

De Bastiani, M.A.<sup>1,3</sup>; Müller, C.B.<sup>1,2</sup>; de Barros, R.L.S.<sup>1,2</sup>; Castro, M.A.A.<sup>1</sup>; Lopes, F.M.<sup>1,2</sup>; Roehle, A.<sup>3</sup>; Mazzini, G.<sup>1</sup>; Dal-Pizzol, F.<sup>4</sup>; Fernandes, M.C.<sup>3</sup>; Xavier, L.L.<sup>5</sup>; Moreira, J.C.F.<sup>1</sup>; Klamt, F.<sup>1,2</sup>

1-UFRGS, RS; 2-INCT-TM, RS; 3-UFCSPA, RS; 4-UNESC, SC; 5-PUCRS, RS.

## INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é o maior responsável por morte em decorrência de neoplasias malignas no mundo. Cerca de 85% desses casos são do tipo não-pequenas células (CPNPC). Por esse motivo, o desenvolvimento de biomarcadores mostra-se vantajoso para a realização de diagnóstico antecipado, para o prognóstico ou para a terapia farmacológica apropriada. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e otimizar um método imunohistoquímico semi-quantitativo (SQ-IHQ) para a quantificação de cofilina-1 em biópsias de tumor e aplicá-lo em uma coorte retrospectiva de 50 pacientes com CPNPC para avaliar seu potencial prognóstico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de tumor foram submetidas à reação imuno-histoquímica utilizando anticorpo primário policlonal de coelho anti-cofilina-1 (Abcam®). O método SQ-IHQ foi estabelecido utilizando medidas de densitometria óptica (D.O.) (Figura 1) e aplicado à coorte de CPNPC. Os dados clinicopatológicos dos pacientes dos quais as biópsias originaram foram analisados e informações relevantes referentes a um período de 5 anos foram extraídas. Associação entre o imunocônteuído de cofilina-1 e o desfecho clínico foi observada utilizando curvas de mortalidade Kaplan-Meier e "long-rank test". Para avaliar a robustez dos nossos achados, três diferentes estratégias de "clustering" foram realizadas para estratificar os pacientes em dois grupos de acordo com o nível de expressão do biomarcador (clustering hierárquico, Kmean e median cutoff).

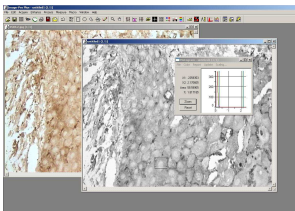


Figura 1. Software de análise de imagens utilizado para quantificação do imunocônteuído de cofilina-1. As imagens são convertidas em escala de cinza e à intensidade da imunoreação são atribuídos valores de D.O..

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados clinicopatológicos dos pacientes estão resumidos na tabela 1. Os valores de D.O. obtidos através do método utilizado evidenciam que tumores apresentam maior conteúdo de cofilina-1 que o tecido normal e que pequenas variações nesses valores de D.O. estão associados com diferentes desfechos dos pacientes (Figura 2).

Tabela 1. Dados Epidemiológicos e Clinicopatológicos de acordo com o Imunocônteuído de Cofilina-1

Características	Imunocônteuído de Cofilina					
	Median cutoff		Kmean		Hierarchical	
	Lower 50	Upper 50	Low	High	Low	High
Coorte, n=50	25 (50%)	25 (50%)	30 (60%)	20 (40%)	35 (70%)	15 (30%)
Idade, anos	61.4 ± 11	63.6 ± 9	61.8 ± 11	65.0 ± 10	62.4 ± 10	63.3 ± 10
Sexo						
Homens	14 (56%)	17 (68%)	17 (57%)	14 (70%)	20 (57%)	11 (73%)
Mulheres	11 (44%)	8 (32%)	13 (43%)	6 (30%)	15 (43%)	4 (27%)
Tipo Histológico						
Adenocarcinoma	11 (44%)	19 (76%)	15 (50%)	15 (75%)	20 (57%)	10 (67%)
Escamoso	12 (48%)	3 (12%)	13 (44%)	2 (10%)	13 (37%)	2 (13%)
Grande Células	1 (4%)	2 (8%)	1 (3%)	2 (10%)	1 (3%)	2 (13%)
Indeterminado	1 (4%)	1 (4%)	1 (3%)	1 (5%)	1 (3%)	1 (7%)
Estadiamento (TNM)						
IA/IB - IIA/IIB	11 (44%)	5 (20%)	13 (44%)	3 (15%)	14 (40%)	2 (13%)
IIIA/IIIB	8 (32%)	3 (12%)	10 (33%)	1 (5%)	10 (28%)	1 (7%)
IV	4 (16%)	16 (64%)	5 (16%)	15 (75%)	8 (23%)	12 (80%)
Indeterminado	2 (8%)	1 (4%)	2 (7%)	1 (5%)	3 (9%)	0 (0%)

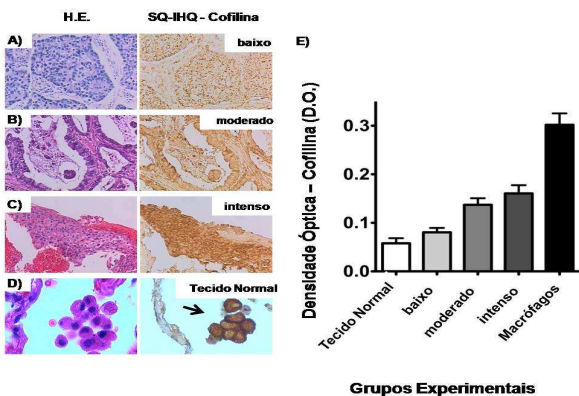


Figura 2. Coloração HE e imunohistoquímica contra cofilina-1 representativas de amostras de CPNPC. As imagens representam casos de (A) baixo, (B) moderado e (C) alto imunocônteuído de cofilina-1 (aumento de 200X). (D) Tecido normal obtido da ressecção das margens das biópsias representa os níveis basais de cofilina-1 e macrófagos foram considerados marcação positiva (seta) (aumento de 1000X). (E) Valores de D.O. observados pelo método SQ-IHQ em cada caso.

Nos três tipos de agrupamento realizados, a análise de sobrevivência mostrou que os pacientes com maior imunocônteuído de cofilina-1 apresentavam menor sobrevida ( $P < 0.05$ ). Dessa maneira, a correlação entre conteúdo de cofilina-1 e sobrevida indicam que os níveis de cofilina-1 conseguem discriminar bom e mau prognóstico (Figuras 3 e 4). Nenhuma outra correlação foi encontrada quando as variáveis idade, sexo ou tipo histológico foram testadas em associação com o desfecho dos pacientes ou com o imunocônteuído de cofilina. Com estes achados, nós garantimos da propriedade intelectual através de depósito de patente no INPI (PI0802917-2 A2), permitindo assim a divulgação dos principais resultados na forma de publicações em revistas científicas internacionais, e possibilitando ainda sua potencial exploração para produção de um método e kit de detecção do biomarcador para uso em serviços hospitalares (Figura 5).

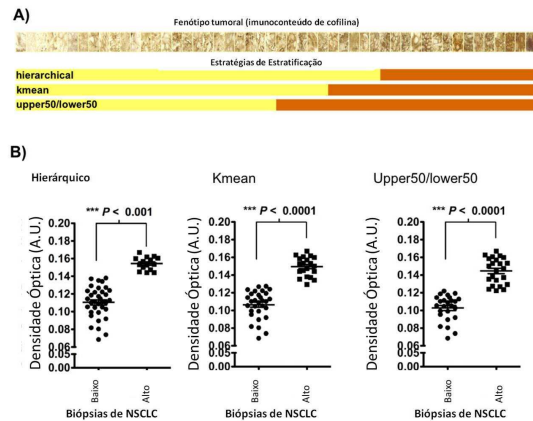


Figura 3. Estratégias de "Clustering". (A) Tumores alinhados utilizando clustering hierárquico; Kmean (realizado com o algoritmo de Hartigan-Wong); e upper50/lower50 median cutoff. (B) Dados originais analisados de acordo com os agrupamentos.

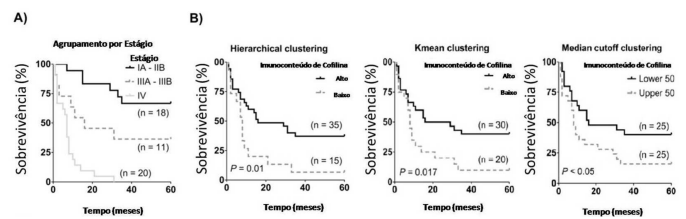


Figura 4. Curvas de mortalidade Kaplan-Meier utilizadas para avaliar a performance discriminativa de bom e mau prognóstico dos pacientes com CPNPC. Essas curvas mostram a sobrevida dos pacientes após cinco anos. A sobrevida cumulativa também foi observada de acordo com o sistema de estadiamento TNM (A). Pacientes foram agrupados de acordo com o conteúdo de cofilina-1 pelas três diferentes abordagens: hierárquica, Kmeans e median cutoff (B).

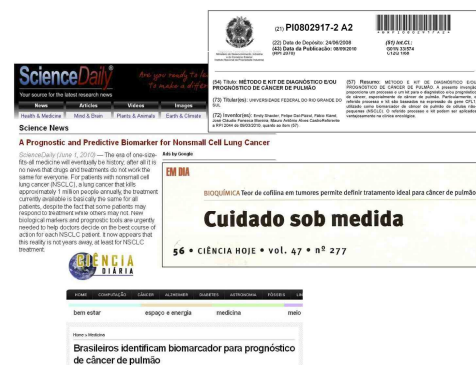


Figura 5. Impacto do Biomarcador na mídia nacional e internacional. Após o depósito no INPI e garantia da propriedade intelectual, os principais achados foram primeiramente publicados em revistas científicas internacionais (ex.: *Cancer, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*) e amplamente divulgados em diversos meios de comunicação (impressos e em sites virtuais).

## CONCLUSÃO

Nosso método mostrou boa sensibilidade/especificidade para indicar o desfecho dos pacientes de acordo com seu imunocônteuído de cofilina. Sua aplicação em uma coorte retrospectiva e os resultados apresentados são um passo importante no processo de validação da cofilina-1 como um biomarcador prognóstico para CPNPC.