Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106(49): 809-820.

Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechmer F, 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.

Hirsch FR. The role of genetic testing in the prediction of response to EGFR inhibitors in NSCLC. *Oncogene*. 2009;28(suppl 1):S1-S3.

Hollen PJ, Gralla RJ, Stewart C, et al. A prospective comparison of Karnofsky (KPS) with ECOG performance status in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): A COMET group study investigating sensitivity and specificity issues important in clinical decision making. *J Clin Oncology*. 2005; 23(16S): 8134.

Honig A, Rieger L, Kapp M, et al. Immunohistochemistry in human placental tissue-pitfalls of antigen detection. *J Histochemistry & Cytochemistry*. 2005; 53(11): 1413-1420.

Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde; 2003 [acessado em 19 abr. 2010]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=comentarios.asp&ID=15>

Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde; 2010 [acessado em 19 abr. 2010]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=mapa.asp&ID=15>

Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde; 2008 [acessado em 22 mai. 2010]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/OMS_Relatorio.pdf

Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde; 2010 [acessado em 27 mar. 2010]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=localizacoes.asp&ID=15>

Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde; 2010 [acessado em 27 mar. 2010]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=340

Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde; 2010 [acessado em 25 jul. 2010]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/diretriz_rastreamento_prostat_a.pdf

Irigoyen M, Pajares MJ, Agorreta J, et al. TGFBI expression is associated with a better response to chemotherapy in NSCLC. *Molecular Cancer*. 2010; 9:130.

Jemal A, Thun MJ, Ries AG, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(23): 1672-1694.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60(5):000-000.

Kiuchi T, Ohashi K, Kurita S, Mizuno K. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J Cell Biol.* 2007; 177(3): 465-476.

Klamt, F., Shacter, E. Taurine Chloramine, an Oxidant Derived from Neutrophils, Induces Apoptosis in Human B Lymphoma Cells through Mitochondrial Damage *J. Biol. Chem.* 2005; 280(20): 21346-21352.

Klamt F, Zdanov S, Levine RL et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat. Cell Biol.* 2009;11: 1241-1246.

Knorst MM, Dienstmann R, Fagundes LP. Retardo no diagnóstico e no tratamento cirúrgico do câncer de pulmão. *J Pneumol.* 2003; 29(6): 358-364.

Kudryashov DS, Grintsevich E, Rubenstein PA, Reisler E. A nucleotide state sensing region on actin. *JBC.* 2010; (Print).

Leyman S, Sidani M, Ritsma L, et al. Unbalancing the Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate–Cofilin Interaction Impairs Cell Steering. *Molecular Biol of Cell.* 2009; 20:4509-4523.

Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6:352-366.

Malta DC, Moura L, Souza MFM, et al. Lung cancer, cancer of the trachea, and bronchial cancer: mortality trends in Brazil, 1980-2003. *J Bras Pneumol*. 2007; 33(5): 536-543.

Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, et al. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics*. 2006; 61(5): 417-424.

Matos LL, Trufelli DC, Matos MGL, et al. Immunohistochemistry as an important tool biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker Insights*. 2010; 5: 9-20.

Meira M, Masson R, Stagljar I, et al. Memo is a cofilin-interacting protein that influences PLC γ 1 and cofilin activities, and is essential for maintaining directionality during ErbB2-induced tumor-cell migration. *J Cell Science*. 2009; 122: 787-797.

Mohamed MK, Ramalingam S, Lin Y, et al. Skin rash and good performance status predict improved survival with gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2005; 16: 780-785.

Müller CB. O uso da técnica de imunoistoquímica como ferramenta para quantificação do imunoconteúdo de cofilina e sua possível aplicação como biomarcador em câncer de pulmão de não-pequenas células [Monografia de Conclusão de Curso]. Porto Alegre: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2009. 68p. Faculdade de Biomedicina.

Müller CB, Barros RLS, Moreira JCF, Klamt F. Bioinformatics approach for the clinical validation of potential non-small cell lung cancer prognostic biomarkers. *Frontiers in Bioscience*. 2010 (In Press).

National Cancer Institute [homepage]. Estados Unidos. 2010 [acessado em 22 mai. 2010]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/dictionary/?CdrID=46595>.

Núcleo Estadual no Rio de Janeiro. Ministério da Saúde [homepage]. Rio de Janeiro. 2010. [acessado em 26 de jul 2010]. Disponível em: http://www.nerj.rj.saude.gov.br/www_internet/compra/Pcontas_nerj_racional.php

Novaes FT, Cataneo DC, Ruiz Junior RL, et al. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. *J Bras Pneumol*. 2008; 34(8): 595-600.

Oken MM, Creech Rh, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Group. *Am J Clin Oncol*. 1982; 5(6): 649-655.

Olak J, Ng A. Diagnosis and treatment of early-stage non-small cell lung cancer. *The Oncologist*. 1996; 1: 201-209.

Pallis AG, Gridelli C, Van Meerbeeck JP, et al. EORTEC elderly task force and lung cancer group and international society for geriatric oncology (SIOG) experts' opinion for treatment of non-small-cell lung cancer in an elderly population. *Annals of Oncology*. 2010; 21: 692-706.

Parsons A, Daley A, Begh R, Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* 2010; 340: b5569.

Paschoal MEM. Epidemiologia do câncer de pulmão. *Pulmão RJ* 2009; 4:S3-S5.

Pham N, Morrison A, Schwock J, et al. Quantitative image analysis of immunohistochemical stains using a CMYK color model. *Diagnostic Pathology*. 2007; 2:8.

Planque C, Li L, Zheng Y, et al. A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5):1355-1362.

Ralhan R, Cao J, Lim T, et al. EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer*. 2010; 10:331.

Ramos SG. O diagnostic histológico de micrometástases de tumores de pulmão. *J Bras Pneumol*. 2008; 34(3): 127-128.

Rao C, Hu Q, Ma J, et al. Comparison of the epidermal growth factor receptor protein expression between primary non-small cell lung cancer and paired lymph node metástases: implications for targeted nuclide radiotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010; 29: 7.

Rosell R, Robinet G, Szczesna A, et al. Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2008;19:362-369.

Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2007; 28(3): 507-518.

Sidani M, Wessels D, Gosh M, et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *JCB*. 2007; 179(4): 777-791.

Stinchombe TE, Socinski MA. Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6: 233-241.

Tabnet. DATASUS [homepage]. Brasília, DF. Ministério da Saúde; 2008 [acessado em 27 mar. 2010]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/c10.def>

Thatcher N. First- and second-line treatment of advanced metastatic non-small cell lung cancer: a global view. *BMC Proceedings*. 2008; 2(2):S3.

Triunfo M. Brasileiros identificam biomarcador para prognóstico de câncer de pulmão. *Ciência Diária*. [acessado em 01 jul 2010]. Disponível em: <http://cienciadiaria.com.br/2010/06/04/brasileiros-identificam-biomarcador-para-predicao-e-prognostico-de-cancer-de-pulmao/>.

Visvanathan M, Netzer M, Seger M, et al. Oncogenes and pathway identification using filter-based approaches between various carcinoma types in lung. *Int J Comput Biol Drug Des*. 2009; 2(3): 236-251.

Wang W, Mouneimne G, Sidani M, et al. The activity status of cofilina is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol*. 2006; 173(3): 395-404.

Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2007; 7; 429-440.

World Health Organization [homepage]. Estados Unidos; 2005 [acessado em 22 mai. 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/gender/documents/LungCancerlast2.pdf>.

World Health Organization [homepage]. Estados Unidos; 2005 [acessado em 22 mai. 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/en/atlas5.pdf>

World Health Organization [homepage]. Estados Unidos; 2005 [acessado em 22 mai. 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/en/atlas6.pdf>

World Health Organization: The World Health Organization Histological Typing of Lung Tumors. 1999; 3^a Edição, Suíça.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 2004; Lyon.

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, et al. A simple and fast densitometric method for analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Research Protocols*. 2005; 16: 58-64.

Younes RN, et al. Nonsmall cell lung cancer: evaluation of 737 consecutive patients in a single institution. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*. 2004; 59(3):119-127.

Zamboni M, Carvalho WR. Câncer de Pulmão. 1^a Ed. Rio de Janeiro. Editora Atheneu. 2005. 308p.

ANEXOS

Bioinformatics Approach for the Clinical Validation of Potential Non-Small Cell Lung Cancer Prognostic Biomarkers

Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600-anexo, Porto Alegre 90035-003, Brazil

Carolina Beatriz Müller, Rafael Longhi Sampaio de Barros, José Cláudio
Fonseca Moreira, Fábio Klamt

TABLE OF CONTENTS

1. *Abstract*
2. *Introduction*
3. *Searching for NSCLC potential biomarker*
 - 3.1. *Literature search*
 - 3.2. *Tumor samples and microarray data*
 - 3.3. *Survival data analysis*
4. *Discussion*

1. ABSTRACT

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for nearly 1 million deaths annually, worldwide. Conventional treatments offer limited benefits and patients have a survival rate of approximately 1 year. A biomarker for NSCLC could provide the potential benefits of early diagnosis, prognosis and could lead to important applications such as drug targeting. In a search for a biomarker with prognostic value, we reviewed the literature and tested potential biomarkers by performing a meta-data analysis using public databank of NSCLC biopsies containing gene expression data and clinical and pathologic information from 111 patients. We generated standard Kaplan–Meier mortality curves by clustering patients according to either biomarker expression levels or NSCLC stage grouping. Our statistical analyses show that all 60 potential biomarkers analyzed here have no prognostic value for NSCLC patient outcome.

2. INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide, accounting for 1.3 million deaths annually (data from World Health Organization, 2008). The high mortality associated with this disease is primarily due to the fact that the majority of lung cancers are not detected until they have progressed to an advanced stage (1). Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents nearly 85% of lung cancer cases. Compared with other major types of cancer such as colon, prostate, and breast cancers, the clinical outcome of conventional therapies for NSCLC remains poor, with a median survival of 9-11 months (2).

Therefore, there is an urgent need for more effective therapies, drugs, or treatments that could help decrease the incidence of NSCLC. Alternatively, cancer biomarker gives good guidance on many areas of cancer biology. Unlike uniformity of long-established TNM system, the international standard protocol that allows the staging of carcinoma according to the extent of disease in the patient, cancer biomarkers are considered to be more suitable to the heterogeneous nature of cancer (3). In 2008, Sawyers discussed the three types of cancer biomarkers. These can be used for prognosis, to predict the natural course of a tumor, indicating whether the outcome for the patient is likely to be good or poor. They can also be used in prediction, helping to decide which patients are likely to respond to a given drug and at what dose it might be most effective (4). A biomarker for NSCLC could provide the potential benefits of early diagnosis, considering that the disease is usually detected in late stages when surgical removal of the tumor is no longer an option, and additionally, could lead to other important applications such as prognosis and drug targeting (5). An impressive number of molecular markers have been implicated in the prognosis of NSCLC; however, the results reported in literature are conflicting and none are in use in clinics. Thus, further investigation, newer molecular assays and the development of appropriate panel of molecular markers are still required (6).

Systematic analysis of gene expression using high-throughput screening of cDNA microarray libraries has been considered as an effective approach for identifying and validating potential biomarkers for NSCLC (7). However, final validation should be done by testing a collection of well-defined clinical samples. Herein, we describe a bioinformatics-based approach to test and validate the prognostic value of potential NSCLC biomarkers. Our research group have been studying many aspects of tumor biology by different bioinformatics approaches (8-9). Here our approach is to correlate data collected from the literature with data on gene expression of a large and well-defined collection of NSCLC biopsies containing information on patients' clinical status and pathology to clinically evaluate the efficacy of potential biomarkers to predict patients outcome. Validation by clinical trials in large cohorts of patients

is necessary before cancer-related phenotypes can be translated into the clinic as reliable biomarkers.

3. SEARCHING FOR NSCLC POTENTIAL BIOMARKER

3.1. Literature search

The list of genes presented in Table 1 was compiled by searching the PubMed database for articles published in English between January 1985 and December 2009. Search criteria included subject heading terms for “biomarker”, “prognosis”, “gene expression” and “lung cancer”. Genes reported in two or more articles during the period of our search, or in one article at least during the last 3 years were selected. Those articles describing pooled biomarkers into the same analysis were excluded from the list (*i.e.* combined performance for multiple genes). A total of 60 NSCLC was tested.

3.2. Tumor samples and microarray data

For the clinical validation of potential NSCLC prognostic biomarkers, we used a large, homogeneous, well-defined collection of samples from lung cancer biopsies, along with respective gene expression data and relevant clinical and pathologic information -such as age, sex, cancer histological type, and NSCLC staging in a cohort follow-up period of 72 months- on 111 patients (10). Data were obtained from the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>; Series GSE3141) and from the Duke Institute for Genome Sciences & Policy website (<http://data.cgt.duke.edu/oncogene.php>). All gene array data was on Affymetrix U133A GeneChip, from core biopsies of patients' tumor. A *sine qua non* condition for select a given gene was the presence of two or more microarray probes in NSCLC cohort used.

3.3. Survival data analysis

We used the SPSS software (SPSS for Windows, release 14.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL) to generate Standard Kaplan–Meier mortality curves with their significance levels, for patient clusters. Survival curves were compared using the log-rank test; patients were clustered according to biomarker expression level or NSCLC stage grouping (*i.e.* initial and advanced staging).

4. DISCUSSION

Through a systematic MEDLINE literature inspection, we selected 60 genes as potential biomarkers to be validated using a clinical databank. These biomarkers constitute a diverse group of genes involved in different cellular functions. They code proteins such as transcription factors (*TFAP2B*, *MYC*), protein kinases (*PIK3CA*, *STAT1*, *KRAS*, *STYK1*, *LCK*), protein phosphatases (*DUSP6*), receptors (*AGER*, *EGFR*, *AMFR*), and several DNA repair systems (*ALKBH5*, *ALKBH3*, *FGFR1OP*, *ERCC1*) (See table 1 for complete list of potential prognostic biomarkers). These potential biomarkers are related in the most distinct ways with lung cancer; for example, mutations in the genetic region encoding the kinase domain of the epidermal growth-factor receptor (*EGFR*) predict the sensitivity of lung tumors to erlotinib or gefitinib (11), as well different mutation in *KRAS* predict that patients with lung cancer will fail to respond to these inhibitors (12).

Some genes of DNA repair system are also considered to be potential biomarkers to NSCLC. They have been constantly described as being related with sensitivity to chemotherapeutic drugs (13-14), specially alkylating agents, which are the most largely used anti-cancer drug for NSCLC treatment (15). These drugs are mutagenic, genotoxic and have the ability to damage DNA (16). Cisplatin is an alkylating agent widely used in NSCLC treatment; however, this type of cancer can presents inherently resistance against it. Like many DNA alkylators, cisplatin acts inhibiting DNA replication, which is the critical target in cancer treatment. In this case, the resistance against cisplatin is mainly determinate by the expression levels of nucleotide excision repair genes (NER). ERCC, a component of the NER complex, is a potential marker involved in prediction of resistance to cisplatin, which has been described to be related with its mRNA expression (17-19).

Despite the large literature about markers in NSCLC, our study shows that none of the genes we tested have their mRNA levels directly correlated with patient outcome. It is important to state that our analysis was based on gene expression status, not taking into account other relevant parameters, like gene mutation pattern, methylation, or cohort subgroups. As an example, *ERBB2* gene has prognostic value in patients with NSCLC when considering specific cohort gender (20). Likewise, *ERCC1* is effective in stage IIB-IIIA-IIIB of NSCLC (21) and *CD9* has prognostic value given the mutation status of *KRAS* gene (22).

Different experimental approaches have been used to establish each of the genes listed in table 1 as potentials biomarkers for predicting patient outcome. This approach shows that biomarker candidates should be carefully

tested in clinical samples and exemplifies a rational use of public high-throughput clinical data. In theory, it could be applied to validate any possible biomarker, optimizing the use of the information available in public databanks and serving as standard tool to guide future clinical trials. Thus, we would be maximizing the use of information already generated and increasing its applicability.

The panel generated by this tool must be further analyzed. Microarrays are well described as capable of determining the expression levels of thousands of genes simultaneously (23) and the ability to define cancer subtypes, recurrence of disease and response to specific therapies using DNA microarray-based gene expression signature has been demonstrated in multiple studies (24). Bild & Col. described the activation status of several oncogenic pathway based on the statistical combination of gene expression signatures (8). Nevertheless, we believe that the gene signatures should be obtained based on biological (not statistical) combination of high-throughput screening of cDNA microarray probes. In this scenario, fluctuation of gene expression within biological networks can be evaluated by landscape analysis, which can represent different functional states of the same gene network (25)

In summary, our research describes a reliable tool able to discriminate biomarkers performance, revealing that none of the 60 genes individually tested had shown sufficient statistical power to be safely included in clinical use, when compared to TNM system, which is considered gold standard by physicians. Therefore, these approach may strengthens the development of new biomarkers, since up-to-date there is still no prognostic biomarker (based on gene expression) available for NSCLC. As stated by Dr. Goldstraw in the last World Conference on Lung Cancer (26), it is still uncertain how to integrate the predictive information from biomarkers with the anatomical extent of disease described by the TNM system, which rises the possibility that T, N, and M could be joined by a B (biological) factor. Biomarkers will probably be the next major development in NSCLC staging.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This project is supported by Brazilian MCT/CNPq Universal funds (479860/2006-8 & 476114/2008-0) by MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7) funds. C.B.M. was supported by a training grant from FAPERGS (08511895) and F.K. received a fellowship from MCT/CNPq (303613/2008-4). The author would like to thanks Dr Márcia Triunfol for critical review of this manuscript.

6. REFERENCES

- 1 Ihde DC. Chemotherapy of lung cancer. *N Engl J Med* 1992; **327**(20): 1434-41.
- 2 Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer - Reply. *N Engl J Med* 2004; **350**(19): 2009-10.
- 3 Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMP Rep* 2008; **41**(9):615-25
- 4 Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008 ; **452**(7187):548-52.
- 5 Chi-Shing CW. Potentially useful biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2007; **61**(9): 515-9.
- 6 Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001, **34**: 53-8
- 7 Kim B, Lee HJ, Choi HY *et al.* Clinical validity of the lung cancer biomarkers identified by bioinformatics analysis of public expression data. *Cancer Res* 2007; **67**(15): 7431-8.
- 8 Bild AH, Yao G, Chang JT *et al.* Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; **439**(7074): 353-7.
- 9 Deng WG, Jayachandran G, Wu G, Xu K, Roth JA, Ji L. Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2beta in human lung cancer cells. *J Biol Chem* 2007; **282**(36): 26460-70.
- 10 Vallbohmer D, Brabender J, Yang DY *et al.* Sex differences in the predictive power of the molecular prognostic factor HER2/neu in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006; **7**(5): 332-7.
- 11 Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Rev. Cancer* 2007 **7**, 169–181.
- 12 Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. *KRAS* mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*. 2005; **2**(1):e17.
- 13 Müller MR, Thomale J, Rajewsky MF, Seeber S. Drug Resistance and DNA repair in Leukaemia. *Cytotechnology* 1998; **27**(1-3): 175-85.

- 14 Felip E, Rosell R. Testing for excision repair cross-complementing 1 in patients with non-small-cell lung cancer for chemotherapy response. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7(3):261-8.
- 15 Damia G, D'Incalci M. Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology* 1998; 27(1-3):165-73.
- 16 Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3(11):1389-407
- 17 Schettino C, Bareschino MA, Maione P, Rossi A, Ciardiello F, Gridelli C. The potential role of pharmacogenomic and genomic in the adjuvant treatment of early stage non small cell lung cancer. *Curr Genomics* 2008; 9(4):252-62
- 18 Rosell R, Lord RV, Taron M, Reguart N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 38(3):217-27.
- 19 Rosell R, Taron M, Alberola V, Massuti B, Felip E. Genetic testing for chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41 Suppl 1:S97-102.
- 20 Miyake M, Adachi M, Huang C, Higashiyama M, Kodama K, Taki T. A novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; 18(14): 2397-404.
- 21 McNeil C. New NSCLC staging raises treatment issues. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(23):1748-9.
- 22 Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J *et al.* Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 51(1): 61-9.
- 23 Campioni M, Ambrogi V, Pompeo E, Citro G, Castelli M, Spugnini EP, Gatti A, Cardelli P, Lorenzon L, Baldi A, Mineo TC: Identification of genes down-regulated during lung cancer progression: a cDNA array study. *J Exp Clin Cancer Res* 2008, 27:38.
- 24 Ramaswamy S & Golub T R. DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.* 2002 20, 1932--1941.
- 25 Castro MA, Filho JL, Damolin RJ, Sinigaglia M, Moreira JC, Mombach JC, de Almeida RM. ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context. *Bioinformatics* 2009; 25(11):1468-9.

- 26 Adachi M, Taki T, Konishi T, Huang CI, Higashiyama M, Miyake M. Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression. *J Clin Oncol* 1998; **16**(4): 1397-406.
- 27 Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, Sun Z, Szoke J, Gerald WL, Watson M, Govindan R, You M. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med* 2006 **3**: e467.
- 28 Stav D, Bar I, Sandbank J (2007) Usefulness of CDK5RAP3, CCNB2, and RAGE genes for the diagnosis of lung adenocarcinoma. *Int J Biol Markers* **22**: 108-113.
- 29 Oshita F, Sekiyama A, Saito H, Yamada K, Noda K, Miyagi Y (2006) Genome-wide cDNA microarray screening of genes related to the benefits of paclitaxel and irinotecan chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Exp Ther Oncol* **6**: 49-53.
- 30 Takanami I, Takeuchi K (2003) Autocrine motility factor-receptor gene expression in lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* **51**: 368-373.
- 31 Takanami I, Takeuchi K, Watanabe H, Yanagawa T, Takagishi K, Raz A (2001) Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* **95**: 384-387.
- 32 Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J, Smolen A, Korobowicz E, Korszen-Pilecka I, Zdunek M (2006) Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **51**: 61-69.
- 33 Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J, Smolen A, Pilecka I, Jablonka A (2005) Survivin antiapoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer: in situ hybridization study. *Folia Histochem Cytobiol* **43**: 237-242.
- 34 Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A (1999) A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* **17**: 2100-2104.
- 35 Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, Mendez P, Chaib I, Perez-Roca L, Szymanowska A, Rzyman W, Puma F, Kobiarska-Gulida G, Farabi R, Jassem J (2007) BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* **2**: e1129.
- 36 Guo NL, Wan YW, Tosun K, Lin H, Msiska Z, Flynn DC, Remick SC, Vallyathan V, Dowlati A, Shi X, Castranova V, Beer DG, Qian Y (2008) Confirmation of Gene Expression-Based Prediction of Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **14**: 8213-8220.

- 37 Ho CC, Kuo SH, Huang PH, Huang HY, Yang CH, Yang PC (2008) Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. *Lung Cancer* 59: 105-110.
- 38 Kim B, Lee HJ, Choi HY, Shin Y, Nam S, Seo G, Son DS, Jo J, Kim J, Lee J, Kim J, Kim K, Lee S (2007) Clinical validity of the lung cancer biomarkers identified by bioinformatics analysis of public expression data. *Cancer Res* 67: 7431-7438.
39. Li R, An SJ, Chen ZH, Zhang GC, Zhu JQ, Nie Q, Xie Z, Guo AL, Mok TS, Wu YL (2008) Expression of cyclin D1 splice variants is differentially associated with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Human Pathology* 39: 1792-1801.
- 40 Miyake M, Adachi M, Huang C, Higashiyama M, Kodama K, Taki T (1999) A novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer. *Oncogene* 18: 2397-2404.
- 41 Adachi M, Taki T, Konishi T, Huang CI, Higashiyama M, Miyake M (1998) Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression. *J Clin Oncol* 16: 1397-1406.
- 42 Oshita F, Sekiyama A, Ito H, Kameda Y, Miyagi Y (2006) Genome-wide cDNA microarray screening of genes related to survival in patients after curative resection of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 16: 817-821.
- 43 Raz DJ, Ray MR, Kim JY, He B, Taron M, Skrzypski M, Segal M, Gandara DR, Rosell R, Jablons DM (2008) A Multigene Assay Is Prognostic of Survival in Patients with Early-Stage Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 14: 5565-5570.
- 44 Tsai MF, Wang CC, Chang GC, Chen CY, Chen HY, Cheng CL, Yang YP, Wu CY, Shih FY, Liu CC, Lin HP, Jou YS, Lin SC, Lin CW, Chen WJ, Chan WK, Chen JJ, Yang PC (2006) A new tumor suppressor DnaJ-like heat shock protein, HLJ1, and survival of patients with non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 98: 825-838.
- 45 Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, Chan WK, Li HN, Liu CC, Singh S, Chen WJ, Chen JJ, Yang PC (2007) A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 356: 11-20.
- 46 Shibata T, Hanada S, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Ohta T, Sakamoto M, Hirohashi S (2007) Gene expression profiling of epidermal growth factor receptor/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 98: 985-991.
- 47 Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, Cambieri A, Selvaggi G, Saviozzi S, Calogero R, Papotti M, Scagliotti GV (2006) ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive

of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* 17: 1818-1825.

- 48 Vallbohmer D, Brabender J, Yang DY, Danenberg K, Schneider PM, Metzger R, Holscher AH, Danenberg PV (2006) Sex differences in the predictive power of the molecular prognostic factor HER2/neu in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 7: 332-337.
- 49 Tang H, Goldberg E (2008) Homo Sapiens Lactate Dehydrogenase c (Ldhc) Gene Expression in Cancer Cells is Regulated by Transcription Factor Sp1, CREB and CpG Island Methylation. *J Androl jandrol*.
- 50 Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G (2007) DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 356: 800-808.
- 51 Tian L, Suzuki M, Nakajima T, Kubo R, Sekine Y, Shibuya K, Hiroshima K, Nakatani Y, Fujisawa T, Yoshino I (2008) Clinical significance of aberrant methylation of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) in nonsmall cell lung cancer: association with prognosis, PTGER2 expression, and epidermal growth factor receptor mutation. *Cancer* 113: 1396-1403.
- 52 Mano Y, Takahashi K, Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y (2007) Fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner as a novel prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Sci* 98: 1902-1913.
- 53 Iwakiri S, Sonobe M, Nagai S, Hirata T, Wada H, Miyahara R (2008) Expression status of folate receptor alpha is significantly correlated with prognosis in non-small-cell lung cancers. *Ann Surg Oncol* 15: 889-899.
- 54 Meyer B, Loeschke S, Schultze A, Weigel T, Sandkamp M, Goldmann T, Vollmer E, Bullerdiek J (2007) HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* 46: 503-511.
- 55 Gallegos Ruiz MI, Floor K, Roepman P, Rodriguez JA, Meijer GA, Mooi WJ, Jassem E, Niklinski J, Muley T, van Zandwijk N, Smit EF, Beebe K, Neckers L, Ylstra B, Giaccone G (2008) Integration of gene dosage and gene expression in non-small cell lung cancer, identification of HSP90 as potential target. *PLoS ONE* 3: e0001722.
- 56 Lee ES, Son DS, Kim SH, Lee J, Jo J, Han J, Kim H, Lee HJ, Choi HY, Jung Y, Park M, Lim YS, Kim K, Shim YM, Kim BC, Lee K, Huh N, Ko C, Park K, Lee JW, Choi YS, Kim J (2008) Prediction of Recurrence-Free Survival in Postoperative Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Using an Integrated Model of Clinical Information and Gene Expression. *Clin Cancer Res* 14: 7397-7404.
- 57 Kato T, Hayama S, Yamabuki T, Ishikawa N, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y (2007) Increased expression of insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein 1 is associated with

- tumor progression in patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 13: 434-442.
- 58 Corson TW, Zhu CQ, Lau SK, Shepherd FA, Tsao MS, Gallie BL (2007) KIF14 messenger RNA expression is independently prognostic for outcome in lung cancer. *Clin Cancer Res* 13: 3229-3234.
 - 59 Shibata T, Hanada S, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, Ohta T, Sakamoto M, Hirohashi S (2007) Gene expression profiling of epidermal growth factor receptor/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 98: 985-991.
 - 60 Xing J, Stewart DJ, Gu J, Lu C, Spitz MR, Wu X (2008) Expression of methylation-related genes is associated with overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 98: 1716-1722.
 - 61 Sun Z, Yang P, Aubry MC, Kosari F, Endo C, Molina J, Vasmatazis G (2004) Can gene expression profiling predict survival for patients with squamous cell carcinoma of the lung? *Mol Cancer* 3: 35.
 - 62 Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, Harano T, Ogura N, Mitsudomi T, Some M, Yanagisawa K, Takahashi T, Osada H, Takahashi T (2004) Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* 23: 5360-5370.
 - 63 Yamashita SI, Masuda Y, Yoshida N, Matsuzaki H, Kurizaki T, Haga Y, Ikei S, Miyawaki M, Kawano Y, Chujo M, Kawahara K (2008) p53AIP1 expression can be a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 20: 148-151.
 - 64 Angulo B, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, Medina PP, Conde E, Tang M, Soler G, Lopez-Encuentra A, Cigudosa JC, Sanchez-Cespedes M (2008) Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol* 214: 347-356.
 - 65 Hofmann HS, Bartling B, Simm A, Murray R, Aziz N, Hansen G, Silber RE, Burdach S (2006) Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59.620-element oligonucleotide array. *Oncol Rep* 16: 587-595.
 - 66 Kim JH, Bogner PN, Baek SH, Ramnath N, Liang P, Kim HR, Andrews C, Park YM (2008) Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. *Clin Cancer Res* 14: 2326-2333.
 - 67 Diederichs S, Bulk E, Steffen B, Ji P, Tickenbrock L, Lang K, Zanker KS, Metzger R, Schneider PM, Gerke V, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C (2004) S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 64: 5564-5569.

- 68 Amachika T, Kobayashi D, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N (2007) Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers. *Lung Cancer* 56: 337-340.
- 69 Lin X, Gu J, Lu C, Spitz MR, Wu X (2006) Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12: 5720-5725.
- 70 Miura N, Nakamura H, Sato R, Tsukamoto T, Harada T, Takahashi S, Adachi Y, Shomori K, Sano A, Kishimoto Y, Ito H, Hasegawa J, Shiota G (2006) Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci* 97: 1366-1373.
- 71 Deng WG, Jayachandran G, Wu G, Xu K, Roth JA, Ji L (2007) Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2beta in human lung cancer cells. *J Biol Chem* 282: 26460-26470.
- 72 Ceppi P, Longo M, Volante M, Novello S, Cappia S, Bacillo E, Selvaggi G, Saviozzi S, Calogero R, Papotti M, Scagliotti GV (2008) Excision repair cross complementing-1 and topoisomerase IIalpha gene expression in small-cell lung cancer patients treated with platinum and etoposide: a retrospective study. *J Thorac Oncol* 3: 583-589.
- 73 Shintani Y, Ohta M, Hirabayashi H, Tanaka H, Iuchi K, Nakagawa K, Maeda H, Kido T, Miyoshi S, Matsuda H (2004) Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in tumor tissues and the efficacy of 5-fluorouracil in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 45: 189-196.
- 74 Shintani Y, Ohta M, Hirabayashi H, Tanaka H, Iuchi K, Nakagawa K, Maeda H, Kido T, Miyoshi S, Matsuda H (2003) New prognostic indicator for non-small-cell lung cancer, quantitation of thymidylate synthase by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 104: 790-795.

Table 1. Potential NSCLC biomarkers previously described.

Symbol¹	Gene Name¹	Gene ID¹	P-value²	Ref.
<i>ABCC1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	4363	0.6239	[27]
<i>AGER</i>	advanced glycosylation end product-specific receptor	177	0.0894	[28]
<i>ALKBH1</i>	alkB. alkylation repair homolog 1	8846	0.5685	[29]
<i>ALKBH5</i>	alkB. alkylation repair homolog 5	54890	0.1704	[29]
<i>ALKBH7</i>	alkB. alkylation repair homolog 7	84266	0.6970	[29]
<i>ALKBH8</i>	alkB. alkylation repair homolog 8	91801	0.5752	[29]
<i>AMFR</i>	autocrine motility factor receptor	267	0.6829	[30,31]
<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1	598	0.0661	[32]
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5	332	0.3584	[33,34]
<i>BRCA1</i>	breast cancer 1, early onset	672	0.5103	[35]
<i>CALB1</i>	calbindin 1, 28kDa	793	0.3541	[36]
<i>CAV1</i>	caveolin 1, caveolae protein	857	0.0808	[37]
<i>CBLC</i>	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence c	23624	0.0608	[38]
<i>CCNB2</i>	cyclin B2	9133	0.8282	[28]
<i>CCND1</i>	cyclin D1	595	0.1177	[29]
<i>CD9</i>	CD9 molecule	928	0.7940	[40,41]
<i>CDK8</i>	cyclin-dependent kinase 8	1024	0.4337	[42]
<i>CRABP1</i>	cellular retinoic acid binding protein 1	1381	0.5485	[27]
<i>CTSB</i>	cathepsin B	1508	0.6717	[43]
<i>DNAJB4</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B,	11080	0.2820	[44]

	member 4			
<i>DUSP6</i>	dual specificity phosphatase 6	1848	0.2842	[45]
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	1956	0.6074	[46,47]
<i>ERBB2</i>	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2.	2064	0.2379	[46,48]

Table 1. Continued.

Symbol¹	Gene Name¹	Gene ID¹	P-value²	Ref.
<i>ERBB3</i>	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	2065	0.5191	[49]
<i>ERCC1</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency.	2067	0.4269	[47, 50,5 1]
<i>FGFR10 P</i>	FGFR1 oncogene partner	11116	0.1871	[52]
<i>FOLR1</i>	folate receptor 1 (adult)	2348	0.3262	[53]
<i>GSTA1</i>	glutathione S-transferase alpha 1	2938	0.6353	[36]
<i>HMGA2</i>	high mobility group AT-hook 2	8091	0.7014	[54]
<i>HSP90A A1</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	3320	0.4367	[55]
<i>IFI44</i>	interferon-induced protein 44	10561	0.9626	[56]
<i>IGF2BP1</i>	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	10642	0.8041	[57]
<i>IL1A</i>	interleukin 1. alpha	3552	0.4672	[29]
<i>ILF3</i>	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	3609	0.7057	[36]
<i>KIF14</i>	kinesin family member 14	9928	0.9346	[58]
<i>KRAS</i>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	3845	0.4472	[59]

<i>LARS2</i>	leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	23395	0.8316	[27]
<i>LCK</i>	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	3932	0.5878	[49]
<i>LST1</i>	leukocyte specific transcript 1	7940	0.2105	[27]
<i>MBD2</i>	methyl-CpG binding domain protein 2	8932	0.4473	[60]
<i>MMD</i>	monocyte to macrophage differentiation-associated	23531	0.1662	[45]
<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	4609	0.4586	[61,62]
<i>P53AIP1</i>	p53-regulated apoptosis-inducing protein 1	63970	0.8171	[63]
<i>PIK3CA</i>	phosphoinositide-3-kinase.	5290	0.1111	[64]
<i>PLAU</i>	plasminogen activator. urokinase	5328	0.1314	[65]
<i>PRDX2</i>	peroxiredoxin 2	7001	0.9166	[66]
<i>PRSS3</i>	protease, serine, 3	5646	0.5814	[67]
<i>RRM1</i>	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	6240	0.8498	[47,50]

Table 1. *Continued.*

Symbol¹	Gene Name¹	Gene ID¹	P-value²	Ref.
<i>SLC1A7</i>	solute carrier family 1, member 7	6512	0.4883	[36]
<i>SLC2A1</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	6513	0.7739	[27]
<i>SP100</i>	SP100 nuclear antigen	6672	0.9490	[38]
<i>STAT1</i>	signal transducer and activator of transcription 1. 91kDa	6772	0.9245	[45]
<i>STC1</i>	stanniocalcin 1	6781	0.1508	[27]
<i>STYK1</i>	serine/threonine/tyrosine kinase 1	55359	0.6834	[68]

<i>TAL2</i>	T-cell acute lymphocytic leukemia 2	6887	0.4593	[36]
<i>TERF2</i>	telomeric repeat binding factor 2	7014	0.1028	[69]
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase	7015	0.7542	[70]
<i>TFAP2B</i>	transcription factor AP-2 beta	7021	0.1814	[71]
<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha	7153	0.1998	[72]
<i>TYMS</i>	thymidylate synthetase	7298	0.1742	[73,74]

¹Gene symbols and names according to HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC database (<http://www.genenames.org>).

²Differences in survival were assessed with the log-rank test using SPSS version 14.0. In all statistical analyses, *P*-value less than 0.05