

DÉBORA CRISTINA BATISTA ROSOLEN

**Avaliação citogenética molecular de células do líquido pleural de
pacientes com derrame pleural maligno**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Pneumologia

Orientadora: Profa Dra Leila Antonangelo

São Paulo

2014

ROSOLEN, D. C. B. Avaliação citogenética molecular de células do líquido pleural de pacientes com derrame pleural maligno. Tese apresentada á Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Cláudio e Leocil, como
uma pequena retribuição à base sólida
que tenho e à educação que me
proporcionaram.*

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho:

Inicialmente **a Deus**, por sempre guiar a minha vida.

À **Profa. Dra Leila Antonangelo**, pelo incentivo e cobrança, por acreditar em mim e mostrar o caminho da ciência e ser exemplo de profissional.

À **Dra Leslie Kulikowski** pela atenção e colaboração no esclarecimento de dúvidas relacionadas ao estudo e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Francisco S. Vargas** pela confiança, por acreditar no futuro deste trabalho, por contribuir para o meu crescimento profissional e ser um exemplo a ser seguido.

À **Profa. Dra Lisete R. Teixeira** por sua amizade e carinho nos momentos mais difíceis e por fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins.

Ao grupo de Pleura, **Dr Evaldo Marchi, Dra Roberta Sales, Dr Roberto Onishi, Dra Milena Acencio, Prof, Dr Ricardo Terra e biólogos Carlos e Vanessa**, pela valiosa contribuição, convívio e aprendizado.

Aos **Professores Mário Terra Filho e Rogério de Souza** em especial e à Pós Graduação da Pneumologia, pelos ensinamentos e experiência adquirida.

Aos meus amigos da Seção de Genética, obrigada pelo carinho, amizade e ajuda. **Giorgio Bottura e Ana Rosa Dutra** meu eterno agradecimento, vocês participaram em todas as fases deste trabalho, ajudando em todos os momentos.

Aos amigos do Serviço de Hematologia, DLC HCFMUSP, em especial, **Dr Marcos Munhoz, Leila Borracha, Regina Mingroni, Marisa Bilci, Patrícia Oliveira** que sempre estiveram ao meu lado dando força e apoio.

À Seção de Citologia, **César Moreira, Antonieta Lamanna, Tânia Cabral, Liliane Ribeiro e Dr Ernesto Terreri** por me ajudarem, estando sempre à disposição para sanar as dúvidas relacionadas aos exames citológicos.

À Seção de Citometria de Fluxo - DLC HCFMUSP, **Dra Mirtes Sales e equipe**, pelo acolhimento e a ajuda técnica durante as análises de citometria.

Às amigas, **Annelise Lopes, Alines** (Corá, Veludo e Nasseh), **Flávia Paes, Roberta Marquesini e Raquel Righini** que muito me ajudaram, incentivando e compreendendo a minha ausência em várias situações.

À querida **Meire Martins** que me adotou como filha desde o começo da minha vida profissional, sempre me aconselhando, dando força e me fazendo acreditar que tudo é possível.

À minha família pela torcida, orações, paciência e apoio incondicional.

À direção do Laboratório Central, **Prof.Dr. Alberto Duarte, Dr. Marcelo Faulhaber e Anderson Bedin** pela compreensão, incentivo, amizade e torcida.

Ao ex-aluno de iniciação científica, **Amom Mendes** pelo auxílio com a coleta de dados.

Expresso também a minha gratidão e solidariedade aos **pacientes**, que prestaram contribuição fundamental o desenvolvimento do estudo.

À **Universidade de São Paulo (USP)** pela infraestrutura acadêmica e laboratorial.

Ao **CNPq** e à **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo Da Vinci

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	2
1.1 Derrame Pleural Neoplásico.....	4
1.1.2 Análise citológica	5
1.1.3 Análise das populações poliplóides por Citometria de Fluxo	6
1.1.4 Identificação de alterações citogenéticas e gênicas.....	7
2. Objetivos	12
3. Casuística e Métodos	14
3.1 Casuística	14
3.2 Critérios de Inclusão.....	14
3.3 Coleta e preparação das amostras.....	14
3.4 Exame Citológico	15
3.5 Avaliação da ploidia de DNA por Citometria de Fluxo.....	16
3.6 Técnica de Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	18
3.7 Técnica de amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA).....	37
3.7.1 Extração de DNA	20
3.7.2 Protocolo MLPA.....	20
3.8 Análise Estatística	21
4. Resultados	39
4.1 Resultados obtidos pelo Exame Citológico.....	24
4.2 Resultados obtidos pela ploidia de DNA.....	25
4.3 Resultados obtidos pela técnica de FISH	27
4.4 Resultados obtidos pela técnica de amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA) para o gene EGFR.....	50
5. Discussão	38
6. Conclusões	63
Referências	64
Anexo	77
Apêndice	65

LISTA DE ABREVIATURAS

VEGF:	Fator de crescimento do endotélio vascular
VATS:	Videotorascoscopia
DPM:	Derrame pleural maligno
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
FISH:	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
MLPA:	Amplificação multiplex por sondas ligação - dependentes
Array-CGH:	Hibridação genômica comparativa
PCR:	Reação de polimerase em cadeia
CF:	Citometria de fluxo
ID:	Índices de DNA
mm:	Milímetro
µL:	Microlitro
S:	Sensibilidade
E:	Especificidade
VPP:	Valor preditivo positivo
VPN:	Valor preditivo negativo
Cr:	Cromossomo
DP:	Desvio padrão
Crt:	Controle

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diagnóstico etiológico dos derrames pleurais	23
Tabela 2. Resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do exame citológico no diagnóstico de DPM	24
Tabela 3. Resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da ploidia de DNA por citometria de fluxo no diagnóstico de DPM	27
Tabela 4. Valores de corte obtidos para classificação dos derrames pleurais de acordo com a sonda utilizada (Cr 11 ou Cr 17)	27
Tabela 5. Comparação do número de células aneuploides (média \pm DP), em casos de derrame pleural com citologia positiva, negativa ou suspeita	30
Tabela 6. Número de células aneuploides (média \pm DP) em amostras de líquido pleural utilizando sonda de FISH para o cromossomo 11	31
Tabela 7. Número de células aneuploides (média \pm DP) em amostras de líquido pleural utilizando sonda de FISH para o cromossomo 17	32
Tabela 8. Resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da técnica de FISH no diagnóstico de DPM	33
Tabela 9. Resultado da sensibilidade, especificidade e acurácia das técnicas de Citologia, ploidia de DNA e FISH no diagnóstico de DPM, isoladas ou em combinação	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das amostras de líquido pleural para análise pelas diferentes metodologias	15
Figura 2. A) Histograma representando população celular com conteúdo de DNA euploide (conteúdo normal); Figura B) Histograma representando população celular com conteúdo de DNA aneuploide (conteúdo anormal)	17
Figura 3. A) LP com citologia positiva; B) LP com citologia negativa e C: LP com citologia suspeita	24
Figura 4. A1: Histograma de população aneuploide por citometria de fluxo em caso de derrame pleural benigno; A2: Agrupamento de macrófagos e células mesoteliais em caso de citologia negativa	25
Figura 4. B1: Histograma de população aneuploide por citometria de fluxo em caso de DPM; B2: Agrupamento de células tumorais em caso de citologia positiva	26
Figura 5. Representação dos resultados de índices de DNA obtidos por citometria de fluxo nas amostras de líquido pleural dos casos neoplásicos e não neoplásicos	26
Figura 6. A) Agrupamento de macrófagos e células mesoteliais em caso de derrame pleural benigno e B) Célula em interfase com conteúdo euploide (2n) para o cromossomo 11 e o 17 pela técnica de FISH.....	28
Figura 7. A) Agrupamento de células tumorais em caso de derrame pleural maligno e B) células aneuploides para o cromossomo 11 e 17 pela técnica de FISH.....	29
Figura 8. Resultados de MLPA nos casos de derrame pleural maligno de acordo com o sitio primário da neoplasia.....	34
Figura 9. Histograma do resultado de MLPA em um caso de derrame pleural benigno.....	35
Figura 10. Histograma do resultado de MLPA em um caso de derrame pleural maligno.....	35

RESUMO

Rosolen DCB. **Avaliação citogenética molecular de células do líquido pleural de pacientes com derrame pleural maligno.** [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução O diagnóstico de derrame pleural maligno (DPM) se baseia no achado de células tumorais no líquido ou no tecido pleural. Resultados falsos positivos ou falsos negativos influenciam na escolha da melhor conduta terapêutica a ser tomada, além de alterar substancialmente o prognóstico desses pacientes. A sensibilidade do exame citológico é geralmente inferior a 70%, motivo pelo qual, métodos complementares são frequentemente associados. Fatores como tipo histológico, sítio primário e grau de invasibilidade do tumor são os principais responsáveis por esta variação. Dentre os exames complementares propostos, destacam-se a dosagem de marcadores tumorais no líquido pleural (LP), as técnicas citoquímicas, imunocitoquímicas e de marcadores de proliferação celular em células do LP, a análise da ploidia de DNA por citometria de fluxo (CF) ou estática (CE) e, mais recentemente, as técnicas de citogenética e de biologia molecular, como a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e a técnica de amplificação multiplex por sondas ligação - dependentes (MLPA) estas, capazes de detectar alterações em regiões gênicas consideradas “alvo” para o desfecho neoplásico. **Objetivos** 1) Padronizar as técnicas de DNA ploidia, FISH e MLPA em amostras frescas de líquido pleural; 2) Testar a eficiência diagnóstica dos métodos da DNA ploidia e da FISH no diagnóstico de derrame pleural maligno e 3) Avaliar alterações no número de cópias no gene *EGFR* em metástases pleurais utilizando a técnica de MLPA. **Métodos** Foram incluídos 200 pacientes adultos portadores de derrame pleural (DP) com indicação de toracocentese. O diagnóstico histológico foi o padrão ouro para malignidade. Características clínicas, radiológicas, histológicas e de seguimento clínico foram considerados para a exclusão de malignidade, de maneira que 130 casos foram classificados como malignos e 70 como benignos. As 200 amostras de LP foram submetidas ao exame citológico e à FISH utilizando sondas centroméricas para os cromossomos 11 e 17. A análise da ploidia de DNA por CF foi realizada em 45 casos de DP e a MLPA com o kit do gene do receptor do fator de

crescimento epidérmico (*EGFR*) em 50 casos. **Resultados** A análise da ploidia de DNA por CF apresentou sensibilidade inferior ao exame citológico, com especificidade próxima (57,0%vs 96,2%; 70,0% vs 66,7%, respectivamente). A FISH isoladamente apresentou sensibilidade de 98,5% e especificidade de 98,6% e de 98,0% e 99,% quando associada ao exame citológico, com apenas um caso falso positivo e dois casos falsos negativos. A técnica de MLPA, padronizada para LP, demonstrou alterações na sequência do gene do *EGFR* em 28,2% dos casos malignos. Nenhuma amostra de líquido pleural dos casos benignos (controle) apresentou alteração no número de cópias e/ou rearranjos estruturais. **Conclusão** A análise citogenética de amostras frescas de líquido pleural por FISH é um valioso complemento ao exame citológico no diagnóstico de derrame pleural maligno, particularmente nos casos em que o resultado da citologia oncótica é inconclusiva.

Descritores: Derrame pleural maligno, citologia, ploidia de DNA, hibridação *in situ* por fluorescência, amplificação multiplex por sondas ligação - dependentes

ABSTRACT

Rosolen DCB. **Molecular cytogenetic evaluation of pleural fluid cells in patients with malignant pleural effusion.** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction The diagnosis of malignant pleural effusion (MPE) is based on the finding of tumor cells in the pleural fluid or tissue. False positive or false negative results influence the choice of the best therapeutic approach to be used with these patients and substantially change their prognosis. The sensitivity of the cytology is generally lesser than 70%, for which complementary methods are often associated. Factors such as tumor histological type, staging, primary site and potential of invasiveness are responsible for this variation. Among the proposed ancillary tests, we highlight the dosage of tumor markers in pleural fluid (PF), the cytochemical and immunocytochemical techniques, including markers of cell proliferation, DNA ploidy analysis by flow cytometry (FC) or static cytometry (EC) and more recently, the cytogenetics and molecular techniques, as the fluorescence in situ hybridization (FISH) and the multiplex ligation - dependent probe amplification (MLPA), capable of detecting changes in gene regions considered "target" for the neoplastic outcome.

Objectives 1) To standardize the techniques of DNA ploidy, FISH and MLPA in fresh samples of pleural fluid; 2) To test the diagnosis efficiency of DNA ploidy and FISH in the diagnosis of malignant pleural effusion and 3) To evaluate changes in the copy number of the *EGFR* gene by using the MLPA technique in cases of pleural metastases. **Methods** We included 200 adult patients with pleural effusion and clinical indication for thoracentesis. The histological diagnosis was considered the gold standard for malignancy. Clinical follow-up, radiological and histological characteristics were considered for exclusion of malignancy, which ranked de cases as 130 malignant effusions and 70 as benign ones. All cases were submitted to cytology and FISH using centromeric probes for the chromosomes 11 and 17. Analysis of DNA ploidy by FC was performed in 45 cases and the MLPA for epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene in 50 cases. **Results** DNA ploidy analysis showed less sensitivity than PF cytology, with similar specificity (57.0% vs

96.2% and 70.0% vs 66.7%, respectively). FISH alone had a sensitivity of 98.5% and specificity of 98.6%, and of 98.0% and 99% when associated with cytology. Only one false positive and two false negative cases were observed. The MLPA technique, standardized for PF, showed changes in the *EGFR* gene in 28.2% of the malignant cases. No samples of pleural fluid from benign cases (control) showed changes in copy number and/or structural rearrangements. **Conclusion** The cytogenetic analysis of fresh pleural fluid samples by FISH seems to be a valuable method to be associated to cytology in the diagnosis of malignant pleural effusion, particularly in cases of inconclusive cytological results.

Descriptors: Malignant pleural effusion, cytology, DNA ploidy, fluorescence in situ hybridization, multiplex ligation - dependent probe amplification.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O desenvolvimento neoplásico deriva de alterações nos processos de proliferação e diferenciação celular e na habilidade das células neoplásicas em invadir tecidos adjacentes e/ou vasos sendo relativamente comum, durante a progressão, o envolvimento das membranas serosas^{1,2}. Quando as células neoplásicas sobrevivem à resposta imunológica e atingem outros órgãos podem induzir a proliferação vascular (neoangiogênese) resultando em colônias metastáticas à distância³.

Considerando-se a baixa frequência de mutações nas células normais e as numerosas mutações detectadas nas neoplasias, postula-se que as células cancerosas exibem um fenótipo modificado, resultado das mutações nos genes relacionados à manutenção da estabilidade genômica⁴.

Várias evidências indicam que o desenvolvimento e a progressão tumoral resultam de um processo complexo que envolve múltiplas etapas, culminado com a transformação neoplásica. O desenvolvimento tumoral pode ser compreendido como resultado da combinação de seis alterações essenciais na fisiologia celular: 1) autossuficiência nos sinais de crescimento; 2) insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento; 3) evasão da morte celular programada; 4) ilimitado potencial replicativo; 5) exarcebação e manutenção da angiogênese e 6) invasão tissular e metástase⁵.

A capacidade metastática das células neoplásicas envolve alterações entre diferentes moléculas; é um processo lento e progressivo, também conhecido como cascata metastática⁶. Neste processo, o primeiro passo é o desprendimento das células do tumor primário, seguido da dissociação intercelular como consequência das alterações nas moléculas de adesão. A seguir, ocorre a invasão do tecido hospedeiro local, provavelmente pela interação entre a célula tumoral e a matriz extracelular, mediada por glicoproteínas específicas. O terceiro passo da cascata metastática é a disseminação vascular. Após a invasão da matriz, as células malignas invadem as paredes vasculares e entram na circulação. O quarto passo é escapar da resposta imune do hospedeiro e a outros fatores físicos no interior da circulação sistêmica. Ao encontrarem um local propício, as células cancerosas extravasadas crescem em resposta a fatores de crescimento autócrinos⁷.

Em síntese, a célula tumoral passaria pelos seguintes passos da cascata no processo de metastáse: parada em leito capilar de órgão distante; extravasamento do leito capilar para o interstício, invasão e indução local de angiogênese com consequente multiplicação no sítio da metástase⁶.

O processo metastático é o evento final das neoplasias malignas, podendo ocorrer, desde que existam condições adequadas, em qualquer tecido ou órgão do corpo. É relativamente comum a infiltração tumoral das cavidades serosas, principalmente da cavidade pleural, levando à formação de derrame pleural.

Do ponto de vista fisiopatológico, o desenvolvimento do derrame pleural maligno estaria relacionado com a invasão de células tumorais nos pequenos capilares do tecido submesotelial, seguido de extravasamento e migração das células para a matriz extracelular da pleura visceral, com posterior implantação na pleura parietal. Ademais, algumas substâncias produzidas pelas células neoplásicas parecem ser capazes de induzir danos funcionais e estruturais nas células mesoteliais, rompendo a barreira pleural, com extravasamento celular para o interior da cavidade. A produção de citocinas pelas células tumorais, particularmente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), também favorece a formação de derrames^{6,8,9}.

Outros mecanismos relacionados incluem a invasão direta da membrana pleural pela neoplasia, como observado nas neoplasias primárias de pulmão, parede torácica e mama, a disseminação hematogênica para a pleura parietal e a disseminação linfática^{10,11}.

Maskell *et al.* (2003)¹², em uma série de casos de necrópsia observou acometimento da pleura visceral em 87% dos casos de tumores metastáticos, enquanto que a pleura parietal estava comprometida em apenas 47% dos casos.

Neste contexto, derrame pleural é uma complicação relativamente frequente em pacientes com câncer e geralmente representa o primeiro sinal de doença metastática para a pleura.

Quando o derrame é volumoso, com repercussão clínica, ou para esclarecimento diagnóstico, há indicação de se realizar a toracocentese, com a finalidade de aliviar os sintomas e obter amostra de líquido pleural para realização de exames laboratoriais, úteis para o diagnóstico etiológico e fundamentais para a escolha da melhor opção terapêutica para o paciente.

1.1 Derrame Pleural Neoplásico

Estima-se que a incidência de derrame pleural neoplásica seja de 45%, superando os de etiologia infecciosa e mesmo os transudatos de causa cardíaca¹³. Estatísticas norte-americanas reportam como superior a um milhão, o número de novos casos de derrame pleural/ano e destes, cerca de 200.000 estão associados à doença maligna. A maioria das neoplasias pode cursar com derrame pleural durante sua evolução¹⁴.

Panadero *et al.* (1989)¹⁵ em uma série post-mortem observaram a presença de derrame pleural em 15% dos pacientes que tinham diagnóstico prévio de doença neoplásica. Outros autores relatam incidência que varia de 42 a 77%¹⁶.

A presença de células tumorais no líquido ou no tecido pleural classifica o derrame como maligno. Resultados falsos positivos ou falsos negativos influenciam na escolha da conduta terapêutica a ser tomada com estes pacientes, além de alterar substancialmente a avaliação prognóstica dos mesmos.

A biópsia dirigida por videotoracoscopia (VATS) representa o padrão ouro para a demonstração do comprometimento neoplásico da pleura. Entretanto, este procedimento nem sempre é factível, principalmente se considerarmos as condições clínicas da maioria dos pacientes com doença avançada, além do alto custo do procedimento^{17,18,19}.

Em aproximadamente 30% dos casos de derrames malignos o surgimento do derrame pleural é a primeira manifestação do tumor e em 10 a 15% das vezes, mesmo após exaustiva procura, não é possível se determinar o sítio primário do tumor¹³.

Neste contexto, é evidente a importância do diagnóstico precoce de derrame pleural maligno.

O exame citológico e os demais exames complementares passíveis de serem realizados no líquido pleural, representam a primeira abordagem para o diagnóstico etiológico do derrame.

Dentre os exames complementares sugeridos, destacam-se a dosagem de marcadores tumorais^{20,21}, as técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas e os marcadores de proliferação celular^{22,23,24}, a análise da ploidia de DNA por citometria de fluxo ou estática²⁵ e mais recentemente, as técnicas de citogenética e de biologia molecular, como por exemplo, a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)²⁶ e a técnica de amplificação multiplex por sondas ligação - dependentes (MLPA), capazes de detectar alterações em regiões gênicas consideradas “alvo” para o desfecho neoplásico^{27,28}.

1.1.2 Análise citológica

O exame citológico do líquido pleural, parte do arsenal diagnóstico de derrames serosos há várias décadas^{29,30}, é a primeira abordagem para o diagnóstico de DPM. Inicialmente, a citologia do líquido pleural referia-se, basicamente, à pesquisa de células neoplásicas na amostra. Com o passar do tempo, surgiram trabalhos propondo a sistematização da análise do líquido pleural, particularmente no que se refere às técnicas de preparação e coloração utilizadas^{21,31,32} e assim, começou a se delinear na literatura, uma terminologia de sensibilidade, especificidade e eficiência diagnóstica desse exame no diagnóstico de DPM. Simultaneamente, surgiram trabalhos avaliando seu desempenho quando comparado à biópsia pleural por agulha^{33,34}.

É consenso na literatura, a superioridade da citologia à biópsia de pleura parietal no diagnóstico das metástases pleurais. Cibas *et al.* (2009)³⁵, relatam sensibilidade de 71% e 45%, respectivamente, presumivelmente pela maior representatividade celular que o líquido fornece. Segundo os autores, a taxa de

detecção de células tumorais à citologia, pode ser aumentada de 2 a 38 % quando várias amostras são examinadas.

Fatores como tipo histológico do tumor, estadiamento, sítio primário da neoplasia e a experiência do citologista são os principais responsáveis por esta variação, enquanto que para a biópsia de pleura, a menor sensibilidade estaria associada ao estágio da doença e ao grau de invasibilidade pleural^{36,37}.

1.1.3 Análise das populações poliplóides por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a medida simultânea de múltiplas características de uma única célula. Essas medidas são feitas com células em suspensão, sendo que as propriedades físicas analisadas incluem o tamanho e a complexidade da célula, além dos componentes moleculares expressos na membrana e/ou citoplasma celular^{38,39,40}.

Os componentes da técnica incluem anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos que emitem fluorescência por um feixe de luz, geralmente laser, permitindo a avaliação de um grande número de células em um curto período de tempo. Nesse método, os núcleos celulares provenientes de tecidos ou fluidos corporais são impregnados com um corante fluorescente que se liga ao DNA. A análise por citometria de fluxo possibilita que sejam definidas as várias fases do ciclo celular. A aneuploidia é avaliada a partir do conteúdo de DNA das células “alvo” nas fases G0/G1 do ciclo celular em relação ao conteúdo de DNA das células normais, diplóides. A população aneuplóide é representada graficamente por histograma que se diferencia do histograma normal, diplóide, obtido a partir de células controles utilizadas simultaneamente na análise.

A ploidia de DNA é considerada uma técnica complementar ao exame citológico na diferenciação entre derrames benignos e malignos, uma vez que permite a avaliação quantitativa do conteúdo de DNA intracelular, geralmente anormal em células tumorais^{25,41}. Entretanto, como esta técnica pressupõe a análise de células em suspensão, é indispensável que a amostra apresente uma boa representação celular

e que as células estejam íntegras e viáveis, condição nem sempre obtida com amostras frescas de líquido pleural, principalmente pelo tempo transcorrido entre a toracocentese e a preparação da amostra para a leitura no citômetro.

1.1.4 Identificação de alterações citogenéticas e gênicas

A instabilidade cromossômica é uma característica comum das células neoplásicas, envolvendo mecanismos como os rearranjos numéricos e estruturais e a instabilidade telomérica e de reparo de DNA, entre outras. Considerando-se que a instabilidade cromossômica é uma das principais causas de resistência de tumores a certos tratamentos quimioterápicos, o entendimento dos mecanismos que levam a essa instabilidade é de grande relevância clínica⁴². Estima-se que desequilíbrios no número de cromossomos seja a alteração genética mais comumente observada em tumores sólidos⁴³, principalmente por envolverem regiões de oncogenes e genes supressores de tumor⁴⁴.

Como os rearranjos numéricos são consistentemente observados nas células tumorais, vários autores trabalham com a hipótese de que as aneuploidias são frequentemente causadas por um tipo particular de instabilidade genética, chamada instabilidade cromossômica, a qual pode refletir defeitos na segregação mitótica⁴⁵.

Um princípio fundamental na compreensão da gênese de tumores é que o câncer surge a partir de aquisições sequenciais de alterações cromossômicas em genes específicos⁴⁴. Estas alterações (mutações e ampliações) ocorrem em células individuais e cada mudança atinge uma onda de expansão clonal, sendo necessárias de 6 a 10 eventos clonais para se atingir a maturação neoplásica. Ao contrário das células normais, que contém um número regular de 46 cromossomos, as células neoplásicas frequentemente apresentam um número maior de cromossomos, cerca de 60 a 90, podendo diferir em número e estrutura em células de um mesmo tumor⁴⁶.

- **Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)**

No final dos anos 80, a introdução da hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) como uma técnica capaz de detectar trissomias e translocações em células em metáfase e núcleos interfásicos utilizando bibliotecas de DNA específicas de cromossomos inteiros, foi uma revolução na análise citogenética⁴⁷. A FISH funde os métodos da citogenética convencional com as tecnologias moleculares⁴⁸. É uma técnica bastante empregada em diagnóstico oncológico e detecta a presença de células com anormalidades cromossômicas numéricas e/ou estruturais e alterações gênicas em regiões consideradas “alvo” para o desfecho neoplásico, podendo ser realizada em amostras teciduais ou em outras amostras biológicas, como o líquido pleural^{28,49,50,51,52}.

A FISH é essencialmente baseada no princípio da análise de *Southern blot*, que explora a capacidade do DNA de cadeia simples de hibridar com seu DNA complementar, com a particularidade que seu alvo é o DNA nuclear de células em interfase ou em metáfase, fixadas em lâmina de microscópio. Uma vez fixadas à lâmina e após desnaturação, as células são submetidas à hibridação com uma sonda de ácido nucléico. A sonda hibridiza na sequência complementar de DNA e pode ser marcada com fluorocromo específico, com detecção direta em microscopia de fluorescência ou, através de hapteno, com detecção indireta⁵³. Considerando-se que a maioria dos derrames malignos resulta de metástases pleurais de tumores de diversos sítios primários, nos últimos anos, vários estudos têm avaliado isoladamente, ou em combinação, sondas de hibridização *in situ* que detectem, com maior sensibilidade, a presença de células aneuplóides no líquido pleural, condição comumente associada com malignidade^{49,51}.

Na revisão da literatura, os cromossomos 11 e 17 constam da maioria dos painéis que avaliam a presença de células aneuplóides em amostras de líquidos cavitários^{26,50,55}, por conterem genes associados com o desenvolvimento de neoplasias, como por exemplo o *HRAS*, *MMP1*, *MMP12*, *p53*, *Her2*, *ERBB2*, *BRCA1*, *STAT3* e *AKAP10*, entre outros.

As mutações menores, como as microdeleções e as microduplicações, também podem ser investigadas por FISH. Entretanto, técnicas como a amplificação multiplex por sondas ligação-dependentes (MLPA) ou a array-CGH (hibridação genômica comparativa) podem ser mais sensíveis para detectar essas alterações. Atualmente, todas estas metodologias são reconhecidamente capazes de detectar anormalidades cromossômicas e gênicas em linhagens tumorais presentes no líquido pleural⁴⁹.

- **Técnica multiplex de amplificação de sondas ligação- dependentes (MLPA)**

A amplificação multiplex por sondas ligação - dependentes (MLPA) é uma ferramenta molecular semi-quantitativa inicialmente desenvolvida por Schouten *et al.*⁵⁶ em 2002 que tem como base, uma reação de polimerase em cadeia (PCR) múltipla. Esta técnica molecular utiliza simultaneamente mais de 40 sondas específicas para sequências diferentes de DNA (principalmente exons de genes específicos de interesse), permitindo a avaliação do número de cópias relativo a cada sequência de DNA. Cada sonda de MLPA se constitui de duas sondas de oligonucleotídeos individuais (oligonucleotídeos 5' e 3'), cada uma com uma sequência específica do DNA alvo (sequência de hibridação) e uma sequência *primer* universal. De maneira similar, uma ou ambas as sondas de oligonucleotídeos contém uma sequência *stuffer*, que é responsável durante a eletroforese, pela diferença de tamanho entre as sondas e, como consequência, pelo tamanho do produto de amplificação⁵⁷. A vantagem desta técnica é a utilização de pequena quantidade de DNA e, com somente um par de *primers*, ser capaz de detectar um número anormal de sequências do DNA genômico e mutações de ponto. Os produtos gerados pela PCR são separados por eletroforese capilar adaptada a um sequenciador automatizado e analisados através de *softwares* específicos. Até 96 amostras podem ser analisadas simultaneamente e os resultados podem ser obtidos em 24-48 horas.

Em síntese, o exame citológico do líquido pleural associado à análise citogenética molecular pode ser um importante recurso diagnóstico no reconhecimento dos derrames pleurais malignos, auxiliando os oncologistas na decisão da melhor conduta terapêutica, além de estimar, com maior precisão, o prognóstico desses pacientes.

No presente estudo avaliaremos métodos complementares ao exame citológico convencional no diagnóstico de derrame pleural maligno, incorporando técnicas que permitam identificar populações celulares aneuploides (citometria de fluxo e FISH) e a técnica de MLPA que reconhece, em um único experimento, alterações no número de cópias de genes envolvidos em neoplasias.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Em amostras frescas de líquido pleural:

- Padronizar a técnica de FISH, de DNA ploidia e de amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA);
- Testar a eficiência diagnóstica dos métodos de FISH e de DNA ploidia no diagnóstico de derrame pleural maligno;
- Avaliar alterações no número de cópias gênicas no gene do *EGFR* em metástases pleurais utilizando o método de amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA);

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística

Um total de 200 pacientes adultos portadores de derrame pleural foi incluído no estudo. Os pacientes eram provenientes dos ambulatórios de Pneumologia e de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa – CAPPesq (protocolo SDC no 998/05) e fez parte do Projeto Temático intitulado “Incursoão Clínica e Experimental na Cavidade Pleural” – FAPESP (protocolo nº2005/55599-8).

Todos os pacientes ou responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que constava de exposição clara dos procedimentos, ressaltando a possibilidade de abandono da participação no protocolo por iniciativa do paciente, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento.

O trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Pneumologia e no Laboratório Clínico, ambos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes portadores de derrame pleural com indicação clínica de toracocentese para alívio da dispnéia e/ou com finalidade diagnóstica.

3.3 Coleta e preparação das amostras

As amostras de líquido pleural (cerca de 60 mL) foram acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Com uma alíquota das amostras foi realizado o exame citológico convencional (citologia quantitativa, qualitativa e citologia oncológica); as demais alíquotas foram utilizadas para o estudo da ploidia de DNA, citogenética molecular (FISH) e extração de DNA para a técnica de MLPA. O fluxograma das amostras está representado na figura 1.

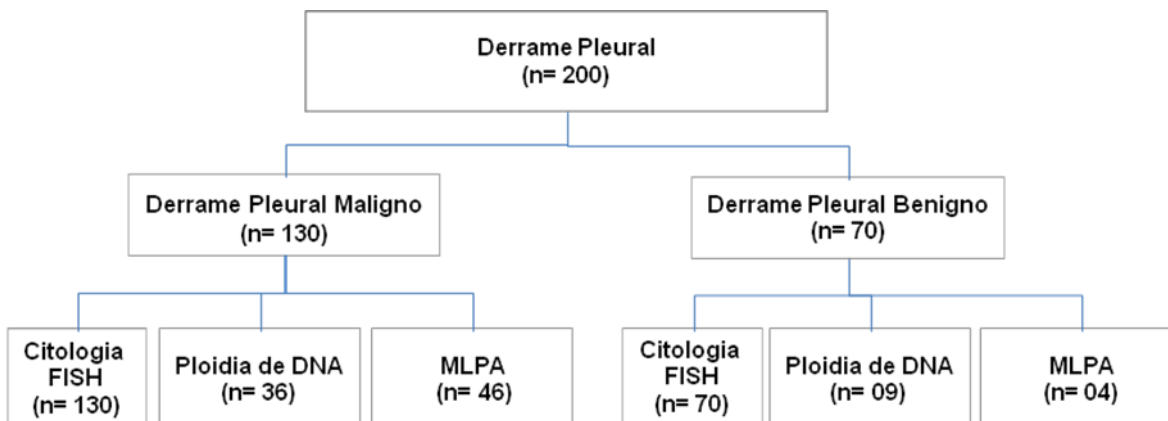


Figura 1- Fluxograma das amostras de líquido pleural para análise pelas diferentes metodologias.

3.4 Exame Citológico

A análise citológica iniciou-se com a contagem total de células nucleadas do líquido pleural em câmara de Neubauer, sendo os cálculos realizados de acordo com as diluições utilizadas:

$$\text{Células mm}^3 = \text{células/mm}^2 \times \text{profundidade da câmara} \times \text{diluição da amostra}$$

Depois de realizada a contagem global de células nucleadas, as amostras foram citocentrifugadas a 2000+/- 200 rpm por 10 minutos para preparação das lâminas. As lâminas, secas ao ar, foram coradas com o corante hematológico de Leishman. Em todos os casos foi realizado exame citológico quantitativo (% de diferencial de leucócitos; % de células mesoteliais e % de macrófagos) e citologia oncótica.

Os casos foram revisados por dois médicos patologistas (LA e ETN) que finalizavam a interpretação quantitativa do exame e realizavam a citologia oncótica.

Com base nos resultados da citologia oncótica, as amostras foram classificadas em três categorias: positiva, negativa e suspeita para malignidade.

3.5 Avaliação da ploidia de DNA por Citometria de Fluxo

Com alíquotas de pelo menos 10 mL de líquido pleural foi realizada a avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (CF) utilizando o *CycleTest™ Plus DNA Reagent*, seguindo as orientações do fabricante (BectonDickinson® Mississauga, Ontário, CA).

Linfócitos do sangue periférico foram utilizados como padrão normal do conteúdo de DNA (padrão 2n). Para a obtenção dos linfócitos, adicionamos 2 mL de sangue a 2 mL de tampão PBS (tampão fosfato-salino) em tubo falcon. Após homogeneização, adicionou-se 3 mL de ficol a este conteúdo e a amostra foi centrifugada a 2.300 rpm por trinta minutos com desaceleração lenta para favorecer o isolamento dos linfócitos.

O preparo do líquido pleural seguiu o seguinte protocolo: inicialmente o líquido foi centrifugado a 2.000 rpm por dez minutos, com suspensão de células em tampão citrato (citrato de sódio, sacarose e dimetilsulfóxido). Para cada amostra, três tubos foram preparados: 1) tubo com padrão interno contendo $0,5 \times 10^6$ de linfócitos do sangue periférico; 2) tubo com a suspensão de células do líquido pleural ($0,5 \times 10^6$) em tampão citrato acrescida de $0,25 \times 10^6$ de linfócitos normais do sangue periférico e 3) tubo com $0,5 \times 10^6$ células de líquido pleural. Os tubos foram incubados com tampão contendo tripsina e espermina, seguidos de incubação com inibidor da tripsina e ribonuclease A e posteriormente, com iodeto de propídio.

As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo B-D FacsScanCalibur (BectonDickinson® San Jose, CA) e analisadas com os programas *Cell Fit* e *Multicycle AV* (BectonDickinson® San Jose, CA).

Os histogramas obtidos demonstram as populações celulares analisadas, diferenciando as euploides (conteúdo normal de DNA), das aneuploides (conteúdo anormal de DNA) pela presença de mais de um pico no histograma e pela relação com o índice de DNA, este último representado pela fórmula:

$$\text{Índice de DNA} = \frac{\text{taxa de G0/G1 da população celular examinada}}{\text{taxa de G0/G1 da população diplóide de referência}}$$

Os índices de DNA (ID) obtidos foram avaliados de acordo com os valores definidos em literatura (Rosin *et al.*, 1994)⁵⁸ como se segue:

DNA diploides:	ID: 0,95 -1,05
DNA tetraploides:	ID: 1,90 -2,10
DNA aneuploides:	ID dos valores acima:
- quase-diploides:	- hipodiploides: ID < 0,95
	- hiperdiploides: ID: entre 1,05 – 1,90
	- hipertetraploides: ID > 2,10

Como exemplo de interpretação, a Figuras 2 A e B representam histogramas de populações celulares euploides e aneuploides, respectivamente.

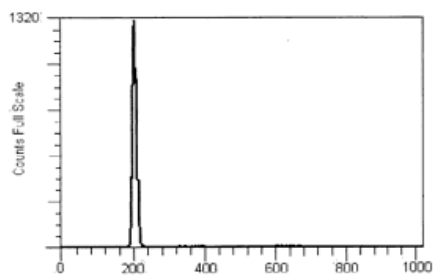


Figura A

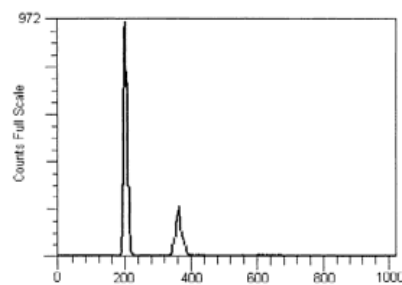


Figura B

Figura 2. A) Histograma representando população celular com conteúdo de DNA euploide (conteúdo normal); Figura B) Histograma representando população celular com conteúdo de DNA aneuploide (conteúdo anormal).

3.6 Técnica de Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH)

A FISH consiste em marcar os cromossomos com fluorescência através de sondas de DNA (ácido desoxirribonucléico) específicas para os cromossomos em estudo. Com o auxílio de um microscópio de fluorescência podemos identificar, através de sinais de fluorescência, o número de cópias para um determinado cromossomo.

Para a técnica de FISH, 20 mL de líquido pleural foram transferidos para tubo falcon e centrifugados a 1400 rpm por 5 minutos. O sedimento foi fixado em solução de Carnoy fresco (metanol: ácido acético, 3:1) para a preparação das lâminas, que foram mantidas à temperatura ambiente até a análise.

As lâminas já fixadas foram colocadas em solução 2xSSC (solução salina citratada) por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a desidratação com uma série de álcool etanol (Merck®) 70%, 85% e 100%, com secagem à temperatura ambiente.

Para a hibridação, foram utilizadas sondas centroméricas para o cromossomo 11 (α -satellite spectrum red, Aquarius Probes® Cytocell, UK) e para o cromossomo 17 (α -satellite spectrum green, Aquarius Probes® Cytocell, UK), de acordo com as instruções do fabricante com modificações adaptadas, principalmente de temperatura e tempo, de maneira a aperfeiçoar a padronização da técnica. Considerando-se uma área de hibridação de 22 x 22 mm, foram utilizados 1,5 μ L de sonda *Green*, 1,5 μ L de sonda *Red* e 2 μ L de solução de hibridação (componentes do kit) em lâminas preaquecidas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, aplicou-se 5 μ L da sonda na lâmina, vedou-se com parafilme e iniciou-se a desnaturação por aquecimento a 75°C por 2 minutos. Para a hibridação, a lâmina foi incubada a 37°C “*overnight*” dentro de um recipiente úmido.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução de 0,4xSSC (solução salina citratada) a 72°C por 2 minutos e em 2xSSC (solução salina citratada) com 0,05% Tween 20 à temperatura ambiente por 30 segundos. A seguir, aplicamos 5 μ L do corante DAPI (Aquarius Probes® Cytocell, UK) para contra coloração, recobrimos

com lâminas de vidro e as lâminas estavam prontas para serem observadas ao microscópio de fluorescência.

As imagens digitais com os resultados das hibridações foram analisadas usando o microscópio Olympus BX41 equipado com lâmpada de 100 W, epiiluminação e jogo de filtros fluoresceína - iodeto de propídio FITC-PI, BP 450-490, FI 510 e BP 520 (Cat.#487709) e pelo sistema CytovisionApplied® (San Jose, CA, EUA). Apenas células que apresentassem sinais claramente distinguíveis na microscopia de fluorescência foram computadas, condição fundamental para se estabelecer valores de corte discriminantes para a classificação dos derrames pleurais como malignos ou benignos. As imagens foram armazenadas para análise posterior.

Para cada amostra, um total de 200 células em interfase foi analisado e células com sinais de monossomia ou polissomia (consideradas aneuplóides) foram computadas. Como o mesotélio reativo benigno pode ser tetraplóide (4n), as células com estas características foram excluídas da análise, seguindo critério estabelecido por Flores-Staino *et al.* (2010)²⁸. Dois observadores independentes (DR e GB) examinaram as lâminas e os resultados foram reportados como a média dos observadores.

Ressaltamos que para se classificar um caso como aneuplóide, é necessário que cada laboratório estabeleça o valor de corte para as sondas utilizadas e para as alterações genéticas investigadas. Desta maneira, foram considerados positivos, os derrames pleurais cujo número de células aneuplóides foi superior ao valor de corte estabelecido e negativo, quando o número de células aneuplóides foi inferior a este valor. Para se estabelecer o valor de corte foram analisados os sinais diplóides (normais) e não diplóides (anormais) emitidos pelas células presentes no líquido pleural de pacientes reconhecidamente não portadores de neoplasia. Utilizamos o teste estatístico da função β inversa (probabilidade em decimal), sendo $\alpha = 1 +$ o maior número de sinais positivos obtidos na leitura entre os observadores e $\beta =$ número de células analisadas⁵⁹.

A análise foi realizada utilizando-se o programa Microsoft Office Excel (Redmond, Washington, EUA).

3.7 Técnica de amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA)

3.7.1 Extração de DNA

O DNA do líquido pleural foi extraído utilizando-se o *kit* de extração *GentraPuregene* (Qiagen-Sciences, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e concentração de DNA genômico obtidos foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Technologies, Wilmington, DE, USA).

3.7.2 Protocolo MLPA

Neste estudo, utilizamos o kit de MLPA que avalia amplificações e deleções do gene *EGFR* - receptor do fator de crescimento epidérmico (P315- MRC- Holland, Amsterdam, The Netherlands), que é um receptor de tirosina quinase localizado no cromossomo 7p11.2 e que está envolvido com o controle de crescimento celular. As reações foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos pelo fabricante, com adaptações para o tipo de amostra biológica.

Aproximadamente 250 ng de DNA genômico (5 μ L) acondicionado em microtubo foi levado ao termociclador (Veriti®ThermalCycler – Life Technologies, GrandIsland, NY, USA) para denaturação a 98°C por 15 minutos. Em seguida, uma mistura das sondas (específicas para cada kit) e solução tamponada foi adicionada ao DNA denaturado para a hibridação das sondas de MLPA (60°C por 3 horas).

Sem retirar os tubos do termociclador, soluções tamponadas juntamente com a enzima ligase foram adicionadas à solução de hibridação para a ligação das sondas em cada região alvo específica (54°C por 15 minutos). Na última etapa, em temperatura ambiente (devido à *Taq* Polimerase ser termoestável), os reagentes para a reação de PCR foram adicionados à solução de ligação para a amplificação somente dos fragmentos que foram unidos pela ligase.

Por se tratar de um teste citogenômico comparativo, em toda reação utilizou-se pelo menos três controles normais, ou seja, os controles utilizados correspondiam a casos de derrame pleural benigno.

Os dados gerados pelo sequenciador automático ABI3500 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) foram analisados utilizando-se o Software GeneMarker® (Softgenetics, LLC, StateCollege, PA – www.softgenetics.com). Os resultados são considerados alterados quando no histograma, o tamanho do pico da amostra analisada foi menor do que 0,75 (deleção) ou maior do que 1,25 (duplicação) quando comparados aos de amostras normais.

O resultado final da análise gera um gráfico com os valores limites para normalidade e uma tabela do número de cópias genômicas para o grupo de sondas utilizado no kit específico.

3.8 Análise Estatística

Para a avaliação de concordância entre os observadores utilizou-se o teste Kappa de Cohen⁶⁰.

Os resultados obtidos com os diferentes métodos são apresentados de forma descritiva, utilizando-se média e desvio padrão. A partir de tabela contingência foram calculadas sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivos e negativos para os métodos realizados.

4. RESULTADOS

4. Resultados

Foram estudados 200 casos consecutivos de derrame pleural. Destes, 130 (65%) casos correspondiam a derrame pleural de etiologia neoplásica e 70 (35%) a derrames pleurais não neoplásicos. A etiologia dos derrames pleurais está apresentada na tabela 1.

Dos pacientes com derrame pleural neoplásico, 72 (55,4%) pertenciam ao sexo feminino e 58 (44,6%) pertenciam ao sexo masculino. Entre os pacientes com derrame pleural benigno, o sexo masculino foi predominante em 46 (65,7%), enquanto o sexo feminino prevaleceu em 24 (34,3%) dos casos.

Tabela1. Diagnóstico etiológico dos derrames pleurais incluídos no estudo.

Derrame Pleural Neoplásico	n= 130 (65%)
Mama	39 (30,0%)
Pulmão	36 (27,7%)
Cólon	15 (11,5%)
Neoplasias Hematológicas (07 linfomas e 02 leucemias)	09 (7,0%)
Ovário	05 (3,8%)
Sítio primário indefinido	14 (10,7%)
Outros	13 (10,0%)
Derrame Pleural Não Neoplásico	n= 70 (35%)
Tuberculose	27 (38,5%)
Pneumonia	15 (21,4%)
Insuficiência Cardíaca	13 (18,6%)
Empiema	06 (8,6%)
Indeterminado	04 (5,7%)
Insuficiência Renal	03 (4,3%)
Insuficiência Hepática	02 (2,8%)

4.1 Resultados obtidos pelo Exame Citológico

O exame citológico com citologia oncológica, realizado nas 200 amostras de líquido pleural, classificou os derrames em três categorias: citologia positiva (82/41,0%); negativa (51/25,5%) e citologia suspeita (67/33,5%). As figuras abaixo exemplificam os casos de acordo com a classificação citológica (Figuras 3 A, B e C).

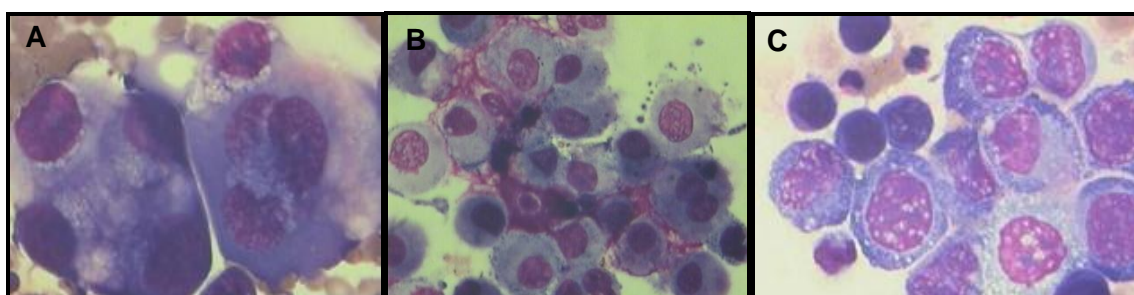


Figura 3. A: LP com citologia positiva; B: LP com citologia negativa e C: LP com citologia suspeita.

Os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do exame citológico no diagnóstico de derrame pleural maligno estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do exame citológico no diagnóstico de DPM.

Citológico	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
	96,2%	66,7%	84,5%	90,2%	86,0%

S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

4.2 Resultados obtidos pela ploidia de DNA

A análise da ploidia de DNA foi realizada em 45 amostras de líquido pleural provenientes de 36 (80%) pacientes portadores de neoplasia, sendo: pulmão (12/33,3%), mama (11/30,5%), cólon (3/8,3%), sítio primário indefinido (3/8,3%), ovário (2/5,6%), linfoma (1/2,8%), outros sítios (4/11,2%) e de 9 (20%) portadores de derrames pleurais benignos, sendo: derrame parapneumônico (4/44,4%), empiema (1/11,1%), insuficiência cardíaca congestiva (2/22,2%), derrame indeterminado (1/11,1%) e tuberculose (1/11,1%).

Estas 45 amostras fazem parte das 200 amostras avaliadas pela citologia e pela FISH. As figuras abaixo exemplificam os resultados da ploidia de DNA em caso de derrame pleural benigno (figura 4 A1 e A2) e derrame pleural maligno (figura 4B1 e 4B2).

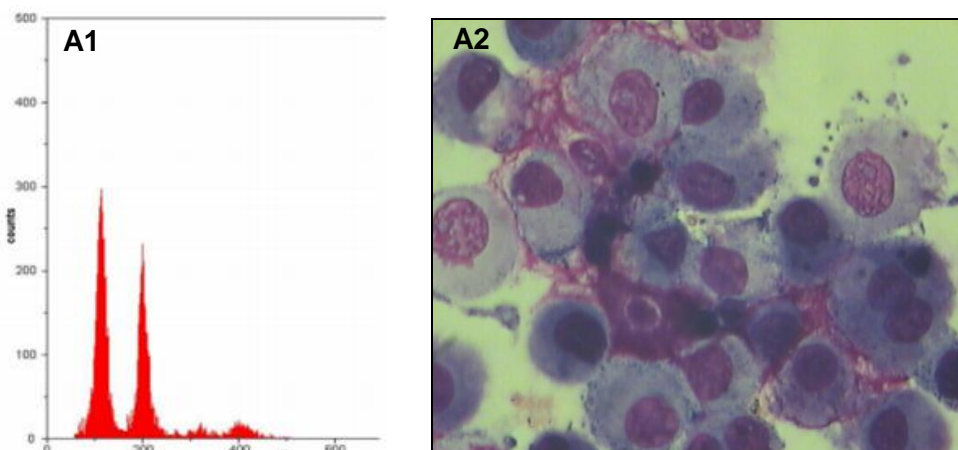


Figura 4. A1: Histograma de população aneuploide por citometria de fluxo em caso de derrame pleural benigno; A2: Agrupamento de macrófagos e células mesoteliais em caso de citologia negativa (Leishman, 1000x).

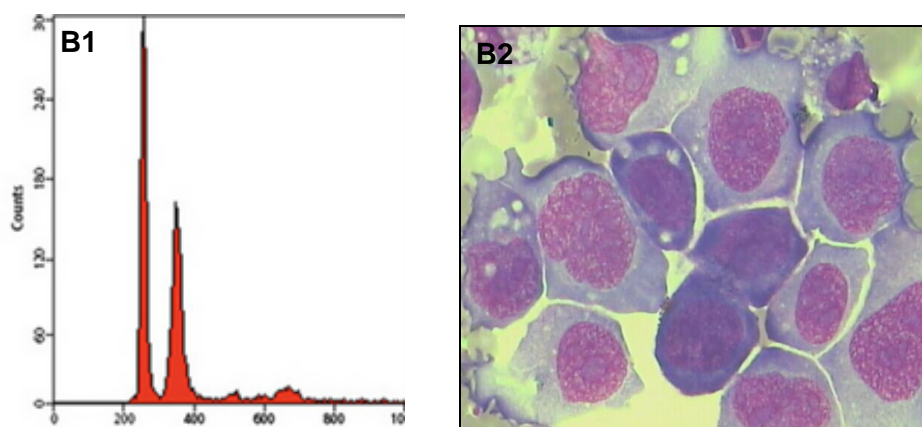


Figura 4 B1: Histograma de população aneuploide por citometria de fluxo em caso de DPM; B2: Agrupamento de células tumorais em caso de citologia positiva (Leishman, 1000x).

A partir dos índices de DNA obtidos, os casos de derrames pleurais malignos e benignos foram classificados como euploides ou aneuploides, conforme demonstrado na figura abaixo.

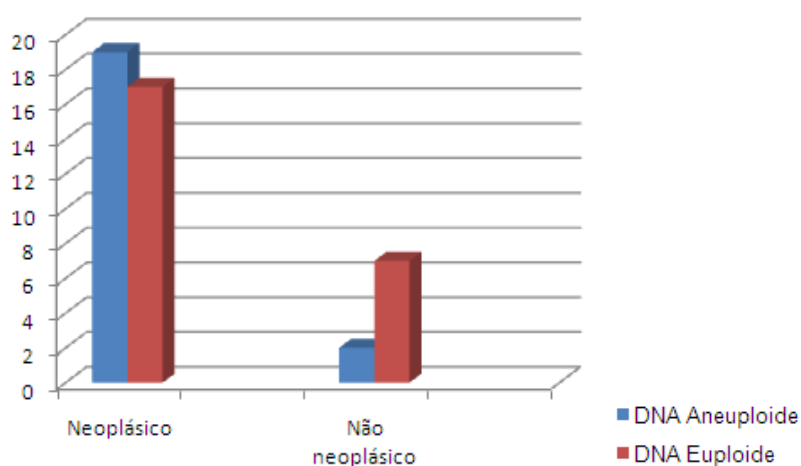


Figura 5. Representação dos resultados de índices de DNA obtidos por citometria de fluxo nas amostras de líquido pleural dos casos neoplásicos e não neoplásicos.

Considerando-se os diagnósticos definitivos dos derrames pleurais, calculou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da técnica de DNA ploidia por citometria de fluxo (tabela 3).

Tabela 3: Resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da ploidia de DNA por citometria de fluxo no diagnóstico de DPM.

Método	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
Ploidia de DNA	57,0%	70,0%	87,0%	32,0%	60,0%

S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

4.3 Resultados obtidos pela técnica de FISH

A técnica de FISH foi realizada nas 200 amostras de líquido pleural. Utilizando-se o critério estabelecido por Wolff *et al.*, 2007⁵⁹, os valores de corte obtidos para a classificação dos casos como malignos, isoladamente para o cromossomo 11 e 17 estão demonstrados na tabela 4.

O coeficiente kappa entre os observadores (DCBR e GB) foi de 0,86.

Tabela 4- Valores de corte obtidos para classificação dos derrames pleurais de acordo com a sonda utilizada (Cr 11 ou Cr 17).

Sinais de fluorescência	Cr 11 (%)	Cr 17 (%)
1	7,9	7,9
3	8,5	5,7
5	3,1	2,3

Na figura 6 (A e B) exemplificamos um caso de derrame pleural com agrupamento de células sem características de malignidade ao exame citológico (caso de transudato secundário à insuficiência cardíaca congestiva- ICC) cujas células apresentam conteúdo normal de DNA (euploide) à técnica de FISH.

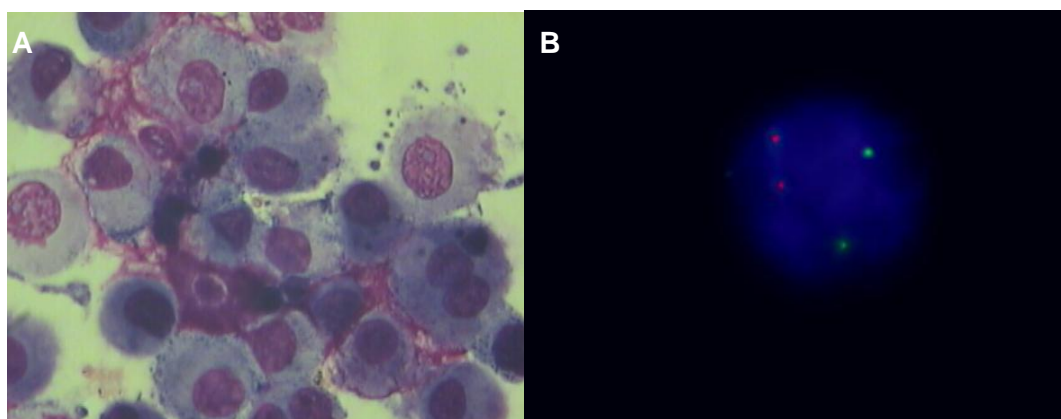


Figura 6. A) Agrupamento de macrófagos e células mesoteliais em caso de derrame pleural benigno (Leishman, 1000x) e B) Célula em interfase com conteúdo euploide ($2n$) para o cromossomo 11 (vermelho) e o 17 (verde) pela técnica de FISH (microscopia de fluorescência, 1000x).

Na figura 7 (A e B) demonstramos um caso de derrame pleural maligno com citologia positiva e FISH com células aneuploides para os cromossomos 11 e 17.

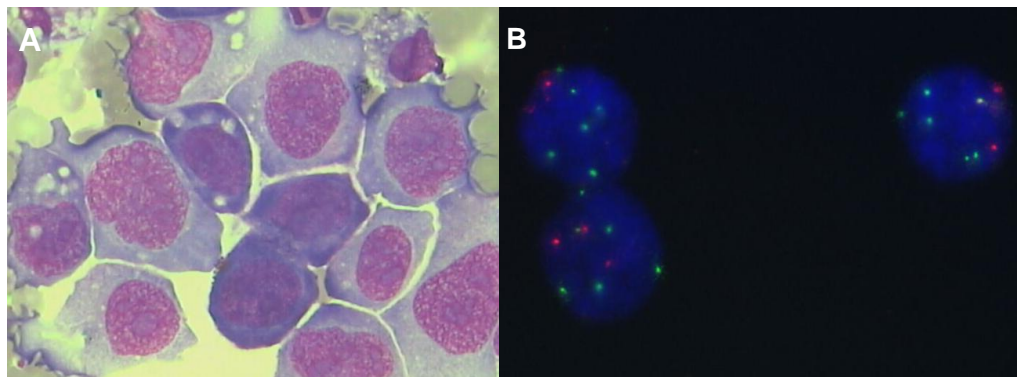


Figura 7. A) Agrupamento de células tumorais em caso de derrame pleural maligno (Leishman, 1000x) e B) células aneuploides para o cromossomo 11 (vermelho) e 17 (verde) pela técnica de FISH (microscopia de fluorescência, 1000x).

De acordo com o exame citológico, 82 (41,0%) amostras de líquido pleural apresentaram citologia positiva para células tumorais; 51 (25,5%) foram classificadas como benignas e 67 (33,5%) apresentaram citologia suspeita para malignidade. As avaliações histológicas e radiológicas associadas ao seguimento clínico dos pacientes confirmaram os 82 casos de derrame pleural maligno. A FISH foi positiva nos 82 casos. Dos 51 casos com citologia negativa, três (5,9%) apresentaram resultado positivo para malignidade na biópsia pleural dirigida por videotoracoscopia (dois casos correspondiam à metástase pleural de tumor de mama e um de tumor renal). Nos três casos foi possível demonstrar a presença de células aneuploides pela técnica de FISH. Dos 67 casos com citologia suspeita, portanto inconclusiva, 43 (64,2%) tiveram diagnóstico de malignidade confirmado através da histologia e da técnica de FISH; 23 casos (34,3%) não apresentaram evidência histológica, radiológica, clínica ou genética de malignidade e um caso (1,5%) que correspondia a um derrame parapneumônico com intensa reatividade de células mesoteliais apresentou FISH positiva, porém sem evidência clínica de malignidade no seguimento clínico do paciente.

Embora tenham sido observadas células aneuploides em casos de derrames pleurais benignos, o número de células foi inferior ao valor de corte previamente estabelecido. A tabela 5 mostra o número de células aneuploides (média e desvio padrão) para ambas as sondas analisadas em todos os casos de derrame pleural. As tabelas 6 e 7 demonstram o número de células aneuploides (média e desvio padrão) para cada sonda utilizada. Interessante ressaltar que não observamos diferenças significativas no número de células aneuploides nos casos de derrame pleural maligno, independentemente do resultado da citologia (positiva, negativa ou suspeita).

Tabela 5. Comparação do número de células aneuploides (média \pm DP), em casos de derrame pleural com citologia positiva, negativa ou suspeita.

Células Aneuploides (%)	Citologia (n = 200)		
	Positivo (n = 82)	Negativo (n = 51)	Suspeito (n = 67)
FISH Positivo			
Câncer	61,3 \pm 9,7 (n = 82)	62,0 \pm 5,7 (n = 3)	57,2 \pm 10,6 (n = 43)
Benigno	-----	-----	33,2 \pm 0,0 (n = 1)
FISH Negativo			
Câncer	-----	7,5 \pm 3,5 (n = 2)	-----
Benigno	-----	5,9 \pm 2,9 (n = 46)	10,9 \pm 9,1 (n = 23)

Tabela 6. Número de células aneuploides (média \pm DP) em amostras de líquido pleural utilizando sonda de FISH para o cromossomo 11.

Cromossomo 11 (%)	Sinais	Citologia (n=200)		
		Positivo	Negativo	Suspeito
FISH Positivo				
Câncer	1	15,7 \pm 7,9	9,3 \pm 4,9	14,7 \pm 7,0
	3	26,6 \pm 9,1	(n=82) 18,8 \pm 6,6	(n=3) 26,8 \pm 7,7
	5	3,3 \pm 4,5	1,0 \pm 0,9	2,9 \pm 4,1
Benigno	1	-----	-----	3,5 \pm 0,0
	3	-----	(n=0) -----	(n=0) 8,5 \pm 0,0
	5	-----	-----	4,0 \pm 0,0
FISH Negativo				
Câncer	1	-----	1,2 \pm 0,3	-----
	3	-----	(n=0) 3,0 \pm 0,7	(n=2) -----
	5	-----	2,0 \pm 0,7	-----
Benigno	1	-----	1,9 \pm 1,3	2,1 \pm 1,1
	3	-----	(n=0) 1,7 \pm 1,6	(n=46) 2,5 \pm 1,9
	5	-----	0,0 \pm 0,3	0,7 \pm 1,2

Tabela 7. Número de células aneuploides (média \pm DP) em amostras de líquido pleural utilizando sonda de FISH para o cromossomo 17.

Cromossomo 17 (%)	Sinais	Citologia (n=200)		
		Positivo	Negativo	Suspeito
FISH Positivo				
Câncer	1	16,3 \pm 11,6	13,2 \pm 2,3	17,7 \pm 11,6
	3	18,5 \pm 9,3 (n=82)	16,2 \pm 1,2 (n=3)	19,4 \pm 10,1 (n=43)
	5	1,9 \pm 3,4	6,5 \pm 5,2	2,9 \pm 4,6
Benigno	1	-----	-----	4,5 \pm 0,0
	3	----- (n=0)	----- (n=0)	5,0 \pm 0,0 (n=1)
	5	-----	-----	1,5 \pm 2,0
FISH Negativo				
Câncer	1	-----	1,5 \pm 0,7	-----
	3	----- (n=0)	0,0 \pm 0,0 (n=2)	----- (n=0)
	5	-----	0,0 \pm 0,0	-----
Benigno	1	-----	2,4 \pm 1,5	2,5 \pm 0,8
	3	----- (n=0)	1,0 \pm 1,2 (n=46)	2,1 \pm 2,1 (n=23)
	5	-----	0,0 \pm 0,3	0,3 \pm 0,5

A partir dos resultados obtidos, os casos foram classificados como euploides ou aneuploides e considerando-se os diagnósticos definitivos (derrame pleurais benignos ou malignos), calculou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia diagnóstica da técnica de FISH (tabela 8).

Tabela 8. Resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da técnica de FISH no diagnóstico de DPM.

Método	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
FISH	98,5%	98,6%	99,2%	98,6%	98,5 %

S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

4.4 Resultados obtidos pela técnica de amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA) para o gene do *EGFR*

A técnica de MLPA foi realizada em 50 amostras de líquido pleural, 46 provenientes de pacientes com câncer: pulmão (19), mama (15), cólon (6) e sítio primário indefinido (6). Os derrames pleurais benignos, utilizados como controle negativo, correspondiam a quatro casos de tuberculose pleural. Estas amostras fazem parte das 200 amostras avaliadas por citologia e pela técnica de FISH.

Nos derrames pleurais malignos, alterações na sequência do *EGFR* foram observadas em 13 casos (28,2%). Em 19 casos (41,3%) foram detectadas cópias anômalas nas sondas dos controles internos da reação. As amostras de líquido pleural dos casos de tuberculose (controle normal) não apresentaram número de cópias amplificado e/ou rearranjo do gene estrutural.

A figura 8 representa os resultados de MLPA nos casos de derrame pleural maligno de acordo com o sítio primário da neoplasia.

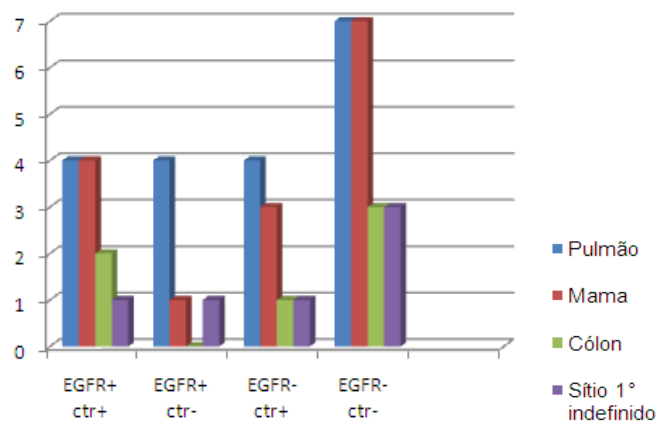


Figura 8. Resultados de MLPA para o gene do *EGFR* nos casos derrame pleural maligno de acordo com o sitio primário das neoplasias.

As figuras 9 e 10 exemplificam resultados de MLPA em caso de derrame pleural benigno e maligno, respectivamente. Notar que no caso de derrame pleural benigno, os picos de amplificação do controle e do caso teste são semelhantes e dispostos na faixa considerada normal. No caso maligno, observamos 2 picos com alteração de conteúdo genético.

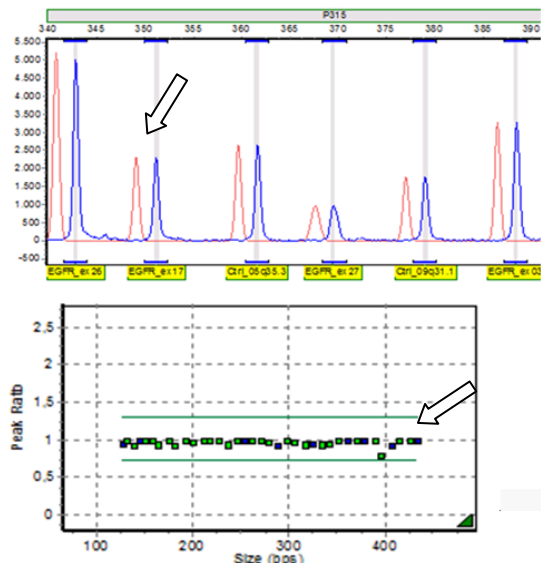


Figura 9. Histograma do resultado de MLPA em um caso de derrame pleural benigno.

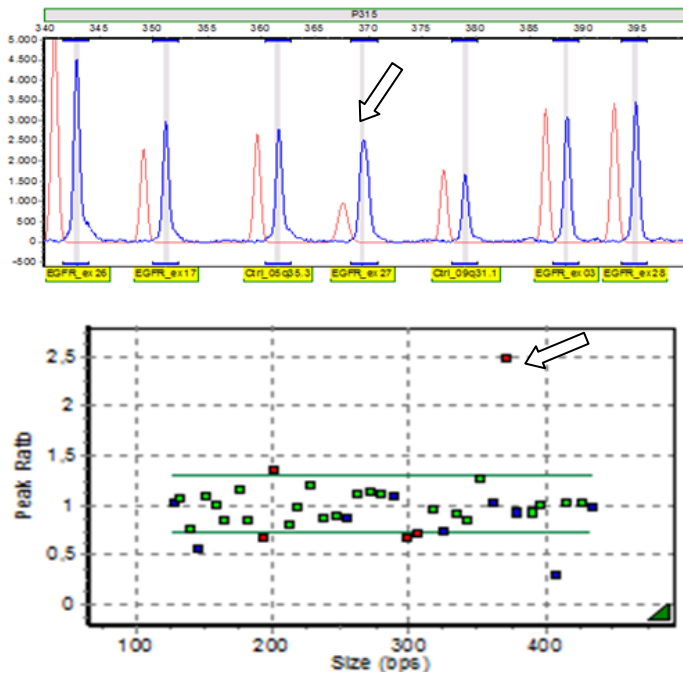


Figura 10. Histograma do resultado de MLPA em um caso de derrame pleural maligno.

A tabela 9 resume os achados de sensibilidade, especificidade e acurácia das técnicas de Citologia, ploidia de DNA e FISH no diagnóstico de DPM, isoladas ou em combinação.

Tabela 9: Resultado da sensibilidade, especificidade e acurácia das técnicas de Citologia, ploidia de DNA e FISH no diagnóstico de DPM, isoladas ou em combinação.

Método	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
Citologia	96,2%	66,7%	84,5%	90,2%	86,0%
Ploidia de DNA	57,0%	70,0%	87,0%	32,0%	60,0%
Citologia + ploidia DNA	81,0%	75,0%	94,0%	46,0%	80,0%
Citologia + FISH	98,0%	99,0%	99,0%	97,0%	98,0%

Os resultados obtidos com a técnica de MLPA não constam da tabela, uma vez que esta técnica foi padronizada em amostras frescas de líquido pleural utilizando sondas para o gene *EGFR* e não tinha o propósito diagnóstico.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

A incidência estimada de derrame pleural maligno é de 45%, superando os de etiologia infecciosa e mesmo os transudatos de causa cardíaca¹³. Estatísticas norte-americanas reportam como superior a um milhão, o número de novos casos de derrame pleural/ano e destes, cerca de 200.000 estão associados à doença maligna, uma vez que a maioria das neoplasias pode cursar com derrame durante sua evolução^{14,15,16}.

A toracocentese é a primeira e a menos invasiva abordagem diagnóstica destes pacientes e o líquido pleural obtido representa importante potencial como amostra biológica para o diagnóstico etiológico do derrame, particularmente quando consideramos a realização do exame citológico com citologia oncótica em laboratórios clínicos, que têm prazos encurtados para a liberação de resultados.

Entretanto, o diagnóstico citológico de derrame pleural maligno é frequentemente desafiador, particularmente pela dificuldade na diferenciação entre a célula tumoral e a célula mesotelial benigna hiperreativa, além de fatores relacionados com o tipo histológico do tumor primário e sua capacidade esfoliativa para a cavidade pleural, as técnicas de preparação utilizadas na realização do exame citológico e a experiência do observador.

A maioria dos pacientes com derrame pleural maligno apresenta doença avançada com importante comprometimento sistêmico, de maneira que a possibilidade de se estabelecer o diagnóstico de câncer em amostra de líquido pleural é de grande valor na prática clínica, pois evita submeter estes pacientes a procedimentos diagnósticos mais invasivos, como a videotoracoscopia.

No presente estudo, avaliamos e padronizamos, em amostras de líquido pleural, o desempenho da citologia convencional isolada ou combinada com métodos complementares no diagnóstico de derrame pleural maligno. Associamos a avaliação da ploidia de DNA por citometria de fluxo e a técnica de FISH com sondas econômicas para os cromossomos 11 e 17, cromossomos estes, envolvidos com progressão e invasão tumoral^{26,49,53,54}. A técnica de MLPA foi realizada a partir da sequência do gene do *EGFR*, intuindo-se que sua padronização em amostra de líquido pleural seria relevante, uma vez que estão sendo desenvolvidas sondas

multiplex com amplo espectro de genes relacionados á progressão tumoral e que podem, no futuro, serem utilizadas como marcadores diagnósticos.

Nas 200 amostras analisadas, a citologia do líquido pleural foi positiva em 82 casos (41,0%), negativa em 51 (25,5%) e suspeita de malignidade em 67 (33,5%). Considerando-se o diagnóstico histológico, radiológico e de seguimento clínico como padrões ouro para o diagnóstico de malignidade e o resultado positivo ou suspeito para células malignas como citologia positiva, a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do exame citológico foi de 96,2%, 66,7%, 84,5%, 90,2% e de 86,0%, respectivamente. Para a ploidia de DNA obtivemos, respectivamente, os seguintes valores: 57,0%; 70,0%; 87,0%; 32,0% e 60,0% e para a FISH, de 98,5%, 98,6%, 99,2%, 98,6% e 98,5%. A combinação de métodos, especialmente da citologia com a FISH, melhora substancialmente a especificidade diagnóstica, ambos com boa sensibilidade.

A MLPA, realizada em amostras de líquido pleural de pacientes com câncer de pulmão e mama mostrou alteração numérica ou estrutural na região do gene do *EGFR* em 28,2% dos casos.

Segundo dados de literatura, a sensibilidade do exame citológico no diagnóstico de derrame pleural maligno é, em geral, inferior a 60%^{14,61}. Shidhan e Falzon (2010)⁶² relatam taxa de falsos positivos em torno de 0,5% e de falsos negativos em torno de 30%. Cibas e Ductman (2009)³⁵ relatam taxa de falsos positivos inferior a 1%, com prejuízo da sensibilidade, que variou de 58 a 71%. Em nosso estudo a sensibilidade e especificidade para o exame citológico foram respectivamente de 96% e 67%. Destacamos que é opção do nosso serviço, ressaltar em forma de texto no laudo, a possibilidade de neoplasia nos casos de citologia suspeita e que exames complementares são necessários para o diagnóstico definitivo.

Longatto Filho et al. (1998)⁶³ ao avaliar o desempenho do exame citológico no diagnóstico de derrames cavitários concluiu que a citologia apresenta uma alta capacidade resolutiva para diagnóstico de malignidade porém, com baixa sensibilidade. Segundo os autores, a acurácia do diagnóstico citológico depende de minuciosa avaliação dos eventos clínicos associados ao cuidado no preparo das amostras biológicas.

As aplicações da citometria de fluxo em oncologia clínica são múltiplas, podendo ser utilizada para diagnóstico e prognóstico.

O princípio da utilização da ploidia de DNA por CF se baseia na proposição de que a detecção de populações de DNA aneuploides seria indicativo da presença de células neoplásicas malignas, assim como a proporção elevada de células na fase S⁶⁴.

A vantagem do método é que por avaliar um grande número de células nucleadas, propicia a contagem aleatória das mesmas e portanto, avalia a ploidia de maior número de células tumorais⁶⁵.

Chen *et al.* (1995)⁶⁶ ressaltam a importância da utilização da ploidia de DNA por CMF e de técnicas imunocitoquímicas associadas. Os autores reportam que em 10/11 casos de derrame pleural classificados como suspeitos pela citologia, os histogramas obtidos representavam conteúdo de DNA diploide, fato que os levou a reclassificá-los como benignos.

O diagnóstico de DPM em combinação com a citopatologia, conforme demonstrado por Huang *et al.* (1992)²⁵, apresentou sensibilidade de 94%, especificidade de 100% e valor preditivo positivo de 100%. Mais recentemente, os mesmos autores relataram sensibilidade bastante inferior ao analisarem 71 casos de derrames pleurais (38 benignos e 33 secundários a adenocarcinoma de pulmão). Embora todos os derrames benignos tenham apresentado conteúdo nuclear euploide de DNA, apenas 52% dos DPM apresentaram aneuploidia²⁵.

Em nosso estudo, das 45 amostras de líquido pleural 36 (80%) eram neoplásicas e 9 (20%) eram não neoplásicas. Das 36 amostras neoplásicas a análise da ploidia de DNA detectou a presença de células aneuploides em 19 (52,8%), resultado semelhante ao obtido por Huang *et al.*²⁵. Em 17 amostras (47,2%) o índice de DNA ficou dentro dos padrões estabelecidos como normais (resultados falsos negativos). Das 9 amostras não neoplásicas, 2 (22,2%) apresentaram conteúdo celular de DNA aneuploide, não havendo evidências histológicas, radiológicas ou de seguimento clínico de neoplasia (falsos positivos). Estes resultados conferiram uma taxa de sensibilidade e especificidade para a técnica de 57% e 70%, respectivamente.

No contexto diagnóstico, até o momento, a baixa sensibilidade do método não justifica sua utilização como rotina na identificação de casos de DPM^{65,66,67}.

Entretanto, em 2007, em estudo efetuado com amostras de sangue periférico de pacientes portadores de neoplasias metastáticas de pulmão, próstata, pâncreas, mama e cólon, Nagrath *et al* (2007)⁶⁸ obtiveram a separação das células tumorais circulantes através de marcação com o anticorpo EpCAM e concluíram que a detecção de células tumorais marcadas com conteúdo anormal de DNA é uma nova e efetiva ferramenta de identificação das células tumorais circulantes em pacientes com doença metastática.

Em síntese, devemos considerar que quando se detecta uma população de células aneuploides, o diagnóstico de malignidade deve ser considerado. Se o resultado do exame citológico é negativo ou suspeito, o mesmo deve ser revisto; não sendo definida a positividade, a investigação clínica e radiológica deve ser planejada, de forma a incluir o exame histológico⁶⁷. Entretanto, o índice elevado de resultados falsos negativos torna evidente que a citometria de fluxo não se constitui em método de escolha para a triagem no diagnóstico de derrames pleurais. Além de apresentar como fator limitante, a contaminação das células de interesse por outras não neoplásicas presentes em suspensão no líquido pleural (como as células mesoteliais e os macrófagos), que interferem na determinação da fração de proliferação e conseqüentemente, na sensibilidade e especificidade do método, requer processamento imediato e bastante moroso das amostras.

Sabe-se que as neoplasias malignas são caracterizadas por ganhos e perdas de material genético a nível cromossômico. Vale destacar que o câncer de pulmão, um dos principais responsáveis pelas metástases pleurais, é caracterizado por aberrações complexas que afetam a maioria dos cromossomos^{69,70,71,72}. Neste contexto, a utilização de técnicas mais sensíveis de detecção de anormalidades cromossômicas, como a FISH, deve ser considerada para fins diagnósticos. Adicionalmente, a padronização da técnica em amostras frescas de líquido, sem a necessidade da cultura de células permite sua incorporação ao arsenal diagnóstico dos laboratórios clínicos, sem alterar o tempo de liberação do exame (TAT - *TurnAround Time*).

Em nosso estudo, optamos por utilizar sondas de FISH centroméricas para os cromossomos 11 e 17, uma vez que a detecção de aneuploidia nesses cromossomos tem sido associada a neoplasias de vários sítios primários^{73,74,75}.

Genes relevantes para o fenótipo neoplásico, como por exemplo, os genes *HRAS*, *MMP1*, *MMP12*, *PGR*, *PAK1* estão localizados no cromossomo 11 e os genes *p53*, *Her2*, *BRCA1*, *STAT3*, *AKAP 10* estão localizados no cromossomo 17, entre outros.

Na casuística estudada, a totalidade dos derrames pleurais malignos com citologia oncológica positiva teve confirmação de aneuploidia pela técnica de FISH; dos casos com citologia negativa, três foram reclassificados como malignos (confirmados por histologia) e dos casos com citologia suspeita de malignidade, o diagnóstico foi confirmado em 44 casos (65,5%). Apenas um caso de derrame pleural parapneumônico com hiperreatividade mesotelial e citologia suspeita apresentou FISH falso positiva. Este achado pode estar relacionado com a resposta proliferativa mesotelial, com maior número de células na fase S do ciclo celular. Embora tenham sido observadas células aneuploides em casos de derrames pleurais benignos, o número de células foi inferior ao valor de corte previamente estabelecido.

Fiegl *et al.* (2004)²⁶, em estudo semelhante, associaram FISH ao exame citológico em amostras de líquido pleural de 358 pacientes com derrame pleural, sendo 157 casos malignos e 72 benignos. Os casos de DPM incluíam portadores de câncer de mama, pulmão e pâncreas, entre outros. Os autores obtiveram positividade do exame citológico em 44.4% dos casos malignos, enquanto que a FISH foi positiva em 53.9% dos casos. A associação das técnicas elevou a sensibilidade diagnóstica para 60.9%.

No presente estudo, os resultados obtidos demonstram expressivo ganho desses cromossomos na maioria dos casos de derrame pleural maligno analisados. Embora sondas para outros cromossomos possam ser utilizadas, julgamos que a utilização de apenas duas sondas foi suficiente para a detecção de aneuploidia, visto que à exceção de um caso de derrame pleural parapneumônico que apresentou número de células aneuploides acima do valor de corte previamente estabelecido, todos os demais casos de malignidade foram corretamente classificados.

Cora *et al.* (2005)⁵⁵ avaliaram 32 pacientes com derrame pleural, sendo 14 benignos e 18 malignos, incluindo casos de mesotelioma, adenocarcinoma e

carcinoma de pequenas células de pulmão. Utilizando sondas centroméricas específicas para os cromossomos 9 e 11, os autores obtiveram boa diferenciação entre os derrames benignos e malignos. Ioakim-Liossi *et al.* (1999)⁷⁶ observaram aneuploidia e alterações estruturais nos cromossomos 1, 3, 6, e 11 em amostras frescas ou provenientes de cultura de pacientes com câncer de mama e ovário. Por outro lado, Roka e cols (1998)⁷⁷ relataram alta frequência de aneuploidia do cromossomo 8 em amostras de líquido pleural de pacientes com neoplasia de mama. Reafirmando a multiplicidade cromossômica envolvida nos processos tumorais metastáticos, Flores-Staino *et al.* (2010)²⁸ encontraram aberrações envolvendo os cromossomos 3, 7, 17 e 9p21 em 29 amostras de líquido pleural de pacientes com carcinoma metastático para a pleura.

Atualmente, a FISH é utilizada como método confirmatório de alterações pontuais, não sendo, até o momento, um exame de baixo custo para ser implantado em laboratórios de rotina. Entretanto, a busca de sondas ou do menor conjunto de sondas, capazes de complementar o exame citológico com eficiência deve ser encorajada na pesquisa oncológica, principalmente para pacientes com diagnóstico prévio de câncer que desenvolvem derrame pleural e cujo exame citológico do líquido pleural mostrou resultado de citologia oncótica suspeita, porém inconclusiva. Neste sentido, kits de sondas adicionais têm sido testados, como o kit *UroVysion* (Vysis-Abbott Laboratories, Downers Grove, Illinois, EUA), que é um conjunto de sondas comerciais envolvendo 4 regiões cromossômicas específicas utilizado em amostras de urina para o diagnóstico de câncer de bexiga. Flores-Staino *et al.* (2010)²⁸ relatam resultados satisfatórios com a adaptação deste kit para amostras de líquido pleural no diagnóstico de DPM. Nosso grupo de trabalho testou o kit e também obteve boa sensibilidade e especificidade diagnósticas em uma série de casos de derrame pleural incluindo casos benignos e malignos, com multiplicidade de sítios primários (dados ainda não divulgados).

Na constante busca por métodos moleculares simplificados e que permitam a análise simultânea de amplo espectro de cromossomos, ou regiões gênicas específicas, surgem os primeiros estudos utilizando a técnica de MLPA em câncer^{78,79,80}. Devido à sua capacidade de evidenciar variações no número de cópias de vários genes humanos, a MLPA pode ser utilizada no diagnóstico de doenças.

genéticas cuja patogênese esteja relacionada com a presença de deleções ou duplicações de genes específicos.

A identificação de mutações em genes conhecidos de pacientes afetados por câncer hereditário e em seus familiares é de fundamental importância para a instituição de práticas profiláticas específicas. Na maioria dos casos, as mutações de linhagem germinal que afetam esses genes são pontuais e dentre as técnicas passíveis de identificação destes rearranjos, inclui-se a MLPA⁸¹.

Vários grupos têm demonstrado a utilidade do ensaio de MLPA na análise de rearranjos genômicos de *BRCA1* e *BRCA2*^{82,83}. Montagna *et al.*⁸⁴, relataram que rearranjos genômicos são responsáveis por mais de um terço das mutações de *BRCA1* em famílias com câncer de mama e ovário no norte da Itália.

A aplicação da análise de MLPA forneceu resultados úteis também no estudo de grandes rearranjos do gene *APC* em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar (PAF) e de seus familiares. Bunyan *et al.*⁸⁵ detectou deleções de genes completos ou parciais da *APC* em 6/24 casos de pacientes com PAF.

Como são poucos os estudos com MLPA e amostras biológicas outras que não as teciduais, optamos por utilizar o kit de MLPA (P315-MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que avalia amplificações e deleções do gene *EGFR*, gene relacionado com o controle do crescimento celular e por consequência, alterado em várias neoplasias. Na época em que iniciamos o estudo, haviam poucos kits relacionados com o diagnóstico genérico de neoplasia. Como grande parte da nossa casuística se refere a metástases pleurais de câncer de pulmão e mama, tumores que em 20 a 30 % das vezes expressam a mutação do *EGFR*^{86,87,88}, entendemos que adaptar e padronizar a técnica de MLPA em amostras de líquido pleural com este kit seria providencial. Como são restritos os estudos com líquido pleural, aperfeiçoamos a técnica de extração e purificação do DNA para a técnica de PCR múltipla, conforme as orientações da assessoria científica do fabricante.

Das 50 amostras incluídas no estudo, 46 (92%) eram malignas (predominantemente metástases de pulmão, mama e cólon) e 4 (8%) eram líquidos pleurais de etiologia tuberculosa e que foram utilizadas como controle negativo para a técnica de MLPA.

Nos derrames pleurais malignos, alterações na sequência do *EGFR* foram observadas em 13 casos (28,2%). Interessante ressaltar que em 19 casos (41,3%) foram detectadas cópias anômalas nas sondas dos controles internos da reação, talvez por expressarem regiões de instabilidade genômica. As amostras dos casos de tuberculose (controle normal) não apresentaram número de cópias amplificado e/ou rearranjo do gene estrutural.

Recentemente fomos informados da produção, ainda em pesquisa pelo fabricante, de uma sonda multiplex genérica para câncer, capaz de detectar ampliações no número de cópias gênicas e/ou rearranjo do gene estrutural envolvendo múltiplos genes relacionados com progressão tumoral (X050-MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Nossas expectativas com este kit são otimistas, pois a cobertura de aproximadamente 50 regiões gênicas relacionadas com progressão tumoral possibilitará reconhecer, em apenas um teste de PCR, o caráter maligno do derrame pleural, independentemente do sítio primário da neoplasia.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

Conforme era objeto deste estudo, obtivemos êxito na padronização das técnicas de ploidia de DNA, FISH e de MLPA em amostras frescas de líquido pleural.

- A técnica de FISH acrescentou sensibilidade e especificidade ao diagnóstico de derrame pleural maligno. A utilização de duas sondas centroméricas foi eficiente para o diagnóstico de malignidade, não onerando substancialmente o custo do exame citológico. Acreditamos que a associação da FISH ao exame citológico convencional seja de grande valor na prática clínica, particularmente em casos com células atípicas no líquido pleural e diagnóstico citológico inconclusivo. A ploidia de DNA, embora mais específica que o exame citológico, não acrescentou sensibilidade diagnóstica, não se justificando sua utilização em rotina.
- Os resultados de MLPA utilizando kit específico para ampliações e deleções do gene *EGFR* - receptor do fator de crescimento epidérmico – demonstraram alterações genéticas moleculares em células do líquido pleural de aproximadamente 20% dos pacientes portadores de metástases pleurais de tumores de pulmão, mama e cólon.

REFERÊNCIAS

Referências

1. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
2. Nicolson GL. Breast cancer metastasis-associated genes: role in tumour progression to the metastatic state. *Biochem Soc Symp*. 1998;63:231-43.
3. Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer*. 1998;34(2):214-21.
4. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. 2001;61(8):3230-9.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
6. Schmitt FC, Costa C. Biologia celular In: Bibbo M, Longatto Filho A. *Aspectos clínicos e laboratoriais dos derrames cavitários*. Rio de Janeiro. Ed. Revinter; 2001. p.41-56.
7. Rubin E. Neoplasia. In: Rubin Emanuel, editor. *Patologia: bases clinicopatológicas da medicina*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 16-25.
8. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146(5):1029-39.
9. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13(1):9-22.
10. Sahn SA. Malignancy metastatic to the pleura. *Clin Chest Med*. 1998;19(2):351-61.
11. Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura: an analysis of 96 patients. *Am J Med*. 1977;63(5):695-702.

-
12. Maskell NA, Butland RJ; Pleural Diseases Group, Standards of Care Committee, British Thoracic Society. BTS guidelines for the investigation of a unilateral pleural effusion in adults. *Thorax*. 2003;58(Suppl 2):ii8-17.
 13. Light R. Approach to the patient. In: Light R, editor. *Pleural diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 109-99.
 14. Loddenkemper R. Thoracoscopy. State of the art. *Eur Respir J*. 1998;11(1): 213-21.
 15. Rodriguez-Panadero F, BorderasNaranjo F, Lopez Mejias J. Pleural metastatic tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series. *Eur Respir J*. 1989;2. 366-9.
 16. Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J, Rodriguez, Panadero F, Sahn SA. Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J*. 2001;18(2):402-19.
 17. Ambrogi MC, Lucchi M, Dini P, Mussi A, Angeletti CA. Videothoracoscopy for evaluation and treatment of hemothorax. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002;43(1):109-12.
 18. Burdine J, Joyce LD, Plunkett MB, Inampudi S, Kaye MG, Dunn DH. Feasibility and value of video-assisted thoracoscopic surgery wedge excision of small pulmonary nodules in patients with malignancy. *Chest*. 2002;122(4):1467-70.
 19. Sales RK, Vargas FS, Capelozzi VL, Seiscento M, Genofre EH, Teixeira LR, Antonangelo L. Predictive models for diagnosis of pleural effusions secondary to tuberculosis or cancer. *Respirology*. 2009;14(8):1128-33.
 20. Tsung-Cheng Hsieh TC, Wen-Wei Huang, Chun-Liang Lai, Shih-Ming Tsao, Cheng-Chuan Su. Diagnostic value of tumor markers in lung adenocarcinoma-associated cytologically negative pleural effusions. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(9):483-8.

-
21. Antonangelo L. Citologia. In: Vargas FS, Teixeira LR, Marchi E. *Derrame Pleural*. São Paulo: Editora Roca; 2004. p. 125-42.
 22. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7212-20.
 23. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
 24. Antonangelo L, Saldiva PH, Amaro Júnior E, Capelozzi VL. Utility of computerized morphometry combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. *Anal Quant Cytol Histol*. 1994;16(4):247-52.
 25. Huang MS, Tsai MS, Wang TH, Lin MS, Chong IW, Chen KL, Hwang JJ. Flow cytometric DNA analysis of pleural effusions. *Gaoxiong YiXue KeXue Za Zhi*. 1992;8(12):640-6.
 26. Fiegl M, Haun M, Massoner A, Krugmann J, Müller-Holzner E, Hack R, Hilbe W, Marth C, Doba HC, Gastl G, Grünwald K. Combination of cytology, fluorescence in situ hybridization for aneuploidy, and reverse-transcriptase polymerase chain reaction for human mammaglobin/mammaglobin B expression improves diagnosis of malignant effusions. *J Clin Oncol*. 2004;22(3):474-83.
 27. Koss LG. *Koss's diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Company; 2006. v. 2.
 28. Flores-Staino C, Darai-Ramqvist E, Dobra K, Hjerpe A. Adaptation of a commercial fluorescent in situ hybridization test to the diagnosis of malignant cells in effusions. *Lung Cancer*. 2010;68(1):39-43.
 29. Zemansky AP Jr. Examination of fluids for tumor cells; analysis of 113 cases checked against subsequent examination of tissue. *Am J Med Sci*. 1928;175:489-504.
 30. Cardozo PI. A critical evaluation of 3000 cytologic analysis of pleural fluid and pericardial fluid. *Acta Cytol*. 1966;10:455-60.

-
31. Taft PD, Arizaga-Cruz M. A comparison of cell block, Papanicolaou and Milipore filter techniques for the cytologic examination of serous fluids. *Am J Clin Pathol.* 1960;34:561-564.
32. Dhundee J, Cotter M, Gibbs AR. Examination of cytological smears and clot sections prepared from pleural fluids: a comparative study. *Cytopathology.* 1996;7(6):406-13.
33. Grunze H. The comparative diagnostic accuracy, efficiency and specificity of cytologic techniques used in the diagnosis of malignant neoplasms in serous effusion of the pleural and pericardial cavities. *Acta Cytol.* 1964;8:150-63.
34. DiBonito L, Falconieri G, Colautti I, Bonifacio D, Dudine S. The positive peritoneal effusion. A retrospective study of cytopathologic diagnoses with autopsy confirmation. *Acta Cytol.* 1993;37(4):483-8.
35. CIBAS ES. Pleural, pericardial, and peritoneal fluids. In: Cibas ES, Ductman BS. *Cytology: diagnostic principles and clinical correlates.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2009. p.129-53.
36. Johnston WW. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer.* 1985;56(4):905-9.
37. Martensson G, Pettersson K, Thiringer G. Differentiation between malignant and non-malignant pleural effusion. *Eur J Respir Dis.* 1985;67(5):326-34.
38. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia; 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-49.
39. Shapiro HM. *Practical flow cytometry.* 3rd ed. West Newton: Wiley-Liss; 1995. Chap. 1, p.1-10.

-
40. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000;46(8B):1221-9.
41. Davidson B, Dong HP, Holth A, Berner A, Nicholson, JKA. Immunophenotyping of Lymphocytes by flow cytometry. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington (DC): ASM Press; 2002. p.137-143.
42. Gollin S. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:33-42.
43. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. 2nd ed. New York: Wiley-liss; 1995. p.369-88.
44. Gisselsson D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma*. 2008;117(6):511-9.
45. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature*. 2004;432:338-41.
46. Meyer-Lindenberg A, Hariri AR, Munoz KE, Mervis CB, Mattay VS, Morris CA, Berman KF. Neural correlates of genetically abnormal social cognition in Williams syndrome. *Nat Neurosci*. 2005;8(8):991-3.
47. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(23):9138-42.
48. Chaudhary AGA. Establishing an array CGH platform for molecular diagnosis of saudi patients with intellectual disability. *J Mol Genet*. 2011;3(2):12-22.
49. Reis-Filho JS, Schmitt FC. Fluorescence *in situ* hybridization, comparative genomic hybridization, and other molecular biology techniques in the analysis of Tsung effusions. *Diagn Cytopathol*. 2005;33(5):294-9.

-
50. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(11):1105-14.
51. Savic S, Franco N, Grilli B, Barascud Ade V, Herzog M, Bode B, Loosli H, Spieler P, Schönegg R, Zlobec I, Clark DP, Herman JG, Bubendorf L. Fluorescence in situ hybridization in the definitive diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology. *Chest.* 2010;138(1):137-44.
52. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Biosci Horiz.* 2010;3(1):85-95.
53. Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence *in situ* hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol.* 2000;37(4):320-33.
54. Zojer N, Fiegl M, Angerler J, Müllauer L, Gsur A, Roka S, Pecherstorfer M, Huber H, Drach J. Interphase fluorescence in situ hybridization improves the detection of malignant cells in effusions from breast cancer patients. *Br J Cancer.* 1997;75(3):403-7.
55. Cora T, Acar H, Ceran S, Bodur S. Analysis of chromosomes 9 and 11 aneuploidy frequency in pleural effusion of patients with and without malignancy: interphase FISH technique. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(2):248-51.
56. Schouten JP, McElgunn C J, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
57. Stuppia L, Antonucci I, Palka G e Gatta V. Use of the MLPA Assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3245-76.
58. Rosin MP, Anwar WA, Ward AJ. Inflammation, chromosomal instability, and cancer: the schistosomiasis model. *Cancer Res.* 1994;54(Suppl.):1929s-33s.

-
59. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN; Association of Molecular Pathology Clinical Practice Committee; American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn*. 2007;92:134-43.
60. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37:360-63.
61. Romero S, Fernández C, Arriero JM, Espasa A, Candela A, Martín C, Sánchez-Payá J. CEA, CA 15-3 and CYFRA 21-1 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Eur Respir J*. 1996;9(1):17-23.
62. Shidham VB, Falzon M. Serous effusios. In: Gray W, Kocjan G. Diagnostic Cytopathology. 3rd ed. London: Elsevier; 2010. p.115-75.
63. Longatto Filho A, Oyafuso MS, Silva LG, Bortolan J, Lombardo VA, Bisi H. Sensibilidade do método citológico para o estudo de derrames cavitários: correlação com o tipo histológico da neoplasia. *Folha Méd*. 1998;116(2):91-4.
64. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayall BH, Wheelless L, Cox C. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry*. 1993;14(5):472-7.
65. Hedley DW, Clark GM, Cornelisse DJ. Consensus review of clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry*. 1993;14(5):482-5.
66. Chen TL, Luo I, Mikhail N, Raskova J, Raska K Jr. Comparison of flow and Image cytometry for DNA content analysis of fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in breast carcinoma. *Cytometry*. 1995;22:181-9.

-
67. Joseph MG, Banerjee D, Harris P, Gibson S, Mc Fadden RG. Multiparameter flow cytometric DNA analysis of effusions: a prospective study of 36 cases compared with routine cytology and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 1995;8(6):686-93.
68. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Utkus L. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235-9.
69. Berrieman HK, Ashman JN, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L. Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent *in situ* hybridisation. *Br J Cancer*. 2004;90:900-5.
70. Varella-Garcia M, Chen L, Powell RL, Hirsch FR, Kennedy TC, Keith R, Mitchell JD, Franklin WA.. Spectral karyotyping detects chromosome damage in bronchial cells of smokers and patients with cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:505-12.
71. Aviel-Ronen S, Coe BP, Lau SK, da Cunha Santos G, Zhu CQ, Strumpf D, Jurisica I, Lam WL, Tsao MS. Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(29):10155-60.
72. Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Girard L, Macaulay C, Lam S, Gazdar AF, Minna JD, Lam WL.. DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers. *Oncogene*. 2008;27:4615-24.
73. Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene*. 2002;21:6877-83.
74. Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett*. 2006;239(1):1-9.
75. Liu YZ, Wang Z, Fang LL, Li L, Cao J, Xu X, Han YL, Cai Y, Wang LX, Wang MR. A potential probe set of fluorescence *in situ* hybridization for detection of lung cancer in bronchial brushing specimens. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(9):1541-9.

-
76. Ioakim-Liossi A, Gagos S, Athanassiades P, Gogas J, Dvaris P, Markopoulos C. Changes of chromosomes 1,3, 6 and 11 in metastatic effusions arising from breast and ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;110:34-40.
77. Roka S, Fiegl M, Zojer N, Filipits M, Schuster R, Steiner B, Jakesz R, Huber H, Drach J. Aneuploidy of chromosome 8 as detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization is a recurrent finding in primary and metastatic breast cancer *Breast Cancer Res Treat.* 1998;48(2):125-33.
78. Tajiri R, Ooi A, Fujimura T, Dobashi Y, Oyama T, Nakamura R, Ikeda H. Intratumoral heterogeneous amplification of ERBB2 and subclonal genetic diversity in gastric cancers revealed by multiple ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Pathol.* 2014;45(4):725-34.
79. Zhang D, Wang Z, Luo Y, Xu Y, Liu Y, Yang W, Zhang X. Analysis of DNA copy number aberrations by multiple ligation-dependent probe amplification on 50 intestinal type gastric cancers. *J Surg Oncol.* 2011;103(2):124-32.
80. Buffart TE, van Grieken NC, Tijssen M, Coffa J, Ylstra B, Grabsch HI, van de Velde CJ, Carvalho B, Meijer GA. High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers. *Virchows Arch.* 2009;455(3):213-23
81. Mazoyer S. Genomic rearrangements in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Hum Mutat.* 2005;25:415-22.
82. Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, Kast K, Kutsche M, Hellebrand H, Goecke TO, Kiechle M, Niederacher D, Schmutzler RK, Meindl A. MLPA screening in the *BRCA1* gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Hum Mutat.* 2008;29(7):948-58.
83. Lips EH, Laddach N, Savola SP, Vollebergh MA, Oonk AM, Imholz AL, Wessels LF, Wesseling J, Nederlof PM, Rodenhuis S. Quantitative copy number analysis by

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1- associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Res.* 2011;13(5):R107.

84. Montagna M, Dalla Palma M, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet.* 2003;12(9):1055-61.

85. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF. Dosage analysis of cancerpredisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer.* 2004;91:1155-9.

86. Valentin MD, da Silva SD, Privat M, Alaoui-Jamali M, Bignon YJ. Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(1):21-30.

87. Planck M, Edlund K, Botling J, Micke P, Isaksson S, Staaf J. Genomic and transcriptional alterations in lung adenocarcinoma in relation to EGFR and KRASmutation status. *Plos one.* 2013 oct 24;8(10).

88. Isaksson S, Bendahl PO, Salomonsson A, Jönsson M, Haglund M, Gaber A, Jirström K, Jönsson P, Borg A, Johansson L, Staaf J, Planck M. Detecting EGFR alterations in clinical specimens-pitfalls and necessities. *Virchows Arch.* 2013;463(6):755-64

ANEXO

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º: _____ SEXO: ___ M ___ F

DATA NASCIMENTO: ___/___/___

ENDEREÇO: _____ N.º: _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º: _____ SEXO: ___ M ___ F

DATA NASCIMENTO: ___/___/___

ENDEREÇO: _____ N.º: _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Incursão Clínica e Experimental na Cavidade Pleural

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Francisco Vargas Suso

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 15089

CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR TITULAR UNIDADE DO HCFMUSP: PNEUMOLOGIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 MESES (Insere-se em Projeto Temático)

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

A pleura é semelhante a uma pele bem fina que recobre o pulmão dentro do tórax. Em algumas doenças pode haver acúmulo de líquido entre o pulmão e a pleura. Em alguns doentes, mesmo após tratamento, o acúmulo deste líquido se repete, causando dor e falta de ar, principalmente após esforços.

Para melhorar os sintomas é necessário que este líquido seja retirado. Para realizarmos este tratamento utilizamos inicialmente uma agulha fina e seringa para injetarmos nas costas (tórax) um remédio líquido que diminui a dor (anestesia) e possibilita que uma agulha mais grossa possa ser colocada nas costas, para retirar adequadamente o líquido.

Durante o tratamento, serão preenchidos questionários e serão colhidas amostras de sangue e líquido pleural e poderá ser retirado um pedaço da pleura (biópsia) quando necessário. Todo o material retirado (líquido pleural, sangue, pedaço de pleura) será armazenado para exames para o seu tratamento atual e, para realizar alguns novos exames e pesquisas para descobrir novas formas de diagnóstico e tratamento.

Para acompanhar este tratamento serão realizados diversos exames, dentre eles a radiografia de tórax (chapa) e/ou tomografia computadorizada (exame muito parecido com a radiografia, só que feito deitado), e testes de capacidade pulmonar em repouso e na atividade física. Podendo ser necessários testes para reconhecer a influência do líquido no sono e hospitalização para a realização dos exames.

Concordo com a punção/biópsia de pleura, coleta de sangue e líquido pleural e estou ciente e concordo que este material (líquido, pleura e sangue) poderá ser utilizado no futuro para realização de novos exames ou pesquisas, relacionadas ou não ao meu tratamento, preservando a minha privacidade e o sigilo de minha identidade. Considero que fui devidamente esclarecido e concordo com a realização da drenagem do tórax, dos exames de imagem, função pulmonar em repouso e na atividade física, sono e hospitalização que serão realizados para avaliar a influência do líquido e a expansão do meu pulmão, bem como outros exames que se fizerem necessários e durante a evolução do tratamento.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Dr. Francisco S. Vargas, Dra. Leila Antonangelo, Dra. Lisete R. Teixeira, Dr. Evaldo Marchi, Dr. Eduardo H. Genofre. Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – 10o andar – bloco II, CEP: 05403-000, São Paulo – SP, Tel: (11) 3069-5034, Fax: (11) 3069-5695, e-mail: pnevargas@incor.usp.br

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

Assinatura do pesquisador

Anexo B



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.11.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **998/05**, intitulado: **"Incursão Clínica e Experimental na Cavidade Pleural"** apresentado pelo Departamento de **CARDIOPNEUMOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A Aprovação deste Projeto é extensiva aos sub-projetos (Lista Anexa), anteriormente apresentados de forma isolada e que passaram a integrar-se em um único grande projeto.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Francisco Vargas Suso**

CAPPesq, 09 de Novembro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

APÊNDICE

Apêndice

Tabela 1. Resultados encontrados pela técnica Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH)

Diagnóstico	Células Anormais	Cr 11			Cr 17		
		1 sinal	3 sinais	5 sinais	1 sinal	3 sinais	5 Sinais
CA pulmão	51,2	11,5	26,00	12,0	1,0	4,5	0
	64,5	10,5	32,50	7,0	4,5	10,0	0
	68,9	9,00	23,00	5,5	14,5	16,0	3,0
	50,5	23,0	22,00	5,5	14,0	29,5	0
	49,5	14,0	28,50	6,0	26,0	20,0	1,0
	66,0	11,0	21,50	0	18,0	18,5	5,5
	55,0	9,00	27,50	3,5	5,0	4,0	0
	62,5	11,5	14,00	0	10,5	14,0	10,5
	70,5	2,00	27,50	5,0	7,5	34,0	0
	74,0	13,5	33,00	7,5	3,0	15,0	4,5
	61,5	1,00	39,50	11,0	10,5	8,50	1,5
	50,5	23,5	21,50	5,	14,5	21,5	0
	49,0	14,0	27,50	6,0	26,5	20,0	1,5
	69,5	7,50	24,00	5,5	15,5	16,5	5,0
	49,5	17,0	27,00	3,0	27,0	20,0	2,5
	54,5	24,0	23,50	0	17,0	31,0	0
	56,5	25,0	25,0	0	18,0	31,5	0
	50,5	21,5	58,0	0	19,0	21,5	0
	66,0	16,5	24,0	0	11,5	27,5	0
	51,5	16,5	29,0	6,0	26,5	22,5	0
	57,5	26,5	31,5	0	16,5	0	0
	55,5	14,5	41,0	0	34,0	14,5	0
	50,0	22,5	27,5	0	27,5	19,5	0
	57,0	29,5	16,5	0	11,0	9,0	0
	65,0	28,5	17,0	0	9,5	35,5	0
	68,5	11,5	18,5	0	40,5	11,5	0
	63,5	5,0	12,5	1,0	4,5	5,5	0
	57,5	13,0	28,0	12,5	3,5	3,0	3,0
	56,5	11,0	30,0	4,0	11,5	22,5	9,0
	50,5	14,5	26,5	9,5	18,5	24,0	5,0
	52,5	24,0	22,0	6,5	15,0	30,5	0
	70,5	2,0	27,5	5,0	7,5	34,0	0
	69,0	9,0	23,0	5,5	14,5	16,0	3,0
47,5	23,5	24,0	0	16,5	23,5	0	
62,5	24,0	29,0	0	9,5	18,5	14,0	
52,5	22,0	25,5	0	19,0	27,0	0	

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico	Células Anormais	Cr 11			Cr 17		
		1 sinal	3 sinais	5 sinais	1 sinal	3 sinais	5 Sinais
Ca mama	56,0	10,0	29,5	16,0	1,5	5,5	0
	68,5	7,0	25,5	4,5	7,5	17,5	0
	62,0	5,5	20,5	3,5	9,0	19,0	0
	71,0	7,0	17,5	0	12,0	16,0	1,5
	61,0	7,5	21,5	1,5	4,0	18,0	3,5
	71,0	9,0	16,0	0	56,5	1,0	0
	55,5	9,0	32,0	3,0	18,5	21,5	6,0
	63,5	17,0	16,0	6,0	12,0	15,5	8,0
	59,5	9,0	13,0	1,5	45,5	2,0	2,0
	66,0	10,5	21,0	4,5	8,5	20,5	4,0
	64,5	18,5	16,0	6,0	11,5	15,0	8,5
	60,0	12,0	28,0	17,0	1,0	2,5	3,0
	74,5	15,5	23,5	9,0	13,0	25,0	7,5
	66,0	1,0	33,0	2,0	26,0	16,0	0
	62,5	2,0	44,5	0	17,5	2,0	0
	63,0	11,5	28,0	17,5	1,5	6,5	0
	57,5	10,0	28,0	14,5	5,0	9,0	16,5
	52,5	10,5	30,5	0	19,0	22,0	2,5
	69,0	7,0	25,0	5,0	6,5	16,5	4,5
	74,5	24,5	47,0	0	45,0	27,5	0
	59,5	11,5	33,5	3,0	19,0	26,0	0
	58,5	25,5	10,0	0	22,0	30,5	0
	57,0	29,0	16,0	0	16,0	35,0	0
	56,0	22,5	9,0	0	29,5	22,5	0
	57,5	29,5	20,5	0	11,5	5,5	0
	62,5	14,0	30,5	3,5	11,5	32,0	0
	70,5	24,5	44,0	0	41,0	26,5	0
	51,0	17,0	27,5	0	22,5	23,5	0
	58,5	29,5	18,0	0	12,5	9,0	0
	25,5	4,5	13,0	5,5	2,0	7,0	3,0
	66,0	6,5	15,0	1,5	14,5	15,5	3,5
	64,5	6,5	15,0	1,5	14,5	15,5	3,5
	57,5	26,0	20,5	11,5	11,5	11,5	0
	25,5	4,5	13,0	5,5	2,0	7,0	3,0
	60,0	6,0	19,5	0	0	34,5	0
	57,5	10,0	28,0	14,5	5,0	9,0	16,5
	59,5	22,0	34,5	0	30,0	25,5	0
	51,0	14,0	34,0	0	29,5	17,0	0

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico	Células Anormais	Cr 11			Cr 17		
		1 sinal	3 sinais	5 sinais	1 sinal	3 sinais	5 Sinais
Cólon	74,0	6,0	24,5	0,5	16,0	14,5	8,5
	74,5	20,0	34,5	1,5	19,5	22,5	11,5
	76,0	19,5	39,0	4,0	16,0	28,0	0
	79,5	27,5	26,5	1,0	34,5	26,0	3,0
	68,5	28,5	29,50	0	23,5	22,5	0
	70,5	15,0	33,0	0	42,5	8,5	0
	75,0	21,5	39,0	0,5	24,5	35,5	0
	69,5	26,5	28,5	0	18,0	32,5	0
	71,5	17,5	23,5	0	18,5	19,0	10,5
	71,5	17,5	23,5	0	18,5	19,0	10,5
	65,5	9	36,0	6,5	24,0	18,5	11,5
	70,5	8,5	36,0	4,0	7,0	23,0	5,0
	71,5	17,5	23,5	0	18,5	19,0	10,5
	49,5	6,0	28,5	0	33,5	12,5	0
	71,5	17,5	23,5	0	18,5	19,0	10,5
Neoplasias	51,5	15,5	29,5	6,5	26,0	22,0	0
Hematológicas							
	59,5	9,0	13,0	2,5	45,5	2,0	2,0
	55,0	16,5	38,5	0	28,5	16,5	0
	52,5	13,5	39,0	0	31,5	0	0
	58,5	19,0	39,5	0	31,5	19,0	0
	51,0	22,5	28,5	0	11,5	22,5	0
	51,0	12,0	18,5	1,5	13,5	29,5	3,0
	51,5	15,5	28,5	6,5	26,022, 0	1,0	
	51,0	16,5	34,5	0	25,0	16,5	0
Ovário	65,0	7,5	29,0	9,5	2,0	9,0	0
	66,5	18,5	29,0	11,0	11,5	21,5	0
	66,0	14,5	31,0	11,5	5,5	26,0	0
	52,5	25,5	18,5	0	0	25,0	0
	52,5	24,0	22,0	0	17,0	30,5	0

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico	Células Anormais	Cr 11			Cr 17		
		1 sinal	3 sinais	5 sinais	1 sinal	3 sinais	5 Sinais
Sítio Primário Desconhecido	72,0	5,0	28,3	3,5	6,0	14,0	0
	51,0	12,0	18,5	1,5	13,5	29,5	3,0
	69,0	1,0	49,5	2,0	20,0	14,0	1,5
	67,5	7,5	25,5	9,5	2,0	10,0	10,5
	66,0	20,5	26,5	0	10,5	25,0	0
	64,5	28,0	17,0	0	7,5	35,0	0
	25,5	15,0	5,0	0	4,5	5,5	0
	70,5	8,5	12,5	0	49,5	8,5	0
	71,0	26,5	28,0	0	15,5	42,0	0
	53,5	11,5	31,5	0	0	3,5	40,5
	53,5	11,5	31,5	0	3,5	10,5	0
	66,0	15,5	24,5	0	11,5	19,0	0
	73,5	26,5	28,0	0	12,5	42,0	0
	10,0	1,5	3,5	1,5	1,0	0	0
Outros	51,0	14,0	32,5	4,5	29,5	18,5	0
	58,5	25,5	21,5	0	12,5	9,5	0
	66,0	20,5	26,5	0	11,0	25,0	0
	55,5	15,0	26,5	0	10,5	17,5	12,5
	49,5	15,0	11,5	12,0	11,5	9,0	11,0
	70,5	8,5	36,0	4,0	7,0	23,0	5,0
	63,5	29,5	32,0	0	12,0	37,0	0
	54,5	14,5	36,0	4,0	33,0	18,5	0
	53,5	14,0	27,0	0	15,5	26,5	2,5
	51,5	8,5	37,0	0	32,5	8,5	0
	48,5	23,5	25,0	0	17,5	23,5	0
	52,0	13,0	28,0	0	19,0	24,0	0
	5,0	1,0	2,5	2,5	2,0	0	0

Tabela 2. Resultados dos índices de DNA por Citometria de Fluxo

Diagnóstico	Índice de DNA
Pulmão	1,00
	1,14
	1,06
	1,04
	1,03
	1,17
	1,09
	1,01
	1,03
	0,99
	1,07
	1,11
	Mama
0,70	
0,96	
0,98	
1,16	
1,08	
0,99	
0,95	
1,05	
1,03	
1,08	

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico	Índice de DNA
Cólon	1,07
	0,99
	0,61
Sítio Primário Indefinido	0,93
	1,11
	1,07
Linfoma	1,18
Ovário	1,48
	0,89
Outros	1,02
	0,96
	1,13
	1,38
Benigno	1,02
	0,95
	0,99
	1,01
	1,17
	1,02

Tabela 3: Resultado da amplificação multiplex por sondas ligação- dependentes (MLPA)

Diagnóstico	Resultados
Pulmão	EGFR + Ctr –
	EGFR + Ctr -
	EGFR - Ctr +
	EGFR - Ctr +
	EGFR + Ctr +
	EGFR + Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico	Resultados
Mama	EGFR + Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR + Ctr +
	EGFR -Ctr +
	EGFR + Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR + Ctr +
	EGFR + Ctr +
	EGFR+ Ctr +
	EGFR- Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
Cólon	EGFR - Ctr +
	EGFR + Ctr +
	EGFR - Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFr + Ctr -
	EGFR - Ctr -

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico	Resultados
Sítio Primário Indefinido	EGFR - Ctr +
	EGFR + Ctr +
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR- Ctr -
	EGFR - Ctr -
Benigno	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -
	EGFR - Ctr -