

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Rita de Cássia Sant’Anna Alves**

**Estudo Citogenético dos Genes  
*MYC* e *HER2* em Carcinomas de  
Pequenas Células de Pulmão,  
através da Técnica de Hibridização  
*in situ* Cromogênica - CISH**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre  
2014**

Rita de Cássia Sant'Anna Alves

**Estudo Citogenético dos Genes *MYC*  
e *HER2* em Carcinomas de Pequenas  
Células de Pulmão, através da  
Técnica de Hibridização *in situ*  
Cromogênica - CISH**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia da  
Universidade Federal de Ciências da  
Saúde de Porto Alegre – UFCSPA  
como requisito para a obtenção do  
grau de Doutor

Orientador: Professora Dra. Adriana Vial Roehé

Porto Alegre  
2014

### Catálogo na Publicação

Alves, Rita de Cássia sant Anna

Estudo citogenético dos genes myc e her2 em carcinomas de pequenas células de pulmão, através da técnica de hibridização in situ cromogênica - cish / Rita de Cássia sant Anna Alves. -- 2014.

115 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.

Orientador(a): Adriana Vial Roehe.

1. Neoplasias do Sistema Respiratório. 2. Análise Citogenética. I. Título.

**“Sabemos de quase nada adequadamente, de poucas coisas  
*a priori*, e da maioria por meio da experiência.”**

**Gottfried Wilhelm Leibniz**

## **Agradecimentos**

À minha querida filha Roberta pela compreensão em todos os momentos de ausência.

Aos meus pais amados, Paulo e Arlette por me apoiarem em todos os momentos deste projeto transmitindo entusiasmo e sabedoria.

Ao meu amor Manoel Renato, pela paciência e incansável disposição para colaborar na execução deste projeto.

À minha orientadora, Dra. Adriana Vial Roehe, agradeço pela amizade e dedicação na orientação desta tese, sempre muito presente.

Às Secretárias Maristela Pasin e Luciana Spencer pela amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, professores, funcionários e colegas.

Às profissionais do Laboratório de Patologia da Pós-Graduação, Rosalva Meurer, Terezinha Stein e Keli Reiter pela amizade e apoio técnico na realização deste projeto.

Aos professores e técnicos administrativos do Departamento de Patologia e Medicina Legal pelo apoio e suporte durante todo este projeto, meu sincero agradecimento.

Ao querido Professor Dr. Antônio Hartmann, pelo incentivo na realização deste projeto e exemplo profissional.

Ao professor Dr. Paulo Zen, professor de Genética Clínica da UFCSPA, pela orientação na interpretação dos resultados do CISH e conselhos técnicos.

Ao professor Dr. Vinícius Duval da Silva, chefe do Serviço de Patologia da PUC-RS, pelo auxílio na realização das microfotografias.

Aos estudantes de graduação Henrique Alencastro Puls e Natália Caramori pelo auxílio na revisão dos prontuários.

À aluna de Pós-graduação do Programa de Patologia Lisiane Zavalhia, pelos conselhos valiosos.

Às colegas, Flávia Frustockl, Isabel Nunes, Isabella Meirelles, Heloísa Folgierini e Maria Cristina Boeira pela amizade e apoio nos momentos em que estive ausente.

À professora Estela Maris Bertolon pelo auxílio na elaboração e revisão do artigo.

A todas as pessoas que ajudaram de alguma forma neste projeto e que não foram citadas.

## Sumário

I. Lista de Abreviaturas Utilizadas.....	VIII
II. Lista de Figuras e Quadros da Introdução.....	XIII
III. Lista de Figuras e Tabelas do Artigo.....	XIII
IV. Resumo .....	XIV
1. Introdução.....	16
1.1. Incidência do câncer de pulmão e do carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC).....	16
1.2. Fatores de risco para o câncer de pulmão.....	18
1.3. Características clínicas do SCLC e estadiamento.....	22
1.4. Aspectos morfológicos do SCLC.....	27
1.5. Alterações genéticas do SCLC.....	30
1.5.1. Proto-oncogene <i>MYC</i> ( <i>c-myc</i> ).....	34
1.5.1.1. Estrutura e função do gene <i>MYC</i> .....	34
1.5.1.2. SCLC e amplificação do gene <i>MYC</i> .....	38
1.5.2. Proto-oncogene <i>HER2</i> ( <i>ERBB2</i> ).....	43
1.5.2.1. Estrutura e função do gene <i>HER2</i> .....	43
1.5.2.2. Amplificação e expressão dos genes da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico ( <i>EGFR</i> e <i>HER2</i> ) em neoplasias pulmonares malignas.....	45
1.5.2.2.1. <i>EGFR</i> e <i>HER2</i> em NSCLC.....	45
1.5.2.2.2. <i>EGFR</i> e <i>HER2</i> em SCLC.....	47
1.6. Referências bibliográficas.....	50

2. Objetivos.....	61
2.1. Objetivos específicos.....	61
3. Artigo científico redigido em inglês e resultados do gene <i>HER2</i> .....	62
4. Considerações finais.....	78
5. Anexos.....	80
5.1. Materiais e métodos.....	80
5.1.1. Amostra e variáveis.....	80
5.1.2. Técnica de CISH.....	82
5.1.2.1. Técnica de CISH – procedimento e análise microscópica.....	83
5.1.3. Análise estatística.....	86
5.2. Tabelas e figuras da análise estatística.....	87
5.3. Fotos da técnica de CISH e das características histopatológicas da amostra.....	95
5.4. Considerações éticas e pareceres dos Comitês de Ética.....	104
5.5. Trabalhos apresentados em Congressos e Jornadas.....	109
5.6. Referências dos anexos.....	115

**I. Lista de abreviaturas utilizadas**

AE1-AE3: Pancitoqueratina

BR: Regiões básicas

CACNA2D2: *Calcium Channel, Voltage-Dependent, Alpha 2/Delta Subunit 2*

CD56: *Neural Cell Adhesion Molecule* - molécula de adesão neural

Cdc25a: *Cell division cycle 25<sub>a</sub>*.

CDK: *Cyclin-dependent kinase*

CDK2: *Cyclin-dependent kinase 2*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CISH: Hibridização *in situ* cromogênica

CONEP: Conselho Nacional de Ensino em Pesquisa

COPD: *Chronic obstructive pulmonary disease*

101F6: Cytochrome B561 Family, Member D2

DAB: 3,3' - *diaminobendizine*

DLEC1: *Deleted In Lung And Esophageal Cancer 1*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etilenodiamino tetra-acético

*HER3 (ERBB3): Tyrosine Kinase-Type Cell Surface Receptor HER3*

*HER4 (ERBB4): Tyrosine Kinase-Type Cell Surface Receptor HER4*

EGF: *Epidermal growth factor* - fator de crescimento epidérmico

*EGFR: Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-1*

E2F: Fator de transcrição

*ERBA-2: Thyroid Hormone Receptor Beta*

EUA: Estados Unidos da América

FISH: Hibridização *in situ* fluorescente

*FHIT: Fragile histidine triad*

*FUS1: Fused in sarcoma*

G1: Primeira fase do ciclo celular, crescimento

GHC: Grupo Hospitalar Conceição

H.E.: Hematoxilina e eosina

*HER2: Tyrosine Kinase-Type Cell Surface Receptor HER2*

HLH: *Helix-loop-helix*

IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ISH: Hibridização *in situ*

Ki67: Proteína Ki67

LOH: *Loss of heterozygosity*

*L-myc: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene lung carcinoma derived homolog*

LZ: *Leucine Zipper*

mad: *Mitotic arrest deficient* - proteína que atua no ciclo celular

max: Proteína max

MbI e II: *Myc boxes*

*MYC: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

myc-1: Proteína sintetizada pelo gene *MYC*

myc-2: Proteína sintetizada pelo gene *MYC*

myc-3: Proteína sintetizada pelo gene *MYC*

myc-5: Proteína sintetizada pelo gene *MYC*

*NPRL2*: Gene nitrogênio permease regulador- like

*NSCLC: Non small cell lung cancer* – carcinoma não de pequenas células do pulmão

NE: Neuroendócrinos

NISS: Núcleo de informação do Sistema de Saúde da Secretaria da Saúde de Porto Alegre

*N-myc: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*

OMS: Organização Mundial da Saúde

p64: Proteína p64

p67: Proteína p67

PBS: *Phosphate buffered saline* – tampão fosfato-salino

PCR: *Polymerase chain reaction* - reação de cadeia da polimerase

*P, R, B-myc*: Genes da família myc

Rb: Proteína Rb

*RB1: Retinoblastoma 1*

*RAF1: V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*

*RAR $\beta$ : Retinoic acid receptor  $\beta$ 2*

*RASSF1A: Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1*

RNA: Ácido ribonucleico

S: Fase do ciclo celular, síntese

SIAP: Sistema de Imagens Anatomopatológicas

SCLC: *Small cell lung cancer* – carcinoma de pequenas células do pulmão

*SEMA3B: Sema Domain, Immunoglobulin Domain (Ig), Short Basic Domain, Secreted, (Semaphorin) 3B*

*SEMA3F: Sema Domain, Immunoglobulin Domain (Ig), Short Basic Domain, Secreted, (Semaphorin) 3F*

SNC: Sistema nervoso central

TAD: *Transactivation domain* - domínio de transativação

TKIs: *Tyrosine kinase inhibitors* - inibidores da tirosina quinase

TP53: *Tumor Protein P53*

VALSGS: *Veterans Administration Lung Study Group System*

v-myc: *V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog-like 1*

## II. Lista de Figuras e Quadros da Introdução

Quadro 1 - Classificação das neoplasias pulmonares, simplificada conforme a Organização Mundial da Saúde – OMS .....	23
Figura 1 - Características macroscópicas do SCLC.....	28
Figura 2 - Aspectos microscópicos do SCLC .....	28
Figura 3 - Localização do gene <i>MYC</i> no cromossomo 8 .....	35
Figura 4 - Estrutura e principais regiões da proteína myc .....	36
Figura 5 - Interação da proteína myc na fase G1 do ciclo celular .....	37
Figura 6 - Estrutura da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico.....	44
Figura 7 - Localização do gene <i>HER2</i> no cromossomo 17.....	44

## III. Lista de Figuras e Tabelas do Artigo e dos resultados do gene HER2

### - *MYC* amplification associated with poor survival in small cell lung cancer: a chromogenic in situ hybridization study

Table I - Clinical pathological characteristics and <i>MYC</i> status in SCLC patients.....	74
Fig-1 - Kaplan- Meier Curve .....	75

### - Resultados do gene HER2

Tabela 1 - Características da amostra em relação ao <i>HER2</i>	77
---	----

#### IV. Resumo

**Introdução:** o carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC) é um tumor extremamente agressivo com baixa sobrevida em dois anos. Pouco avanço ocorreu nos últimos 20 anos em termos terapêuticos para este tipo de neoplasia. Alterações citogenéticas envolvendo o gene *MYC* e *HER2* têm sido relacionadas a uma maior agressividade no SCLC e podem representar potenciais alvos terapêuticos.

**Objetivo:** determinar o número de cópias dos genes *MYC* e *HER2* em SCLC, através da técnica de CISH e correlacionar a amplificação gênica com aspectos clinicopatológicos e sobrevida global dos pacientes.

**Material e Métodos:** foram utilizados blocos de parafina provenientes de 77 pacientes com SCLC submetidos uma biópsia para diagnóstico do SCLC. As amostras foram analisadas através da técnica de CISH com as sondas para os genes *MYC* e *HER2*. A relação entre a análise citogenética, características histopatológicas e sobrevida global foi averiguada pelo Teste Exato de Fisher e o método de Mann-Whitney.

**Resultados:** as amostras foram provenientes de biópsias brônquicas em 64,9% dos casos, e o restante, de linfonodos regionais. A análise pelo CISH com a sonda *MYC* foi realizada em 55 amostras e com a sonda *HER2*, em 21 amostras. O *MYC* foi considerado amplificado em 20% das amostras. Após regressão multivariada os pacientes com amplificação do gene *MYC* apresentaram uma sobrevida menor (4,7 semanas) comparados com os

pacientes sem amplificação (26,2 semanas) ( $P=0,02$  IC= 1,355- 10,261). Não houve correlação estatística entre a amplificação do gene *MYC* e outros aspectos clinicopatológicos. Não foi observada amplificação do gene *HER2* nas amostras estudadas.

**Conclusão:** a amplificação do gene *MYC* é um evento frequente no SCLC e poderia estar relacionada a uma sobrevida global menor. O status do gene *MYC* pode ser um fator prognóstico independente no SCLC.

**Palavras chave:** *MYC*, carcinoma de pequenas células do pulmão, CISH, fator prognóstico, sobrevida, amplificação gênica.

## **1. Introdução**

### **1.1. Incidência do câncer de pulmão e do carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC)**

O câncer de pulmão é uma das neoplasias de maior incidência no mundo e associa-se a uma alta mortalidade. Antes do século XX, esta neoplasia era considerada rara e a partir deste século sua incidência teve um aumento significativo. As últimas estatísticas mundiais estimam cerca de 1,61 milhão de casos novos por ano de câncer de pulmão (Alberg e Samet, 2003; INCA, 2011; Siegel e cols., 2013).

O câncer de pulmão é o segundo tipo de neoplasia mais incidente nos Estados Unidos da América (EUA) em homens e mulheres, correspondendo a 14% dos novos casos estimados para o ano de 2013. Para este ano, a estimativa de novos casos de câncer de pulmão nos EUA é de 228.190 casos, sendo 118.080 do sexo masculino e 110.110 do feminino (Siegel e cols., 2013).

Nos homens, esta neoplasia fica atrás apenas do câncer de próstata que corresponde a 28% dos novos casos de câncer em 2013 nos EUA. Para as mulheres, o câncer de pulmão também é o segundo em incidência, correspondendo a 14% dos casos novos de câncer para o ano de 2013, perdendo apenas para o câncer de mama (Siegel e cols., 2013).

Com relação à mortalidade, contudo, o câncer de pulmão está em primeiro lugar nas estimativas por neoplasias nos EUA nos últimos anos,

correspondendo a 159.480 óbitos no total, sendo 28% (87.260 casos) nos homens e 26% (72.220 casos) nas mulheres em 2013 (Siegel e cols., 2012; Siegel e cols., 2013).

No Brasil, o câncer de pulmão também apresenta uma alta incidência. Para o ano de 2012 foram estimados 17.210 casos novos entre os homens e 10.110 novos casos entre as mulheres, correspondendo a um risco estimado de 18 casos novos a cada 100 mil homens e 10, a cada 100 mil mulheres. O câncer de pulmão é o segundo tipo mais frequente nas regiões Sul (37/100 mil) e Centro-Oeste (17/100 mil) para os homens. Para as mulheres, ele é o terceiro mais frequente na região Sul (19/100 mil). Estas estimativas são esperadas também para 2013, conforme o Instituto nacional do Câncer – INCA (INCA, 2011).

Entre as neoplasias de pulmão, o SCLC representa 20% dos casos (Jackman e Johnson, 2005; Siegel e cols., 2012). Na Inglaterra, um estudo de *coorte*, em uma população entre 1970 e 2007, mostrou uma incidência de 10 a 11% para o SCLC (Riaz e cols., 2012). Nos últimos anos, há uma tendência na redução deste tipo de câncer, possivelmente relacionada à redução do consumo de tabaco nos países desenvolvidos (Jackman e Johnson, 2005; Riaz e cols., 2012; Siegel e cols., 2012).

No Brasil, o SCLC também é uma neoplasia maligna frequente, que corresponde de 15 a 25% dos casos de carcinoma de pulmão (INCA, 2011).

## 1.2. Fatores de risco para o câncer de pulmão

### - Cigarro

As neoplasias malignas de pulmão apresentam fatores de risco bem estabelecidos. Dentre estes fatores, o fumo é o agente etiológico mais implicado no desenvolvimento do câncer de pulmão, correspondendo à causa desta neoplasia em 90% dos casos. O fumo está mais relacionado a alguns tipos histológicos, como o carcinoma epidermoide e o SCLC (Travis e cols., 2004).

O risco de desenvolver um câncer em um indivíduo fumante é 20 a 30% maior do que na população não fumante. Assim, a incidência desta neoplasia está diretamente relacionada ao consumo de cigarros. A evolução do câncer de pulmão no século XX mostra claramente esta associação, que culminou com um pico da doença nas décadas de 50 e 60 e progressivamente vem declinando, mostrando que este tipo de neoplasia é evitável com a cessação do hábito de fumar (Doll, 1950; Levin e cols., 1950; Wynder e Graham, 1950; Alberg e Samet, 2003; Anthonisen e cols., 2005).

O fumo é consumido há alguns séculos, porém o aumento da incidência de câncer pulmonar e a sua relação com o fumo só foram estabelecidos a partir da primeira metade do século XX, devido à industrialização. Isto proporcionou o desenvolvimento de produtos manufaturados que determinaram a alteração na forma do consumo, exposição a outros agentes carcinogênicos presentes no cigarro e, conseqüentemente, o aumento da incidência da neoplasia. Vários

estudos conduzidos na década de 50 e 60 comprovaram a associação do cigarro com o câncer de pulmão. Em 1964, o *Committee to the Surgeon General* dos EUA considerou que havia evidências suficientes para concluir que o cigarro causa câncer de pulmão (Levin e cols., 1950; Wynder e Graham, 1950; Doll, 1955a; Doll e Hill, 1964; DHEW, 1964; Alberg e Samet, 2003; Miller, 2005).

O cigarro contém em sua composição mais de 4.000 substâncias identificáveis, das quais mais de 40 são agentes carcinogênicos conhecidos, entre eles hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ex: benzopireno) e nitrosaminas, além de uma infinidade de substâncias não conhecidas e potencialmente lesivas (Rom e cols., 2000; Alberg e Samet, 2003).

Outras formas de fumo como o charuto e o cachimbo, também estão relacionadas a um maior risco de câncer de pulmão. Porém, a forma de consumo determina uma incidência menor de câncer nestes grupos, quando comparado com o cigarro (Boffetta e cols., 1999).

As diferenças na incidência do câncer de pulmão entre os sexos também refletem o padrão de consumo do cigarro. As estatísticas norte-americanas mostram o declínio do câncer de pulmão em mulheres a partir de 1990, cerca de uma década após a redução da incidência desta neoplasia em homens. Isto mostra as diferenças históricas no padrão de consumo. As mulheres apresentaram um pico de maior prevalência do consumo de cigarros 20 anos após os homens (Siegel e cols., 2012).

O fumo passivo também é uma forma de exposição aos agentes do cigarro frequentemente associado ao risco de desenvolver câncer de pulmão. Esta associação é demonstrada através de estudos em cônjuges de fumantes que apresentam uma incidência maior de neoplasias pulmonares que a população não exposta ao fumo passivo (Alberg e Samet, 2003).

Contudo, o aumento significativo do câncer de pulmão, principalmente de adenocarcinomas em mulheres não fumantes, mostra a possível existência de outros fatores etiológicos no desenvolvimento desta neoplasia. Dentro deste contexto vários estudos mostram a associação de agentes virais, como o vírus do papiloma humano e ainda de fatores hormonais, na etiologia do adenocarcinoma pulmonar (Alberg e Samet, 2003; Chen e cols., 2004; Lam e cols., 2004).

#### - Poluição e exposição ocupacional

A poluição ambiental é um fator que pode estar associado ao câncer de pulmão através principalmente de carcinógenos gerados pela combustão de derivados do petróleo (Alberg e Samet, 2003).

Em países como a China, o câncer de pulmão apresenta também uma incidência alta, devido, não só ao consumo elevado do cigarro, mas também à poluição ambiental e ao hábito de cozimento e defumação de alimentos em ambientes fechados (Alberg e Samet, 2003).

A exposição ocupacional e ambiental a certas substâncias também pode estar implicada na gênese do câncer de pulmão em aproximadamente 9 a 15% dos casos. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, o arsênio, o radônio e

o amianto (asbesto) são algumas destas substâncias. Todos estes agentes potencialmente carcinogênicos podem isoladamente ou de forma sinérgica com o cigarro aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de pulmão (Doll, 1955b; Coultas e Samet, 1992; Greenberg e Selikoff, 1993; Pershagen e cols., 1994; Alberg e Samet, 2003).

#### - Fatores genéticos e étnicos

Apesar dos fatores ambientais e ocupacionais serem considerados os principais fatores etiológicos no câncer de pulmão, a variabilidade individual na suscetibilidade a agentes carcinogênicos também contribui para a sua ocorrência na população. As variações genéticas individuais explicam, de certa forma, porque razão pessoas que nunca fumaram desenvolvem este tipo de câncer e porque outras que fumaram durante toda a vida nunca irão desenvolver a doença (Alberg e Samet, 2003).

A história familiar é um fator de risco importante para o câncer de pulmão. Em 2004, em um estudo de análise de ligação, o loco 6q23-25 foi associado a uma maior suscetibilidade para o câncer de pulmão em famílias com múltiplos membros afetados por neoplasias de pulmão e cabeça e pescoço (Bailey-Wilson e cols., 2004; Jonsson e cols., 2004; Schwartz, 2004; Miller, 2005).

Com relação à etnia, observa-se uma maior incidência da neoplasia em afro-americanos do que em caucasianos americanos. O mesmo ocorre entre a população hispânica e norte americana branca de origem europeia (Alberg e Samet, 2003).

- Outros fatores

Algumas doenças pulmonares como infecções, tuberculose e doença pulmonar obstrutiva crônica também são consideradas fatores de risco para este tipo de câncer (Alberg e Samet, 2003; Travis e cols., 2004).

Fatores socioeconômicos e geográficos também estão implicados numa maior incidência. A neoplasia é mais incidente nos EUA e países ricos da Europa do que na Ásia e África (Alberg e Samet, 2003).

### **1.3. Características clínicas do SCLC e estadiamento**

O câncer de pulmão apresenta características clinicopatológicas conforme o seu tipo histológico. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Grupo de Estudo Internacional para o Câncer de Pulmão classificam as neoplasias epiteliais malignas do pulmão em dois grandes grupos: o SCLC e o carcinoma não de pequenas células (NSCLC), os quais apresentam aspectos clínicos, patológicos, prognósticos e terapêuticos bastante diversos.

Dentro dos NSCLC, encontram-se o carcinoma epidermoide, o adenocarcinoma, o carcinoma bronquíolo-alveolar e o carcinoma de grandes células, entre outros. Dentro do grupo dos SCLC, encontra-se o SCLC puro e o combinado, onde outros tipos histológicos podem ser encontrados. A classificação histopatológica das neoplasias pulmonares da OMS pode ser observada no Quadro 1 (Travis e cols., 2004).

Quadro 1 - Classificação das neoplasias pulmonares, simplificada conforme a Organização Mundial da Saúde – OMS.

<p><b>Neoplasias epiteliais malignas</b></p> <p>Carcinoma epidermoide</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- papilar,</li> <li>- células claras</li> <li>- pequenas células</li> <li>- basaloide</li> </ul> <p>Carcinoma de pequenas células</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinoma de pequenas células combinado</li> </ul> <p>Adenocarcinoma</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- subtipo misto</li> <li>- acinar</li> <li>- papilar</li> <li>- bronquíolo alveolar</li> <li>- não-mucinoso, mucinoso, misto ou indeterminado</li> <li>- sólido com mucoprodução</li> <li>- fetal, mucinoso, células claras,</li> <li>- cistoadenocarcinoma, com células em anel de sinete</li> </ul> <p>Carcinoma de grandes células</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- neuroendócrino</li> <li>- basaloide</li> <li>- linfoepitelioma “like”</li> <li>- células claras</li> <li>- fenótipo rabdoide</li> </ul> <p>Adenoescamoso</p> <p>Sarcomatoide</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pleomórfico</li> <li>- células fusiformes</li> <li>- células gigantes</li> <li>- carcinosarcoma</li> <li>- blastoma pulmonar</li> </ul> <p>Tumor carcinoide</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- típico</li> <li>- atípico</li> </ul> <p>Tumores de glândulas salivares</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- carcinoma mucoepidermoide</li> <li>- adenoide cístico</li> <li>- carcinoma epitelial-mioepitelial</li> </ul> <p>Lesões pré-invasivas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- carcinoma epidermoide <i>in situ</i></li> <li>- hiperplasia adenomatosa atípica</li> <li>- hiperplasia de células neuroendócrinas difusa idiopática</li> </ul>	<p><b>Tumores mesenquimais</b></p> <p>Hemangioendotelioma epitelioide</p> <p>Angiossarcoma</p> <p>Blastoma pleuropulmonar</p> <p>Condroma</p> <p>Tumor peribrônquico miofibroblástico congênito</p> <p>Linfangiomatose pulmonar difusa</p> <p>Tumor miofibroblástico inflamatório</p> <p>Linfangioleiomiomatose</p> <p>Sarcoma sinovial</p> <p>Sarcoma da artéria pulmonar</p> <p>Sarcoma da veia pulmonar</p> <p><b>Tumores epiteliais benignos</b></p> <p>Papilomas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- escamoso</li> <li>- exofítico, invertido</li> <li>- glandular</li> <li>- misto</li> </ul> <p>Adenomas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- alveolar</li> <li>- papilar</li> <li>- adenomas de glândulas salivares</li> <li>- mucinoso, pleomórfico, outros</li> <li>- cistoadenoma mucinoso</li> </ul> <p><b>Tumores linfoproliferativos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- linfoma B da zona marginal do tipo MALT</li> <li>- linfoma difuso de grandes células</li> <li>- granulomatose linfomatoide</li> <li>- histiocitose de células de Langerhans</li> </ul> <p><b>Miscelâneas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- hamartoma</li> <li>- hemangioma esclerosante</li> <li>- tumor de células claras</li> <li>- tumores germinativos</li> <li>- teratoma maduro, imaturo</li> <li>- outros tumores germinativos</li> <li>- timoma intrapulmonar</li> <li>- melanoma</li> </ul> <p><b>Tumores metastáticos</b></p>
--	---

O SCLC é uma neoplasia de características peculiares, tanto do ponto de vista clínico quanto morfológico. Clinicamente o SCLC apresenta-se como uma neoplasia de padrão neuroendócrino, com um comportamento biológico agressivo. Na maioria das vezes, há uma predileção pela localização na região central do tórax, evidenciada pelos exames de imagem, com comprometimento hilar e de linfonodos mediastinais, podendo também ocorrer invasão direta do mediastino. Esta neoplasia também tem uma tendência à disseminação precoce, sendo comum a presença de sintomas relacionados às metástases já no momento do diagnóstico (Travis e cols., 2004).

Os sintomas relacionados às metástases frequentemente são constitucionais, como perda de peso e fadiga, e órgãos específicos, como dor abdominal relacionada ao comprometimento hepático, suprarrenal e pancreático; dor pelo envolvimento da medula óssea; e alterações em exames laboratoriais, como enzimas hepáticas elevadas, anemia, aumento da fosfatase alcalina. O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) é observado em 5 a 10% dos pacientes no momento do diagnóstico. Contudo, as metástases cerebrais desenvolvem-se mais frequentemente no curso da doença, podendo ser múltiplas (Rivera e cols., 2003; Jackman e Johnson, 2005).

Cerca de 10% dos pacientes apresentam a síndrome da veia cava superior, que se caracteriza por obstrução da veia cava superior, levando à distensão das veias da região cervical, edema da face e membros superiores, taquipneia, cianose e paralisia de cordas vocais. Também é muito comum nesta neoplasia o aparecimento de síndromes paraneoplásicas, as quais são

relacionadas à produção ectópica de hormônios peptídicos, como a síndrome de secreção inapropriada do hormônio antidiurético e secreção inapropriada do hormônio adrenocortical. Síndromes neurológicas relacionadas a auto-anticorpos também são observadas como a Síndrome de Lambert-Eaton (Rivera e cols., 2003; Jackman e Johnson, 2005).

O diagnóstico do SCLC pode ser estabelecido, na maioria das vezes, por exame citopatológico de escarro, pleura, lavado e escovado brônquico; exame anatomopatológico de biópsia brônquica e biópsia de linfonodos mediastinais, ou punção biópsia pulmonar. Quando não é possível se estabelecer o diagnóstico por um destes métodos, a abordagem pode ser realizada através de mediastinoscopia, toracoscopia ou toracotomia. A biópsia de sítios metastáticos também é útil, muitas vezes comprovando o tipo histológico e estabelecendo o estadiamento (Chin e cols., 2000; Delgado e cols., 2000; INCA, 2003; Rivera e cols., 2003; Travis e cols., 2010; Thunnissen e cols., 2012).

As amostras de biópsias endobrônquicas são pequenas, medindo entre 2 a 5 milímetros. O SCLC geralmente é uma lesão que pode ser biopsiada através desta via e caracteriza-se por localização submucosa ou mucosa sem ulceração da mucosa brônquica (Travis e cols., 2010).

Os pacientes com SCLC raramente se apresentam com doença localizada no momento do diagnóstico, impossibilitando a ressecção cirúrgica. Nesta situação não se utilizava o sistema TNM para estadiamento dos SCLC até bem pouco tempo. Ao invés disso, o estadiamento era baseado no proposto pelo *Veterans Administration Lung Study Group System* (VALSGS), o

qual classifica os pacientes como tendo doença limitada ou avançada. Doença limitada é definida como doença restrita a um hemitórax com linfonodos hilares e mediastinais, incluindo linfonodos hilares ipsilaterais e contralaterais, mediastinais ipsilaterais e contralaterais, supraclaviculares ipsilaterais e contralaterais e derrame pleural ipsilateral (independente da citologia). Doença limitada destes pacientes equivale a estágio I a III do TNM. Todos os outros pacientes fora destes parâmetros são considerados pacientes com doença avançada segundo o VALSGS (Travis e cols., 2004; Kim e cols., 2012).

Na última edição do IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) *Lung Cancer Staging Project*, o SCLC e outras neoplasias neuroendócrinas pulmonares foram incluídos na sétima edição da Classificação do TNM. Esta forma de estadiamento foi justificada pela diferença na sobrevida dos pacientes com doença localizada que apresentavam N<sub>0</sub> e N<sub>1</sub> *versus* aqueles com N<sub>2</sub> e N<sub>3</sub> (Vallières e cols., 2009; Sørensen e cols., 2010; Goldstraw, 2011).

O SCLC por se tratar de uma neoplasia quimiossensível, é tratado preferencialmente com agentes quimioterápicos associados à radioterapia. A cirurgia de ressecção raramente é utilizada e apresenta indicações controversas, estando indicada em doença extremamente limitada sem evidência de comprometimento nodal (Simon e cols., 2003).

Na doença localizada, o tratamento consiste do uso de drogas quimioterápicas como o etoposide associado à cisplatina em combinação com radioterapia torácica. Os pacientes são potencialmente curáveis, sendo a sobrevida em 5 anos de 20 a 25% (Sørensen e cols., 2010).

Na doença avançada pode-se utilizar cisplatina ou carboplastina em combinação com etoposide. O prognóstico é extremamente pobre, com uma sobrevida em dois anos de aproximadamente 10% e média de sobrevida de 10 meses (Sørensen e cols., 2010).

#### **1.4. Aspectos morfológicos do SCLC**

Macroscopicamente o SCLC caracteriza-se por uma massa central parda ou cinza, endurecida e de aspecto infiltrativo. O envolvimento hilar, de linfonodos regionais e de estruturas mediastinais é frequente, principalmente por esta tendência de localização central. O estudo dos aspectos macroscópicos, contudo, é limitado devido à escassez de peças cirúrgicas, uma vez que o tratamento é iminente químico e radioterápico. Na Figura 1 observa-se o aspecto macroscópico do SCLC (Travis e cols., 2004).

Do ponto de vista histopatológico, o SCLC é definido como uma neoplasia maligna epitelial, constituída por células pequenas com pouco citoplasma, bordas celulares pouco definidas, cromatina nuclear finamente granular e nucléolo inconspícuo ou ausente. As células são ovais, arredondadas ou fusiformes, com amoldamento nuclear e contagem mitótica elevada. O crescimento tumoral pode apresentar padrão em lençóis de células, rosetas, ninhos organoide e células em paliçada, sendo que raramente podem formar estruturas tubulares. O aspecto microscópico pode ser observado na Figura 2 (Travis e cols., 2004; Travis, 2012).

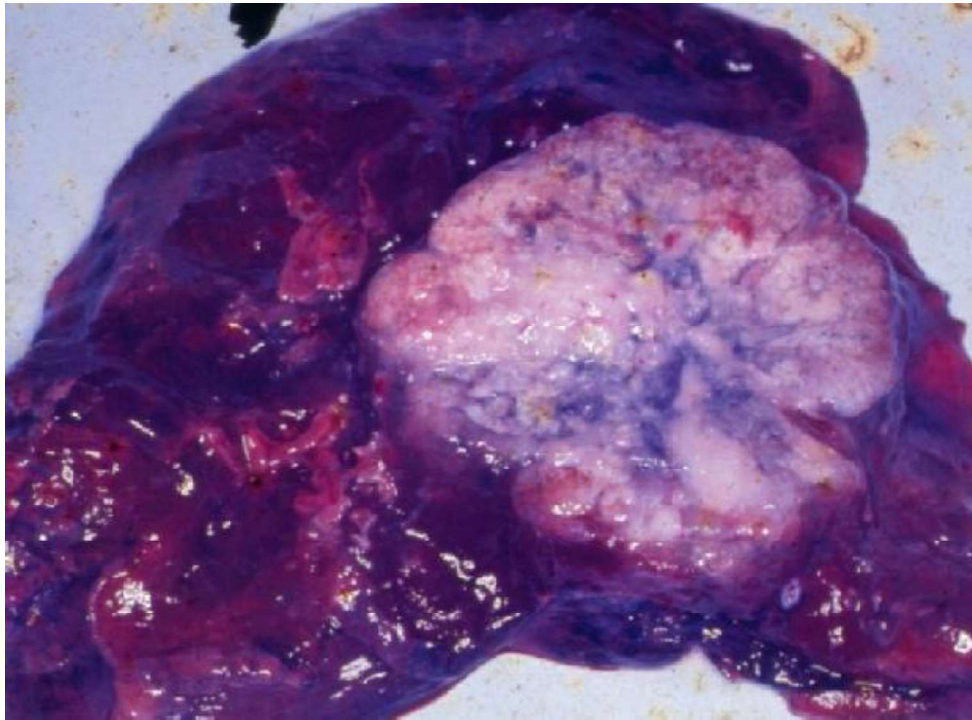


Figura 1 - Características macroscópicas do SCLC. (fonte: SIAP- Sistema de Imagens Anatomopatológicas, UFCSPA).

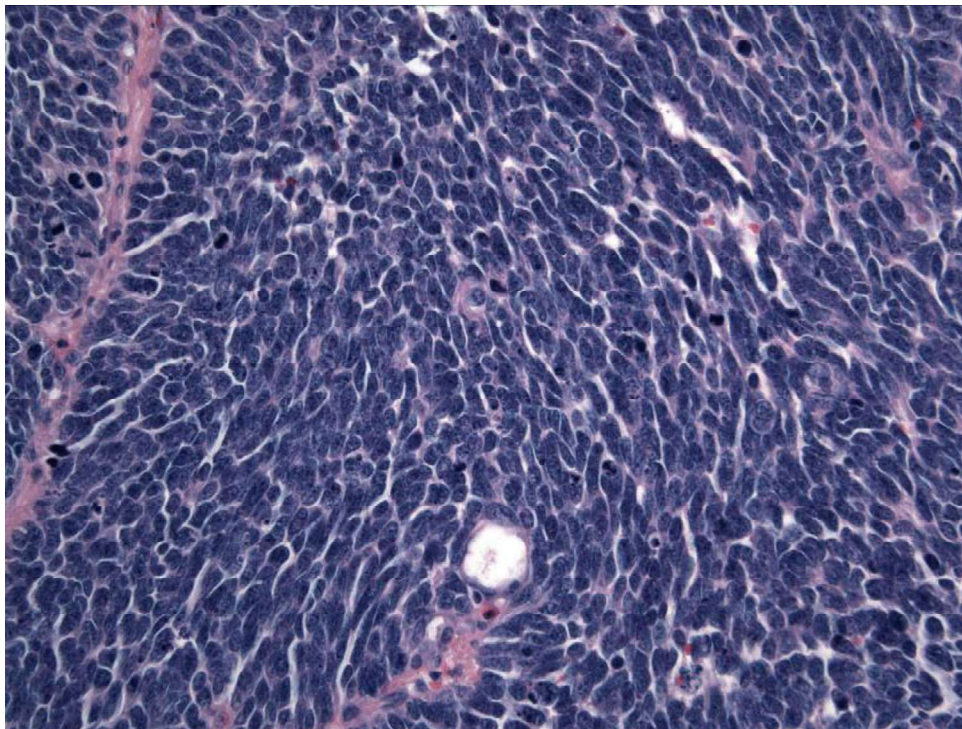


Figura 2 - Aspecto microscópico do SCLC (fonte: Jackman e cols., 2005)

Algumas características próprias do SCLC são a presença de necrose microscópica focal, artefato por esmagamento e encrustamento basofílico do DNA ao redor dos vasos, o qual produz uma alteração artefactual no processamento histológico que é chamada de efeito Azzopardi. O efeito Azzopardi, apesar de ser característico do SCLC, pode prejudicar a avaliação histopatológica pela perda dos detalhes nucleares, como padrão cromatínico e atividade mitótica. Além disso, essas alterações também podem dificultar a interpretação de exames complementares no material de biópsia, como o exame imuno-histoquímico e a hibridização *in situ* (ISH) (Nicholson e cols., 2002).

A classificação do SCLC já sofreu várias modificações desde a década de 60, quando Kreyberg (1962) propôs a classificação do SCLC em avencelular (*oat cell*) e poligonal. Em 1981, a OMS propôs uma classificação com um tipo intermediário. Entretanto, após a classificação da IASLC de 1998, este grupo intermediário foi abolido (Travis e cols., 2004; Travis, 2012).

A classificação atual do SCLC (OMS, 2004) é feita em duas categorias: típico SCLC, onde mais de 90 % do tumor é constituído pelo SCLC; e combinado, onde ocorre a presença de outro subtipo histológico de câncer de pulmão do tipo NSCLC, podendo estar representado por áreas de adenocarcinoma, carcinoma epidermoide ou de grandes células em pelo menos 10% do espécime. Os carcinomas combinados são mais raros e sua frequência é de 28% dependendo do tamanho da amostra, tipo de espécime (autópsia, biópsia ou peça cirúrgica) e variações na interpretação (Nicholson e cols., 2002; Travis, 2012).

Microscopicamente, o diagnóstico baseia-se nos achados histopatológicos característicos do SCLC e, na maioria das vezes, o exame anatomopatológico convencional, através da coloração de hematoxilina e Eosina (H.E.), é suficiente para estabelecer o diagnóstico. Uma pequena proporção de casos pode trazer dificuldades diagnósticas, seja pela escassez do material e presença de artefatos próprios da neoplasia (efeito Azzopardi, por exemplo), ou aspecto morfológico não característico (Zakowski, 2003; Travis e cols., 2004).

Nos casos de difícil diagnóstico, pode-se lançar mão do estudo imunohistoquímico. Os marcadores utilizados são a pancitoqueratina (AE1-AE3), os marcadores neuroendócrinos (NE) e o Ki 67. Os marcadores NE utilizados são a cromogranina, a sinaptofisina e o CD56. Contudo, cerca de dois terços dos SCLC mostram-se negativos para a sinaptofisina e a cromogranina. Já o CD56 mostra-se positivo em 90 a 100% dos casos (Zakowski, 2003; Kontogianni e cols., 2005).

No diagnóstico diferencial do SCLC, encontram-se os NSCLC e outras neoplasias, sobretudo os linfomas, os quais apresentam aspectos histopatológicos semelhantes ao SCLC (Travis, 2010).

### **1.5. Alterações genéticas do SCLC**

O câncer de pulmão, de uma maneira geral, leva muitas décadas para se desenvolver. Ao longo deste período muitas alterações genéticas podem

ocorrer levando à perda de genes supressores tumorais e/ou à ativação de vários genes que estimulam a proliferação celular, os oncogenes (Kiefer e cols., 1987; Bergh, 1990).

A ativação de um proto-oncogene em uma neoplasia pode ocorrer por vários mecanismos: amplificação gênica, deleção alélica, translocação, mutação pontual ou rearranjo gênico (Lodish e cols., 2007).

A introdução de técnicas moleculares mais avançadas possibilitou a identificação de alterações cromossômicas e gênicas complexas em amostras de tecidos tumorais. Estes avanços permitiram a compreensão mais ampla das alterações genéticas das neoplasias, seu mecanismo e interações.

Entre o SCLC e o NSCLC existem muitas diferenças no que diz respeito à ativação de proto-oncogenes e fatores de crescimento, mesmo tendo uma histogênese relacionada. As dificuldades no estudo das alterações genéticas do SCLC e suas diferenças com os NSCLC ocorrem pelo conhecimento incompleto do modelo de carcinogênese para o SCLC. As células neuroendócrinas na mucosa brônquica são difíceis de serem identificadas, bem como as alterações pré-neoplásicas originadas nestas células, como a hiperplasia idiopática difusa de células neuroendócrinas do pulmão, entidade rara que é considerada um precursor das neoplasias neuroendócrinas pulmonares (Bergh, 1990; Travis, 2010).

#### - Alterações genéticas comuns ao SCLC e ao NSCLC

A deleção do braço curto do cromossomo 3 (3p) é conhecida em linhagens celulares do SCLC e NSCLC e está relacionada a diversos possíveis

oncogenes e genes supressores de tumores. Entre os genes encontrados nesta região destacam-se o *FHIT*, o *RAF1*, o *CACNA2D2*, o *101F6*, o *NPRL2*, o *RASSF1A*, o *SEMA3B*, o *SEMA3F*, o *FUS1*, o *DLEC1* e o *RAR $\beta$* , assim como genes que codificam receptores de fatores de crescimento tireoideo (*ERBA-2*) (Hung e cols., 1995; Kovatich e cols., 1998; Miller, 2005). Muitos destes genes estão mutados ou deletados no câncer de pulmão. O gene supressor de tumores *FHIT*, conhecido como o gene da tríade histidina frágil, associado ao fumo e ao câncer de pulmão, é frequentemente deletado ou mutado no câncer de pulmão e em lesões precursoras do câncer na mucosa brônquica (Sozzi e cols., 1996; Rom e cols., 2000). Do mesmo modo, o gene *RASSF1A* apresenta perda da sua expressão em 100% dos SCLC (Ashman e cols., 2002).

Os genes que codificam os fatores de crescimento epidérmico também são de importância no câncer de pulmão. Especialmente em NSCLC, as alterações do gene *EGFR* são muito estudadas (Cappuzzo e cols., 2005a e b; Metro e cols., 2006; Hirsch e cols., 2008a e b; Tatematsu e cols., 2008).

No cromossomo 17 encontra-se o gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico, o *HER2*. A sua amplificação e mutação é estudada nos NSCLC (Varella-Garcia e cols., 2009).

#### - Alterações genéticas do SCLC

No SCLC podem ocorrer múltiplas deleções, translocações, e aneuploidias. As deleções podem ocorrer de forma randômica ou afetar certos cromossomos e regiões. Muitas destas alterações estão localizadas em

cromossomos e regiões relacionadas a proto-oncogenes ou genes supressores de tumores. A perda de heterozigose (LOH) envolvendo os cromossomos 3p, 5p21, 9p e na região do gene *TP53* no cromossomo 17 têm sido descritas (Morstyn e cols., 1987; Waters e cols., 1988; Travis, 2012). Também há relatos de deleções envolvendo os cromossomos 1, 2, 6, 10, 11, 13, 14 e X (Kiefer e cols., 1987; Morstyn e cols., 1987; Waters e cols., 1988; Bergh, 1990).

No cromossomo 13, as alterações cromossômicas são relevantes, pois neste se localiza o gene supressor de tumores *RB1*. No cromossomo 17, há também o gene supressor de tumores *TP53*. Ambos encontram-se inativados no SCLC. O gene *TP53* também pode estar mutado em 67 a 70% dos SCLC (Bergh, 1990; Miller, 2005; Travis, 2012).

O gene *IGF1R*, que codifica o receptor do fator 1 de crescimento insulina-*like*, apresenta aumento do número de cópias e de sua expressão no SCLC (Travis, 2012).

O gene *MYC* está localizado no cromossomo 8 e frequentemente encontra-se amplificado nos SCLC (Little e cols., 1983; Johnson e cols., 1996). Outros genes da família *MYC* também podem estar amplificados neste tumor, como o *L-myc* e *N-myc* (Nau e cols., 1985; Nau e cols., 1986; Waters e cols., 1988).

Em SCLC, os cromossomos 8, 9, 15 e 18 parecem ser relativamente estáveis, com raras anormalidades numéricas em estudos avaliando linhagens de células. Entretanto, a região cromossômica onde o *MYC* se encontra

amplificado pode estar representada por cromossomos diminutos duplicados (Little e cols., 1983; Waters e cols., 1988; Ashman e cols., 2002).

A complexidade e heterogeneidade das alterações que podem ser encontradas nestas neoplasias sugerem que ocorra a multiativação de proto-oncogenes e de fatores de crescimento (Bergh, 1990).

### **1.5.1. Proto-oncogene *MYC* (*c-myc*)**

#### **1.5.1.1. Estrutura e função do gene *MYC***

O proto-oncogene *MYC* faz parte da família *MYC*, onde são encontrados outros genes com importância no câncer de pulmão, como o *L-myc* e o *N-myc* e outros três genes *P-*, *R-* e *B-myc* (Bergh, 1990).

Este proto-oncogene foi identificado no final da década de setenta como um gene celular homólogo a um oncogene retroviral *v-myc* produtor de neoplasias linfoides em aves. A possibilidade do desenvolvimento de neoplasias epiteliais despertou o interesse no estudo em humanos. O estudo deste proto-oncogene teve um papel fundamental no entendimento das bases genéticas e mecanismos das neoplasias, como os conceitos de retrovírus e inserção viral, e de que um gene celular desregulado é capaz de promover a transformação neoplásica. Ele também foi fundamental para a identificação de

outros oncogenes (Sheiness e Bishop, 1979; Dalla-Favera e cols., 1982a; Wasylshen e Penn, 2010).

O gene *MYC* é constituído por três *exons*, que contem 6 a 7 quilobases, e está localizado no braço longo do cromossomo 8 (na região 8q24.1). Na Figura 3 está representada a sua localização no cromossomo 8 (Watt e cols., 1983; Johnson e cols., 1987; Johnson e cols., 1996). Os produtos destes três *exons* codificam as fosfoproteínas nucleares, p64 e p67, ou *myc-1* e *myc-2*. Também é conhecida uma isoforma da proteína *myc* chamada *myc-s* ou *myc-3* (Johnson e cols., 1987; Faria e Rabenhorst, 2006).

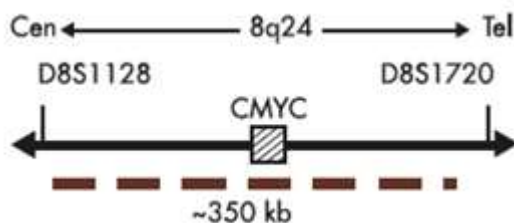


Figura 3 - Localização do gene *MYC* no cromossomo 8 (fonte: Johnson e cols., 1987).

Na região N-terminal da proteína *myc* localiza-se o domínio de transativação (TAD) que contém duas regiões chamadas de “*myc boxes*” (Mb I e II), que estão ligadas às atividades biológicas do *MYC*. Já a porção C-terminal apresenta três domínios importantes, chamados: região básica (BR), relacionada ao reconhecimento da sequência de DNA; a “*helix-loop-helix*” (HLH) e o “*zipper*” de leucina (LZ), que são responsáveis pela formação de heterodímeros entre a proteína *myc* e seus ligantes. O principal ligante da *myc* é a proteína *max*. O complexo *max/myc* está relacionado à atividade

transcricional, que é responsável pela ativação de genes envolvidos no controle do crescimento celular e apoptose. Estas regiões podem ser observadas na Figura 4.

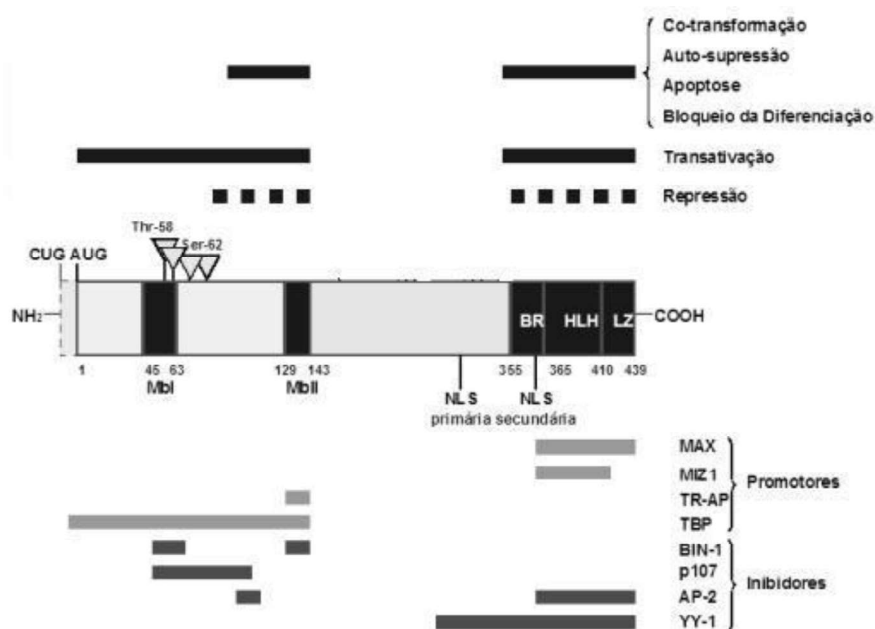


Figura 4 - Estrutura e principais regiões da proteína myc (fonte: Faria e Rabenhorst, 2006).

O *MYC* está implicado no crescimento, proliferação, apoptose, angiogênese, instabilidade genômica e regulação do ciclo celular através da produção de fosfoproteínas nucleares. A ativação do *MYC* é regulada por fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e componentes do ciclo celular. Normalmente, o *MYC* é expresso em baixos níveis em células normais, podendo ser ativado quando recebe um estímulo (Dang, 1999).

O gene *MYC* está envolvido no desenvolvimento de vários tipos de neoplasia, apresentando um mecanismo de ativação e função complexos.

Muitos genes-alvo estão identificados como possíveis vias de ativação do *MYC*. A proteína produzida pelo gene *MYC* é capaz de ativar positivamente vários reguladores do ciclo celular como, por exemplo, a ciclina D1 e E e a ciclina kinase dependente 4 e 6 (CDK), na fase G1 do ciclo celular, estimulando a fosforilação da proteína Rb, a liberação do fator de transcrição E2F e a progressão para a fase S do ciclo celular. Na fase S do ciclo celular, a proteína *myc* dimerizada com a proteína *max* atua na ativação do promotor *Cdc25a* que, por sua vez, ativa a CDK2, que é responsável pela estimulação G1/S. A interação da *myc* no ciclo celular pode ser observada na Figura 5 (Rom e cols., 2000; Zajac-Kaye, 2001).

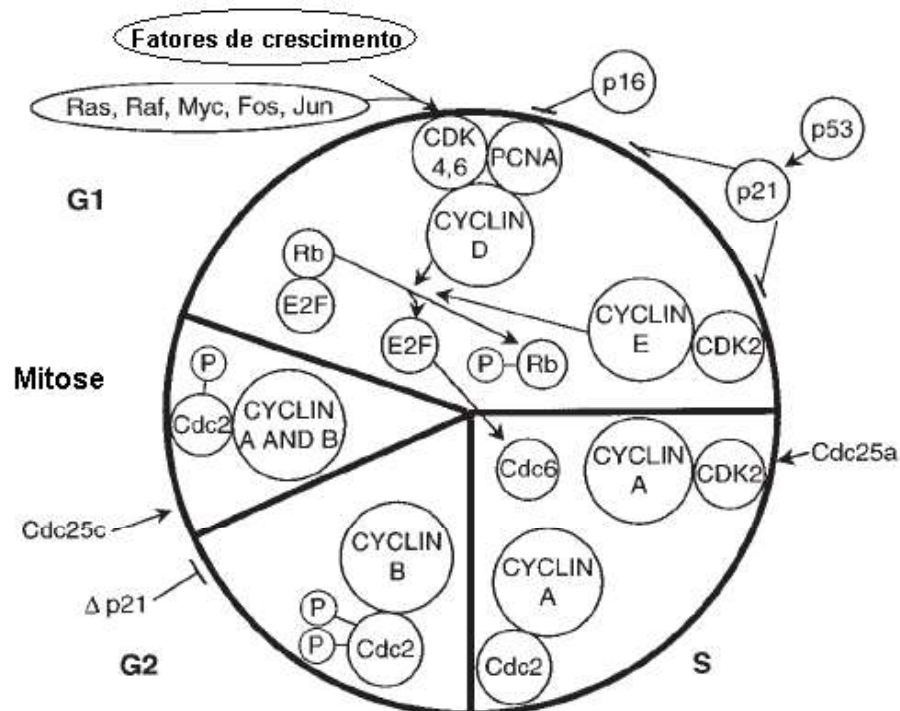


Figura 5 - Interação da proteína *myc* na fase G1 do ciclo celular. A *myc* estimula a expressão de *cdk 4 e 5*, liberando a ciclina D que irá interferir na fosforilação da proteína Rb e conseqüentemente no fator de transcrição E2F, levando à progressão do ciclo celular para a fase S (fonte: Rom e cols., 2000).

Apesar de estas vias serem ativadas pela *myc*, a sua atuação parece ser mais complexa. Uma das razões é a ausência do elemento E-box nas regiões reguladoras em muitas destas ciclinas. Este é necessário para sua transativação através do dímero *myc/max*. Por outro lado, a apoptose induzida pela *myc* pode ser observada sem a ligação com a proteína *max*. Estas ações paradoxais envolvendo a ativação de vias de regulação sugerem que outras proteínas estejam envolvidas na ativação da *myc*, que não só a *max*. Um exemplo disto é a proteína *mad*, que pode competir com a proteína *max* na dimerização com a *myc* e inibir sua função (Dang, 1999; Rom e cols., 2000).

Muitos outros genes e proteínas podem interferir na função do *MYC*, como por exemplo os receptores aurora-quinase, que também parecem regular a função do *MYC*. Estudos recentes em neuroblastomas sugerem que inibidores dos receptores aurora-quinase podem ser alternativas terapêuticas para aqueles pacientes que apresentam amplificação e aumento da expressão do *MYC*. Estes achados são promissores, não só nestas neoplasias, mas em outras, como no SCLC, onde este alvo terapêutico poderá representar uma alternativa terapêutica no futuro (den Hollander e cols., 2010; Gustafson e Weiss, 2010).

#### **1.5.1.2. SCLC e amplificação do gene *MYC***

Nos tumores humanos, o *MYC* pode estar ativado por diversos mecanismos, seja através de translocações como de amplificações. Nos

linfomas, a forma de ativação é a translocação, como a que ocorre no Linfoma de Burkitt. Mutações de ponto também têm sido descritas em alelos translocados neste tipo de linfoma (Dalla-Favera e cols., 1982b; Battey e cols., 1983).

A amplificação do *MYC* pode ser encontrada em diversos tipos de tumores sólidos humanos, incluindo os carcinomas de pulmão, mama e cólon. Também, em neoplasias de mama, cólon e estômago observa-se uma elevada expressão do gene (Saksela e cols., 1985; Gu e cols., 1988; Takahashi e cols., 1989; Johnson e cols., 1996; Dang, 1999; Deming e cols., 2000; Rummukainen e cols., 2001; Ribeiro e cols., 2010).

No carcinoma pulmonar, o *MYC* e outros genes da família *MYC* apresentam amplificação e aumento das suas expressões demonstradas por diversas técnicas como o slot blot, o southern blot, o PCR, a imunohistoquímica e a hibridização *in situ* fluorescente - FISH, utilizando-se sondas de DNA e RNA em linhagens celulares e material parafinado (Little e cols., 1983; Saksela e cols., 1985; Nau e cols., 1986; Wong e cols., 1986; Johnson e cols., 1987; Kiefer e cols., 1987; Gu e cols., 1988; Waters e cols., 1988; Takahashi e cols., 1989; Brennan e cols., 1991; Johnson e cols., 1996; Kubokura e cols., 2001; Iwakawa e cols., 2011; Iwakawa e cols., 2013).

A amplificação da família *MYC* foi inicialmente descrita no câncer de pulmão no início da década de 80. Little e cols. (1983) demonstraram a amplificação e expressão do *MYC* em linhagens celulares de neoplasias pulmonares, incluindo cinco linhagens de SCLC. Também Kiefer e cols. (1987) encontraram resultados similares em linhagens de células de SCLC. Nesta

época, a classificação das neoplasias de pequenas células propunha a presença de variantes microscópicas, às quais apresentaram amplificação neste trabalho. Posteriormente, observou-se que tais variantes não apresentavam correlação clínica e prognóstica e estas deixaram de fazer parte da subclassificação do SCLC, perdendo-se o interesse no estudo de suas alterações como um grupo distinto (Little e cols., 1983; Kiefer e cols., 1987; Travis e cols., 2004; Travis, 2009).

Saksela e cols. (1985) também demonstraram a presença de amplificação do *MYC* em linhagens de células de SCLC em um estudo onde também foram incluídos outros genes da família *MYC* e demais tipos histológicos de carcinoma pulmonar. Por outro lado, enquanto Nau e cols. (1985) e Nau e cols. (1986) observaram a amplificação do *N-myc* e do *L-myc* em linhagens de células de SCLC.

Johnson e cols. (1987) demonstraram em seu estudo a presença de amplificação dos genes *MYC*, *N-myc* e *L-myc* em linhagens de células de pacientes com SCLC tratados e não tratados com quimioterapia. Neste estudo, houve uma maior amplificação em pacientes tratados. Em especial, o gene *MYC* foi amplificado em 20% dos casos tratados e não apresentou amplificação nos pacientes não tratados. Também foi observada uma menor sobrevida naqueles pacientes que apresentavam amplificação.

Waters e cols. (1988) caracterizaram em seu estudo algumas alterações cromossômicas e amplificações em linhagens celulares de SCLC. Neste estudo, os autores observaram que o cromossomo 8 é relativamente estável. A amplificação da família *MYC* também foi detectada no estudo.

Estudos subsequentes mostraram aumento do número de cópias, amplificação e expressão de genes da família *MYC* em SCLC, utilizando-se amostras tumorais (Wong e cols., 1986; Gu e cols., 1988; Shiraishi e cols., 1989; Takahashi e cols., 1989; Brennan e cols., 1991).

Wong e cols.(1986) demonstraram um aumento do número de cópias do *MYC* em amostras de tumores primários de SCLC e metástases. Neste estudo, foi observada uma concordância na alteração do *MYC* entre as amostras tumorais primárias e suas metástases, mostrando que não havia uma relação entre o aumento do número de cópias do *MYC* e o desenvolvimento das metástases. Estes resultados sugerem que a amplificação do *MYC* poderia ser um evento precoce na tumorigênese do SCLC, não relacionado ao surgimento das metástases.

Takahashi e cols. (1989) estudaram 18 linhagens celulares de SCLC e 23 tumores, evidenciando amplificação do *MYC* em 24% e 10% dos casos, respectivamente. Os autores também encontraram uma correlação de 100% entre a amplificação e a expressão gênica. Contudo, a expressão aumentada do *MYC* também foi detectada em alguns casos sem amplificação, demonstrando a complexidade do papel do *MYC* na carcinogênese do SCLC.

Brennan e cols. (1991), utilizando amostras tumorais e linhagens celulares observaram a amplificação da família *MYC* mais frequentemente em pacientes tratados do que em não tratados com quimioterapia, reforçando os resultados anteriores de Johnson e cols. (1987). Estes sugeriam que o tratamento quimioterápico pode induzir a amplificação do *MYC*.

As diferenças na amplificação do *MYC* em estudos *in vitro* e *in vivo*, discrepâncias na sua expressão e variações em pacientes tratados e não tratados, reforçam a ideia de que a ativação de outros oncogenes, genes supressores de tumores e fatores de crescimento devam estar envolvidos sinergicamente na progressão e prognóstico desta neoplasia. Entretanto, a maioria dos estudos apresenta um número pequeno de pacientes com pouca correlação clínica e metodologias variadas, o que de certa forma dificulta comparações e conclusões à cerca do papel do *MYC* como um fator prognóstico.

Em ISH, poucos estudos demonstram a amplificação do *MYC* em neoplasia pulmonares, concentrando-se em NSCLC. Kubokura e cols. (2001) encontraram uma diferença significativa na amplificação do *MYC* entre pacientes com NSCLC que se apresentavam no estágio N0 e N2. Yakut e cols. (2003) também observaram a amplificação do *MYC* através de FISH em 7,8% dos casos de pacientes não tratados que apresentavam NSCLC, os quais também apresentaram uma menor sobrevida.

Gugger e cols. (2002) observaram a presença de amplificação do *MYC* em SCLC através de FISH em 20% das amostras tumorais (n=13), em um estudo citogenético onde também foram estudadas a expressão e amplificação de outros genes no espectro de neoplasias neuroendócrinas pulmonares (Gugger e cols., 2002).

Estudos sobre o *status* de amplificação do *MYC*, utilizando o método de CISH em carcinomas de pulmão são muito escassos. A maioria dos trabalhos restringe-se à comparação dos métodos de FISH e CISH, principalmente no

estudo de alterações envolvendo o gene *EGFR*. Em mama também são encontrados estudos comparativos entre as duas técnicas na detecção das alterações genéticas do gene *HER2*. Na maior parte destes observa-se boa reprodutibilidade das alterações encontradas no FISH, quando realizado o teste de CISH (Tanner e cols., 2000; Bhargava e cols., 2005; Hoff e cols., 2010; Yoo e cols., 2010; Hwang e cols., 2011).

## **1.5.2. Proto-oncogene *HER2 (ERBB2)***

### **1.5.2.1. Estrutura e função do *HER2***

A família dos genes que codificam os receptores do fator de crescimento epidérmico tem um papel importante no desenvolvimento de muitas neoplasias malignas, sendo bem estabelecida sua atuação no câncer de mama e em NSCLC (Cappuzzo e cols., 2005a; Metro e cols., 2006; Daniele e cols., 2007; Ross e cols., 2009; Hoff e cols., 2010).

Este grupo de receptores é constituído por quatro receptores externos (domínio externo): *EGFR (ERBB1)*, *ERBB2 (HER2/neu)*, *ERBB3 (HER3)* e *ERBB4 (HER4)*. Estes tem influência na ativação do domínio interno do receptor que ativa a tirosina quinase e tem um importante papel na transdução de sinais celulares, regulando muitos aspectos da proliferação, diferenciação e metabolismo celulares (Bazley e Gullick, 2005; Lodish e cols., 2007). A

estrutura destes receptores pode ser observada na Figura 6.

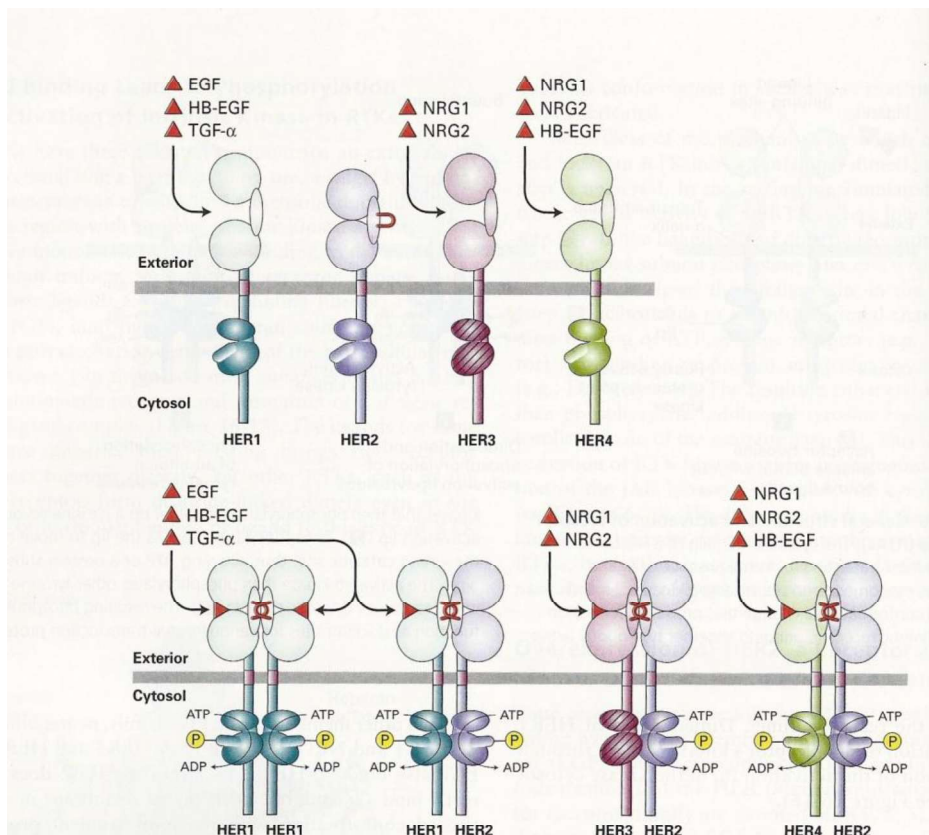


Figura 6 - Estrutura da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (fonte: Lodish e cols., 2007).

O oncogene *HER2* é um membro da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico que codifica uma proteína, a p185. O gene que codifica a proteína está localizado no cromossomo 17 (17q11.2-q12). A localização do gene pode ser observada na Figura 7.

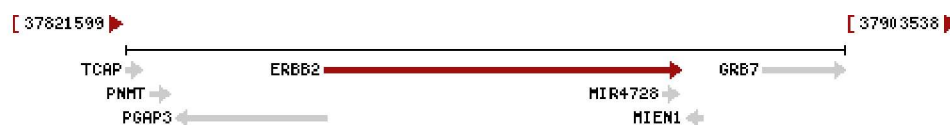


Figura 7 - Localização do gene *HER2* no cromossomo 17 (fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>).

A proteína p185 codificada pelo gene é uma glicoproteína transmembrana que faz parte da superfamília das proteína quinases. Esta proteína atua como receptor para os membros da família dos fatores de crescimento.

### **1.5.2.2. Amplificação e expressão dos genes da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (*EGFR* e *HER2*) em neoplasias pulmonares malignas**

#### **1.5.2.2.1. *EGFR* e *HER2* em NSCLC**

No NSCLC, observam-se muitas alterações envolvendo os gene *EGFR* e *HER2*, como amplificações. A superexpressão destes genes está relacionada a um pior prognóstico e resistência à quimioterapia e à radioterapia (Hirsch e cols., 2003; Hirsch e cols., 2005).

Muitos estudos citogenéticos são realizados em NSCLC, onde o papel da amplificação e da expressão de genes da família dos receptores do *EGFR* como fator prognóstico é bem estabelecido, podendo determinar o tratamento destas neoplasias com inibidores específicos. As principais drogas que atuam nestes receptores são os pequenos inibidores da tirosina quinase (TKIs), como o Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) e o Erlotinid (Tarceva<sup>®</sup>) e anticorpos monoclonais, como o Cetuximab (Cappuzzo e cols., 2005a; Nakamura e cols., 2005; Metro e cols., 2006; Hirsch e cols., 2008a; Hirsch e cols., 2008b; Varella-Garcia e cols., 2009).

Daniele e cols. (2007) demonstraram uma menor resposta ao tratamento com TKIs naqueles pacientes que não apresentavam ganhos do gene *EGFR* e *HER2*, através de FISH e CISH, em amostras exíguas de NSCLC. Os autores sugerem a utilização das técnicas de ISH como os métodos de escolha na detecção de alterações citogenéticas em amostras escassas, como as de citologia e biópsias.

A superexpressão da proteína e amplificação do gene *HER2* são encontradas em vários tipos de neoplasias, como as de mama e pulmão, onde podem ser observadas em 15 a 40% dos tumores. Nos adenocarcinomas de pulmão, a superexpressão e amplificação podem ocorrer em cerca de 20 a 37% dos casos, sendo suas incidências maiores na população japonesa, em mulheres e não-fumantes (Schneider e cols., 1989; Kristiansen e cols., 2001; Nakamura e cols., 2003; Onn e cols., 2004; Dziadziuszko e cols., 2006; Chopra e cols., 2009; Gandhi e cols., 2009; Han e cols., 2009; Varella-Garcia e cols., 2009).

Cox e cols. (2001) observaram a superexpressão do *HER2* através do Hercep Test<sup>®</sup> em 4,3% dos NSCLC. Naqueles casos onde houve positividade imuno-histoquímica membranosa forte e contínua (3+), a amplificação estava presente (100% dos casos). Posteriormente, Heinmoller e cols. (2003) também encontraram uma incidência semelhante associada à expressão e à amplificação do *HER2* em NSCLC.

Awaya e cols. (2005) estudaram o adenocarcinoma de pulmão e as hiperplasias adenomatosas atípicas do pulmão, mostrando expressão aumentada sincrônica do *EGFR* e *HER2* apenas nos adenocarcinomas, sem a

presença de amplificação. Os autores sugeriram que tal fato fosse um evento tardio no desenvolvimento de neoplasias invasivas, nem sempre associado à amplificação gênica.

#### **1.5.2.2.2. *EGFR* e *HER2* em SCLC**

Em SCLC, são escassos os trabalhos que estudam o papel dos receptores do EGF (Cebollero Presmanes e cols., 2008; Tatematsu e cols., 2008). Shigematsu e Gazdar (2006) relatam a existência de mutação no gene *EGFR* em menos de 5% dos tipos histológicos não adenocarcinomas.

Tatematsu e cols. (2008) observaram em seu trabalho a mutações do *EGFR* em 4% dos SCLC, assim como amplificação nos casos onde havia um componente combinado com adenocarcinoma. Outro relato de caso também demonstra a presença de mutação do gene *EGFR* em uma paciente não fumante que apresentava o diagnóstico inicial de adenocarcinoma e presença de metástases do tipo pequenas células (Zakowski e cols., 2006). Estes achados confirmam a raridade destas alterações em SCLC puros.

Okamoto e cols. (2006) relataram um caso de uma paciente, como SCLC puro, que apresentava mutação do gene *EGFR* e resposta ao tratamento com gefitinib.

Estudos imuno-histoquímicos mostram superexpressão do gene *HER2* em aproximadamente 17,9% a 33% dos pacientes com SCLC. Este achado foi

associado a um pior prognóstico (Junker e cols., 2005; Canoz e cols., 2006; Giltnane e cols., 2006; Cebollero Presmanes e cols., 2008).

Canoz e cols. (2006) observaram a superexpressão do gene *HER2*, através do estudo imuno-histoquímico, em 17,9% das amostras estudadas de SCLC. Esta foi associada a uma sobrevida global menor.

Cebollero Presmanes e cols. (2008) estudaram a expressão e amplificação do *HER2* em SCLC. Neste estudo, a superexpressão foi observada, através da técnica de imuno-histoquímica, em 26,3% dos pacientes. Esta foi associada à doença disseminada, contudo não mostrou relação com a sobrevida dos pacientes. A amplificação do *HER2* foi identificada em um paciente, correspondendo a 6,3% da amostra.

Minami e cols. (2012) estudaram *in vitro* a expressão do *HER2*. Os autores observaram um aumento exclusivamente em pacientes de etnia japonesa. Estes dados explicam em parte a baixa incidência da expressão e amplificação do *HER2* na maioria dos estudos ocidentais.

Giltnane e cols. (2006) estudaram a expressão e amplificação do *HER2* no SCLC através da técnica de análise de imunofluorescência quantitativa e FISH em uma amostra de 23 pacientes. Não foi detectada amplificação em nenhum dos casos e não houve associação entre aumento de expressão do *HER2* com o prognóstico.

As diferenças encontradas entre a expressão e a amplificação do gene *HER2* em SCLC observadas nos trabalhos de Giltnane e cols. (2006) e Cebollero Presmanes e cols. (2008) sugerem que existam outros mecanismos

de interação que estejam influenciando na expressão gênica. Distúrbios transcricionais e pós-transcricionais, bem como diferenças técnicas como fixação e processamento do material fixado em formalina e embocado em parafina, são alguns fatores que podem contribuir para as diferenças encontradas (Awaya e cols., 2005).

A necessidade de se encontrar um alvo terapêutico em SCLC levou à condução de alguns ensaios clínicos em pacientes resistentes à quimioterapia, que apresentavam superexpressão do *HER2* (Micke e cols., 2001; Potti e cols., 2002; Johnson e cols., 2003; Potti e cols., 2005; Moore e cols., 2006). Tais estudos não conseguiram provar a efetividade do tratamento com TKIs. Entretanto, o SCLC é potencialmente suscetível ao mecanismo de ação destas drogas, principalmente à citotoxicidade mediada por células *natural killer*. Esta suscetibilidade poderá no futuro representar uma alternativa de tratamento para aqueles pacientes que apresentam quimiorresistência à primeira linha de agentes quimioterápicos e superexpressão do *HER2* (Minami e cols., 2013; Lu e cols., 2013).

## 1.6. Referências bibliográficas

Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003; 1231 Suppl: 21S-49S.

Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE, *et al*. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med*. 2005; 1424: 233-9.

Ashman J, Brigham J, Cowen M, Bahia H, Greenman J, Lind M, *et al*. Chromosomal alterations in small cell lung cancer revealed by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer*. 2002; 1023: 230-6.

Awaya H, Takeshima Y, Furonaka O, Kohno N, Inai K. Gene amplification and protein expression of EGFR and HER2 by chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol*. 2005; 5810: 1076-80.

Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, *et al*. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet*. 2004; 753: 460-74.

Batley J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, *et al*. The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell*. 1983; 343: 779-87.

Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12 Suppl 1: S17-27.

Bergh JC. Gene amplification in human lung cancer. The myc family genes and other proto-oncogenes and growth factor genes. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 1426 Pt 2: S20-6.

Bhargava R, Oppenheimer O, Gerald W, Jhanwar SC, Chen B. Identification of MYCN gene amplification in neuroblastoma using chromogenic in situ hybridization (CISH): an alternative and practical method. *Diagn Mol Pathol*. 2005; 142: 72-6.

Boffetta P, Nyberg F, Agudo A, Benhamou E, Jockel KH, Kreuzer M, *et al*. Risk of lung cancer from exposure to environmental tobacco smoke from cigars, cigarillos and pipes. *Int J Cancer*. 1999; 836: 805-6.

Brennan J, O'Connor T, Makuch RW, Simmons AM, Russell E, Linnoila RI, *et al*. myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res*. 1991; 516: 1708-12.

Canoz O, Ozkan M, Arsav V, Er O, Coskun HS, Soyuer S, *et al.* The role of c-erbB-2 expression on the survival of patients with small-cell lung cancer. *Lung*. 2006; 1845: 267-72.

Cappuzzo F, Hirsch F, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli G, Bemis L, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005a; 979: 643-55.

Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, Domenichini I, Bartolini S, Ceresoli G, *et al.* Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005b; 2322: 5007-18.

Cebollero Presmanes M, Sánchez-Mora N, García-Gómez R, Herranz Aladro M, Alvarez-Fernández E. [Prognostic value of ERBB2 amplification and protein expression in small cell lung cancer]. *Arch Bronconeumol*. 2008; 443: 122-6.

Chen YC, Chen JH, Richard K, Chen PY, Christiani DC. Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection. *Cancer*. 2004; 1016: 1428-36.

Chin RJ, Cappellari J, McCain T, Case L, Haponik E. Increasing use of bronchoscopic needle aspiration to diagnose small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc*. 2000; 758: 796-801.

Chopra S, Shahhahranu B, Cheng T, Gu M. Detection and Quantitation of EGFR Gene Copy Number Amplification by FISH in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) - A Comparative Study with IHC Stains in 537 Cases. *Modern Pathology*. 2009; 22: 1724.

Coultas DB, Samet JM. Occupational lung cancer. *Clin Chest Med*. 1992; 132: 341-54.

Cox G, Vyberg M, Melgaard B, Askaa J, Oster A, O'Byrne KJ. Herceptest: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2001; 924: 480-3.

Dalla-Favera R, Gelmann EP, Martinotti S, Franchini G, Papas TS, Gallo RC, *et al.* Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982a; 79: 6497-501.

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982b; 79: 7824-7.

Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999; 191: 1-11.

Daniele L, Macrì L, Schena M, Dongiovanni D, Bonello L, Armando E, *et al.* Predicting gefitinib responsiveness in lung cancer by fluorescence in situ hybridization/chromogenic in situ hybridization analysis of EGFR and HER2 in biopsy and cytology specimens. *Mol Cancer Ther.* 2007; 64: 1223-9.

Delgado P, Jorda M, Ganjei-Azar P. Small cell carcinoma versus other lung malignancies: diagnosis by fine-needle aspiration cytology. *Cancer.* 2000; 905: 279-85.

Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer.* 2000; 8312: 1688-95.

den Hollander J, Rimpi S, Doherty JR, Rudelius M, Buck A, Hoellein A, *et al.* Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood.* 2010; 1169: 1498-505.

DHEW- US Department of Health Education and Welfare. Smoking and Health: report of the Advisory Committee to the Surgeon General. Washington, DC, US: Government Printing Office; 1964. DHEW-Public Health Service Publication n° 1103.

Doll R. On the etiology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1950; 113: 638-40.

Doll R. Etiology of lung cancer. *Adv Cancer Res.* 1955a; 3: 1-50.

Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med.* 1955b; 122: 81-6.

Doll R, Hill AB. Mortality in Relation to Smoking: Ten Years' Observations of British Doctors. *Brit Med F.* 1964; 1: 1399-1410.

Dziadziuszko R, Witta S, Cappuzzo F, Park S, Tanaka K, Danenberg P, *et al.* Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 1210: 3078-84.

Faria MHG, Rabenhorst SHB. Impact of the C-MYC oncogene on cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2006; 522: 165-71.

Gandhi J, Zhang J, Xie Y, Soh J, Shigematsu H, Zhang W, *et al.* Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2009; 42: e4576.

Giltane JM, Murren JR, Rimm DL, King BL. AQUA and FISH analysis of HER-2/neu expression and amplification in a small cell lung carcinoma tissue microarray. *Histopathology.* 2006; 492: 161-69.

Goldstraw P. Updated staging system for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011; 204: 655-66.

Greenberg M, Selikoff IJ. Lung cancer in the Schneeberg mines: a reappraisal of the data reported by Harting and Hesse in 1879. *Ann Occup Hyg*. 1993; 371: 5-14.

Gu J, Linnoila RI, Seibel NL, Gazdar AF, Minna JD, Brooks BJ, *et al*. A study of myc-related gene expression in small cell lung cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol*. 1988; 1321: 13-7.

Gugger M, Burckhardt E, Kappeler A, Hirsiger H, Laissue J, Mazzucchelli L. Quantitative expansion of structural genomic alterations in the spectrum of neuroendocrine lung carcinomas. *J Pathol*. 2002; 1964: 408-15.

Gustafson WC, Weiss WA. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene*. 2010; 299: 1249-59.

Han S, Sun X, Ritzenthaler J, Roman J. Fish oil inhibits human lung carcinoma cell growth by suppressing integrin-linked kinase. *Mol Cancer Res*. 2009; 71: 108-17.

Heinmoller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, *et al*. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res*. 2003; 914: 5238-43.

Hirsch F, Varella-Garcia M, Bunn PJ, Di Maria M, Veve R, Bremmes R, *et al*. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003; 2120: 3798-807.

Hirsch F, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier A, Gumerlock P, *et al*. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2005; 2328: 6838-45.

Hirsch F, Herbst R, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, *et al*. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2008a; 2620: 3351-7.

Hirsch F, Varella-Garcia M, Dziadziuszko R, Xiao Y, Gajapathy S, Skokan M, *et al*. Fluorescence in situ hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a phase III trial of erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008b; 1419: 6317-23.

Hoff K, Jørgensen JT, Müller S, Røngaard E, Rasmussen O, Schønau A. Visualization of FISH Probes by dual-color chromogenic in situ hybridization. *Am J Clin Pathol*. 2010; 1332: 205-11.

Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, *et al*. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA*. 1995; 27324: 1908.

Hwang CC, Pintye M, Chang LC, Chen HY, Yeh KY, Chein HP, *et al*. Dual-colour chromogenic in-situ hybridization is a potential alternative to fluorescence in-situ hybridization in HER2 testing. *Histopathology*. 2011; 595: 984-92.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Carcinoma de pequenas Células de Pulmão - Conduas do INCA. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2003; 493: 149-52.

Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, *et al*. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*. 2011; 176: 1481-9.

Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, *et al*. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 529: 802-16.

Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet*. 2005; 3669494: 1385-96.

Johnson BE, Ihde DC, Makuch RW, Gazdar AF, Carney DN, Oie H, *et al*. myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course. *J Clin Invest*. 1987; 796: 1629-34.

Johnson BE, Russell E, Simmons AM, Phelps R, Steinberg SM, Ihde DC, *et al*. MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996: 210-17.

Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, *et al*. Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2003; 916: 5880-87.

Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Jonsson HH, Kristjansson K, Arnason S, *et al.* Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA*. 2004; 292:24: 2977-83.

Junker K, Stachetzki U, Rademacher D, Linder A, Macha H, Heinecke A, *et al.* HER2/neu expression and amplification in non-small cell lung cancer prior to and after neoadjuvant therapy. *Lung Cancer*. 2005; 48:1: 59-67.

Kiefer PE, Bepler G, Kubasch M, Havemann K. Amplification and expression of protooncogenes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*. 1987; 47:23: 6236-42.

Kim AW, Johnson KM, Detterbeck FC. The lung cancer stage page: there when you need it--staginglungcancer.org. *Chest*. 2012; 141:3: 581-6.

Kontogianni K, Nicholson AG, Butcher D, Sheppard MN. CD56: a useful tool for the diagnosis of small cell lung carcinomas on biopsies with extensive crush artefact. *J Clin Pathol*. 2005; 58:9: 978-80.

Kovatich A, Friedland DM, Druck T, Hadaczek P, Huebner K, Comis RL, *et al.* Molecular alterations to human chromosome 3p loci in neuroendocrine lung tumors. *Cancer*. 1998; 83:6: 1109-17.

Kreyberg L. Histological lung cancer types. A morphological and biological correlation. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*. 1962; Suppl 157: 1-92.

Kristiansen G, Yu Y, Petersen S, Kaufmann O, Schluns K, Dietel M, *et al.* Overexpression of c-erbB2 protein correlates with disease-stage and chromosomal gain at the c-erbB2 locus in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2001; 37:9: 1089-95.

Kubokura H, Tenjin T, Akiyama H, Koizumi K, Nishimura H, Yamamoto M, *et al.* Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2001; 74: 197-203.

Lam WK, White NW, Chan-Yeung MM. Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; 8:9: 1045-57.

Levin ML, Goldstein H, Gerhardt PR. Cancer and tobacco smoking; a preliminary report. *J Am Med Assoc*. 1950; 143:4: 336-8.

Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*. 1983; 306:5939: 194-6.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott mP, Bretscher A, *et al.* *Molecular Cell Biology*. 6<sup>th</sup> ed. New York: Freeman and Company; 2007.

Lu HY, Wang XJ, Mao WM. Targeted therapies in small cell lung cancer (review). *Oncol Lett.* 2013; 5:3-11.

Metro G, Finocchiaro G, Toschi L, Bartolini S, Magrini E, Cancellieri A, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted therapies in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Rev Recent Clin Trials.* 2006; 11: 1-13.

Micke P, Hengstler JG, Ros R, Bittinger F, Metz T, Gebhard S, *et al.* c-erbB-2 expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer.* 2001; 924: 474-9.

Miller YE. Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 333: 216-23.

Minami T, Kijima T, Otani Y, Kohmo S, Takahashi R, Nagatomo I, *et al.* HER2 as therapeutic target for overcoming ATP-binding cassette transporter-mediated chemoresistance in small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012; 114: 830-41.

Minami T, Kijima T, Kohmo S, Arase H, Otani Y, Nagatomo I, *et al.* Overcoming chemoresistance of small-cell lung cancer through stepwise HER2-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and VEGF-targeted antiangiogenesis. *Sci Rep.* 2013; 3: 2669.

Moore AM, Einhorn LH, Estes D, Govindan R, Axelson J, Vinson J, *et al.* Gefitinib in patients with chemo-sensitive and chemo-refractory relapsed small cell cancers: a Hoosier Oncology Group phase II trial. *Lung Cancer.* 2006; 521: 93-7.

Morstyn G, Brown J, Novak U, Gardner J, Bishop J, Garson M. Heterogeneous cytogenetic abnormalities in small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1987; 4712: 3322-7.

Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, *et al.* Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2003; 1031: 61-6.

Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. *Cancer.* 2005; 1039: 1865-73.

Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, *et al.* L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature.* 1985; 318: 69-73.

Nau MM, Brooks BJ, Carney DN, Gazdar AF, Battey JF, Sausville EA, *et al.* Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 1092-6.

Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, *et al.* Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol.* 2002; 269: 1184-97.

Okamoto I, Araki J, Suto R, Shimada M, Nakagawa K, Fukuoka M. EGFR mutation in gefitinib-responsive small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2006; 176: 1028-9.

Onn A, Correa AM, Gilcrease M, Isobe T, Massarelli E, Bucana CD, *et al.* Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 101 Pt 1: 136-43.

Pershagen G, Akerblom G, Axelson O, Clavensjo B, Damber L, Desai G, *et al.* Residential radon exposure and lung cancer in Sweden. *N Engl J Med.* 1994; 3303: 159-64.

Potti A, Willardson J, Forseen C, Kishor Ganti A, Koch M, Hebert B, *et al.* Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2002; 363: 257-61.

Potti A, Ganti AK, Tuchman SA, Sholes K, Langness E, Koka V, *et al.* HER-2/neu and CD117 (c-kit) overexpression in patients with pesticide exposure and extensive stage small cell lung carcinoma (ESSCLC). *J Carcinog.* 2005; 4: 8.

Riaz SP, Lüchtenborg M, Coupland VH, Spicer J, Peake MD, Møller H. Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer. *Lung Cancer.* 2012; 753: 280-4.

Ribeiro HF, Alcântara DF, Matos LA, Sousa JM, Leal MF, Smith MA, *et al.* Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 438: 717-21.

Rivera MP, Detterbeck F, Mehta AC, Physicians ACoC. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. *Chest.* 2003; 1231 Suppl: 129S-36S.

Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 1614 Pt 1: 1355-67.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009; 144: 320-68.

Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ. Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples. *Lab Invest.* 2001; 8111: 1545-51.

Saksela K, Bergh J, Lehto VP, Nilsson K, Alitalo K. Amplification of the c-myc oncogene in a subpopulation of human small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1985; 454: 1823-7.

Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, Manning J, Zhao XY, Fang K, *et al.* Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1989; 4918: 4968-71.

Schwartz AG. Genetic predisposition to lung cancer. *Chest.* 2004; 1255 Suppl: 86S-9S.

Sheiness D, Bishop JM. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol.* 1979; 312: 514-21.

Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer.* 2006; 1182: 257-62.

Shiraishi M, Noguchi M, Shimosato Y, Sekiya T. Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res.* 1989; 4923: 6474-9.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 621: 10-29.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013; 631: 11-30.

Simon GR, Wagner H, Physicians ACoC. Small cell lung cancer. *Chest.* 2003; 1231 Suppl: 259S-71S.

Sørensen M, Pijls-Johannesma M, Felip E, Group EGW. Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010; 21 Suppl 5: v120-5.

Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, *et al.* The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell.* 1996; 851: 17-26.

Takahashi T, Obata Y, Sekido Y, Hida T, Ueda R, Watanabe H, *et al.* Expression and amplification of myc gene family in small cell lung cancer and its relation to biological characteristics. *Cancer Res.* 1989; 4910: 2683-8.

Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, *et al.* Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000; 1575: 1467-72.

Tatematsu A, Shimizu J, Murakami Y, Horio Y, Nakamura S, Hida T, *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(19): 6092-6.

Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, *et al.* The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer.* 2012; 76(1): 1-18.

Travis WD. Lung tumours with neuroendocrine differentiation. *Eur J Cancer.* 2009; 45 Suppl 1: 251-66.

Travis WD. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol.* 2010; 21 Suppl 7: vii65-71.

Travis WD. Update on Small Cell carcinoma and its Differentiation from Squamous Cell Carcinoma and Other Non-Small Cell Carcinomas. *Mod Pathol.* 2012; 25(Suppl. 1): 18-30.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, *et al.* Pathology and Genetics: Tumors of Lung, Pleura Thymus and Heart. Lyon:IARC; 2004.

Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, *et al.* Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol.* 2010; 5(4): 411-4.

Vallières E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, *et al.* The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009; 4(9): 1049-59.

Varella-Garcia M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Kosaka T, Nakajima E, Xavier A, *et al.* EGFR and HER2 genomic gain in recurrent non-small cell lung cancer after surgery: impact on outcome to treatment with gefitinib and association with EGFR and KRAS mutations in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol.* 2009; 4(3): 318-25.

Wasylishen AR, Penn LZ. Myc: the beauty and the beast. *Genes Cancer.* 2010; 1(6): 532-41.

Waters JJ, Ibson JM, Twentyman PR, Bleehen NM, Rabbitts PH. Cytogenetic abnormalities in human small cell lung carcinoma: cell lines characterized for myc gene amplification. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988; 30(2): 213-23.

Watt R, Nishikura K, Sorrentino J, ar-Rushdi A, Croce CM, Rovera G. The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human c-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(20): 6307-11.

Wong AJ, Ruppert JM, Eggleston J, Hamilton SR, Baylin SB, Vogelstein B. Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science*. 1986; 233:4762: 461-4.

Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc*. 1950; 143: 329-36.

Yakut T, Egeli U, Gebitekin C. Investigation of c-myc and p53 gene alterations in the tumor and surgical borderline tissues of NSCLC and effects on clinicopathologic behavior: by the FISH technique. *Lung*. 2003; 181: 245-58.

Yoo SB, Lee HJ, Park JO, Choe G, Chung DH, Seo JW, *et al*. Reliability of chromogenic in situ hybridization for epidermal growth factor receptor gene copy number detection in non-small-cell lung carcinomas: a comparison with fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer*. 2010; 67: 301-5.

Zajac-Kaye M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung Cancer*. 2001; 34 Suppl 2: S43-6.

Zakowski MF. Pathology of small cell carcinoma of the lung. *Seminars in Oncology*. 2003; 30: 3-8.

Zakowski MF, Ladanyi M, Kris MG. EGFR mutations in small-cell lung cancers in patients who have never smoked. *N Engl J Med*. 2006; 355: 213-5.

## 2. Objetivos

- Determinar o número de cópias dos genes *MYC* e *HER2* em SCLC através da técnica de CISH.

### 2.1. Objetivos específicos

- Correlacionar a amplificação dos genes *MYC* e *HER2* com aspectos clinicopatológicos de pacientes com SCLC, incluindo: sexo, idade, estadiamento, local da biópsia, sítio metastático, presença de comorbidades (DPOC) e características histopatológicas (presença de necrose, ulceração, padrão trabecular, nucléolo evidente, rosetas, formação glandular, efeito Azzopardi, artefato de esmagamento e apoptose).

- Correlacionar a amplificação dos genes *MYC* e *HER2* com o tempo de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com SCLC entre 1995 e 2005 no Hospital Nossa Senhora Conceição de Porto Alegre (GHC) e Laboratório de Patologia do Hospital Santa Rita (Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre).

**3. Artigo científico redigido em inglês e resultados do gene *HER2***

***MYC* Amplification Associated with Poor Survival in Small Cell Lung  
Cancer: a Chromogenic in Situ Hybridization Study**

Rita de Cássia S. Alves, Rosalva Meurer, Adriana Vial Roehé

Submetido em: 13/01/2014 para o periódico Lung Cancer

Artigo original

**MYC amplification associated with poor survival in  
Small Cell Lung Cancer: a chromogenic in situ  
hybridization study.**

Rita de Cássia S.Alves, Rosalva Meurer, Adriana Vial Roehe <sup>£</sup>

Graduate Program of Pathology of Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

Department of Pathology of UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

<sup>£</sup>Corresponding author

Postal Address: Rua Sarmiento Leite, 245. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

ZIP code: 90050-170

E-mail address: [aroehe@gmail.com](mailto:aroehe@gmail.com); [adrianar@ufcspa.edu.br](mailto:adrianar@ufcspa.edu.br)

Phone number: 55-51-30338723

FAX number: 55-51- 33038810

## Abstract

**Introduction:** Small Cell Lung Cancer (SCLC) is a highly aggressive tumor. Scanty studies have examined MYC gene amplification status in tumor samples, using chromogenic in situ hybridization (CISH). In this study we evaluate tissue samples from untreated patients, to investigate the relation between MYC amplification and clinical and pathological factors, including survival analysis. **Methods:** Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples were obtained from 77 patients with SCLC who underwent a diagnostic biopsy for SCLC. Samples were analyzed by CISH, using a MYC probe (ZytoDot® CISH probe). The relation between cytogenetic analysis, pathologic characteristics and survival time was evaluated by chi-square Fisher's test and Mann-Whitney method. A regression model was performed to exclude confounding factors. **Results:** Out of 77 samples, 64.9% were from bronchi biopsy and the others were from mediastinal, cervical and supraclavicular lymph nodes. From the total, 55 samples have been analyzed by CISH. MYC oncogene was found to be amplified in 20% of tumors. After multivariate regression, patients with MYC amplification had significantly shorter survival time (4.67 weeks) versus patients without MYC amplification (26.15 weeks) ( $p=0.02$  CI=1.355-10.261). There was no statistical correlation between MYC amplification and biopsy site, metastasis site and histopathological features. **Conclusion:** MYC amplification is a frequent event in SCLC and it is related to short survival time. It may be an independent prognostic factor in SCLC. Further research is required to support this finding and to clarify the entire role of MYC gene in the SCLC tumorigenesis.

Key words: MYC, small cell lung cancer, CISH, survival time, gene amplification, prognostic factor.

## **1. Introduction:**

Small Cell Lung Cancer (SCLC) is a highly aggressive subtype of lung cancer and is associated with poor prognosis. MYC is located in the chromosomal region 8q24 and its amplification has been reported in SCLC and it has been associated to fast tumor progression and short survival time [1-3]. Most studies that evaluate MYC amplification in SCLC use in vitro molecular methods and have demonstrated discrepant results in treated and untreated patients [4-11]. There are few studies using in situ hybridization to demonstrate MYC amplification in lung cancer, especially SCLC [1, 12-15].

Fluorescent in situ hybridization (FISH) has facilitated the direct examination of cell nuclei and has been proved to be the gold standard method to identify gene amplification in breast cancer and non-small-cell lung cancer (NSCLC). Currently, chromogenic in situ hybridization (CISH) is being used as an alternative method to evaluate gene amplification. CISH has shown good correspondence with FISH in breast tumors. The visualization is similar to immunohistochemistry and adds the morphology to select tumor areas, making it easier in pathology routine and facilitating evaluation in scant samples like bronchi biopsies [15, 16].

In this study we have investigated MYC gene amplification by CISH, using tissue samples from untreated patients, to evaluate the relation between gene amplification, clinical and pathological factors and prognosis.

## **2. Methods:**

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples were obtained from patients with SCLC who underwent a diagnostic biopsy at Nossa Senhora Conceição Hospital and Santa Casa Hospital, Porto Alegre, Brazil, between 1995 and 2005. The H&E slides were reviewed by the authors and scant tumor samples were excluded. Variables analyzed were age, sex, stage, survival time, MYC amplification, biopsy site,

metastasis site and the presence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Morphologic histopathologic features were also examined, such as the presence of necrosis, ulceration, trabecular pattern, nucleolus evidence, rosettes, glandular formation, Azzopardi and crush effect and apoptosis.

#### Sample preparation and CISH:

Before hybridization, the samples were deparaffinized in xylene, incubated in 100% ethanol and washed in deionized water. The slides were then placed in Heat Pretreatment Solution EDTA at 95°C for 30 minutes, after which the tissue samples were covered with a pepsin solution and incubated in a humidity chamber at 37°C for 7 minutes. Ten microliters of MYC (c-myc) ZytoDot® (Bremerhaven, Germany) CISH probe were applied in each sample. The denaturation was performed in a thermal plate at 94°C for 10 minutes. Subsequently, the slides were transferred to a humidity chamber and hybridized overnight at 37°C. After hybridization, the slides were washed with SSC at 75°C for 5 minutes and incubated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes. A blocking solution was then applied. After that, the slides were incubated with mouse-anti-digoxigenin for 30 minutes and anti-mouse-HRP-polymer for 30 minutes. The DAB solution was applied and the slides were incubated for 30 minutes, counterstained with Mayer's Hematoxylin solution, dehydrated and covered with a coverslip using Mounting Solution. All steps were performed using the ZytoDot® CISH Implementation Kit Protocol.

#### Interpretation:

CISH hybridization was analyzed using an Olympus® (Tokyo, Japan) BX40 light microscope under an immersion objective. Ideally 100 non-overlapping nuclei in each sample were scored to determine the number of MYC signals. Amplification was defined when at least 20% of the analyzed tumor cells had more than 5 signals [16].

#### Statistical analysis:

Statistical analysis was performed with a SPSS 19.0 software package (SPSS Inc. Chicago, IL). The chi-square Fisher's exact test was used to compare categorical data. The analysis of survival and MYC amplification rate were performed using Mann-Whitney analysis and Kaplan-Meier curve was obtained. Cox regression with univariate and multivariate analyses was performed to exclude confusion variables. P values under 0.05 were considered significant.

#### Ethical issues:

The protocol was approved by the Ethics Committee of the Institutions (protocol n.3496/11), in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and all subsequent revisions.

### **3. Results**

The study sample was composed by 77 SCLC biopsy specimens. From these, 55 have been analyzed by CISH. Twenty two (28.57%) cases were excluded due to non-representative tumor in the sample or unsuccessful hybridization. The specimens originated from bronchi biopsy (64.9%) and from mediastinal, cervical and supraclavicular lymph nodes (35.1%). MYC oncogene was amplified in 20% of the tumors. There was no statistical relationship between gene amplification and clinical pathological features (Table I).

The mean survival time was 22.91 weeks (range 0-102.7 weeks). After multivariate analysis MYC amplification was significantly associated with short survival time, 4.67 weeks versus 26.15 weeks (HR= 3.72; P=0.02; CI 1.355-10.26) (FIG.1).

Concerning morphological features there was no statistical correlation between MYC amplification and the histopathological aspects analyzed. Samples from mediastinal

lymph nodes and other sites nodes were associated with necrosis and nucleolus evidence (P=0.01).

#### 4. Discussion

MYC family genes and MYC amplification in lung cancer and SCLC have been previously described using in vitro methods [3-10]. Few studies have used tumor specimens and molecular methods to detect MYC amplification [2-4, 17]. Even molecular studies are quite methodologically heterogeneous, finding MYC amplification after chemotherapy and reporting differences between in vitro and in vivo analysis [2, 3, 7, 9, 10].

Takahashi et al., studying 18 SCLC cell lines and 23 patients' tumors, found 24% and 10% of MYC amplification respectively. The authors also showed 100% of correlation between amplification and gene expression. However, higher MYC expression was detected in some cases without amplification, reassuring the MYC complex role in the SCLC carcinogenesis [3]. In the present study we demonstrated 20% of MYC amplification by in situ hybridization in FFPE tumor samples of untreated patients.

Iwakawa et al. reported MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma. Tumors with MYC amplification had higher relapse rates in 5 years, suggesting that MYC alteration could be related to micrometastasis at the diagnosis and/or aggressive biological behavior [18]. Yakut, et al. demonstrated MYC amplification by FISH in 7.8% of untreated NSCLC cases. It was associated with reduced survival time [19].

Johnson et al. analyzed cell lines from treated and untreated SCLC patients and showed 20% of MYC amplification only in the treated group. This finding was associated with shorter survival time compared to treated patients without gene amplification [10].

In our study, we examined only SCLC untreated patients and those with MYC amplification had significant shorter survival time (4.67 weeks versus 26.15 weeks).

Brennan et al. have shown different MYC status in treated and untreated patients using cell lines and fresh tumor. Although treatment may be implicated in increasing MYC amplification, the study demonstrated that patients who did not have MYC amplification previous to treatment did not develop it on post-treatment [2]. These authors found 8% of incidence of MYC amplification in cell lines from untreated patients, and have also correlated this pre-treatment MYC status with a short survival time.

Regarding to the presence of metastasis, we found no correlation between this and MYC amplification. The same was detected by Wong et al. indicating that MYC amplification may be an earlier event in SCLC tumorigenesis [4].

We did not find statistical relation between gene amplification and histopathological features as well. However, in the past, some researchers described more frequent MYC amplification in variant type of SCLC [5, 8]. This was not confirmed by Takahashi et al., who have also showed amplification in classic SCLC [3].

Few studies have investigated MYC amplification status in FFPE-SCLC samples by ISH methods [15]. The reasons for this include the scant or absent tumor tissue derived from small diagnostic biopsies and technical difficulties due to crush artifact and overlapped nucleus. Furthermore, SCLC is now more and more frequently diagnosed through cytopathology, diminishing the availability of FFPE material. In the present study we have experienced similar technical issues, resulting in a small, but informative sample.

Concerning the number of tumor cells evaluated in each sample, many reports have established 100 cells as a minimal count to evaluate amplification in FISH. Nevertheless, MYC amplification could be analyzed in our study with a mean number

of 60 cells. This could be explained by reduced divergences due to mixed population of tumor and non-tumor cells. The addition of morphology to select tumor areas, allowed by the CISH analysis under light microscopy, has facilitated the interpretation. This has permitted to count only tumor cells avoiding underestimation of signal count [20]. In this context it may not be necessary to use the same number of cells in CISH as in FISH, and it is especially important in scant samples as well as in bronchi biopsy. This is supported by similar amplification incidence observed both in our study and in previous reports using different methodologies.

## **5. Conclusion:**

In our study, we demonstrated that MYC amplification is a frequent event in SCLC untreated patients and this is related to short-time survival. MYC amplification is likely to be an independent prognostic factor for SCLC, however it must be reassured by further comprehensive studies. The complex role of MYC status in SCLC carcinogenesis still needs to be elucidated in order to allow advances in SCLC target therapy.

## **Conflict of interest statement**

None declared.

## **Acknowledgments**

We thank Vânia Naomi Hirakata for statistic analysis, the pathology laboratory's technical staff and the Pathology Department of UFCSPA staff for technical and general support.

## **References**

- [1] Kubokura H, Tenjin T, Akiyama H, Koizumi K, Nishimura H, Yamamoto M, et al. Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer:

- analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001;7: 197-203.
- [2] Brennan J, O'Connor T, Makuch RW, Simmons AM, Russell E, Linnoila RI, et al. Myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res* 1991;51: 1708-1712.
- [3] Takahashi T, Obata Y, Sekido Y, Hida T, Ueda R, Watanabe H, et al. Expression and amplification of myc gene family in small cell lung cancer and its relation to biological characteristics. *Cancer Res* 1989;49: 2683-2688.
- [4] Wong AJ, Ruppert JM, Eggleston J, Hamilton SR, Baylin SB, Vogelstein B. Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* 1986;233: 461-464.
- [5] Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983;306: 194-196.
- [6] Saksela K, Bergh J, Lehto V, Nilsson K, Alitalo K. Amplification of the c-myc oncogene in a subpopulation of human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1985;45: 1823-1827.
- [7] Waters JJ, Ibson JM, Twentyman PR, Bleehen NM, Rabbitts PH. Cytogenetic abnormalities in human small cell lung carcinoma: cell lines characterized for myc gene amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;30: 213-223.
- [8] Nau MM, Brooks BJ, Carney DN, Gazdar AF, Battey JF, Sausville EA, et al. Small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83: 1092-1096.
- [9] Kiefer PE, Bepler G, Kubasch M, Havemann K. Amplification and expression of protooncogenes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1987;47: 6236-6242.

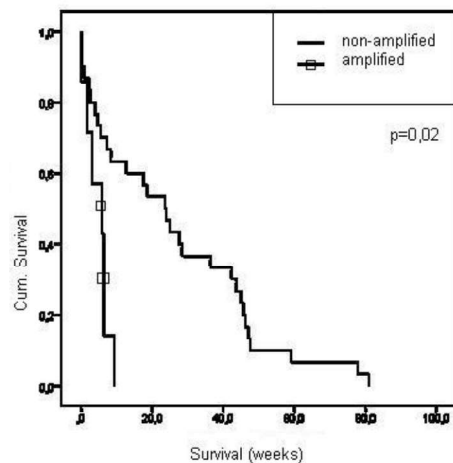
- [10] Johnson BE, Ihde DC, Makuch RW, Gazdar AF, Carney DN, Oie H, Russell E, et al. Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course. *J Clin Invest* 1987;79: 1629-1634.
- [11] Mitani S, Kamata H, Fujiwara M, Aoki N, Tango T, Fukuchi K, et al. Analysis of c-myc DNA amplification in non-small cell lung carcinoma in comparison with small cell lung carcinoma using polymerase chain reaction. *Clin Exp Med* 2001;1: 105-111.
- [12] Gu J, Linnoila RI, Seibel NL, Gazdar AF, Minna JD, Brooks BJ, et al. A study of myc-related gene expression in small cell lung cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1988;132: 13-17.
- [13] Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, et al. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52: 802-816.
- [14] Jung-Wan Y, Kwang Won S, Se Jin J, Yeon-Mock O, Tae Sun S, Woo Sung K, et al. The Relationship between the Presence of Chromosomal Instability and Prognosis of Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Fluorescence in situ Hybridization Analysis of Paraffin-embedded Tissue from 47 Korean Patients. *J Korean Med Sci* 2010;25: 863-867.
- [15] Gugger M, Burckhardt E, Kappeler A, Hirsiger H, Laissue J, Mazzucchelli L. Quantitative expansion of structural genomic alterations in the spectrum of neuroendocrine lung carcinomas. *J Pathol* 2002;196: 408-415.
- [16] Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ. Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples. *Lab Invest* 2001;81: 1545-1551.

- [17] Shiraishi M, Noguchi M, Shimosato Y, Sekiya T. Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res* 1989;49: 6474-6479.
- [18] Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, et al. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res* 2011;17: 1481-1489.
- [19] Yakut T, Egeli U, Gebitekin C. Investigation of c-myc and p53 gene alterations in the tumor and surgical borderline tissues of NSCLC and effects on clinicopathologic behavior: by the FISH technique. *Lung* 2003;181: 245-258.
- [20] Todorović-Raković N. Detection of c-myc Amplification in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumor Tissue by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH). *Methods Mol Biol* 2013;1012: 249-254.
- [21] Yoo SB, Lee HJ, Park JO, Choe G, Chung DH, Seo JW, et al. Reliability of chromogenic in situ hybridization for epidermal growth factor receptor gene copy number detection in non-small-cell lung carcinomas: a comparison with fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer* 2010;67: 301-305.

**Table I** Clinical pathological characteristics and MYC status in SCLC patients

<b>Variable</b>	<b>MYC Non-amplified</b>	<b>MYC amplified</b>	<b>n</b>	<b>P value</b>
<b>Age*</b>	58.4*** (n=43)	60.1*** (n=11)	54	0.648 CI=1.0 -1.06
<b>Sex **</b>			55	1.00
Female	15 (34.8%)	4 (36.3%)	19	
Male	29 (67.4%)	7 (63.6%)	36	
<b>Stage **</b>			40	0.279
Local	4 (9.3%)	2 (18.9%)	6	
Advanced	29 (67.4%)	5 (45.5%)	34	
<b>Biopsy site**</b>			40	0.41
Bronchi	26 (60.5%)	6 (54.6%)	32	
Other	14 (32.5%)	3 (27.3%)	17	
<b>Metastasis**</b>			55	
<b>ossea</b>	8 (18.6%)	0 (0%)	8	0.295
<b>brain</b>	10 (23.3%)	2 (18.9%)	12	1.00
<b>liver</b>	9 (20.9%)	2 (18.9%)	11	1.00
<b>node</b>	7 (16.3%)	0 (0%)	7	0.545
<b>COPD**</b>	12 (27.9%)	4 (36.4%)	16	0.681
<b>Survival (weeks)****</b>	26.2*** (17.8 – 34.5)	4.7*** (2.3 – 7.1)	37	0.02 CI=1.355-10.261 HR=3.72

\* T-test; \*\* Fisher's Exact test; \*\*\* mean, \*\*\*\*Mann-Whitney; COPD- chronic obstructive pulmonary disease.



**Fig- 1** Kaplan- Meier Curve: Patients with MYC amplification had significantly shorter survival time (4.67 weeks) compare to patients without MYC amplification (26.15 weeks) (P=0.01, CI= 1,355-10,261).

- Documento de envio do artigo

Gmail \*Rita de Cássia Sant Anna Alves <ritapatologia@gmail.com> \*

-----

\*Fwd: Submission Confirmation\*

1 mensagem

-----

\*Adriana Roehe \* <aroehe@gmail.com> 15 de janeiro de 2014 15:31

Para: Rita de Cássia Sant Anna Alves <ritapatologia@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: \*Lung Cancer\* <lungcancer@elsevier.com

<mailto:lungcancer@elsevier.com>>

Date: 2014/1/13

Subject: Submission Confirmation

To: aroehe@gmail.com <mailto:aroehe@gmail.com>, adrianar@ufcspa.edu.br  
<mailto:adrianar@ufcspa.edu.br>

Dear Dr.Med. Roehe

Thank you for submitting your article entitled "MYC amplification associated with poor survival in Small Cell Lung Cancer: a chromogenic in situ hybridization study." for consideration for publication in Lung Cancer.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the journal.

Yours sincerely

Lung Cancer

### **- Resultados do gene HER2**

O estudo citogenético do gene *HER2* foi realizado em 21 amostras de SCLC. Nestas amostras não foram identificadas ampliações ou resultados significativos relacionando as demais variáveis e o número de cópias do gene *HER2*. Na tabela 1 podem-se observar as frequências das variáveis estudadas para o gene *HER2*.

Tabela 1 - Características da amostra em relação ao *HER2*

<b>Variável</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Média</b>
<b>Idade</b>	21		61,45
<b>Sexo</b>	21		
Feminino	4	19,04	
Masculino	17	80,95	
<b>Estadiamento</b>	21		
Local	2	9,52	
Avançado	13	61,90	
Perdas	6	28,57	
<b>Local da biópsia</b>	21		
Brônquica	9	42,85	
Outro	12	57,14	
<b>Metástases</b>	-		
Óssea	2	9,09	
Cerebral	7	31,81	
Hepática	5	22,72	
Nodal	5	22,72	
<b>Tratamento</b>	21		
Quimioterapia	3	14,28	
Quimioterapia + radioterapia	4	19,04	
cirurgia	1	4,76	
Cirurgia+ quimioterapia	1	4,76	
Quimioterapia + radioterapia + cirurgia	1	4,76	
Perdas	11	52,38	
<b>Sobrevida (semanas)</b>	17		29,67 (0-80,9)
<b><i>HER2</i></b>	21		
Número de cópias	21		2,53 (2,06-3,48)
Porcentagem de núcleos amplificados	21	4,11 (0-17,24)	
Número de núcleos analizados			59,38 (21-99)

#### 4. Considerações finais

O SCLC é uma neoplasia agressiva com um prognóstico muito reservado em dois anos. Apesar de apresentar fatores de risco ambientais bem estabelecidos, poucas perspectivas terapêuticas foram observadas nos últimos 20 anos.

Em parte, esta estagnação é resultante da dificuldade de se obter amostras tumorais abundantes para estudo da sua carcinogênese complexa.

Neste contexto, o estudo de genes como o *MYC* e *HER2* mostra claramente, através de estudos conflitantes com relação à expressão, à amplificação e ao *status* pré e pós-quimioterapia, a complexidade de sua atuação no SCLC. Por outro lado, a expressão aumentada e amplificação destes genes são demonstradas em alguns estudos, podendo representar um fator prognóstico independente no SCLC, especialmente com relação ao *MYC*, onde as alterações são mais frequentes.

No presente estudo foi possível realizar, pela primeira vez, a amplificação do gene *MYC* através da técnica de CISH em SCLC e verificar a sua associação com uma sobrevida global menor. O estudo não identificou a amplificação do gene *HER2* em 21 casos estudados. Os dados da literatura sugerem que a amplificação do gene *HER2* seja um evento mais raro nos SCLC.

O estudo de alvos terapêuticos no SCLC em genes e proteínas que atuam sinergicamente ou que influenciam na sua regulação poderá mudar este

cenário no futuro, como por exemplo, com os inibidores dos receptores aurora-quinase e inibidores dos receptores do fator de crescimento epidérmico.

## **5. Anexos**

### **5.1. Materiais e métodos**

#### **5.1.1. Amostra e variáveis**

Este estudo tem delineamento transversal retrospectivo, onde as amostras utilizadas foram provenientes do Laboratório de Patologia do Hospital Nossa Senhora Conceição de Porto Alegre – GHC e do Laboratório de Patologia do Hospital Santa Rita – Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Inicialmente foram selecionados 78 blocos de parafina e respectivas lâminas de H.E. de pacientes diagnosticados com SCLC de 1995 a 2005.

As lâminas originais coradas pelo método de H.E. foram revisadas, recoradas e refeitas, quando necessário. Os diagnósticos foram revisados por dois autores. Foram excluídos do estudo casos com diagnóstico de SCLC de outra localização, por exemplo, esôfago, e tipo histológico diverso. Também foram excluídos da amostra aqueles casos que apresentavam escassez de tecido neoplásico na lâmina e no bloco de parafina, insuficientes para a realização do teste de CISH.

Os diagnósticos foram revisados e classificados conforme a classificação da OMS vigente. Os autores concordaram em 100% dos casos

diagnosticados previamente. Não foram identificados tipos histológicos combinados na amostra (componente NSCLC coexistente em mais de 10% do tumor).

As variáveis estudadas foram idade, sexo, tabagismo, localização da biópsia, estadiamento clínico, comorbidades, tipo de tratamento realizado, sobrevida global, contagem do *MYC* e *HER2*.

Para a variável tabagismo foi considerado o número de cigarros consumidos por dia, quando esta informação estava disponível no prontuário médico.

A informação sobre o estadiamento foi obtida através da revisão dos prontuários médicos. Em alguns casos o estadiamento estava informado explicitamente e na grande maioria os pacientes precisaram ser re-estadiados quando possível, conforme os exames laboratoriais e de imagem disponíveis nos prontuários. O estadiamento foi realizado conforme o *Veterans Administration Lung Study Group System*, vigente na época do diagnóstico.

As comorbidades foram agrupadas conforme a sua natureza em cirúrgicas, neoplásicas, cardiovasculares, pulmonares, infecciosas, endócrinas e nefrológicas.

A sobrevida global dos pacientes foi considerada a partir da data do diagnóstico do exame anatomopatológico inicial até a data do óbito. A informação da data do óbito foi obtida através da nota de óbito dos prontuários quando disponível, do atestado de óbito e das informações fornecidas pelo

NISS (Núcleo de Informação do Sistema de Saúde da Secretaria de Saúde de Porto Alegre).

### 5.1.2. Técnica de CISH

Na técnica de CISH a hibridização é a ligação entre a sonda que contém a sequência do gene de interesse e o segmento de DNA complementar do gene em estudo na amostra. As ligações são visualizadas por reação cromogênica que mostra a coloração marrom em *dot* para a região representada pelo gene. A reação é visualizada dentro do núcleo da célula neoplásica através de microscopia ótica. Reações fracas e inespecíficas dispersas não são consideradas como sinal positivo. Neste estudo foi utilizado para a avaliação microscópica o microscópio Olympus® modelo BX40 com objetiva de imersão. As sondas utilizadas foram zytovision®: zyto dot – spec myc probe – código: c-3013400 e zyto dot – spec HER2 probe – código: c-3001-400.

Na análise de amplificação gênica foi obtido o número de sinais idealmente em 100 células, em pelo menos 60 núcleos por caso em média. Núcleos com mais de cinco sinais foram considerados amplificados, segundo Rummukainen e cols. (2001) e Gugger e cols.(2002). Apesar de tratar-se de uma sonda não centromérica este ponto de corte foi escolhido baseado no número de cópias do *MYC* encontrados nas células normais e nos estudos prévios demonstrando a raridade das alterações numéricas no cromossomo 8

em carcinomas de pequenas células. O gene *MYC* apresenta um número de cópias igual ou superior a 5 sinais em cerca de 4% no parênquima pulmonar normal (Gugger e cols., 2002). Para o gene *HER2* também foi utilizado o mesmo critério para determinação da amplificação. Como controle foram utilizados casos de mama que apresentavam amplificação e/ou positividade conhecida para o teste de CISH.

#### **5.1.2.1. Técnica de CISH – Procedimento e Análise Microscópica**

Todos os passos foram realizados utilizando os reagentes do *kit* de implementação ZitoDot (Zitovision®).

##### **Dia 1- desparafinização e proteólise**

A) Pré-tratamento:

- 1 - Realização dos cortes histológicos em lâminas com cola com espessura de 3 a 5  $\mu\text{m}$ .
- 2 - Incubar as lâminas por 10 min a 70°C.
- 3 - Incubar em xilol 2x de 5 min.
- 4 - Incubar 3x de 3 min em etanol 100%.
- 5 - EDTA –*Heat Pretreatment Solution*, em banho-maria a 95°C 30 min.
- 6 - Transferir as lâminas para água deionizada ou destilada imediatamente, lavar 3x 2min e escorrer.
- 7 - Pingar Solução de Pepsina encima do tecido e incubar por 7 min (3-10min) em câmara úmida.

8 - Lavar 3x de 2min. Em água deionizada ou destilada.

9 - Desidratar em 70%, 85%, 95% e 2x em etanol 100%, cada um por 2 min.

10 - Secar ao ar.

B) Desnaturação e hibridização:

1 - Centrifugar e aplicar 10 µl de sonda zitodot CISH em cada lâmina.

2 - Cobrir com lamínula com cola.

3 - Desnaturar em placa quente 94 a 95°C por 10 min.

4 - Transferir as lâminas para uma câmara úmida e hibridize *overnight* a 37°C, sem deixar secar.

### **Dia 2 – pós- hibridização e detecção**

1 - Remover cuidadosamente a cola e a lamínula em solução de lavagem por 5 min.

2 - Lavar por 5min em solução de lavagem a 75 -80°C. Pré aqueça a solução e aumente um grau para cada 2 lâminas lavadas (não exceda os 80°C checando com um termômetro).

3 - Lavar 3x de 2min em água deionizada ou destilada.

4 - Incubar as lâminas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% por 10 min.

5 - Lavar 3x por 2 min em PBS.

6 - Aplicar solução bloqueadora, 3-4 gotas por lâmina, e incubar por 10 min em temperatura ambiente.

7 - Remover a solução bloqueadora.

8 - Aplicar Mouse- anti-DIG, 3 a 4 gotas, por lâmina e incubar por 30 min em temperatura ambiente.

- 9 - Lavar 3x por 2 min em PBS.
- 10 - Aplicar polímero Anti-mouse-HRP, 3 a 4 gotas por lâmina, e incubar por 30 min.
- 11 - Lavar 3x por 2 min em PBS.
- 12 - Durante a lavagem preparar o DAB usando a solução B, pingando em um copo graduado 1 ml e adicionando uma gota de solução A.
- 13 - Aplicar a solução do DAB, 3-4 gotas por Lâmina, e incuba por 30 min em temperatura ambiente.
- 14 - Transferir as lâminas para uma cuba e lavar 2 min em água corrente.
- 15 - Contracorar com Hematoxilina de Mayer 8-10 s.
- 16 - Transferir o material para uma cuba e lavar 2 min em água corrente.
- 17 - Desidratar em etanol por 2min cada em 70%, 85%, 95%, 100% e 100%.
- 18 - Incubar 2x 2 min em xilol.
- 19 - Secar ao ar por 15 min.
- 20 - Montar a lamínula e deixar secar por 30 min.

### **Análise microscópica**

- 1 - Usar objetiva de 10 ou 20x para achar as áreas de hibridização e localizar os locais de interesse baseados nas características observadas nas lâminas de H.E., evitando zonas de necrose e artefatos por esmagamento.
- 2 - Usar a objetiva de 100x (imersão) para contagem dos núcleos dentro das áreas selecionadas. Foi utilizado um retículo quadriculado acoplado à ocular do microscópio para guiar a contagem dos núcleos.

3- Gravar o número de sinais cromogênicos por núcleo. Calcular a porcentagem de núcleos em cada caso. Foram considerados amplificados casos com 20% ou mais dos núcleos contendo mais do que 5 sinais cada.

4 - Procurar outras áreas de células tumorais na preparação para considerar possível heterogeneidade.

### **5.1.3. Análise estatística**

Os testes estatísticos utilizados foram o teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney e regressão de Cox uni e multivariada. A curva de Kaplan-Meier foi utilizada para demonstrar a sobrevida global dos pacientes. Para as demais variáveis qualitativas foi utilizado o teste qui-quadrado para amostras pequenas - Teste Exato de Fisher. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o SPSS para Windows, versão 19 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

## 5.2. Tabelas e figuras da análise estatística

Tabela 1 - Características gerais da amostra – variáveis contínuas

<b>Variável</b>	<b>n</b>	<b>Perdas</b>	<b>Média</b>	<b>Intervalo</b>
Idade	75	2	58,7	40,3-81,3
% Amplificação <i>MYC</i>	55	22	14,2	0-71
Contagem de sinais <i>MYC</i>	55	22	3,2	2-7
Sobrevida em semanas	55	22	22,9	0-102,7
Quantidade de cigarros/dia	30	47	27,2	5-50
% Amplificação <i>HER2</i>	21	56	4,1	0-17
Contagem de sinais <i>HER2</i>	21	56	2,4	2-3

Tabela 2 - Características gerais da amostra – variáveis qualitativas (n=77)

Variável	Frequência	% Válida
<b>Sexo</b>		
Feminino	22	28,9
Masculino	54	71,1
<b>Local da biópsia</b>		
Brônquica	50	72,5
Mediastinal	12	17,4
Cervical	5	7,2
Supraclavicular	2	2,9
<b>Estadiamento</b>		
Localizado	12	21,4
Avançado	44	78,6
<b>Metástases</b>		
Óssea	11	29,7*
Cerebral	14	37,8*
Hepática	15	40,5*
Suprarrenal	4	10,8*
Nodal	9	24,3*
Pancreática	1	2,7*
Renal	1	2,7*
<b>Comorbidades</b>		
Metabólica	4	8,3
Cardiovascular	11	22,9
Nefrológica	6	12,5
Cirúrgica	8	16,7
Hepática	3	6,3
Infecciosa	8	16,7
Hematológica	3	6,3
Drogas	7	14,6
Neoplasia	2	4,2
Neurológica	1	2,1
DPOC	19	39,6
HAS	11	22,9
SVCS	12	25,0

\* Porcentagem de casos

Tabela 3 - Características da amostra em relação ao *MYC*

<b>Variável</b>	<b><i>MYC</i> não amplificado</b>	<b><i>MYC</i> amplificado</b>	<b>n</b>	<b>P</b>
<b>Idade*</b>	58,4*** (n=43)	60,1*** (n=11)	54	0,648 CI=1,0 -1,06
<b>Sexo **</b>			55	1,00
Feminino	15 (34,8%)	4 (36,3%)	19	
Masculino	29 (67,4%)	7 (63,6%)	36	
<b>Estadiamento **</b>			40	0,279
Local	4 (9,3%)	2 (18,9%)	6	
Avançado	29 (67,4%)	5 (45,5%)	34	
<b>Local da biópsia**</b>			40	0,41
Brônquica	26 (60,5%)	6 (54,6%)	32	
Outro	14 (32,5%)	3 (27,3%)	17	
<b>Metástases**</b>			55	
Óssea	8 (18,6%)	0 (0%)	8	0,295
Cerebral	10 (23,3%)	2 (18,9%)	12	1,00
Hepática	9 (20,9%)	2 (18,9%)	11	1,00
Nodal	7 (16,3%)	0 (0%)	7	0,545
<b>DPOC**</b>	12 (27,9%)	4 (36,4%)	16	0,712
<b>Sobrevida (semanas)****</b>	26,2*** (17,8 – 34,5)	4,7*** (2,3 – 7,1)	37	0,02 CI=1,355-10,261 HR= 3,72

\* teste T; \*\* Teste Exato de Fischer; \*\*\* média, \*\*\*\* teste de Mann-Whitney; DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica.

Tabela 4 – Análise univariada

<b>Variável</b>	<b>N HR</b>	<b>P</b>	<b>I.C.</b>
<b>Idade</b>	1,030	0,05	1,00-1,06
<b>Amplificação MYC</b>	4,002	0,05	1,512-10,590
<b>Sexo</b>	1,073	0,82	0,582-1,980
<b>Tratamento</b>			
Quimioterapia	0,583	0,14	0,283-1,201
Quimioterapia+radioterapia	0,561	0,16	0,249-1,265
Cirurgia+quimioterapia+ radioterapia	3,050	0,14	0,680-13,680
<b>Metástases</b>			
Óssea	0,553	0,13	0,255-1,196
Hepática	1,274	0,51	0,617-2,633
Nodal	0,983	0,96	0,419-2,307
<b>DPOC*</b>	0,960	1,00	0,542-1,700

\* Doença Pulmonar obstrutiva crônica.

Tabela 5 - Características histopatológicas e local da biópsia

Variável	Biópsia brônquica % (n)	Linfonodo mediastinal % (n)	Linfonodo cervical % (n)	Linfonodo supraclavicular % (n)	Valor P*
<b>Necrose n=33</b>	36,0 (18)	91,7 (11)	60,0 (3)	50,0 (1)	0,01
<b>Azzopardi n=64</b>	94,0 (47)	83,3 (10)	100,0 (5)	100,0 (2)	0,569
<b>Nucléolo n=17</b>	10,0 (5)	50,0 (6)	80,0 (4)	100,0 (2)	0,000
<b>Rosetas n=6</b>	0,0	25,0 (3)	40,0 (2)	50,0 (1)	0,000
<b>Paliçada n=42</b>	58,0 (29)	83,3 (10)	40,0 (2)	50,0 (1)	0,267
<b>Apoptose n=68</b>	100,0 (50)	91,7 (11)	100,0 (5)	100,0 (2)	0,277
<b>Trabéculas n=47</b>	62 (31)	83,3 (10)	100,0 (5)	50,0 (1)	0,181
<b>Úlceração n=3</b>	6,0 (3)	0,0	0,0	0,0	1,000

\* Teste Exato de Fisher

Tabela 6 - Características histopatológicas e presença de metástases (teste exato de Fisher)

<b>Local de Metástases</b>				
<b>Variável (n)</b>	<b>Óssea % (n) P</b>	<b>Cerebral % (n) P</b>	<b>Hepática % (n) P</b>	<b>Nodal % (n) P</b>
<b>Necrose (16)</b>	36,4 (4) 0,723	42,9 (6) 1,000	46,7 (7) 0,749	44,4 (4) 1,000
<b>Azzopardi (34)</b>	100,0 (11) 0,540	100,0 (14) 0,275	100,0 (15) 0,257	77,8 (7) 0,141
<b>Nucléolo (9)</b>	9,1 (1) 0,229	21,4 (3) 1,000	20,0 (3) 0,711	33,3 (3) 0,657
<b>Rosetas (5)</b>	9,1 (1) 1,000	0,0 (0) 0,135	26,7 (4) 0,136	11,1 (1) 1,000
<b>Paliçada (25)</b>	54,5 (6) 0,443	71,4 (10) 1,000	73,3 (11) 0,724	55,6 (5) 0,432
<b>Apoptose (37)</b>	100,0 (11)	100,0 (14)	100,0 (15)	100,0 (9)
<b>Trabéculas (28)</b>	63,6 (7) 0,404	78,6 (11) 1,000	73,3 (11) 1,000	77,8 (7) 1,000
<b>Úlceração (1)</b>	9,1 (1) 0,297	0,0 (0) 1,000	6,7 (1) 0,405	0,0 (0) 1,000

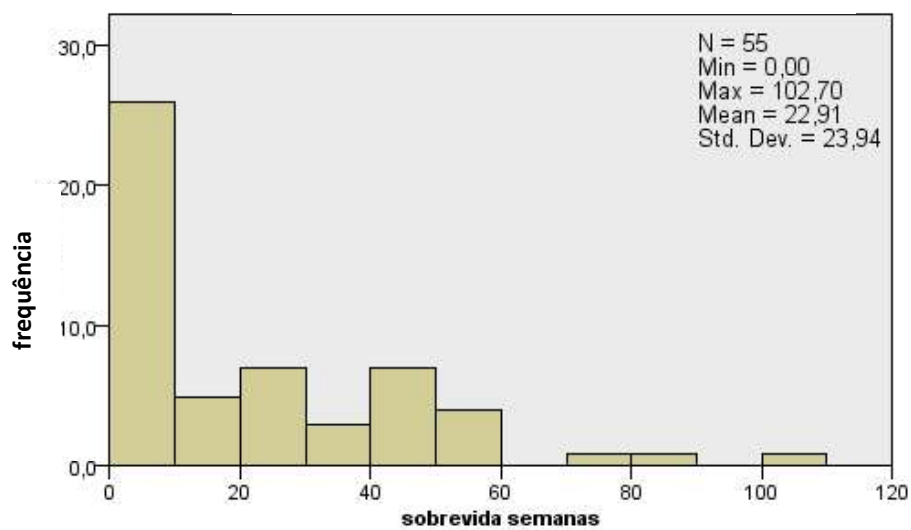


Figura 1 – Frequência da sobrevivida em semanas.

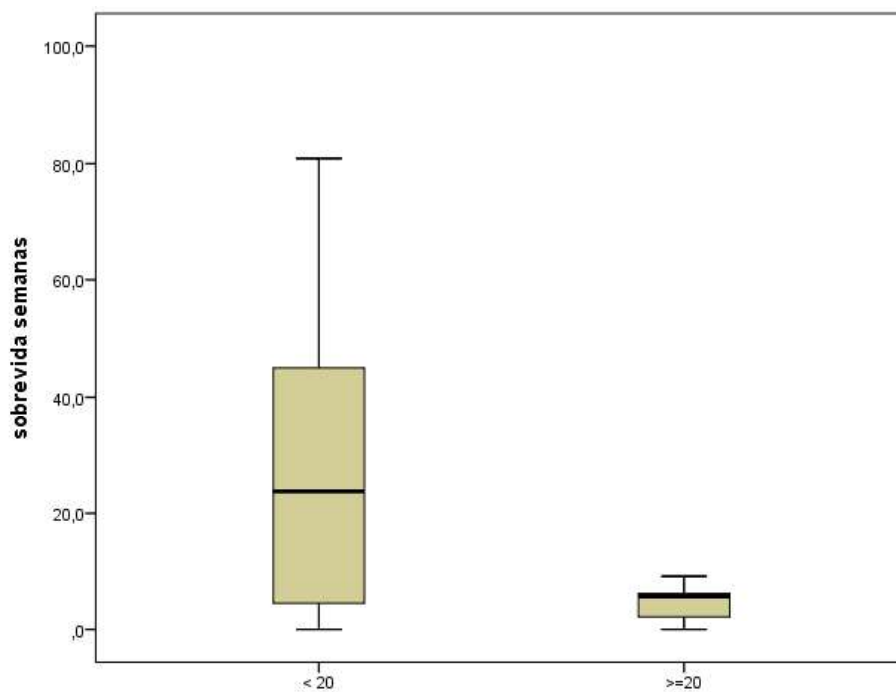


Figura 2 - Sobrevida em semanas nos casos amplificados ( $MYC > 20$ ) e não amplificados ( $MYC < 20$ ).

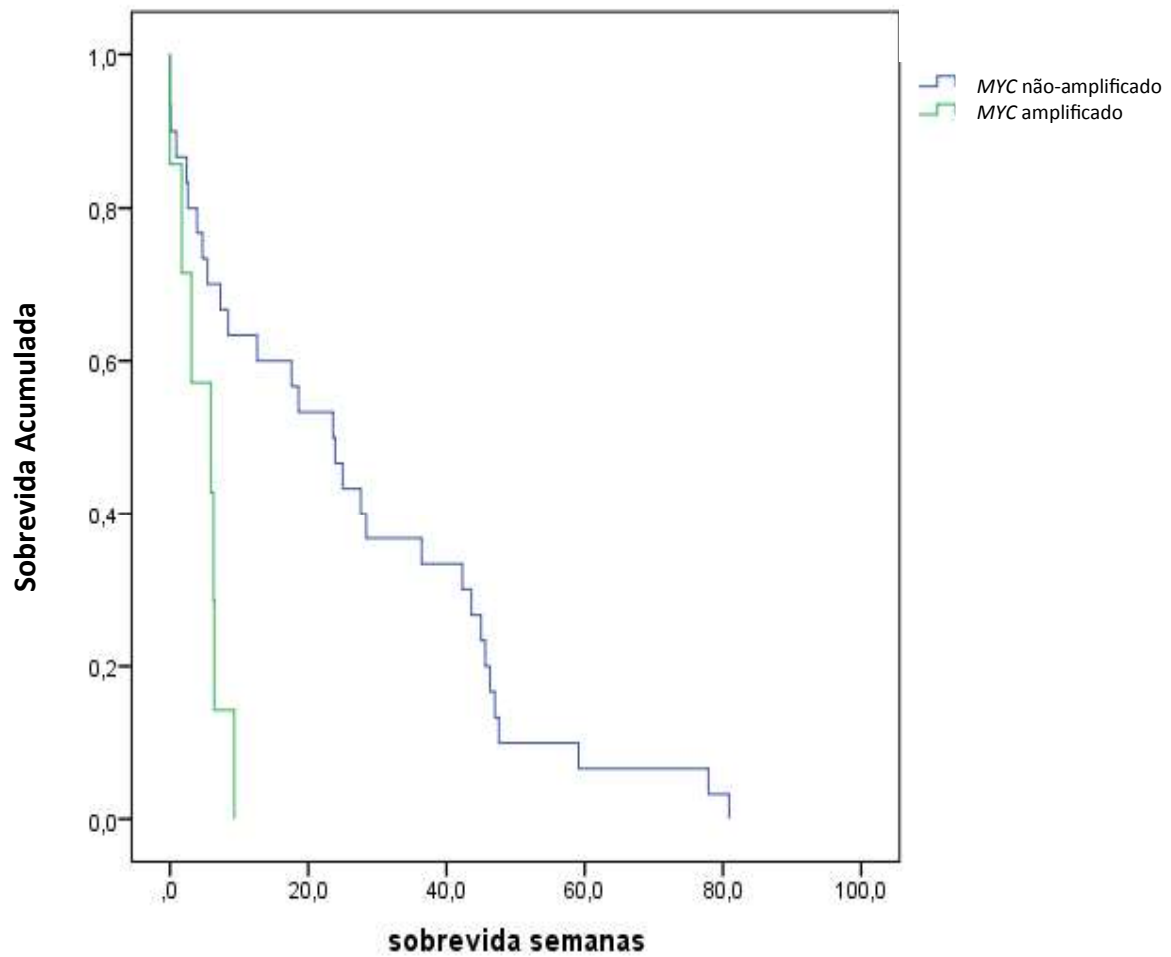


Figura 3 - Curva de sobrevivência dos pacientes com amplificação e sem amplificação do *MYC*, pelo método de Kaplan-Meier.

### 5.3 Fotos da técnica de CISH e das características histopatológicas da amostra

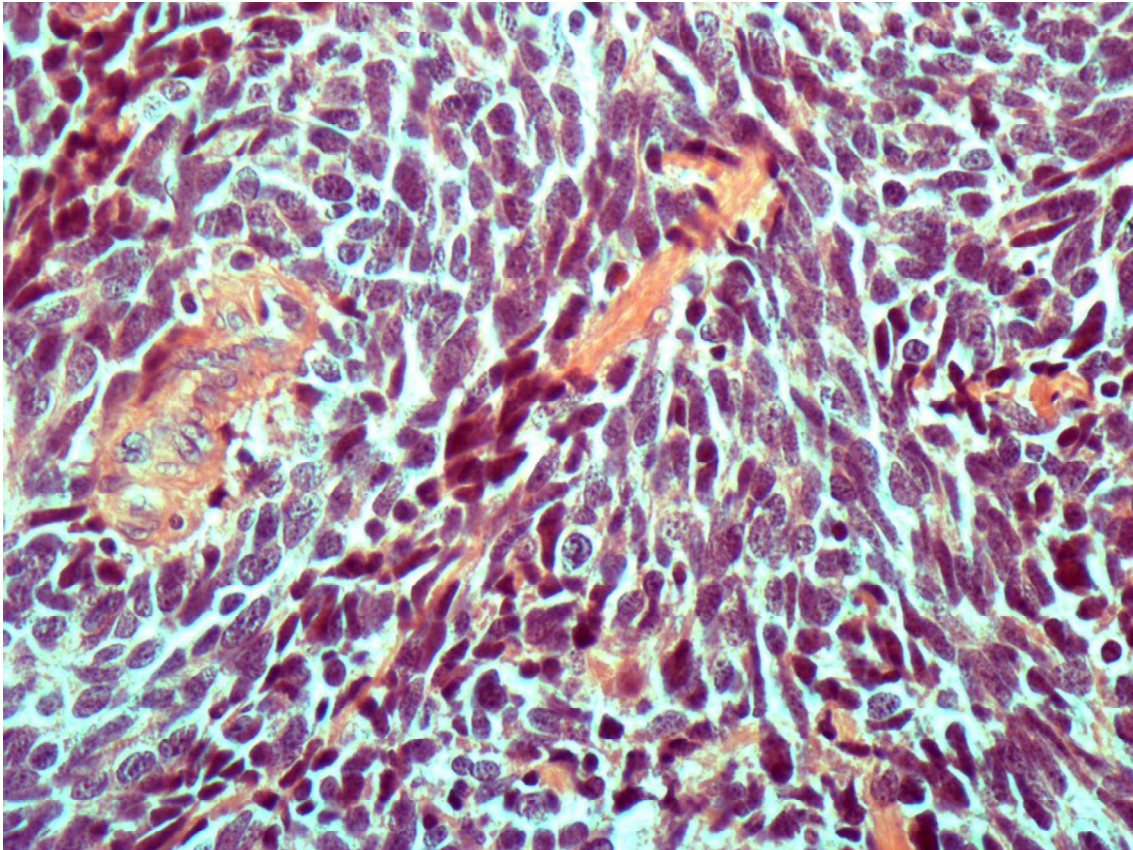


Foto 1 – Aspecto microscópico do SCLC. Observam-se grupamentos celulares com arranjo em paliçada ao redor de vasos, amoldamento nuclear e cromatina nuclear grosseira (H.E., 400x).

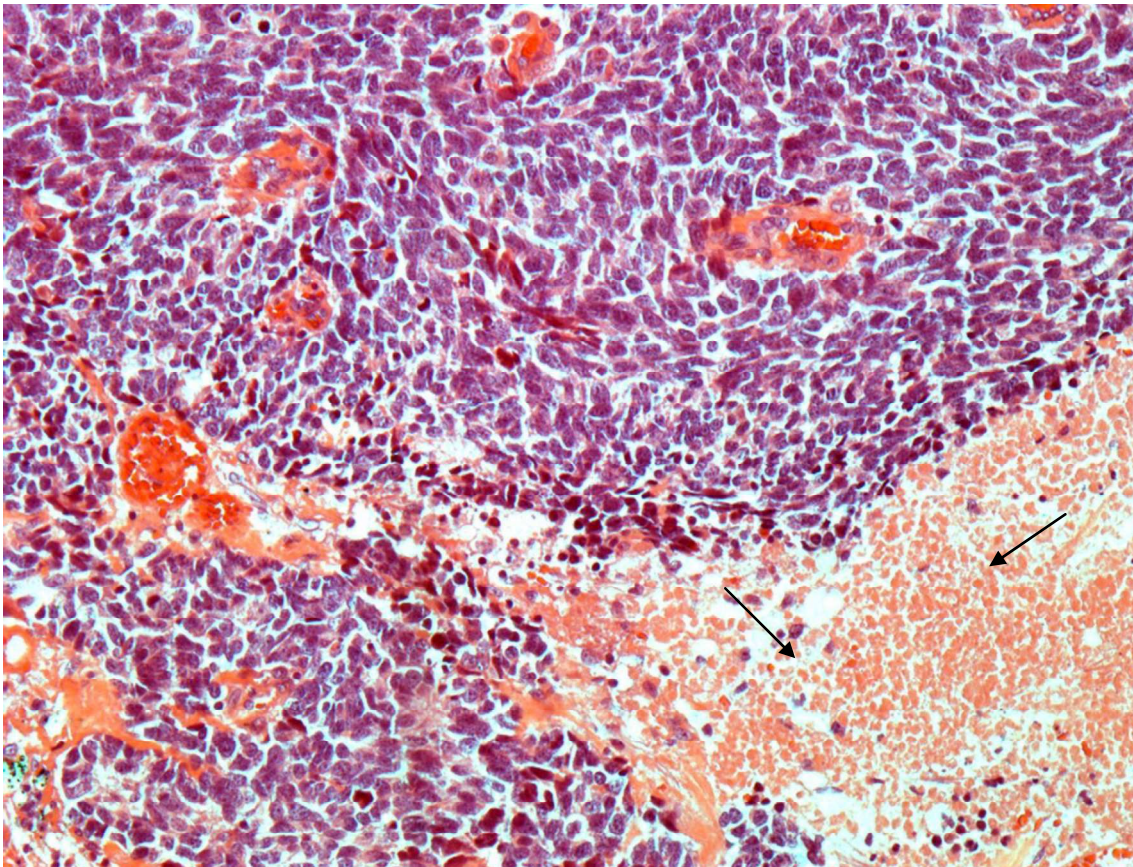


Foto 2 – Aspecto microscópico do SCLC. Grupamentos celulares em ninhos, com arranjo em paliçada ao redor de vasos e área de necrose adjacente (setas). Também podem ser observadas diversas figuras de mitose (H.E., 400x).

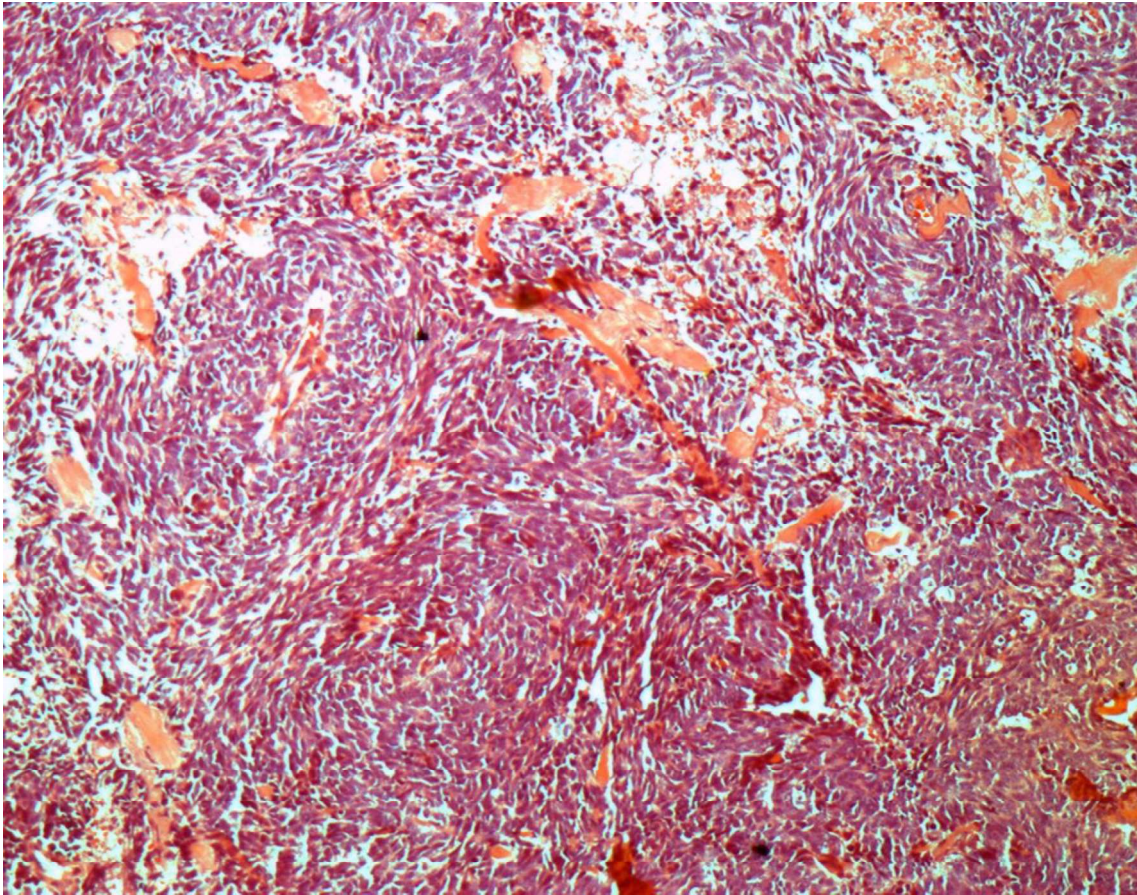


Foto 3 – Aspecto microscópico do SCLC. Células alongadas com arranjo em paliçada (H.E., 100x).

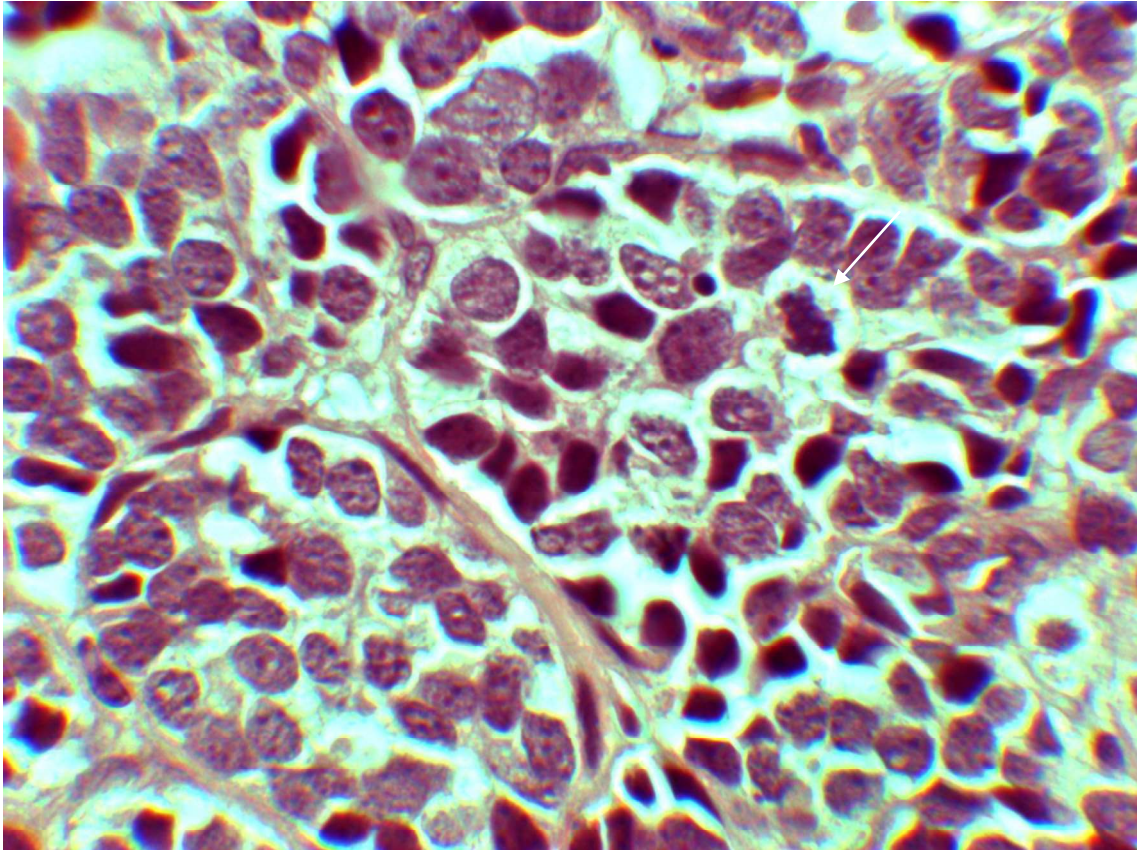


Foto 4 – Aspecto microscópico do SCLC. Arranjo em ninhos, com escasso estroma intercelular. Presença de hiper cromasia nuclear, figuras de mitose (seta), nucléolos e células apoptóticas (H.E., 400x).

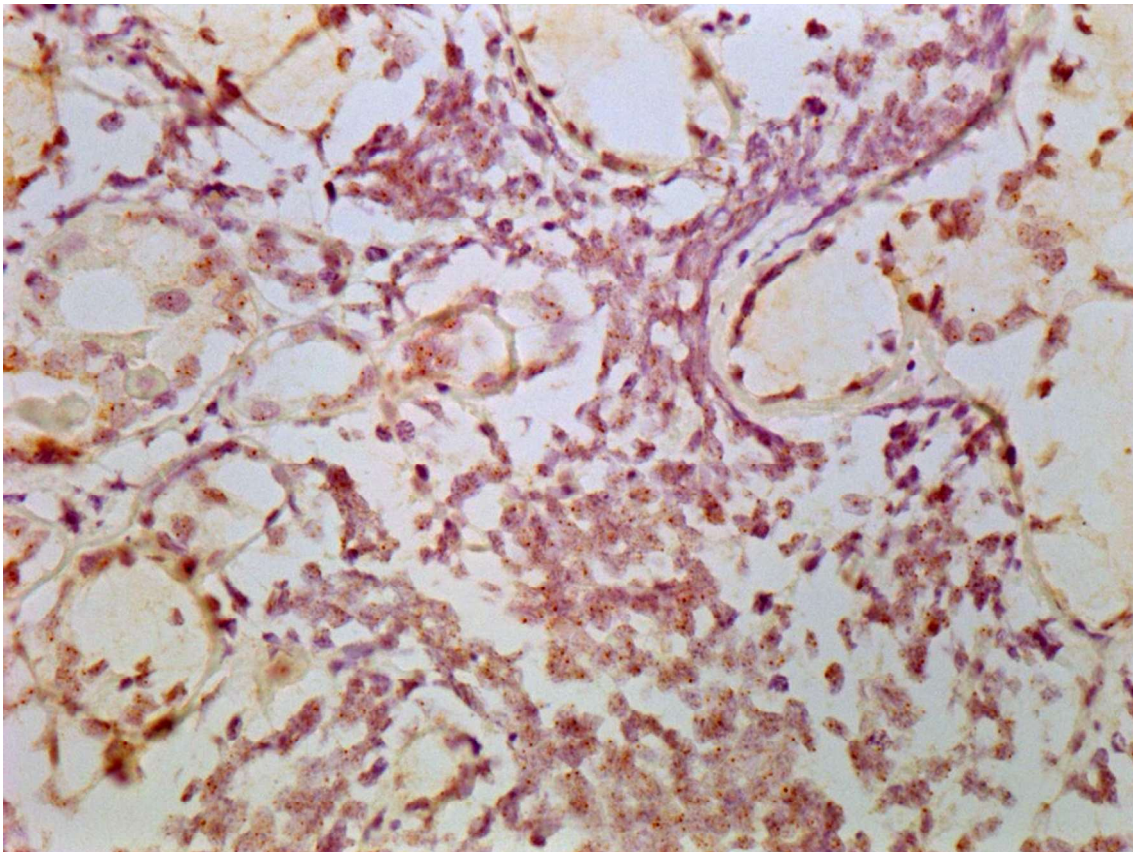


Foto 5 - Técnica de CISH utilizando-se da sonda para o gene *MYC*, 400x. Observa-se a presença de dois sinais em *dot* na maioria das células neoplásicas e estromais.

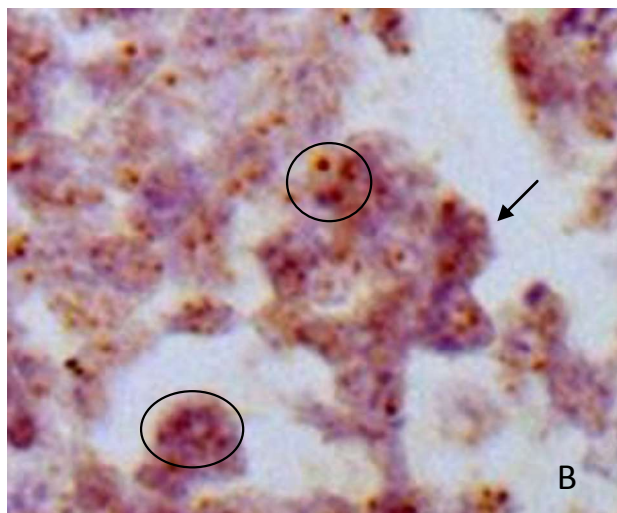
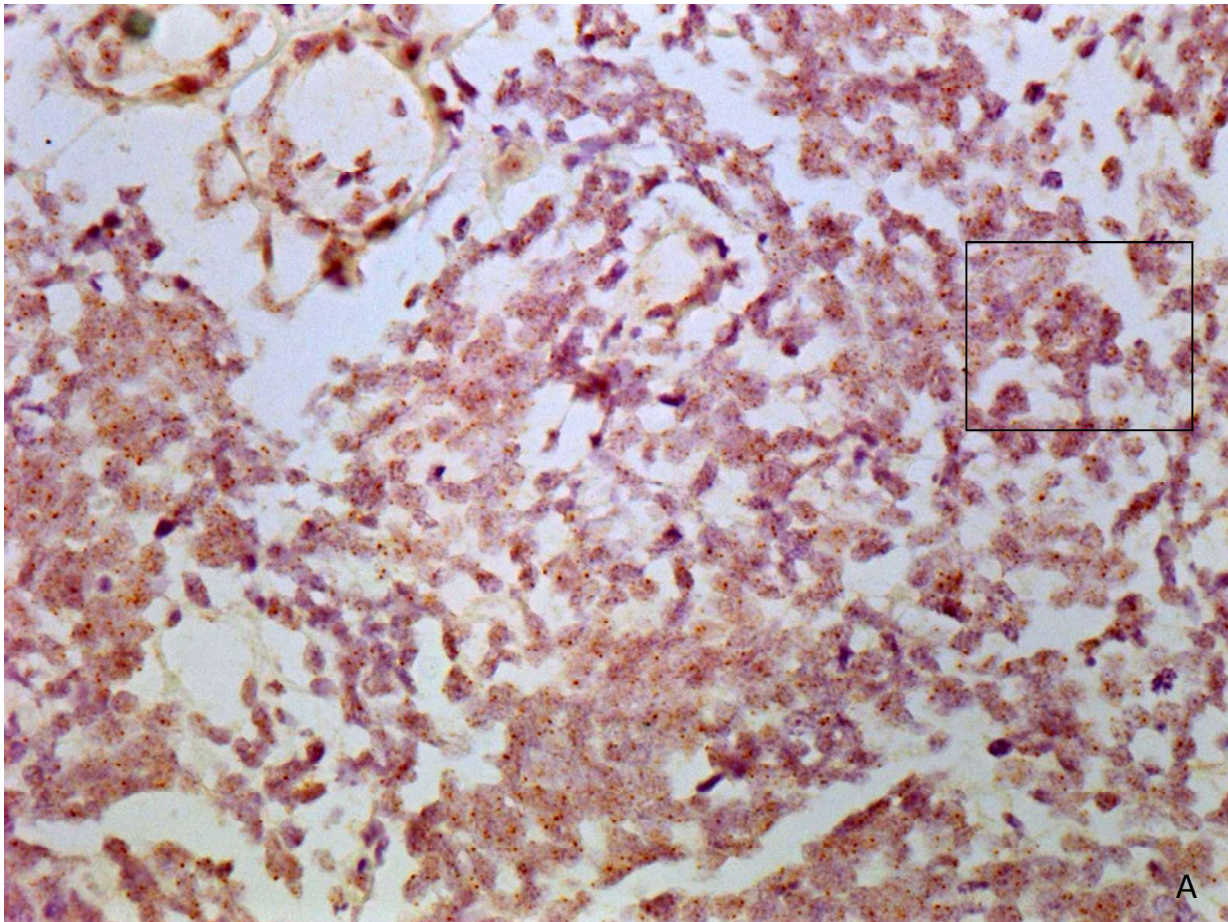


Foto 6 – A: Técnica de CISH utilizando-se da sonda para o gene *MYC*, 400x. Observam-se diversas células com aumento do número de sinais. B: Ampliação da área selecionada na foto A. Observam-se vários núcleos com número aumentado de sinais (círculos). Em algumas células, há sobreposição de núcleos (seta).

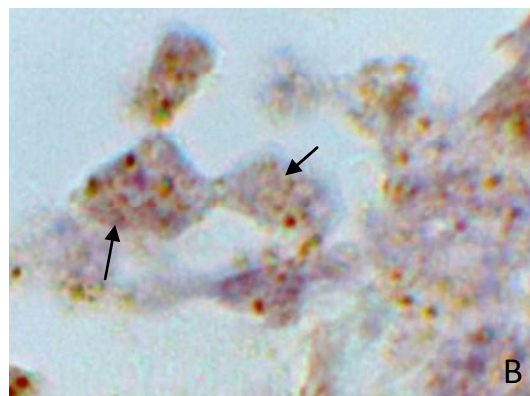
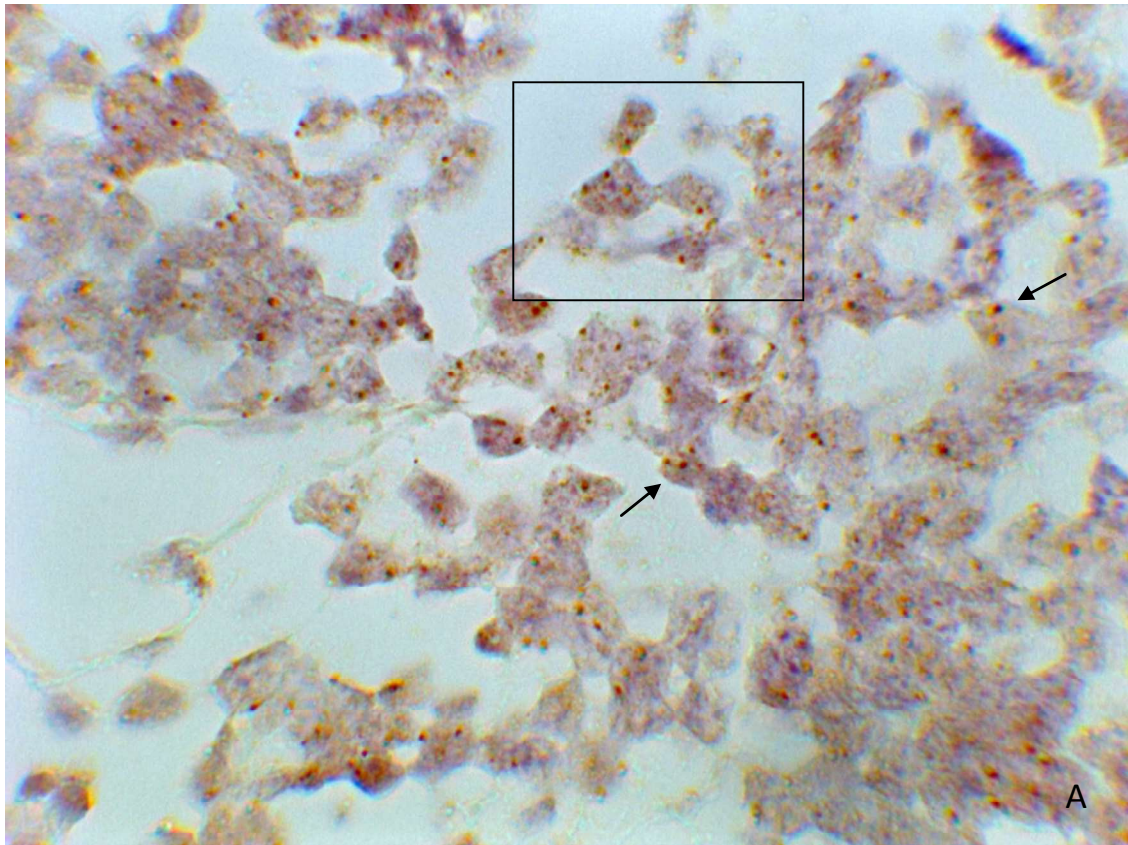


Foto 7 – A: Técnica de CISH utilizando-se da sonda para o gene *MYC*, 1000x. Observam-se diversos núcleos com marcação forte em *dot*, contendo dois ou mais sinais (setas). B: Ampliação da área selecionada na foto A. Observam-se também zonas de reação inespecífica irregular que não foram consideradas como sinal positivo (setas).

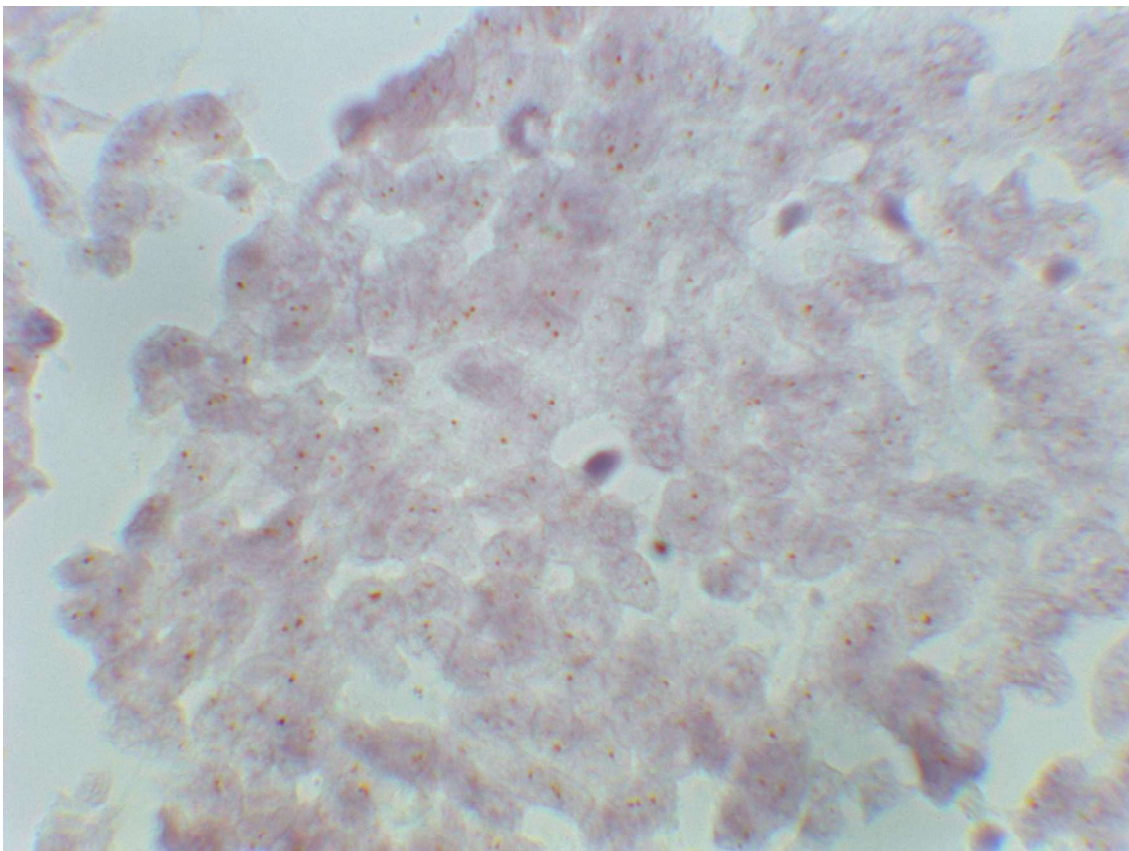


Foto 8 - Técnica de CISH utilizando-se da sonda para o gene *HER2*, 1000x. Nesta microfotografia observa-se marcação em *dot* contendo dois sinais na maioria das células.

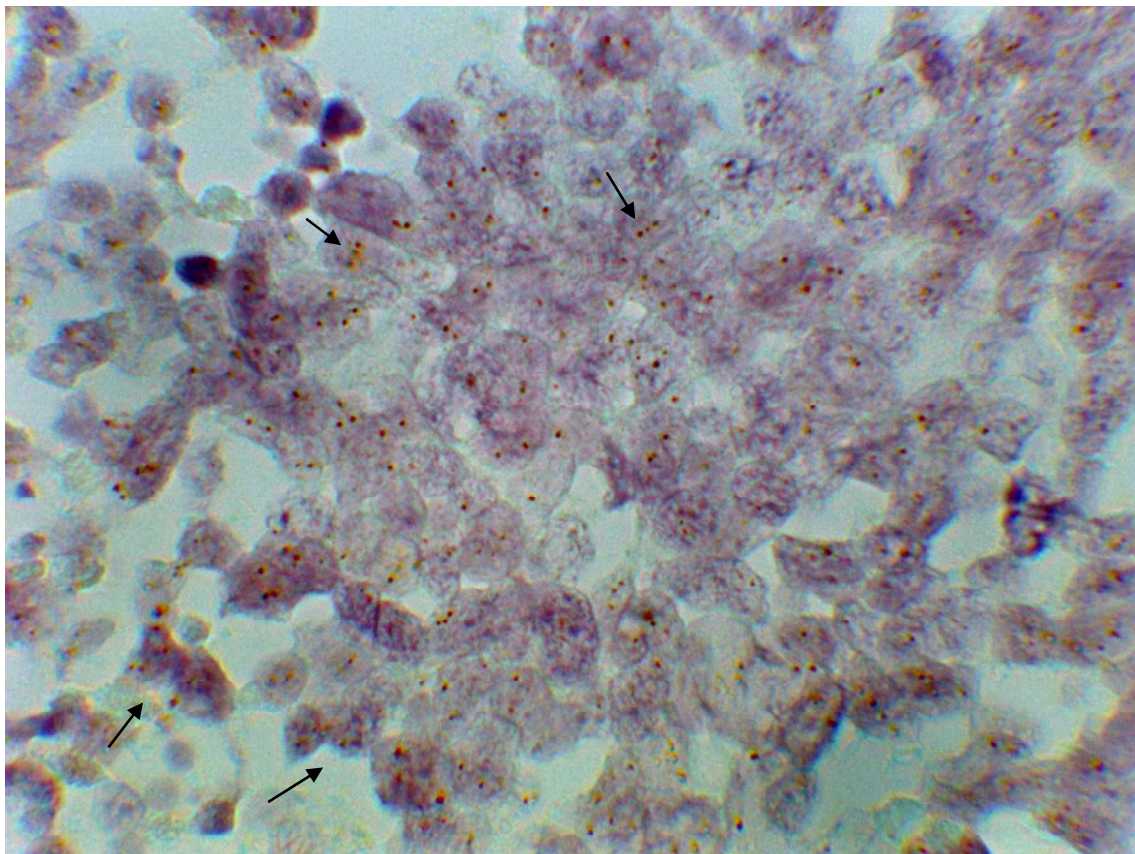


Foto 9 - Técnica de CISH utilizando-se da sonda para o gene *HER2*, 1000x. Nas setas superiores alguns núcleos neoplásicos apresentam três sinais em alinhamento. Nas setas inferiores, identificam-se zonas de sobreposição.

#### **5.4 Considerações éticas e pareceres dos Comitês de Ética**

O estudo foi submetido para avaliação dos Comitês de Ética da UFCSPA e demais instituições envolvidas e foi encaminhado para aprovação no CONEP, conforme as normas vigentes com relação a pesquisas com estudo genético (Resolução 196/96).

O termo de consentimento informado é dispensado neste estudo conforme as normas do CONEP que isentam os pesquisadores de apresentá-lo nos casos onde o material que será utilizado na pesquisa foi armazenado no laboratório antes de março 2005 (Resolução CNS 196/96 e CNS 347/05).



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

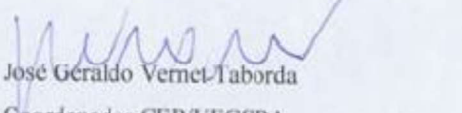
### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFCSPA

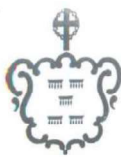
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, recebeu o Parecer nº 317/2011 enviado pelo CONEP referente ao Projeto 643/10, intitulado “Estudo citogenético do gene EGFR em carcinoma de pequenas células do pulmão pelo método de FISH”, de responsabilidade do Pesquisador Antonio Atalíbio Hartmann, o qual foi aprovado com recomendação, desde que atendidas as recomendações do CONEP previamente confirmadas pelo CEP/UFCSPA.

Dessa forma, tendo verificado que as recomendações do CONEP, os aspectos éticos e metodológicos conforme Resolução 196/09 e demais Resoluções foram atendidas, aprova o projeto 643/10.

Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão se comunicados a este CEP.

Porto Alegre, 21 de julho de 2011

  
José Geraldo Vernet Taborda  
Coordenador CEP/UFCSPA



## Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585  
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68  
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



### PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer nº 392/11

Protocolo nº 3624/11

**Título:** “Estudo citogenético do gene *EGFR* em carcinomas de pequenas células do pulmão, através da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência - FISH”.

**Pesquisador Responsável:** Antônio Atalábio Hartmann

**Instituição onde se realizará** – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

**Data de Entrada:** 25/08/2011

**II – Objetivos – Objetivo Geral:** Estudar o gene *EGFR*, *MET*, *MYC* e *AURKA* em carcinomas de pequenas células do pulmão, através do método de M-FISH.  
**Objetivos Específicos:** Correlacionar as alterações encontradas com características clínico-patológicas do carcinoma de pequenas células do pulmão, como: estadiamento, sobrevida, idade dos pacientes.

### III - Sumário do Projeto

**Descrição e caracterização da amostra:** O estudo terá delineamento transversal retrospectivo. Será utilizado material parafinado de neoplasias de pequenas células de pulmão diagnosticados entre 1995 e 2005, provenientes do Laboratório de patologia do Hospital Santa Rita e do Laboratório de Patologia do Hospital Nossa Senhora Conceição.

**Critérios de inclusão:** Será utilizado material parafinado de neoplasias de pequenas células de pulmão diagnosticados entre 1995 e 2005, provenientes do Laboratório de patologia do Hospital Santa Rita e do Laboratório de Patologia do Hospital Nossa Senhora Conceição.

**Critérios de exclusão:** As formas combinadas, onde o componente não pequenas células coexiste em mais de 10% do tumor, serão excluídas do estudo. Também serão excluídos do estudo aqueles casos onde houver material insuficiente no bloco de parafina para realização do teste de FISH.

**Adequação das condições** - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito

### IV - Comentários:

- **Justificativa do uso de placebo** – Não se aplica.
- **Análise de riscos e benefícios** – Não há riscos.
- **Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo** – Não se aplica TCLE.

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCOMPA** Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br  
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde  
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)  
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.  
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.



## Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585  
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68  
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



- **Informação adequada quanto ao financiamento** – Adequado.

- **Outros centros no caso de estudos multicêntricos** – Envolve a ISCMPA e o Hospital Nossa Senhora da Conceição.

**V - Parecer do Relator** — “Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer”.

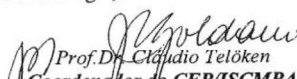
**VI - Data da Reunião:** 04/10/2011.

**“Projeto e Declarações, Aprovados”.**

*Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).*

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 10 de Outubro de 2011.

  
 Prof. Dr. Cláudio Telöken  
 Coordenador do CEP/ISCMPA

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA** Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br  
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde  
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)  
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.  
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

Parecer 392/11



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.  
Av. Francisco Train, 596  
CEP 91350-200 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3357.2000  
CNPJ: 92.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO  
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa  
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.  
Rua Domingos Rubbo, 20  
CEP 91060-000 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3357.4100  
CNPJ: 92.787.128/0001-76

HOSPITAL FÊMINEA S.A.  
Rua Mostardeiro, 17  
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3314.5200  
CNPJ: 92.893.134/0001-53



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em reunião ordinária de 16 de março de 2011, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

**Projeto:** 11-018

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

**Pesquisadores:**

ADRIANA VIAL ROEHE

RITA DE CASSIA ALVES SCHUMACHER

ROSALVA TEREZINHA MEURER

ANTÔNIO ATALIBIO HARTMANN

**Título:** ESTUDO CITOGENÉTICO DOS GENES EGFR,MYC,AURKA E MET EM CARCINOMAS DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO INSITU COM FLUORESCÊNCIA- FISH

Documentação: Aprovados

Aspectos Metodológicos: Aprovados

Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO, neste CEP.


Obs.: Estudo aguardando parecer da CONEP do primeiro centro. O primeiro centro no Brasil responsável pelo envio do estudo para a CONEP é o CEP da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC, bem como os Eventos Adversos ocorridos. O Pesquisador compromete-se a encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e final ao Comitê de ética em Pesquisa do GHC.

Porto Alegre, 16 de março de 2011.

Daniel Demétrio Faustino da Silva  
Coordenador-geral do CEP/GHC

## 5.5 Trabalhos apresentados em Congressos e Jornadas



**XXIX Congresso Brasileiro de Patologia**  
Florianópolis • SC  
13 a 16.11.2013

Certificamos que


MARÇAL, JMB; ALVES, RCS; MEURER, R; ROEHE, AV, participaram do XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, na qualidade de AUTORES do trabalho:


“ESTUDO CITOGENÉTICO DO GENE C-MYC EM CARCINOMAS DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO (SCLC), ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO “IN SITU” CROMOGÊNICA (CISH).” na sessão de PÔSTERES – PATOLOGIA PULMONAR E DO MEDIASTINO.


*Myriam Dumas Hahn*  
Myriam Dumas Hahn  
Presidente da Comissão Científica

*Gianfranco Luigi Colombelli*  
Gianfranco Luigi Colombelli  
Presidente do Congresso

*Carlos Renato Almeida Melo*  
Carlos Renato Almeida Melo  
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia

Realização:  SBB

Apoio:  AMB Associação Médica Brasileira





**XXIX Congresso  
Brasileiro de Patologia**  
Florianópolis • SC  
13 a 16.11.2013

Certificamos que

MARÇAL, JMB; ALVES, RCS; MEURER, R; ROEHE, AV, participaram do XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, na qualidade de AUTORES do trabalho: "CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS E CLÍNICAS DO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO (SCLC), EM BIÓPSIAS ENDOSCÓPICAS E LINFONODOS MEDIASTINAIS, ENTRE 1995 E 2005 NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DO GHC E SANTA CASA DE POA." na sessão de PÔSTERES – PATOLOGIA PULMONAR E DO MEDIASTINO.

*Myriam Dumas Hahn*  
Myriam Dumas Hahn  
Presidente da Comissão Científica

*Gianfranco Lutji Colombeli*  
Gianfranco Lutji Colombeli  
Presidente do Congresso

*Carlos Renato Almeida Melo*  
Carlos Renato Almeida Melo  
Presidente da Sociedade  
Brasileira de Patologia



Realização:



Apoio:



ISSN 2237-3446

Volume 49 - Número 6  
novembro/dezembro 2013

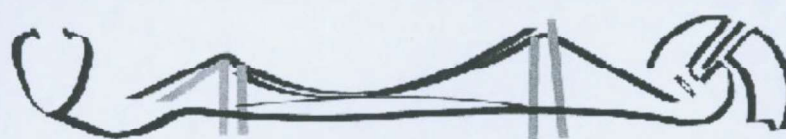
JORNAL BRASILEIRO DE

# PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

BRAZILIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE

Uma publicação conjunta das sociedades: SBPCML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial), SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e SBC (Sociedade Brasileira de Citopatologia)

## SUPLEMENTOS PATOLOGIA



**XXIX Congresso  
Brasileiro de Patologia**  
Florianópolis • SC  
13 a 16.11.2013



193 - ESTUDO CITOGENÉTICO DO GENE C-MYC EM CARCINOMAS DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO (SCLC), ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU" CROMOGÊNICA (CISH).

Autor/ Apresentador	Instituição	Cidade	UF	País
MARÇAL, JMB	UFCSPA e GHC	Porto Alegre	RS	Brasil

Demais Autores	Instituição	Cidade	UF	País
ALVES, RCS	UFCSPA	Porto Alegre	RS	Brasil
MEURER, R	UFCSPA	Porto Alegre	RS	Brasil
ROEHE, AV	UFCSPA	Porto Alegre	RS	Brasil

Área de Conhecimento	Situação
Patologia Pulmonar e do Mediastino	Pôster

Resumo:

Introdução: o SCLC é uma neoplasia agressiva que corresponde a cerca de 10 a 20% dos casos de câncer de pulmão. A ocorrência de amplificação gênica do gene c-myc nestes tumores é observada em linhagens celulares e associada com a progressão mais rápida da doença e menor sobrevida. Objetivos: identificar a presença de amplificação do gene c-myc em SCLC através da técnica de hibridização "in situ" cromogênica em biópsias. Material e métodos: foram estudadas 19 amostras de SCLC, provenientes do Laboratório de Patologia da Santa Casa -UFCSPA e do GHC. A técnica de CISH foi realizada utilizando-se a sonda zytovision: zyto dot-spec cmyc probe, contendo uma sonda polinucleotídica c-myc digoxigênica-ligada. Realizou-se a recuperação antigênica, aplicação de 5 a 10 µl de sonda c-myc, hibridização por 5min a 94°C e incubação a 37°C overnight. A avaliação microscópica foi realizada por dois autores com contagem do número de sinais em 100 núcleos/caso, sem sobreposição. Os resultados foram comparados com dados clínico-patológicos, incluindo sobrevida global. Resultados: A média de idade dos pacientes foi de 56 anos, sendo 36% (n=7) mulheres e 63,15%(n=12) homens. As amostras eram originadas de biópsias endoscópicas em 63,15% (n=12). Quanto ao estadiamento apenas um paciente se encontrava em estágio localizado (5,26%), 52,63%(n=10) apresentavam estágio avançado e em 42,10%(n=8) esta informação não foi encontrada. A sobrevida média dos pacientes foi de 5 meses (n=9). O número de cópias médio foi de 3,18 (n=19). Não houve correlação entre o número de cópias e a sobrevida ou estadiamento dos pacientes. Conclusão: não houve associação estatisticamente significativa entre o número médio de cópias do c-myc, estadiamento e o tempo de sobrevida total dos pacientes, na amostra estudada.

90 - CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS E CLÍNICAS DO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO (SCLC), EM BIÓPSIAS ENDOSCÓPICAS E LINFONODOS MEDIASTINAIS, ENTRE 1995 E 2005 NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DO GHC E SANTA CASA DE POA.

Autor/ Apresentador	Instituição	Cidade	UF	País
MARÇAL, JMB	UFCSPA	Porto Alegre	RS	Brasil

Demais Autores	Instituição	Cidade	UF	País
ALVES, RCS	UFCSPA	Porto Alegre	RS	Brasil
MEURER, R	UFCSPA	Porto Alegre	RN	Brasil
ROEHE, AV	UFCSPA	Porto Alegre	RS	Brasil

Área de Conhecimento	Situação
Patologia Pulmonar e do Mediastino	Pôster

Resumo:

Introdução: o SCLC é uma neoplasia agressiva que corresponde a cerca de 10 a 20% dos casos de câncer de pulmão. O diagnóstico histopatológico é realizado através de biópsias pequenas originadas de broncoscopia e mediastinoscopia. Por se tratar de neoplasia sem benefício com tratamento cirúrgico, estas amostras são as únicas fontes de material para diagnóstico histopatológico e estudos complementares. Objetivos: o objetivo deste estudo é identificar as características microscópicas do SCLC e correlacioná-las com estadiamento e sobrevida dos pacientes. Material e métodos: foram revisados 74 espécimes de SCLC em biópsias endoscópicas e linfonodos mediastinais de pacientes provenientes do Laboratório de Patologia do GHC e do Hospital Santa Rita de Porto Alegre. Os casos foram revisados e avaliados segundo a presença dos seguintes parâmetros: necrose, apoptose, rosetas, glândulas, nucléolo, ulceração, trabéculas, artefatos de esmagamento e efeito Azzopardi. Resultados: a idade média dos pacientes foi de 58 anos, 70,27 % (n=52) do sexo masculino e 29,72% (n=22) do sexo feminino. Quanto ao estadiamento, 58,10% (n=43) dos pacientes apresentavam estágio avançado e a sobrevida média geral foi de 5,4 meses. Entre as características microscópicas observaram-se núcleos pequenos, amoldamento nuclear e alto índice mitótico em 100% dos casos; artefatos de esmagamento e/ou efeito Azzopardi -95,94% (n=71); necrose 43,24% (n=32); nucléolos 24,32% (n=18); paliçada 60,81% (n=45); trabéculas 68,91% (n=51); rosetas 8,10% (n=6); ulceração 4,05% (n=3) e apoptose em 100% dos casos. Conclusão: os achados microscópicos mais frequentes encontrados nas amostras colaboram para o diagnóstico em biópsias de pequenas dimensões. Não houve relação entre os achados microscópicos e a sobrevida dos pacientes.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

## CERTIFICADO

Certificamos que

### **RITA DE CÁSSIA SANT ANNA'ALVES**

participou do evento de extensão "IX JORNADA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFCSPA: "CÂNCER - PERSPECTIVAS EM PESQUISA E APLICAÇÕES CLÍNICAS" E II JORNADA DO SERVIÇO DE GENÉTICA CLÍNICA DA UFCSPA", promovido pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e organizado pelo Programa de Pós-Graduação de Patologia da UFCSPA, na data de 22 de agosto de 2013, na Cidade de Porto Alegre-RS, na qualidade de **APRESENTADOR(A) ORAL DO TRABALHO** intitulado(a) "ESTUDO CITOGENÉTICO DO GENE C-MYC E HER-2 EM CARCINOMAS DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO (SCLC), ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU" CROMOGÊNICA (CISH)" de autoria de: RITA DE CÁSSIA SANT'ANNA ALVES; ROSALVA MEURER; ADRIANA VIAL ROEHE, tendo como orientador(a)(es): ADRIANA VIAL ROEHE.

Porto Alegre, 12 de novembro de 2013.



*Deisi Cristina Gollo Marquês Vidor*  
Deisi Cristina Gollo Marquês Vidor  
Pró-Reitora de Extensão e Assuntos  
Comunitários da UFCSPA



*Giorgio Adriano Paskulin*  
Giorgio Adriano Paskulin  
Coordenador do evento

## 5. Referências dos anexos

Gugger M, Burckhardt E, Kappeler A, Hirsiger H, Laissue J, Mazzucchelli L. Quantitative expansion of structural genomic alterations in the spectrum of neuroendocrine lung carcinomas. *J Pathol.* 2002; 1964: 408-15.

Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ. Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples. *Lab Invest.* 2001; 8111: 1545-51.

Todorović-Raković N. Detection of c-myc Amplification in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumor Tissue by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH). *Methods Mol Biol* 2013;1012: 249-254.