

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**PNEUMOLÓGICAS**

**RITA MARIA GONZALEZ GARCIA**

**Estudo piloto clínico experimental de coleta e armazenamento de material  
de carcinoma pulmonar para utilização em pesquisa biomédica**

**Tese de Doutorado**

**Porto Alegre**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**PNEUMOLÓGICAS**

**RITA MARÍA GONZÁLEZ GARCÍA**

**Estudo piloto clínico experimental de coleta e armazenamento de material  
de carcinoma pulmonar para utilização em pesquisa biomédica.**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Orientador – Prof. Dr. Cristiano F. Andrade,  
Co-orientador- Prof. Fábio Klamt**

Porto Alegre

**2020**

**RITA MARÍA GONZÁLEZ GARCÍA**

**Estudo piloto clínico experimental de coleta e armazenamento de material de carcinoma pulmonar para utilização em pesquisa biomédica.**

**Ficha catalográfica**

### ***Dedicatória***

*Aos meus pais pela semente de superação e esforço que me transmitiram e fizeram a médica que sou hoje. Aos meus queridos filhos, Jorge e Sarahi. E a León Carrasco, pelo seu apoio incondicional em todos estes anos de estudo*

## **AGRADECIMENTOS**

*Sou privilegiada pela ajuda de pessoas e instituições para poder fazer ciência nestes últimos anos. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por todo o apoio que me deram, especialmente ao professor Paulo de Tarso Roth Dalcin, coordenador do programa de pós-graduação em pneumologia da UFRGS, que viu potencial no meu projeto desde o começo e me ajudou a torná-lo realidade.*

*Agradeço ao meu orientador professor Dr. Cristiano Feijó Andrade, que ofereceu seu valioso guia e supervisão na elaboração deste trabalho, incentivando-me todos os dias com o seu espírito de pesquisador insaciável.*

*Ao professor Fabio Klamt, Coorientador, que me apresentou ao seu grupo de Bioquímica, ajudando-me com a sua orientação, permitindo conhecer e trabalhar com o Dr Fabricio , Juliete e Fabiana.*

*Ao serviço de Cirurgia Torácica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que me permitiu desenvolver o projeto com seus pacientes em tratamento cirúrgico.*

*A Universidade de Medicina de Havana, Cuba, que me formou e me permitiu ser a médica que sou hoje.*

*Agradeço desde o fundo do meu coração à minha família, aos meus filhos Sarahi e Jorge pela sua compreensão, pelo seu encorajamento constante e pelo seu apoio incondicional ao longo de todos estes anos de estudo. Sem a ajuda e o amor deles eu jamais teria tido a coragem de empreender este longo e desafiante projeto tão longe de minha querida Cuba, mudando a minha vida e as vidas dos meus filhos.*

*E por fim, mas não menos importante, agradeço muito a todos aqueles amigos e colegas que me apoiaram neste trabalho durante os últimos anos, aquelas pessoas que me viram avançar cada dia e que nunca me deixaram desistir, especialmente aos queridos Marco Aurélio e Rejane, que fazem o seu trabalho com tanto amor e profissionalismo. O auxílio e afeto de muitos foram condições para que eu conseguisse seguir em frente.*

## RESUMO

A conservação do patrimônio genético trouxe a necessidade de novas formas de diagnóstico e tratamento do câncer de pulmão, pelo qual faz-se necessário a coleta e conservação de tecidos frescos, com uma maior qualidade, e que permitam o estudo dos fenômenos moleculares desta patologia. **Objetivo:** Estabelecer um mecanismo estrutural e organizacional para a coleta, preservação, armazenamento, viabilidade e análise molecular de amostras de tecido tumoral pulmonar, tecido pulmonar adjacente saudável e sangue: provenientes de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão. **Metodologia:** O projeto foi realizado como um ensaio piloto clínico experimental longitudinal, prospectivo e não randomizado no qual o mesmo indivíduo é estudado em seu perfil genético e molecular através de diferentes amostras coletadas. A seleção da amostra foi feita por conveniência, não probabilística, não aleatória e intencional, em três protocolos com diferentes momentos de coleta, conservação e armazenamento, relacionados com a data da cirurgia e com diferentes criopreservantes e meios de cultura: protocolo 1: 200µl solução salina NaCl 0,9 % / 20µl soro fetal bovino e 200µl RNALater, protocolo 2: com 300µl PBS e 200µl RNALater, e protocolo 3: 4ml de RPMI 1640 e 200µl RNALater. Foram coletados a fresco 20ml de sangue periférico, duas amostras de tecido tumoral de pulmão, duas amostras de tecido adjacente de pulmão saudável, e linfonodo mediastinal dos pacientes estudados e criopreservadas a -80°C. **Resultados:** Os tumores coletados no estudo foram adenocarcinoma (69%), carcinoma indiferenciado (19%) e carcinoma epidermoide (12%), de um total de 16 pacientes. As amostras de sangue periférico foram conservadas como soro e plasma a -80°C, e realizada imunofenotipagem com citometria de fluxo em sangue periférico a fresco. Com as amostras de tumor, criopreservadas por onze meses em solução salina NaCl/SFB e RNALater, e por três meses em RPMI 1640 obtivemos linhagem celular com a dissociação celular do tecido tumoral demonstrando a viabilidade das amostras. A funcionalidade das amostras de tumor conservadas a fresco em RPMI 1640 demonstrou a presença de marcadores imunofenotípicos relacionados com a presença /ausência dos linfócitos T e B na citometria de fluxo. Não há crescimento da cultura celular em RPMI nas amostras de tumor transportadas no PBS dos 7 pacientes do protocolo 2. **Conclusões:** Um sistema com uma estrutura organizada foi desenvolvido e aperfeiçoado para a coleta, preservação e armazenamento de amostras de sangue, tecido pulmonar saudável, tecido tumoral pulmonar e linfonodal em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas. Demonstramos a viabilidade e funcionalidade das amostras de sangue periférico e tumor de pulmão com a presença dos marcadores imunofenotípicos como CD3, CD4, CD8, CD19, CD26, CD38, CD39 e CD69 ao realizar Imunotipagem com citometria de fluxo, relevantes na predição e prognóstico do câncer de pulmão.

**Palavras-chave:** neoplasias pulmonares; carcinoma de células não pequenas; imunologia; anticorpos.

## ABSTRACT

The conservation of genetic patrimony has brought the need for new ways of diagnosing and treating lung cancer, so it is necessary to resume the collection and conservation of fresh tissues, of higher quality, which allow the study of molecular phenomena of this pathology. **Objective-** To establish a structural and organizational mechanism for the collection, preservation, storage, viability and molecular analysis of samples of lung tumor tissue, healthy adjacent lung tissue and blood: from patients diagnosed with lung cancer. **Methodology-** The project was carried out as a longitudinal, prospective, non-randomized experimental pilot trial in which the same individual is studied in his genetic and molecular profile in different samples collected. Sample selection was done for convenience, non-probabilistic, non-random and intentional; in three protocols with different collection, conservation and storage times, related to the date of surgery; with different cryopreservants and culture mediums, such as: protocol 1: 200µl NaCl 0.9 % saline solution / 20µl bovine fetal serum and 200µl RNALater, protocol 2: with 300µl PBS and 200µl RNALater, and protocol 3: 4ml RPMI 1640 and 200µl RNALater . Were collected in fresh 20ml of peripheral blood, two samples of tumor tissue from lung, two samples of adjacent healthy lung tissue, and one whole lymph node by patients studied; cryopreserved at -80 °C **Results-** The tumors collected in the study were :adenocarcinoma (69%), undifferentiated carcinoma (19%), and squamous cell carcinoma (12%) from a total of 16 patients in the study. Peripheral blood samples were conserved as serum and plasma at -80 °C, and we performed immunophenotyping with cytometry in fresh peripheral blood. With the tumor samples, cryopreserved for eleven months in NaCl/SFB and RNALater saline solution, and for three months in RPMI 1640 we obtained cellular lineage with cell dissociation of the tumor tissue demonstrating the viability of the samples. The functionality of the freshly preserved tumor samples in RPMI 1640 demonstrated the presence of immunophenotypic markers related to the presence/absence of T and B lymphocytes through immunophenotyping with flow cytometry. There is no growth of cellular culture in the tumor samples transported in the PBS of the 7 patients of protocol 2. **Conclusions-** An organized structure mechanism was established for the collection, preservation and storage of blood samples, healthy lung tissue, tumor lung tissue and lymph node in patients with non-small cell carcinoma. We demonstrated the viability and functionality of peripheral blood and lung tumor samples with the presence of immunophenotypic markers such as CD3, CD4, CD8, CD19, CD26, CD38, CD39 and CD69 by performing Immunotyping with flow cytometry, relevant in the prediction and prognoses of lung cancer.

**Keywords:** lung neoplasms; non-small cell carcinoma; immunology; antibodies

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	- Vacutainer A sem EDTA e Vacutainer B com EDTA-	9
<b>Figura 2</b>	- Eppendorf 0,5ml para armazenagem de plasma e soro.	10
<b>Figura 3</b>	- Caixa para armazenagem de tubos criogênicos e tubos eppendorf.	10
<b>Figura 4</b>	- Centrífuga	10
<b>Figura 5</b>	- Ponteiras P1000 e P200 com barreira Danasse e RNA free	11
<b>Figura 6</b>	- Pipetas volumétricas de volume variável	11
<b>Figura 7</b>	- Vacutainers com sangue centrifugado	12
<b>Figura 8</b>	- Vacutainer de sangue com EDTA restante refrigerado	13
<b>Figura 9</b>	- Bisturi com cabo	13
<b>Figura 10</b>	- Mesa auxiliar cirúrgica com pano estéril	14
<b>Figura 11</b>	- Bandeja estéril	14
<b>Figura 12</b>	-Pinça anatômica reta	14.
<b>Figura 13</b>	- Agulha fina estéril	15.
<b>Figura 14</b>	- Luvas estéreis	15
<b>Figura 15</b>	- Caixa para transporte das amostras biológicas	15
<b>Figura 16</b>	- Garrafa térmica para nitrogênio líquido	16
<b>Figura 17</b>	- Agulhas de Punção (biópsia por saca-bocado) de tecidos	16
<b>Figura 18</b>	- Tubos criogênicos para coleta de tecido	17
<b>Figura 19</b>	- Cubeta para quadros de gelo	17
<b>Figura 20</b>	- Material para lavado das amostras	18
<b>Figura 21</b>	- Óculos de proteção	18
<b>Figura 22</b>	- Tubo Falcon de 15ml	18
<b>Figura 23</b>	- Dissociação do tumor em S. Salina e RNALater após onze meses em crioconservação.	22.
<b>Figura 24</b>	- Amostras armazenadas	24
<b>Figura 25</b>	- Dissociação do tumor em RPMI 1640 e RNALater após três meses de crioconservação	26
<b>Figura 26</b>	- Agulha fina para Biópsia transtorácica de 18ga x 15 cm	27
<b>Figura 27</b>	- Pulmão de ovelha, 6 perfurações com agulha fina transtorácica	28.

<b>Figura 28</b>	-Biopsia por punção com agulha de pele de 5mm	29
<b>Figura 29</b>	-Duas amostras de punção com agulha de biópsia de pele de 3mm	29
<b>Figura 30</b>	-TC de Tórax paciente codificação 18-01-15/06	32
<b>Figura 31</b>	-TC de Tórax paciente codificação 18-02-20/06	34
<b>Figura 32</b>	-TC de Tórax paciente codificação 18-03-13/09	35.
<b>Figura 33</b>	-TC de Tórax paciente codificação 18-04-27/09	37
<b>Figura 34</b>	-TC de Tórax do paciente codificação 18-01-09/11	39
<b>Figura 35</b>	-TC de Tórax do paciente codificação 18-02-15/11	41
<b>Figura 36</b>	-TC de Tórax de paciente codificação 18-03 -07/12	42
<b>Figura 37</b>	- TC de Tórax de paciente codificação 19-04-04/01	43
<b>Figura 38</b>	-TC de Tórax de paciente codificação 19-05-18/01	45
<b>Figura 39</b>	-TC de Tórax de paciente codificação 19-06-01/02	46
<b>Figura 40</b>	- TC de Tórax de paciente codificação 19-07-13/03	48
<b>Figura 41</b>	-TC de Tórax de paciente codificação 19-01-17/04	49
<b>Figura 42</b>	-TC de Tórax de paciente codificação 19-02-16/07	51
<b>Figura 43</b>	- TC de Tórax de paciente codificação 19-03-26/07	52
<b>Figura 44</b>	- TC de Tórax de paciente codificação 19-04-09/10	54
<b>Figura 45</b>	- TC de Tórax de paciente codificação 19-05-23/10	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	-Localização Tumoral	58
<b>Tabela 2</b>	-Métodos utilizados para o diagnóstico histológico	58
<b>Tabela 3</b>	-Complicações pós-operatórias	59
<b>Tabela 4</b>	-Complicações pós-operatórias por tipo de cirurgia feita	59
<b>Tabela 5</b>	Resultados de Imunofenotipagem por Citometria de fluxo em sangue. Paciente 19-04-09/10	61
<b>Tabela 6</b>	-Resultados de Imunofenotipagem por Citometria de fluxo em tumor. Paciente 19-04-09/10	61
<b>Tabela 7</b>	-Resultados de Imunofenotipagem por Citometria de fluxo em sangue. Paciente 19-05-23/10	62
<b>Tabela 8</b>	-Resultados de Imunofenotipagem por Citometria de fluxo em tumor. Paciente 19-05-23/10	62
<b>Tabela 9</b>	-Imunofenotipagem com Citometria de fluxo em sangue de paciente 19-03-26/07	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **A** - Tecido sadio
- **ACS** - Sociedade Americana do Câncer
- **ADP** - Difosfato de Adenosina
- **AMP** - Monofosfato de Adenosina
- **ARN** - Ácido ribonucleico
- **ATP** - Trifosfato de Adenosina
- **CD** - Cluster de diferenciação
- **CD4** - Agrupamento de diferenciação 4, glicoproteína, imunoglobulina
- **CD8** - Agrupamento de diferenciação 8, glicoproteína
- **CD19** - Agrupamento de diferenciação 19, Antígeno B-lymphocyte CD19
- **CD26** - Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), proteína 2 complexadora a da adenosina desaminase 2 (anticorpo monoclonal)
- **CD39** - Difosforilase-1 trifosfato ectonucleósido trifosfato ou ENTPD1, (agrupamento de diferenciação 39).
- **CD69** - Proteína da lectina transmembrana humana do tipo C codificada (agrupamento de diferenciação 69)
- **CD73** - .5'-nucleotidase ou ecto-5'-nucleotidase, enzima
- **CPNPC** - Câncer pulmão não pequenas células
- **CTL** - Linfócitos T Citotóxicos
- **DMSO** - Sulfóxido de dimetil ou dimetil sulfóxido
- **DNase** - . Desoxirribonuclease, enzima
- **DPOC** - Doença pulmonar obstrutiva crônica
- **DPP4** - Dipeptidil peptidase 4
- **EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético
- **FoxP3** - Proteína da família FOX
- **G** - Linfonodo
- **HIV** - Vírus da imunodeficiência humana
- **HSA** - Hemorragia subaracnóidea

<b>-IL-10</b>	- Interleucina 10
<b>-INCA</b>	- Instituto Nacional de Câncer
<b>-LB</b>	-Linfócitos B
<b>-NaCl</b>	-Cloreto de sódio
<b>-NSCLC</b>	-Câncer de pulmão de não pequenas células (inglês)
<b>-NK</b>	- Célula assassina natural (linfócito)
<b>-OCDE</b>	- Organização Cooperação e Desenvolvimento Económico
<b>- P</b>	- Plasma
<b>- PBS</b>	- Solução salina tamponada com fosfato
<b>-Pet-ct</b>	- Tomografia computadorizada por Emissão de Pósitrons
<b>-RNA free</b>	- RNA isento
<b>-RNALater</b>	-Solução de estabilização da RNA
<b>-RPMI 1640</b>	- Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>- S</b>	- Soro
<b>- SFB</b>	-Soro fetal bovino
<b>- T</b>	-Tumor
<b>- TC</b>	- Tomografia computadorizada
<b>-TCR</b>	- Receptor linfócitos T
<b>- TNM</b>	-Sistema de estadiamento tumoral
<b>-UFRGS</b>	-Universidade federal de Rio Grande do Sul
<b>-VAP</b>	-Vias aéreas e pulmão

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 - Introdução. Fundamentos teóricos da investigação</b>	.1
1.1- Descrição da realidade problemática.	.1
1.2- Definição do problema	1
1.3- Marco Conceitual e Histórico	.2-3
1.4- Justificativa e referencial teórico	.4
1.5- Objetivos	.6
<b>Capítulo 2 - Metodologia</b>	.7
2.1- Tipo de inquérito	.7
2.2- Área de investigação	.7
2.3- População e critérios de inclusão	7
2.4- Identificação de variáveis de pesquisa	.7
2.5- Amostras	8
2.6- Desenho da investigação	8
2.7- Técnicas e ferramentas de coleta, tratamento e análise de dados.	.9
Interpretação dos dados	
2.8- Limitações do estudo	.26
2.9- Aspectos éticos	.30
<b>Capítulo 3 - Apresentação, análise e interpretação dos resultados.</b>	.31
3.1-Biomarcadores relacionados à imunomodulação de linfócitos B e T em pacientes com carcinoma pulmonar de não pequenas células.	60
3.2--Discussão	64
<b>Capítulo 4- Conclusões</b>	.68
<b>Capítulo 5- Referências Bibliográficas</b>	69
<b>Capítulo 6- Apêndices</b>	73

## 1-INTRODUÇÃO

### 1.1- Descrição da realidade problemática

### 1.2- Definição do problema

O câncer do pulmão é um grande problema de saúde global, devido à sua elevada frequência e distribuição. Esta doença atinge ambos os sexos, e atualmente afeta pacientes cada vez mais jovens. O câncer do pulmão apresenta altas taxas de mortalidade globalmente, devido muito provavelmente ao diagnóstico tardio ou à falta de resposta ao tratamento. Treze por cento dos cânceres do pulmão são diagnosticados como pequenas células, e 84% como células não pequenas. A American Cancer Society (ACS) estima que, para 2020, cerca de 228 820 novos casos de câncer do pulmão serão diagnosticados nos Estados Unidos (116 300 homens e 112 520 mulheres), e cerca de 135 720 pessoas morrerão dessa doença (72 500 homens e 63 220 mulheres). A probabilidade de um homem contrair câncer de pulmão durante a sua vida é de 1 em 15; para uma mulher, o risco é de 1 em 17. Os homens negros são 15% mais propensos a terem câncer de pulmão do que os homens brancos, e têm menos probabilidades de adquirirem câncer de pulmão de pequenas células. A taxa de incidência dessa doença é cerca de 14% mais baixa nas mulheres negras do que nas mulheres brancas.

(1)

No Brasil no Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência estimada para cada ano do triênio 2020-2022, é 17.760 casos novos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,99 casos novos a cada 100 mil homens e 11,56 para cada 100 mil mulheres de novos casos de câncer de pulmão. Ocupa segundo lugar entre os homens e o terceiro entre as mulheres, com exceção do melanoma. As regiões com maior incidência de câncer de pulmão são nas Regiões Sul (31,07/100 mil) com predomínio de São Paulo e Rio Grande do Sul e Nordeste (11,01/100 mil), o que pode estar associado ao desenvolvimento econômico destas regiões, maior poluição atmosférica e o aumento do poder de compra da população, permitindo o aumento do consumo de tabaco em idades mais precoces da vida. (2)

Autoridades governamentais têm trabalhado políticas públicas que promovem a adoção de comportamentos e estilos de vida saudáveis baseados em ambientes livres de tabaco e a proibição de propagandas que promovam o consumo do tabaco. O diagnóstico precoce da doença ajudaria a aumentar a sobrevida dos pacientes e a reduzir em 50% as

perdas econômicas devidas à incapacidade e à morte prematura, por isso deveria ser considerado a criação de um programa anual de triagem para tabagistas.

### **1.3-Marco Conceitual e Histórico**

#### **Marco Conceitual**

Hoje, as estatísticas globais sobre câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC) o definem como o segundo câncer mais comum entre homens e mulheres. Ele tem origem nas células epiteliais do trato respiratório e é responsável por 14% dos novos casos de câncer de pulmão, representa 85-90% de todas as neoplasias pulmonares, sendo o fumo o maior fator de risco para o seu desenvolvimento. A morbidade e mortalidade por câncer de pulmão de células não pequenas vem diminuindo nos homens, enquanto nas mulheres está aumentando, refletindo uma mudança nas tendências do tabagismo. (1,2).

As opções de tratamento para o CPNPC incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo (que funciona bloqueando os sinais de crescimento das células cancerosas) e imunoterapia concebida para melhorar as defesas naturais do corpo. O prognóstico do câncer de pulmão baseia-se principalmente no estadiamento do TNM, mas esta não é aparentemente homogênea, pois existe um nível considerável de heterogeneidade biológica do tumor, ou seja, uma relação ainda pouco conhecida entre tumor e hospedeiro.

Entretanto, não são conhecidas a etiopatogenia que desencadeia o crescimento celular anormal, assim como as inter-relações genéticas e ambientais responsáveis pelos efeitos dos fatores de risco e os mecanismos de ação contra a resistência às drogas. Toda a resposta é desenvolvida no campo da investigação genômica, o que pressupõe o uso de material biológico.

A coleta de material biológico é o ato de obter amostras biológicas, no habitat natural de um indivíduo. A amostra biológica é uma fração de um biospecimen (tecido, sangue, urina), com o propósito de estudar um tecido, um órgão ou um organismo inteiro, já que fornecem informações sobre a biologia do indivíduo e da doença. A coleta de material biológico pressupõe que ela seja identificada, bem classificada, organizada e sistemática.

Os padrões internacionais sobre o uso de material biológico distinguem três modelos básicos para a coleta de amostras humanas e dados relacionados para a pesquisa biomédica: amostra para um projeto de pesquisa, coleta para uma linha de pesquisa e biobanco.

## Marco histórico

As origens da preservação dos tecidos remontam ao século XIX (1882-1885), quando Sydney Ringer, um farmacêutico inglês, desenvolveu soluções de ringer capazes de garantir as necessidades vitais dos órgãos isolados do corpo, sendo a base da cultura celular. (3,4)

Em 1885, pela primeira vez, Wilhelm Roux, um zoólogo e embriologista alemão, manteve vivas as células embrionárias isoladas do pinto, através do aquecimento de uma solução salina durante vários dias, dando origem a um embrião médio. A influência ambiental também foi estudada no desenvolvimento das células. (3,4)

No século XX, Ross Harrison (1907), médico americano, desenvolveu e aplicou uma metodologia de cultura de tecidos nervosos para estudar o comportamento de células animais livres das restrições impostas pelo ambiente em que elas existem naturalmente sob condições de homeostasia, mas sob o stress de uma experiência laboratorial, tornando-o um pioneiro na cultura de células. Alexis Carrel em 1912, usando as observações de Harrison, desenvolveu um modelo de células cardíacas embrionárias de galinha para cultura, exigindo a troca de nutrientes em cultura que permitia o crescimento das células por períodos ainda mais longos do que o de Harrison. (3,4)

Em 1951, George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem HeLa, que ainda hoje é usada em todo o mundo. (3,4)

A cultura de células dispersas tornou-se mais popularizada nas décadas de 1940 e 1950 impulsionada pela pesquisa de vírus associada à produção em larga escala de vacinas antivirais, e também devido à pesquisa oncológica que revelou uma necessidade crescente de maior conhecimento neste campo.

A atividade dos biobancos desenvolveu-se ao longo de muitos anos ao nível dos serviços de patologia hospitalar de diagnóstico. Em 2003, o projeto sobre o genoma humano concentrou-se em estudos genéticos e moleculares, reforçando a presença do biobanco de tecidos humanos vivos (amostra biológica) para a pesquisa biomédica. Na década atual, principalmente devido aos novos desenvolvimentos tecnológicos, houve a necessidade de amostras biológicas mais viáveis e de maior qualidade, criando biobancos mais específicos, que coletasse, armazenassem e distribuíssem material biológico e dados relacionados.

#### 1.4-Justificativa

As repercussões sociais e econômicas do diagnóstico e tratamento do câncer do pulmão atingiram níveis significativos, tornando-se um problema de saúde devido à sua elevada incidência e letalidade, bem como à sua fraca resposta ao tratamento com agentes quimioterápicos. Associados a isto, os avanços tecnológicos da década atual em relação ao comportamento do genoma humano na busca de um tratamento personalizado que precisam de amostras de maior qualidade são fatores que motivam novas áreas de pesquisa para o câncer de pulmão.

Nosso projeto permite a aquisição de material biológico através da criação de uma metodologia de coleta, armazenamento e desenvolvimento de uma sistemática para análises moleculares e celulares. Sendo assim, a identificação destas variáveis clínicas e moleculares podem ser achados importantes para a previsão, prognóstico e resposta terapêutica do câncer de pulmão. Este estudo futuramente nos permitirá desenvolver um Biobanco de células de tecido pulmonar tumoral e saudável, que ajudaria em estudos do câncer e transplante pulmonar.

#### - Referencial Teórico

A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas, a primeira relacionada à coleta, conservação e armazenamento de tecido tumoral de pulmão e sangue periférico, pois precisamos de tecidos vivos com funcionalidade para desenvolver (3,4,5) a segunda etapa da pesquisa que foi a identificação de biomarcadores relacionados à imunotipagem com citometria em amostras de sangue e tumor e imunomodulação de linfócitos T e B.(6)

Desde o ponto de vista teórico nos auxiliamos, de um artigo brasileiro como (Branchini.G,2011, pág. 42 e 47) (7) que desenvolveu a cultura de células em câncer prostático, pois precisávamos de uma referência da forma estrutural para obter tecidos viáveis. Ambas as pesquisas tinham semelhanças estruturais, como: os dois trabalhamos com explante primário celular do tumor, em humanos, com o objetivo de obter linhas celulares para estudos moleculares. As diferenças entre os estudos foram primariamente o órgão de estudo próstata (epitélio cuboide alto ou pseudoestratificado colunar) e pulmão (epitélio ciliado pseudoestratificado colunar com células caliciformes), eles testaram três meios de cultura diferentes aos nossos: DMEM,199, F12K para a cultura primária, escolhendo o F12K para avaliar ou RNA. Nós dividimos a coleta em três protocolos relacionados com os meios de cultura utilizados, Solução salina de NaCl 0,9% adicionado SFB, PBS, RNALater e RPMI

1640, com o objetivo de obter o meio ideal para estabelecer um protocolo para coleta e armazenamento de amostras viáveis de tecido tumoral pulmonar e do sangue periférico para identificar biomarcadores relacionados com a imunomodulação de linfócitos T e B nas amostras obtidas por Imunofenotipagem por Citometria..

## 1.5- OBJETIVOS

### Objetivos Gerais

- Estabelecer um mecanismo estrutural e organizacional para a coleta, preservação e armazenamento e viabilidade de amostras de tecido tumoral pulmonar, tecido pulmonar adjacente saudável e sangue: provenientes de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão.

### Objetivos Específicos

- Sistematizar o processo de coleta, processamento e armazenamento de amostras de tecido tumoral pulmonar, tecido pulmonar saudável adjacente e sangue, com características de viabilidade para futuras pesquisas biomédicas.
- Estabelecer um programa de treinamento para adequação técnica do pessoal envolvido na captação da amostra biológica.
- Demonstrar a viabilidade das amostras com resultados de estudos de imunomodulação de linfócitos B e reguladores T em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPNPC).
- Investigar a relevância dos marcadores imunofenotípicos CD26, CD28, CD39 e CD73 para o prognóstico da CPNPC.
- Investigar possíveis biomarcadores relacionados à imunomodulação de linfócitos B e T em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPNPC).

## 2 – METODOLOGÍA

### 2.1- Tipo de inquérito

### 2.2- Área de investigação

Nosso projeto foi desenvolvido em colaboração com o Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, concebido como um ensaio piloto clínico experimental longitudinal, prospectivo e não randomizado no qual o mesmo indivíduo é estudado em seu perfil genético e molecular em diferentes amostras coletadas. A seleção da amostra foi feita por conveniência, não probabilística, não aleatória e intencional; em diferentes momentos da coleta relacionados à data da cirurgia. Por se tratar de um estudo piloto, considerando uma população de 300 pacientes diagnosticados com neoplasia pulmonar primária (CPNPC) tratados no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre os quais 50 lobectomias são realizadas por ano, foram selecionados 16 pacientes no total.

### 2.3- População e critérios de inclusão

Crítérios de inclusão – foram incluídos pacientes com diagnóstico de câncer primário de pulmão de células não pequenas que foram submetidos a tratamento cirúrgico para a neoplasia.

### 2.4- Identificação de variáveis de pesquisa

As variáveis do estudo foram agrupadas naquelas relacionadas ao paciente, sendo: sexo, raça, idade (35 a 60 anos e mais de 60 anos), tabagismo ou drogadição, antecedentes patológicos pessoais, diagnóstico pré e pós-operatório, tratamento cirúrgico envolvido, realização de exames complementares para o diagnóstico (tomografia computadorizada, Pet-ct, imuno-histoquímica, espirometria, difusão), complicações pós-cirúrgicas e o tempo entre diagnóstico da neoplasia e a cirurgia, assim como características visuais da peça tumoral extraída. As variáveis relacionadas à coleta de amostras: tempo de anestesia; tempo de coleta de sangue; tempo de centrifugação do sangue; quantidade de soro e plasma coletados, tempo de coleta de tecido, quantidade e tipo do tecido coletado em relação ao criopreservante utilizado e tempo de congelamento do tecido. Os resultados destas variáveis foram colocados num banco de dados, onde foram criados tabelas e gráficos com os resultados.

## 2.5- Amostras

As amostras a coletadas em cada paciente foram 20ml de sangue periférico, tecido pulmonar adjacente saudável e tecido tumoral pulmonar (ambos tecidos em quantidade e tamanho variável).

Para melhor compreensão do estudo, nós organizamos a coleta do material e os resultados em base aos protocolos desenvolvidos:

A- Protocolo de coleta e armazenagem do sangue periférico

B- Protocolo de coleta e armazenagem de tecidos pulmonares: separados em três protocolos relacionados com o criopreservante utilizado

1-Conservação e armazenagem das amostras de tecido pulmonar adjacente sadio, tecido tumoral de pulmão e linfonodo, em Solução salina NaCl 0,9 % mais soro fetal bovino (congelação rápida) em nitrogênio líquido e conservação e armazenagem das amostras em RNA Later (congelação lenta).

2- Conservação da amostra de tecido tumoral a fresco em PBS e conservação das amostras de tecido tumoral pulmonar, tecido de pulmão adjacente sadio e linfonodo em RNALater.

3- Conservação da amostra de tecido tumoral em fresco em RPMI 1640 e conservação das amostras RNALater de tecido tumoral pulmonar, tecido pulmonar adjacente sadio e linfonodo.

## 2.6- Desenho da investigação

Diagrama de fluxo de trabalho

- Participação das reuniões às terças-feiras pela manhã no serviço da Cirurgia Torácica para definição dos pacientes que seriam submetidos ao tratamento cirúrgico no dia seguinte, incluímos no estudo aqueles com diagnóstico de tumor pulmonar primário e sendo identificado por número do prontuário.
- A partir do prontuário coletamos os dados pessoais do paciente, os antecedentes patológicos pessoais e familiares, os exames realizados para o diagnóstico e tratamento da patologia e seus resultados, incorporando-os em nosso banco de dados.

- Na véspera da cirurgia (geralmente às terças e quintas-feiras), no laboratório de vias aéreas e pulmão (VAP), foram preparados os materiais que utilizamos para coleta no centro cirúrgico como: tubos criogênicos e tubos coletores de sangue, que foram identificados com uma caneta permanente com o código do paciente (ano, número do paciente na coleta e dia/mês do tratamento cirúrgico).
- Depois, normalmente entre as 13h e as 17h, foi explicado para os pacientes na enfermaria do hospital sobre o projeto, solicitando sua participação, leitura e assinatura no termo de consentimento informado. No caso do paciente internado à tarde, a entrevista foi realizada após às 17 horas.
- No dia seguinte, o material biológico foi coletado na sala do bloco cirúrgico

## 2.7- Técnicas e ferramentas de coleta, tratamento e análise de dados. Interpretação de dados.

### Coleta sangue periférica. Material utilizado na coleta de amostras de sangue

- 5 Vacutainer de 4 ml cada, para coleta de sangue, 2 sem EDTA (tampa vermelha), e 3 com EDTA (tampa roxa) que foram utilizados na coleta de 20ml de sangue do paciente. Os vacutainer rotulados com codificação do paciente.



A



B

**Figura 1 Vacutainer sem EDTA**

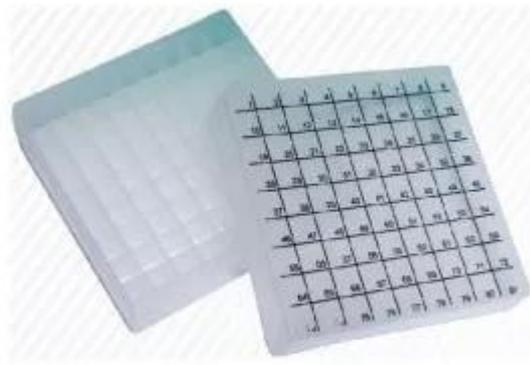
**Vacutainer com EDTA**

- 6 Eppendorf estéreis 0,5 ml cada, 3 para armazenamento de soro (etiquetagem **S** e codificação do paciente) e 3 para armazenamento de plasma (etiquetagem **P** e codificação do paciente) após centrifugação.



**Figura 2- Eppendorf 0,5ml para armazenagem de plasma e soro**

- 2 caixas para o armazém do material coletado, rotuladas com o nome dos pesquisadores o número do projeto.



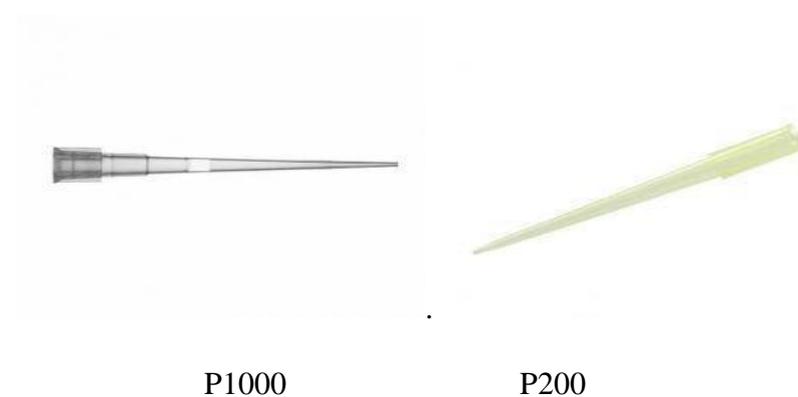
**Figura 3- Caixa para armazém de tubos criogênicos e tubos eppendorf**

-Centrifugação da coleta sanguínea no laboratório experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



**Figura 4- Centrifuga usada na coleta de sangue**

-Ponteiras P1000 e ponteiras P200 com barreira DNase e RNA free para extrair soro e plasma



**Figura 5- Ponteiras com barreira DNase e RNA free.**

-Pipetas volumétricas de volume variável para líquidos, os meios de conservação utilizados na coleta foram medidos (RNALater, Soro Fisiológico, Soro fetal bovino).



**Figura 6- Pipetas volumétricas de volume variável**

### **Protocolo de Coleta sanguínea**

- Entre às 8:00 e as 9:30h, na sala cirúrgica foram coletados 20 ml de sangue periférico dos pacientes, em 5 vacutainer de 4 ml cada um, 3 vacutainer com EDTA (tampa roxa) e 2 vacutainer sem EDTA (tampa vermelha); previamente rotulados com a codificação do paciente. O sangue foi coletado pelo anestesista após anestesia e

acesso venoso profundo. Registramos na tabela de dados para cada paciente a hora da anestesia e a hora de coleta de sangue.

- Após a coleta os tubos foram invertidos para garantir a homogeneização do sangue com o EDTA (anticoagulante).
- No protocolo SF/SFB coletamos o sangue em 4 vacutainer (2 com EDTA, 2 sem EDTA) e centrifugamos entre 15-20 minutos após da extração do sangue
- Nos protocolos PBS/RNALater e RPMI 1640/RNALater, 1 vacutainer de sangue com EDTA não foi centrifugado e mantido em gelo na sala cirúrgica, sendo logo após colocado na geladeira até ser entregue no Laboratório de Imunobioquímica da UFRGS para fazer estudos de linfócitos no sangue.
- Nos protocolos PBS/ RNALater e RPMI 1640/ RNALater, centrifugamos o sangue dos 4 vacutainer restantes (2 com EDTA e 2 sem EDTA) entre 15-20 minutos após a extração do sangue.
- A centrifugação foi feita a 2500 rpm de velocidade, durante 15 minutos e a 4 graus de temperatura, no laboratório experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

-Sangue centrifugado (com EDTA e sem EDTA) para extrair plasma e soro, após a centrifugação.



**Figura 7 –Vacutainers com sangue centrifugado.**

- Dos 2 vacutainers sem EDTA (tampa vermelha), o soro foi extraído e armazenado em eppendorf de 0,5ml previamente etiquetado com o código do paciente e letra S. O restante do sangue que estava no vacutainer foi descartado. Outros 3 eppendorf (quantidade mínima) foram armazenados no freezer a - 80 graus com soro extraído no laboratório VAP.

- Dos 2 vacutainer com EDTA centrifugados (tampa roxa), extraímos o plasma sanguíneo e armazenamos em 3 eppendorf de 0,5ml (quantidade mínima coletada) previamente marcados com o código do paciente e a letra P (plasma), assim também os vacutainer com o resto do sangue previamente rotulados com a codificação do paciente foram armazenados no freezer a -80 graus no laboratório VAP.

-Vacutainers (EDTA) com sangues restantes após a separação do plasma, refrigerados a temperaturas de – 80 graus no Laboratório VAP, rotulados com codificação do paciente.



**Figura 8-Vacutainer de sangue com EDTA restante refrigerados a -80 graus**

Na sala do bloco cirúrgico, foi preparada uma mesa auxiliar estéril para realizar a coleta de tecido, a qual foi realizada entre às 1030h e 1130h.

**Coleta de tecidos pulmonares. Material utilizado na coleta de amostras de tecidos pulmonares.**

- Bisturi estéril para cortar tecidos



**Figura 9 - Bisturi com cabo**

-Mesa auxiliar cirúrgica com pano estéril:



**Figura 10- Mesa auxiliar cirúrgica com pano estéril**

-Cubeta estéril de apoio para a peça cirúrgica extraída



**Figura 11-Bandeja estéril**

- Pinça anatômica reta estéril de uso geral



**Figura 12 -Pinça anatômica reta**

-Agulha fina estéril para retirar pequenos resíduos de tecido



**Figura 13- Agulha fina estéril**

- Um par de luvas esterilizadas



**Figura 14- Luvas esterilizadas**

- Caixa para transporte das amostras de tecidos tumoral pulmonar, sadio e linfonodo.



**Figura 15- Caixa de isopor para transporte das amostras biológicas**

- Garrafa térmica com nitrogênio líquido de 1/2 litro (no protocolo SF-SFB)



**Figura 16–Garrafa térmica para nitrogênio líquido**

- 1 agulha grossa estéril de punção (saca-bocado) de pele de 3mm de diâmetro para biópsia do tecido tumoral e 1 agulha grossa estéril de punção (saca-bocado) de pele de 5mm de diâmetro para biópsia do tecido sadio.

- **Agulha de punção de pele de 5 mm**



- **Agulha de punção de pele de 3 mm**



**Figura 17-Agulhas para biópsia de punção de pele usadas no tecido pulmonar**

-Crio tubos esterilizados de 2 ml cada, com tampa amarela, laranja, azul ou vermelha, rotulados com o código do paciente, e a letra G (linfonodo), a letra T (tumor) e a letra A (tecido saudável) em relação ao tecido nele armazenado, também rotulado como o nome do meio de cultura que possui (SS-RNA). A quantidade de crio tubo estava relacionada com o protocolo de coleta realizado, que estará detalhado mais adiante.



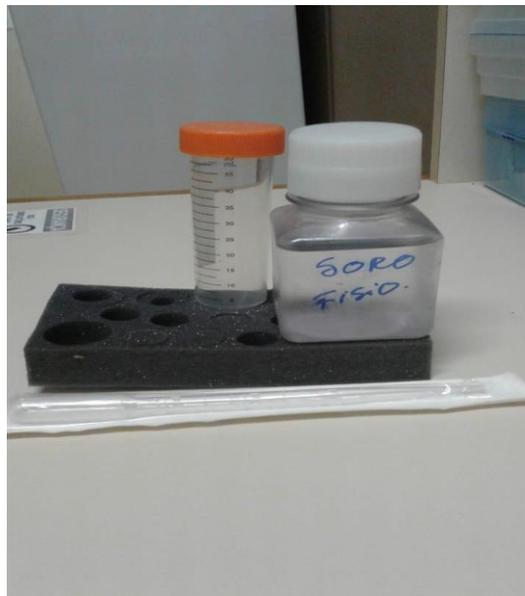
**Figura 18- Tubos criogênicos para coleta de tecido**

-Cubeta com gelo para conservar amostras refrigeradas na sala cirúrgica.



**Figura 19- Cubeta para cubos de gelo**

-Materiais para lavagem das amostras. Pipeta Pasteur estéril, Becker estéril e frasco com Soro fisiológico NaCl 0,9%



**Figura 20-Material para lavagem das amostras**

-Óculos de proteção.



**Figura 21 – Óculos de proteção**

- Tubo Falcon de 15 ml



**Figura 22- Tubo Falcon de 15 ml**

**Coleta e armazenagem de tecidos.**

A coleta, conservação e armazenagem dos tecidos foi dividida em três protocolos, cada um com diferentes criopreservantes e meios de cultura a fresco (PBS e RPMI 1640), para congelamento rápido (solução salina/ SFB) e para congelamento lento o conservam-te RNALater nos três protocolos.

A coleta do material foi realizada durante o ato cirúrgico, independente da técnica cirúrgica empregada (ressecção em cunha segmentectomia ou lobectomia). Após a retirada da peça cirúrgica, as amostras foram coletadas e divididas em: tecido pulmonar adjacente sadio, tecido tumoral de pulmão e linfonodo. Nos tumores com tamanho menor que 1cm a coleta das amostras foi realizada pelo cirurgião ou pelo médico patologista, evitando danos à estrutura anatômica do tumor. Isto ocorreu naqueles casos em que se realizou biópsia por congelamento para o diagnóstico durante o procedimento cirúrgico.

**1-Protocolo de coleta e conservação dos tecidos em Solução Salina Na CL 0,9% com soro fetal bovino em nitrogênio líquido (congelamento rápida) e em RNALater (congelamento lenta)**

Os crio tubos foram esterilizados e rotulados na tampa e dorso com a codificação do paciente, letra que identifica o tecido coletado (A-tecido sadio, T-Tumor, G-linfonodo) e o criopreservante em seu interior (SS – solução salina e RNA- RNALater)

A coleta foi realizada com duas formas de preservação: a congelamento rápida das amostras utilizou como criopreservante a solução salina NaCl 0,9% (200µl) adicionado a 20µl de soro fetal bovino (10%) previamente resfriado a 4°C de temperatura, em cada crio tubo de 2 ml esterilizado com tampa azul. Para a congelamento lenta, foi utilizado RNALater (200µl) como criopreservante dos tecidos, para cada crio tubo de 2 ml esterilizado com tampa laranja.

Neste protocolo foram incluídos 4 pacientes.

O primeiro tecido coletado foi linfonodo, que uma vez amostra lavada com solução salina, uma de suas metades cortada com bisturi foi colocada em um crio tubo com letra G na tampa azul com 200µl de solução salina NaCl 0,9% / 20ug SFB e colocado em uma garrafa térmica com meio litro de nitrogênio líquido. A outra metade foi colocada em um crio tubo

de letra G e tampa laranja, com 200µl de RNALater e colocado em uma cubeta com gelo. Ambas amostras foram armazenadas no laboratório de Vias aéreas e Pulmão.

Após a coleta dos linfonodos (aproximadamente uma hora) já estava disponível a peça cirúrgica. A seguir, foi realizada a biópsia por punção do tecido tumoral (saca-bocado) com agulha de punção de pele de 3mm de diâmetro (tamanho de cada amostra aproximadamente 3mm ) e lavada a amostra com soro fisiológico e colocada em crio tubo com letra T em tampa azul com 200µl de solução salina NaCl 0,9% / 20µl SFB e inseridas em garrafa térmica com meio litro de nitrogênio líquido; a outra amostra de tumor após de ser lavada com soro fisiológico foi colocada em crio tubo com letra T em RNALater 200µl e congelada em cubeta com gelo. Naqueles casos onde o tumor foi maior de 2cm foram coletadas mais de duas amostras para cada criopreservante. Ambas amostras foram armazenadas no laboratório de Vias aéreas e Pulmão.

Na mesma peça cirúrgica foram retiradas duas amostras de tecido pulmonar sadio adjacente e distante do leito tumoral. Procedia-se a biópsia por punção (saca-bocado) com agulha para punção de pele de 5mm de diâmetro (tamanho de cada amostra aproximadamente 5mm), e lavagem com soro fisiológico. Uma das amostras foi inserida em crio tubo com letra A e tampa azul, com solução Salina NaCl 0,9% 200µl /SFB 20µl para congelamento rápido em garrafa térmica com meio litro de nitrogênio líquido. A outra amostra foi inserida no crio tubo com tampa laranja com letra A e dorso rotulado com letra A e RNA, com RNALater 200µl para ser congelada em cubeta de gelo (congelação lenta). Ambas amostras foram armazenadas no laboratório de Vias Aéreas e Pulmão.

As amostras conservadas em RNALater de tumor, linfonodo e tecido pulmonar sadio, foram mantidas por 24 horas na geladeira a 4°C. No dia seguinte foi retirado o sobrenadante do RNALater e armazenado em freezer a -80°C em caixa rotulada com o número do projeto e nome do pesquisador. Enquanto isso, as amostras preservadas em solução salina NaCl 0,9% /SFB foram retiradas do nitrogênio líquido (descartando-o) e armazenadas em freezer a -80 °C temperatura no mesmo dia da coleta.

O objetivo deste protocolo foi definir a qualidade das amostras conservadas durante onze meses, de tecido tumoral pulmonar, assim como avaliar a qualidade do criopreservante usado para manter o tecido tumoral viável. Para isto realizamos testes de dissociação ou desagregação celular (realizado o teste de dissociação para apenas um paciente).

A suspensão celular ou separação celular de amostras de tecidos tumorais (tecidos sólidos) foi realizada através do processo chamado **dissociação ou desintegração celular**. Esse processo depende da **natureza da amostra e seu estado de preservação**. A dissociação celular continua sendo o maior obstáculo na preparação das amostras para citometria de fluxo; no caso de tecidos sólidos de organismos pluricelulares as células estão intimamente ligadas na matriz extracelular com pouco material intercelular o que dificulta sua desintegração (tecidos epiteliais). (8,9,10,11)

#### Técnica de Dissociação ou Desintegração celular do tecido pulmonar tumoral

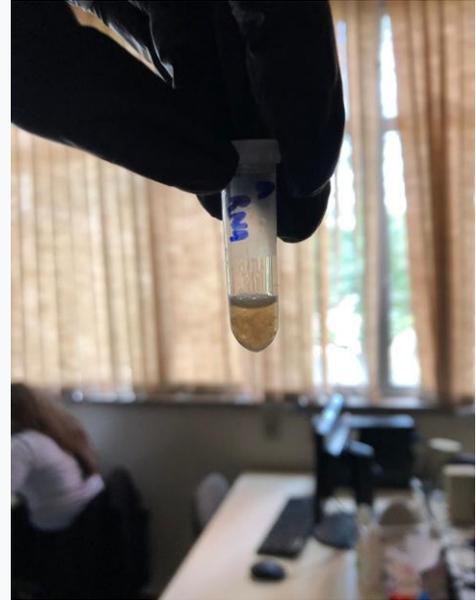
O tecido tumoral foi cortado com auxílio de um bisturi, descartando as zonas de necroses tumoral. O tecido tumoral foi homogeneizado por digestão enzimática com auxílio de pipeta Pasteur e Colagenase IV (colocando 2 ml por eppendorf): Deixado 3 horas em agitação a 37°C, passando delicadamente no vortex a cada hora; após 3 horas, foi centrifugado a 200 rpm por um minuto. A seguir, o sobrenadante foi separado do centrifugado e filtrado em filtro BD 40 µm em Falcon de 50 ml (adicionar 10 ml de PBS); Homogeneizado e transferido para Falcon de 15 ml; Centrifugado a 1200 rpm por 6 min; ressuspender o pellet com cerca de 10 ml de PBS e finalmente separado o sobrenadante do centrifugado.

#### Primeiro teste de dissociação

**Paciente 18-03-13/09.** Dissociação após de onze **meses** de conservação das amostras em solução salina Na CL 0,9% / SFB e RNALater - 80°C de temperatura. Adenocarcinoma in situ, predomínio lepidico (vidro fosco). Feminina. Branca



Solução salina Na CL 0,9%mais SFB



RNALater

**Figura 23-Dissociação de tumor aos Onze meses de crio conservação**

Foi observada desagregação celular ou obtenção de suspensão celular após de conservar por onze meses a  $-80^{\circ}\text{C}$  temperatura o tecido tumoral pulmonar, isto indica uma excelente qualidade da amostra crio preservada e do meio para manter amostra, neste caso: solução salina Na CL 0,9% mais SFB e o RNALater.

**2-Protocolo de conservação da amostra de tecido tumoral de pulmão a fresco em PBS e conservação das amostras de tecido tumoral de pulmão, tecido pulmonar adjacente sadio e linfonodo em RNALater.**

Os crio tubos foram esterilizados e rotulados na tampa e no dorso com a codificação do paciente, letra que identifica o tecido coletado (A-tecido sadio, T-tumor, G-linfonodo) e o criopreservante em seu interior (PBS e RNAL).

Trabalhamos nosso segundo protocolo com a conservação do tecido tumoral de pulmão a fresco em  $300\ \mu\text{l}$  de PBS (solução salina tamponada com fosfato) em tubo falcon de 15ml, previamente esterilizado e rotulado com codificação do paciente e abreviatura PBS (preparado o PBS no laboratório da Imunobioquímica da UFRGS). E a conservação em  $200\ \mu\text{l}$  RNALater do tecido tumoral de pulmão, tecido pulmonar adjacente sadio e linfonodo, em 3 crio tubos de 2ml cada um, estéreis, com tampa amarela, previamente rotulados com as letras do tecido a conservar (A, T, G), codificação do paciente, e abreviatura RNAL. Neste protocolo participaram 7 pacientes.

O primeiro tecido coletado foi linfonodo, extraído a amostra diretamente pelo cirurgião, e que uma vez lavado com soro fisiológico foi colocado em crio tubo de 2ml esterilizado e rotulado com letra G na tampa amarela, e dorso letra G e RNAL e codificação do paciente. O frasco com 200µl de RNALater foi colocado em cubeta térmica com gelo. A amostra foi armazenada no laboratório de VAP.

Após a coleta do linfonodo (aproximadamente uma hora) já estava disponível a peça cirúrgica. A seguir, foram realizadas duas biópsias por punção do tecido tumoral (sacabocado) com agulha de punção de pele de 3mm de diâmetro (tamanho de cada amostra aproximadamente 3mm ) e lavada a amostra com soro fisiológico e colocada em crio tubo com letra T em tampa amarela e o dorso rotulado com RNAL e codificação do paciente, com frasco que continha 200µl de RNALater e depois colocado em cubeta com gelo. A outra amostra de tumor após de ser lavada com soro fisiológico foi colocada em 300µl de PBS em tubo Falcon de 15ml previamente rotulado com codificação do paciente e abreviatura PBS, que foi colocada em cubeta com gelo, que logo foi entregue ao Laboratório da Imunobioquímica da UFRGS, para realizar a cultura celular do tecido tumoral em RPMI 1640.

Posteriormente, foi retirada uma amostra de tecido pulmonar sadio por biópsia por punção com agulha de pele de 5mm de diâmetro (tamanho de cada amostra aproximadamente 5mm). Uma vez lavada com soro fisiológico a amostra foi imersa em crio tubo esterilizado de 2ml com letra A em tampa amarela e dorso rotulado com codificação do paciente e RNAL, com 200µl RNALater para congelar em cubeta de gelo

A amostra tumoral em PBS foi transportada em cubeta de gelo e entregue no Laboratório da Imunobioquímica processado para realizar cultura primária em RPMI 1640. As amostras preservadas em RNALater de tecido tumoral de pulmão, tecido sadio pulmonar e linfonodo foram conservadas na geladeira a 4°C temperatura por 24 horas. Após este período o sobrenadante de RNALater foi descartado e armazenado em freezer a -80°C temperatura.

Não foi realizada cultura celular primária em RPMI 1640 das 7 amostras de tecido tumoral criopreservadas em PBS, por perda da viabilidade do tecido tumoral. Nestes casos descartamos a possibilidade que o coletor das amostras fosse o responsável pelo perda da viabilidade das amostras, pois as mesmas foram coletadas por 3 profissionais diferentes

(cirurgião, patologista e pesquisador), pois as biópsias por congelação e as biópsias do tumor de tamanho menor de 1 cm foram feitas por estes profissionais). Além disso, não foi observado crescimento bacteriano. Esta falha poderia estar relacionada com a precipitação dos sais de fosfato e de outros sais como Na CL que compõem o PBS pelas mudanças de temperatura (transição da temperatura ambiente a refrigerada). Se conhece que soluções de reserva concentradas podem precipitar quando refrigeradas e devem ser mantidas à temperatura ambiente até o precipitado se dissolver completamente antes de serem utilizadas. Talvez tenha também influenciado o tamanho da amostra. (12,13,14)

Por este motivo foi testado um terceiro protocolo com o meio de cultura RPMI 1640.

-As amostras foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  temperatura no Laboratório VAP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



**Figura 24- Amostras de Soro, Plasma, Tecido tumoral pulmonar, Linfonodo e Tecido pulmonar sadio armazenadas a  $-80$  graus de temperatura.**

### **3- Conservação da amostra de tecido tumoral a fresco em RPMI 1640 e conservação das amostras em RNALater de tecido tumoral, tecido sadio e linfonodos.**

O último protocolo de coleta e conservação de tecidos foi a conservação de tecido tumoral de pulmão a fresco em 4ml de RPMI 1640 em tubo Falcon de 15ml, previamente esterilizado e rotulado com codificação do paciente e abreviatura RPMI (preparado o RPMI no laboratório da Imunobioquímica da UFRGS). E a preservação em 200 $\mu\text{l}$  RNALater de

tecido tumoral de pulmão, tecido pulmonar sadio e linfonodo em 3 crio tubos de 2ml cada um, esterilizados, com tampa amarela, previamente rotulados com a letra do tecido conservado (A, T, G), codificação do paciente, e abreviatura RNAI. Neste protocolo participaram 5 pacientes e foi realizada Imunotipagem com citometria de fluxo para estudar Imunomodulação de Linfócitos B e T.

O primeiro tecido coletado foi linfonodo, retirado amostra diretamente pelo cirurgião, e que após lavado com soro fisiológico foi colocado em crio tubo esterilizado de 2ml com letra G na tampa amarela e dorso letra G e RNAL e codificação do paciente, que continha 200µl de RNALater e depois colocado em cubeta com gelo. A amostra foi armazenada no VAP.

Após a coleta do linfonodo (aproximadamente uma hora) já estava disponível a peça cirúrgica. A seguir, foram realizadas duas biópsias por punção do tecido tumoral (sacabocado) com agulha de punção de pele de 3mm de diâmetro (tamanho de cada amostra aproximadamente 3mm ) e lavada a amostra com soro fisiológico e colocada em crio tubo com letra T em tampa amarela e o dorso rotulado com RNAL e codificação do paciente, com frasco que continha 200µl de RNALater e depois colocado em cubeta com gelo. A outra amostra de tumor após de ser lavada com soro fisiológico era colocada em 4ml de RPMI 1640 em tubo Falcon de 15ml previamente rotulado com codificação do paciente e abreviatura RPMI, que foi colocada cubeta com gelo, que logo foi entregue ao Laboratório da Imunobioquímica da UFRGS

Posteriormente, foi retirada uma amostra de tecido pulmonar sadio por biópsia por punção com agulha de pele de 5mm de diâmetro (tamanho de cada amostra aproximadamente 5mm). Uma vez lavada com soro fisiológico a amostra foi imersa em crio tubo esterilizado de 2ml com letra A em tampa amarela e dorso rotulado com codificação do paciente e RNAL, com 200µl RNALater para congelar em cubeta de gelo. A amostra ficava armazenada no laboratório de VAP. As amostras preservadas em RNALater de tecido tumoral de pulmão, tecido sadio pulmonar e linfonodo foram conservadas na geladeira a 4°C temperatura por 24 horas. Após este período o sobrenadante de RNALater foi descartado e o material armazenado em freezer a -80°C temperatura.

**- Segundo teste**

**Paciente 19-02/-16/07 Dissociação** de tecido tumoral após três meses coletado em RPMI 1640 e RNALater e conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  temperatura. Masculino, branco. Adenocarcinoma de padrão lepidico não mucinoso invasor. Cirurgia Robótica.

**RNALater Tumor****RPMI 1640 Tumor****Figura 25-Dissociação de tumor após de três meses de criopreservação**

Observamos a dissociação do tumor nos dois criopreservantes, ou seja, a presença de suspensão celular, mas em RPMI 1640 havia mais grumos de tecido que estavam relacionados com a necrose tumoral, sendo que isto impede uma dissociação perfeita e poderia estar correlacionado com o grau de invasão tumoral.

Com os testes de dissociação, demonstramos que os protocolos de criopreservação desenvolvidos na Solução Salina Na CL 0,9% / SFB, em RNALater e em RPMI 1640 são adequados para conservar amostras de tecido de tumor de pulmão após três e onze meses crio preservados. Nestes casos obtivemos suspensões celulares das amostras tumorais, demonstrando qualidade da amostra conservada e dos criopreservantes utilizados. Demonstramos também que o protocolo de dissociação empregado para o microambiente tumoral foi adequado na separação de linhas celulares de tumor de pulmão.

**2.8- Limitações do estudo**

Limitações no desenvolvimento da coleta de material

1- A procura da agulha apropriada para biópsia tecidual, principalmente do tecido tumoral que nos permitiria ter uma amostra ideal de peso mínimo de 100g para a realização dos estudos, sem danos à estrutura anatômica do tecido que poderia impedir um diagnóstico histopatológico adequado, respeitando a margem cirúrgica tumoral.

No início do projeto foi proposto a biópsia do tumor com agulha fina descartável de 18mm de diâmetro com 15cm de comprimento a qual é utilizada nas biópsias pulmonares trans torácicas, e que faria perfurações pequenas no tecido tumoral e que pelo seu comprimento alcançaria o tumor sem dificuldades mesmo que este fosse profundo no parênquima pulmonar.

Agulha fina para biópsia transtorácica do pulmão



**Figura 26 - Agulha fina para biópsia trans torácica de 18ga x 15 cm**

Em nosso primeiro paciente testamos a coleta da amostra do tecido pulmonar sadio e tecido tumoral ressecados por lobectomia, com este modelo de agulha fina, não conseguimos extrair a quantidade da amostra que precisávamos, pois, as características do pulmão fora da cavidade torácica (desareado), fazia com que o tecido pulmonar ficasse muito esponjoso e que fosse retirado muito pouco tecido pulmonar. Por isto foram realizadas várias punções (n=6) para obter os 100g de tecido. Além disso esta agulha quebrou durante o procedimento, uma vez que ela é descartável e fabricada para um uso único. Devido a isto, testamos no laboratório esta agulha em pulmão de ovelha para verificar quantos gramas era possível extrair e se não haveria prejuízo a estrutura do parênquima pulmonar.

- Biópsias com agulha transtorácica



**Figura 27- Pulmão de ovelha, 6 amostras do tecido com agulha fina transtorácica de 18ga x 15mm**

**Seis amostras do tecido, peso 9gramas**

Com 6 perfurações com agulha fina trans torácica temos 6 amostras do tecido, o peso foi 9 gramas, bem distante da quantidade de tecido que precisaríamos para nossos estudos (100g), sendo assim descartamos esta agulha por não ter utilidade em nosso projeto.

O uso de agulha grossa para biópsia pulmonar percutânea está sendo atualmente recomendado, uma vez que é obtido uma quantidade maior de material para estudo e as complicações são as mesmas que quando se usa uma agulha fina, por este motivo iniciamos um piloto para verificar qual a melhor possibilidade de agulha grossa para nosso estudo. Seleccionamos para as biópsias pulmonares as agulhas de biópsia de pele por punção tipo “ponche” (saca-bocado) de 3mm para biópsia do tumor, e a de 5mm para biópsia do parênquima pulmonar sadio, elas permitiram obter amostras maiores e maior quantidade de material para o estudo.

-Biopsias de pulmão de ovelha com agulhas de punção de pele



**Figura 28- Duas amostras de biópsia por punção com agulha de pele de 5mm ao pulmão de ovelha.**

**Duas amostras de tecido peso, 33 gramas**



**Figura 29 - Duas amostras de punção com agulha de biópsia de pele de 3mm no pulmão de ovelha.**

**Duas amostras de tecido, peso 6 gramas**

Com duas (n=2) biópsias com agulha de punção de pele de 3mm de diâmetro foi possível obter 6 gramas da amostra; e com duas (n=2) amostras com agulha de punção de pele de 5mm foi obtido 33 gramas da amostra, por estes resultados selecionamos estas agulhas para a coleta das amostras de tecidos no projeto.

2- Inicialmente a coleta estimada de sangue periférico no estudo era de 40 ml, no entanto verificamos que esta quantidade era demasiada e verificamos que com 20ml era possível realizar as dosagens propostas no estudo.

3-Dois pacientes se negaram a assinar o termo de consentimento informado, alegando nervosismo devido a cirurgia

4- Uma vez que a cultura primária não pode ser realizada no RPMI 1640 nas amostras de tumor a fresco criopreservadas em PBS, atrasou-se o desenvolvimento do estudo, pois tivemos que definir a causa (aumentando assim o número de pacientes neste protocolo). Revisamos o processo de coleta, assepsia e armazenamento da amostra, inclusive testamos na procura de contaminantes. Definimos que a causa não estava relacionada com o processo de coleta das amostras, mas sim pelas características do criopreservante utilizado que precipita com as trocas de temperatura.

## **2.9- Aspectos éticos**

Realizamos treinamento relacionado ao uso, desinfecção e identificação do material utilizado no laboratório; essencial para o pesquisador. Assim como treinamento em relação a centrifugação sanguínea, dissociação de tecido, imunofenotipagem em sangue e tecido tumoral de pulmão e cultura primária

Autorização do paciente a participar na pesquisa, para isto foi assinado um termo de consentimento livre e esclarecido, onde se convidava o paciente a participar voluntariamente na pesquisa, que visa coletar e armazenar suas amostras de tecido pulmonar e sangue para estabelecer padrões de conservação e armazenagem das mesmas a realizar pesquisa biomédica futura, onde seus resultados seriam posteriormente informados a ele. Explicamos ao paciente que suas amostras não serão vendidas nem doadas a outras instituições, e que a negativa a não participar no projeto não alteraria a conduta médica. Uma vez assinado o termo pelo paciente este era incluído na pesquisa.

Os pacientes não receberam qualquer compensação pela doação dos tecidos coletados.

Confidencialidade na identificação do paciente, seus dados pessoais e patológicos e resultados dos procedimentos médicos e de outros dados incluídos no prontuário, para o qual foi criada uma a codificação: ano da coleta, número na coleta, data da cirurgia (dia e mês).

A coleta das amostras, não interferiu no diagnóstico histopatológico, cito morfológico, fenotípico ou molecular do paciente, nem na utilização para outras finalidades que foram primárias para o paciente, como a avaliação de parâmetros prognósticos.

Participaram 16 pacientes no projeto, todos com diagnóstico de Câncer de Pulmão de células não pequenas, após de ser analisado e autorizado pelo Comitê de Ética em investigação em humanos da instituição sob o número 170311.

### **3 – APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

A seguir serão descritos todos os pacientes incluídos no estudo e interpretação dos resultados.

#### **Protocolo 1- Protocolo de coleta e conservação dos tecidos em solução salina Na CL 0,9% com soro fetal bovino em nitrogênio líquido (congelamento rápida) e em RNALater (congelamento lenta)**

Quatro pacientes participaram deste protocolo, após terem assinados os termos de consentimento informado. Foram 3 mulheres e um homem

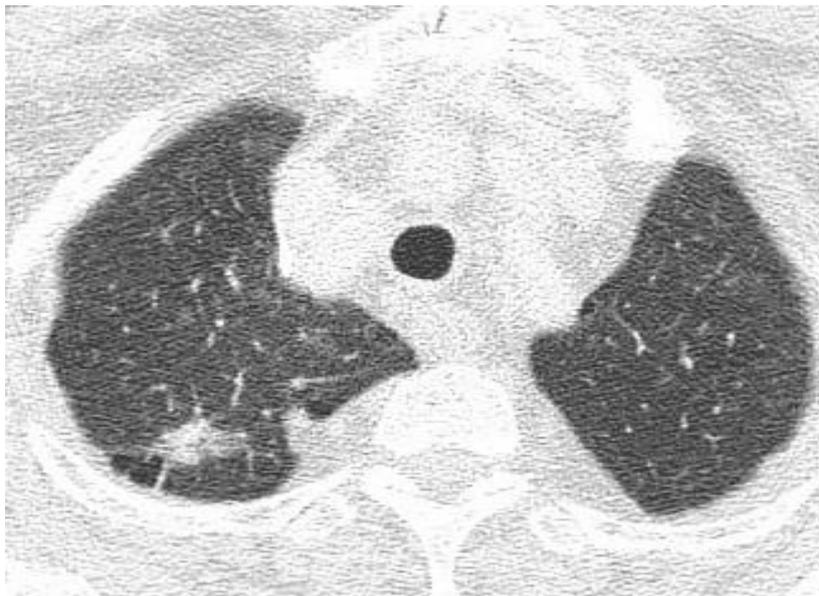
#### **Paciente 01- codificação 18-01-15/06**

Feminina 64 anos de idade, preta, tabagista por mais 30 anos, obesa (não especificado o peso) com antecedentes patológicos pessoais de diabetes mellitus tipo 2, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), história de tratamento para tuberculose pulmonar, hipertensão arterial sistêmica, aneurisma coronário, sífilis e nódulo de mama direita (na união dos quadrantes inferiores, de tamanho entre 1,4 x 1,0 cm), sem diagnóstico histológico. Apresentava sintoma de dispneia aos esforços.

A Tomografia computadorizada de tórax mostrava lesão nodular semissólida de contornos mal definidos no segmento apical do lobo superior direito, medindo 1,9 x 1,4 cm

nos eixos axiais, associando-se opacidades em vidro fosco no lobo superior esquerdo de 1,0 cm. Ausência de derrame pleural, micro nódulos esparsos no pulmão direito. Imagem nodular na mama direita de 1,4 x 1,0 cm.

O diagnóstico pré-operatório foi realizado por biópsia percutânea e no intraoperatório com biópsia por congelação com achado histológico de adenocarcinoma pulmonar, confirmando o diagnóstico pós-operatório com a imuno-histoquímica.



**Figura 30- TC de Tórax do paciente 18-01-15/06, mostrando nódulo espiculado em lobo superior direito**

O tratamento cirúrgico foi segmentectomia, não apresentando intercorrências durante o ato cirúrgico. As características visuais do tumor foram: cor acinzentada com zonas vermelhas, semissólida, friável, arredondado. Complicações pós operatórias foram derrame pleural, a pneumonia.

Na anatomia patológica pós-operatória- adenocarcinoma pulmonar de padrão lepidico, misto não mucinoso (60%) prevalente, micro papilar (30%) e acinar (10%). Sem evidência de neoplasia nos linfonodos examinados.

Exames complementares -TC abdome, TC crânio, sem manifestações de implantes metastáticos. Capacidade de difusão reduzida de intensidade moderada. Espirometria com distúrbio ventilatório misto de intensidade moderada. Ecografia mama- nódulo na união dos

quadrantes inferiores mama direita. Mamografia bilateral. nódulo na união dos quadrantes inferiores mama direita, tamanho de 11-20 mm, linfonodos axilares normais. Bi-RADS categoria 0. Mama esquerda normal, linfonodos normais, calcificações benignas .BI-RADS categoria 2. Biópsia de mama direita -papiloma intraductal com metaplasia apócrina. Pet-ct- pequenas opacidades em vidro fosco nos lóbulos superiores de ambos pulmões sem aumento do metabolismo. Lesão nodular com aumento da atividade metabólica no segmento apical do lobo superior direito, com limites irregulares, medindo 1,6 x 1,2 cm. O tempo percorrido entre o diagnóstico da doença e a cirurgia foi de oito meses Estadiamento tumoral- p T1a p N0pM0 Estágio IA1

Amostras coletadas foram: 3 eppendorf com soro, 3 eppendorf com plasma, 1 amostra de tumor e 1 amostra tecido pulmonar sadio em RNAL, 1 amostra de tumor e 1 amostra tecido pulmonar sadio em solução salina /SFB.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue -00:30 minutos, tempo centrifugação sangue/ freezer-00:30 minutos, tempo coleta sangue/coleta tecido -02:00 horas, tempo coleta tecido/congelação -00:25 minutos. O tempo máximo entre coleta e congelação foi de 30 minutos. Não houve atraso no tempo entre a coleta e o congelamento que prejudicaria a preservação das amostras.

#### **Paciente 02 -codificação 18-02-20/06**

Feminina 62 anos de idade, branca, tabagista por quase 30 anos, com histórico familiar de neoplasia pulmonar (pai). Com antecedentes patológicos pessoais de osteomalácia, meningioma frontal retirado em 2005 e DPOC. Sintoma de dispneia aos esforços.

TC de tórax apresentava nódulo semissólido no segmento apical do lobo superior direito, com predomínio de componente vidro fosco, com 1,9 cm de tamanho e retração pleural. Seu componente sólido era de difícil mensuração, medindo cerca de 0,9 cm. Não havia sinal de linfonodomegalia mediastinal nem derrame pleural.



**Figura 31- TC de Tórax do paciente 18-02-20/06, com nódulo em vidro fosco em lobo superior direito**

Diagnóstico pré-cirúrgico foi feito por biópsia percutânea compatível com a presença de adenocarcinoma com padrão de crescimento lepidico não mucinoso.

Tratamento cirúrgico empregado foi a lobectomia superior direita, com linfadenectomia mediastinal. As características visuais do tumor foram de cor vermelho (vidro fosco), friável, semissólido, não bem definido pelo toque ou pela visão. Não houve intercorrências intraoperatórias. Anatomia patológica pós-cirúrgica: adenocarcinoma pulmonar com predomínio do padrão lepidico (90%) com aéreas acinares (10%), a neoplasia chega próxima a pleura sem comprometê-la. Não há compromisso angiolinfático nem invasão de pleura. Não há evidência de neoplasia nos linfonodos examinados. Complicações pós-operatórias foi o derrame pleural.

Exames complementares: capacidade de difusão com redução leve. Espirometria com um distúrbio ventilatório combinado moderado. Não foi realizada imuno-histoquímica. A cintilografia normal. TC crânio e TC abdômen sem implante metastático. Pet-ct- massa hiper metabólica no segmento apical do lobo superior direito. Estadiamento tumoral- pT1b N0M0 Estágio IA2

Amostras coletadas: foram 3 ependorf de soro, 3 ependorf de plasma, em solução salina 1 amostra de tumor, 1 amostra tecido sadio pulmonar e 1 amostra de linfonodo. Em RNALater 1 amostra de tumor, 1 amostra de tecido sadio pulmonar e 1 amostra de linfonodo.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação : tempo anestesia / coleta sangue- 00:40min, tempo de centrifugação sangue / freezer- 00:30min, tempo coleta sangue/coleta tecido- 03:00, tempo coleta tecido / congelação- 00:25. O tempo máximo entre coleta e congelação foi de 25 minutos. Não houve atraso no tempo entre a coleta e o congelamento prejudicial para a preservação das amostras.

**Paciente 03 - codificação 18-03-13/09**

Paciente feminina de 55 anos de idade, da raça branca, tabagista por 20 anos, com antecedentes de cirurgia por adenocarcinoma moderadamente diferenciado de cólon transversal em 2016, e adrenalectomia por adenoma cortical em 2017. Sintomas de dispneia aos esforços.

TC de tórax com nódulo com atenuação em vidro fosco no segmento apical do lobo superior direito medindo 1,6 x 1,3 cm, sem derrame pleural associado, micro nódulo na lígula, medindo 0,2 cm de aspecto inespecífico. Não há alteração nos linfonodos mediastinais.



**Figura 32- TC de Tórax do paciente 18-03-13/09, com nódulo com atenuação em vidro fosco no segmento apical do lobo superior direito**

O diagnóstico foi realizado por biópsia por congelação e foi compatível com de adenocarcinoma de padrão lipídico.

O tratamento cirúrgico realizado foi lobectomia superior direita, com linfadenectomia mediastinal. As características macroscópicas do tumor foram: cor vermelha (vidro fosco),

friável e sanguinolento, elástico, não definido ao toque nem pela visão. Não houve intercorrência intraoperatória. O diagnóstico pós-operatório final foi de adenocarcinoma in situ, com predomínio de padrão lepidico medindo 12,0 mm de diâmetro máximo, sem evidências de invasão angiolinfático, sem necrose nem comprometimento da pleura visceral. Os linfonodos isolados não apresentavam implantes metastáticos. O tempo entre o diagnóstico da doença e a cirurgia foi de três meses. Complicações pós-operatórias foi atelectasia.

Exames complementares: difusão e espirometria dentro dos parâmetros normais, a imuno-histoquímica foi compatível com o diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar. A cintilografia foi normal. TC de crânio e abdômen sem implantes metastáticos. Pet-ct não foi realizada. Estadiamento tumoral- pTis pN0 M0 Estágio indeterminado

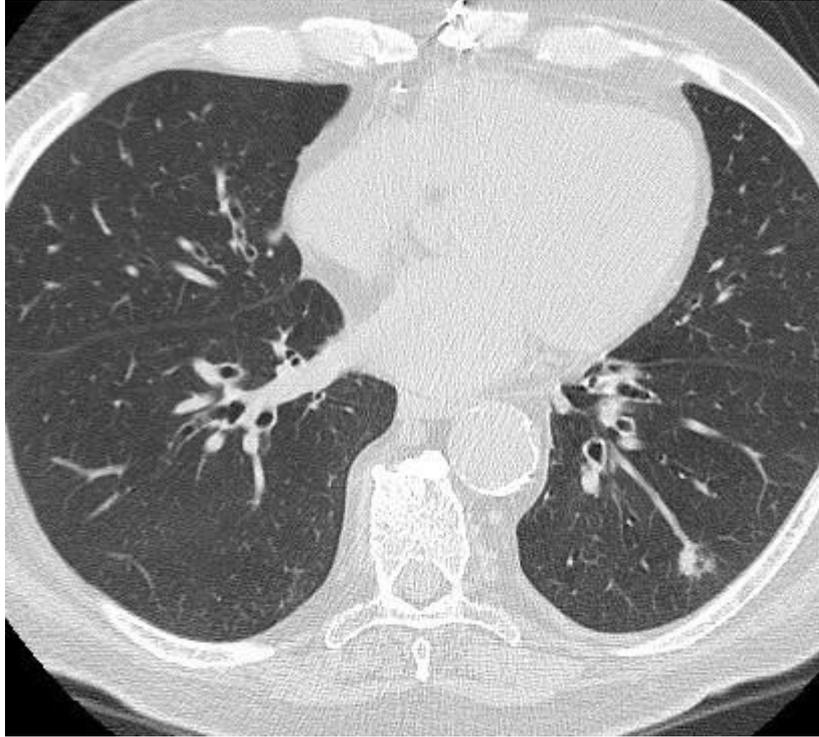
Amostras coletadas foram 3 eppendorf com soro fisiológico, 3 eppendorf com plasma. Em solução salina/soro fetal bovino foi 1 amostra de tumor, 1 amostra de tecido sadio e 1 amostra de linfonodo. Em RNALater 1 amostra de tumor, 1 amostra de tecido sadio pulmonar e 1 amostra de linfonodo

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo de anestesia / coleta sangue – 00:20 min, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:10min ,tempo coleta sangue/coleta tecido- 01:30 min ,tempo coleta tecido / congelação- 00:25min .O tempo máximo entre coleta e congelação foi de 25 minutos. Não houve atraso no tempo entre a coleta e o congelamento que prejudicaria a preservação das amostras.

#### **Paciente 04- codificação 18-04-27/09**

Masculino de 81 anos de idade, da raça branca, tabagista por mais de 30 anos, com antecedentes de bronquites crônica, diabetes mellitus, angioplastia coronariana, cardiopatia isquêmica e segmentectomia pulmonar por adenocarcinoma contralateral de pulmão (nódulo LIE). Assintomático.

Na Tomografia computadorizada de tórax evidenciava-se uma opacidade grosseiramente nodular no lobo inferior esquerdo (sem aspecto tumescente), e outra com atenuação em vidro fosco no lobo inferior direito no segmento apical, que media 0,6 cm no maior eixo, inespecífica como estrutura cestoide localizada na pirâmide basal direita de etiologia indeterminada, micro nódulos com atenuação em vidro fosco alguns com distribuição esparsa aleatória em ambos os pulmões.



**Fig. 33 - TC de Tórax do paciente 18-04-27/09, com lesão nodular em lobo inferior esquerdo**

O diagnóstico foi por biópsia intraoperatória por congelação com proliferação celular epitelial atípica em parênquima pulmonar periférico com inflamação crônica a fibrose cicatricial.

Tratamento cirúrgico empregado foi a segmentectomia (lóbulo inferior direito). Não houve intercorrências intraoperatórias nem complicações pós operatórias. O tempo transcorrido entre o diagnóstico da doença e a cirurgia foi de três meses. Macroscopicamente, o tumor era de cor acinzentada, com zonas avermelhadas (vidro fosco) e elástico, mal definido ao toque. Os diagnósticos pós operatórios foram feitos por dois fragmentos de tecidos, elásticos cujo maior era de 0,3 x 0,2 cm com histologia de proliferação celular atípica em parênquima pulmonar periférico com inflamação crônica a fibrose cicatricial. E outra amostra de cunha de parênquima pulmonar periférico com sutura metálica medindo 6,5x3,5x2,5 cm. Aos cortes era observada lesão mal delimitada pardacenta, elástica que mede 0,6 cm com diagnóstico de adenocarcinoma de padrão lepidico com áreas micro papilares (30%), áreas sólidas (20%) e áreas periféricas de padrão lepidico (50%). Não havia evidência de neoplasia nos linfonodos. O tempo entre diagnóstico da doença e cirurgia foi três meses

Exames complementares: difusão e espirometria dentro de limites normais. Cintilografia pulmonar dentro da normalidade. As TCs de crânio e abdômen sem implantes metastáticos. Estadiamento tumoral- pT1aN0M0 Estágio IA1

Amostras coletadas foram: 3 eppendorf com soro, 3 eppendorf com plasma. Em solução salina/soro fetal bovino 1 amostra de tumor, 1 amostra de tecido sadio pulmonar. Tumor era menor 1 cm o que não permitia coletar mais amostras.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelamento: tempo anestesia / coleta sangue- 00:20 min, tempo centrifugação sangue / freezer - 00:10min, tempo coleta sangue/coleta tecido- 01:30min, tempo coleta tecido / congelamento- 00:20 min. O tempo máximo entre coleta e congelamento foi de 25 minutos. Não houve atraso no tempo estimado para congelamento prejudicial a preservação das amostras.

**Protocolo 2- Conservação da amostra de tecido tumoral de pulmão a fresco em PBS e conservação das amostras de tecido tumoral de pulmão, tecido sadio pulmonar e linfonodo em RNALater.**

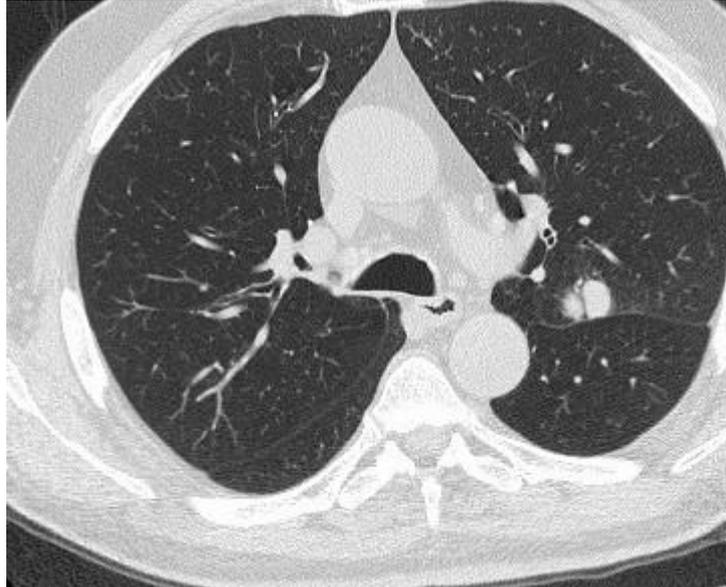
Participaram 7 pacientes neste protocolo.

#### **Paciente 01 codificação 18-01-09/11**

Paciente masculino de 77 anos de idade, da raça branca, tabagista por 22 anos com antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, doença de Barret, DPOC e adenocarcinoma prostático. Encaminhado pelo urologista por achado radiológico torácico no seguimento de carcinoma prostático.

TC de tórax com massa de contornos lobulados e limites bem definidos, no segmento ápico-posterior esquerdo em íntimo contato com cissura oblíqua, de 5,0 cm em seu maior eixo (plano coronal).

O diagnóstico pré-operatório foi realizado por biópsia percutânea como carcinoma epidermóide pouco diferenciado. Na mediastinoscopia com biópsia não houve evidência de neoplasia em linfonodos. Imuno-histoquímica da biópsia pulmonar foi compatível com carcinoma epidermóide pouco diferenciado.



**Figura 34-TC Tórax de paciente 18-01-09/11, com massa de contornos lobulados e limites bem definidos, no segmento ápico-posterior do lóbulo superior esquerdo.**

Lobectomia superior esquerda foi realizada sem intercorrências. Características macroscópicas do tumor: acinzentado, lobulado, com lesões brancacentas. Complicações pós-operatórias hidropneumotórax, atelectasia e enfisema subcutâneo. O diagnóstico pós-operatório foi de carcinoma de padrão basalóide (carcinoma indiferenciado) com alto índice mitótico. O tamanho da neoplasia foi 4,4 cm, e se estendia até a pleura sem comprometê-la. Não havia implante metastático em linfonodos. O tempo entre diagnóstico e cirurgia foi dois meses.

Exames complementares- temos a difusão com uma redução leve e espirometria com transtorno ventilatório obstrutivo leve. A TC de crânio e ressonância de crânio com malformação vascular, não implante neoplásico. TC de abdômen não implante neoplásico... O tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia foi dois meses. Estadiamento tumoral- pT2b pN0 pM0 Etapa IIA.

Amostras coletadas foram 5 eppendorf com soro, 5 eppendorf com plasma, em PBS 1 amostra de tumor, em RNALater temos 1 amostra de tumor, 1 amostra de tecido sadio pulmonar e 1 amostra de linfonodo. 1 vacutainer sangue com EDTA para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação tempo anestesia / coleta sangue – 01:00, tempo centrifugação sangue freezer- 00:35, tempo coleta sangue/coleta tecido – 01:40, tempo coleta tecido / congelação - 00:30. O tempo máximo entre coleta e congelação 30 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação

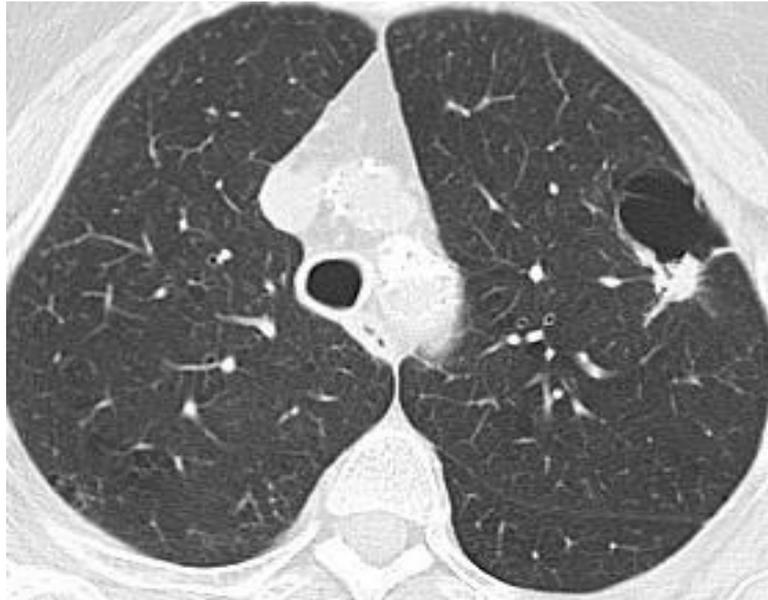
A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

### **Paciente 02- codificação 18-02-15/11**

Paciente feminina de 74 anos, da raça branca, tabagista por mais de 40 anos, com antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, cardiopatia isquêmica, angioplastia coronária, aneurisma abdominal e hallux valgo. Refere dispneia de esforço

TC de tórax se identificou imagem nodular densa com 1,5 x 1,1 cm de tamanho de aspecto irregular associada a área de bulha de 4, 5 cm de diâmetro, no lobo superior esquerdo.

Diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia percutânea sem evidência neoplásica, processo inflamatório crônico com extensas fibroses cicatriciais. Na biópsia por congelação se identificou neoplasia maligna indiferenciada. Tratamento envolvido foi a lobectomia superior esquerda. Durante o ato cirúrgico se apresentou intercorrências relacionada com a dificuldade ao canalizar veias profundas não relacionadas com falta de habilidades médicas nem com malformação vascular. O diagnóstico pós cirúrgico carcinoma epidermóide, a menos de 1 cm da pleura, sem implantes neoplásicos em linfonodos. Características visuais do tumor: de cor acinzentado, necrótico, com áreas vermelhas, lesões esbranquiçadas como calcificações em seu interior. O tempo percorrido entre diagnóstico da doença e a cirurgia foi de onze meses.



**Figura.35- TC de Tórax de paciente 18-02-15/11, com imagem nodular densa com 1,5 x 1,1 cm de tamanho de aspecto irregular associada a área de bulha de 4, 5 cm de diâmetro em lóbulo superior esquerdo.**

Exames complementares- a difusão reduzida levemente, a espirometria com transtorno ventilatório obstrutivo leve. A TC abdômen e TC crânio sem implante neoplásico. Angiotomografia com diagnóstico de tromboembolismo pulmonar. A complicação pós cirúrgica apresentada foi tromboembolismo pulmonar. Estadiamento tumoral- pT1b pN0 pM0 Etapa IA2

Amostras coletadas foram 5 eppendorf com soro, 5 eppendorf com plasma, Em PBS 1 amostra de tumor. Não se coleta amostra de tumor em RNALater, pois o tumor de muito pequeno tamanho. 1 vacutainer de sangue com EDTA para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelamento. :tempo anestesia / coleta sangue- 02:00, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:10, tempo coleta sangue/coleta tecido- 02:00, tempo coleta tecido / congelamento – 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelamento 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação

. A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

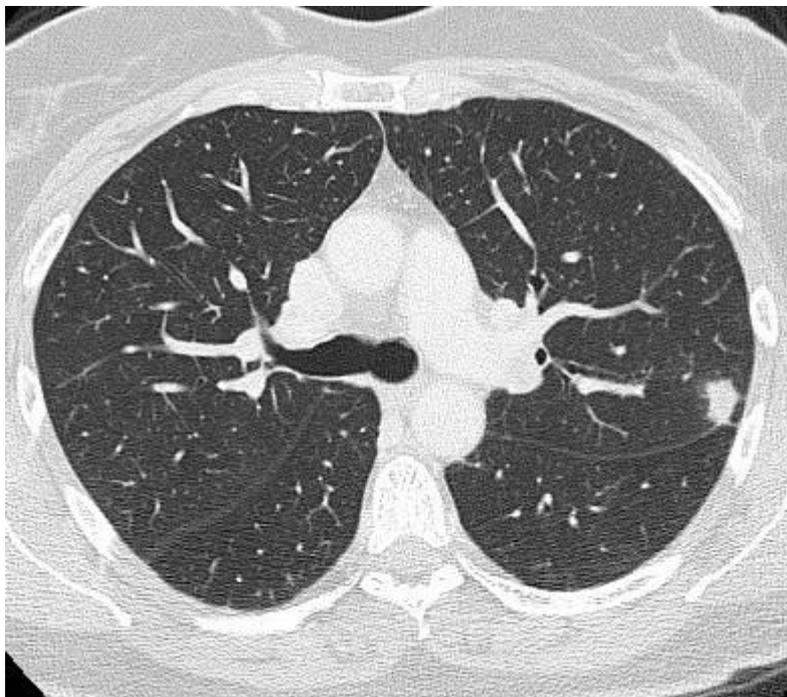
**Paciente 03- codificação 18-03-07/12**

Paciente feminina de 56 anos, da raça branca, tabagista por 30 anos, com antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, gastrites crônica e adenocarcinoma da ampola de Vater com diferenciação pancreato biliar no 2014. Apresenta dispneia.

TC de tórax se descreve imagem subpleural de contorno irregular localizada no segmento lingular superior, medindo 1,6 x 1,0 no lobo inferior esquerdo. Não linfonomegalia tumoral.

Tratamento cirúrgico envolvido foi ressecção em cunha do tumor. As características do tumor de cor pardo acinzentado, firme, irregular e necrótico. Não houve intercorrências cirúrgicas. O diagnóstico pós cirúrgico adenocarcinoma pouco diferenciado, extensão da neoplasia próximo na pleura e linfonodos pré aórticos Adenocarcinoma pouco diferenciado de tecido fibroadiposo. Complicações pós cirúrgicas foi atelectasia. Tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia foi dois meses

Exames Complementares- a difusão normal, a espirometria normal. A TC abdominal e TC crânio sem implante neoplásico. Estadiamento tumoral-pT3 pN1 pM0 Etapa IIB



**Figura 36. TC de Tórax da paciente 18-03-07/12 se aprecia imagem tumoral subpleural de contorno irregular localizada no segmento lingular superior**

Amostras coletadas foram -3 eppendorf com soro, 3 eppendorf com plasma, em RNALater temos 1 amostra de tumor, 1 amostra de linfonodo.1 vacutainer de sangue com EDTA, em PBS 1 amostra de tumor para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS.

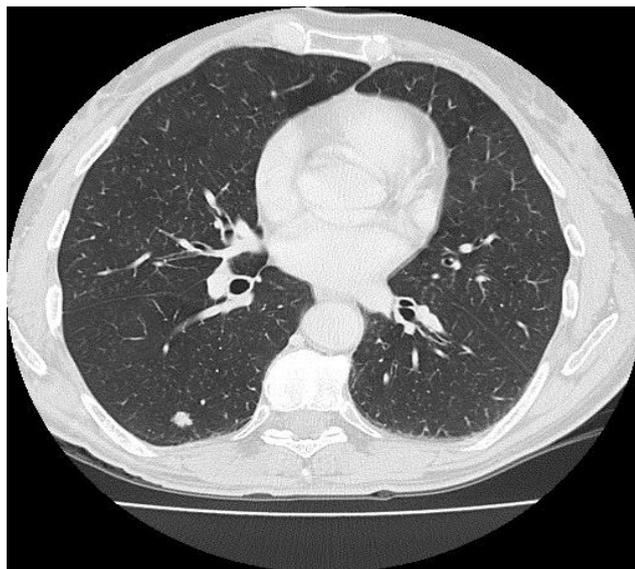
Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação :tempo anestesia / coleta sangue – 00:30, tempo centrifugação sangue / freezer – 00:15, tempo coleta sangue/coleta tecido – 03:00, tempo coleta tecido / congelação – 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação.

. A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

#### **Paciente 04- codificação 19-04-04/01**

Paciente feminina de 61 anos, da raça branca, tabagista por 40 anos, tabagismo por 40 anos. Com antecedentes de asma bronquial, carcinoma basocelular infiltrativo de pele. nódulo de mama e tumor de ovário não diagnosticado. Transferida pôr o grupo de Cirurgia de mama

Na TC de tórax foi identificado nódulo semissólido irregular localizado no segmento superior do lobo inferior direito que mede 1,0 x 0,9 cm, associado a nódulos centro lobulares sugestivos de bronquiolites. Linfonodos sem evidência neoplasia.



**Figura 37. TC de Tórax da paciente 19-04-04/01 com nódulo semissólido irregular localizado no segmento superior do lobo inferior direito**

O diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia intraoperatória por congelação sendo um carcinoma pouco diferenciado de pulmão. O tratamento cirúrgico empregado foi lobectomia inferior direita. As características visuais do tumor foram de cor amarelado com zonas branquíssimas, firme, semissólido, arredondado. Não houve intercorrências na sala cirúrgica. As complicações pós cirúrgicas foram atelectasia, distensão gástrica e distensão de alças do intestino delgado. O diagnóstico pós cirúrgico adenocarcinoma em parênquima pulmonar periférico micro papilar (30%), áreas sólidas (20%) e de padrão lepidico (50%). Sem evidências de neoplasia nos linfonodos estudados. Lobo superior do pulmão direito com focos de carcinoma de padrão lipídico. O tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia foi de três meses.

Exames complementares - espirometria com transtorno ventilatório misto leve e a difusão com redução leve. Na TC de crânio e abdômen superior sem evidencia neoplásica. Ecografia pélvica se aprecia no ovário esquerdo área nodular sólida de contorno regular, hipocalórica medindo 3,3 x2,6 x2,5 cm, para ser esclarecida. A imuno-histoquímica coincide com o diagnóstico de adenocarcinoma. Mamografia bilateral na mama direita nódulo localizado em região retro areolar de tamanho menor de 10mm contorno regular, não linfonodos. BI RADS categoria 0. Estadiamento tumoral pT1b pN0pM0 Etapa IA2

Amostras coletadas foram 1 vacutainer de sangue com EDT, em PBS 1 amostra de tumor para entregar ao laboratório de Imunobioquímica UFRGS. 3 eppendorf com soro, 3 eppendorf com plasma,. Em RNALater temos 1 amostra de tumor.

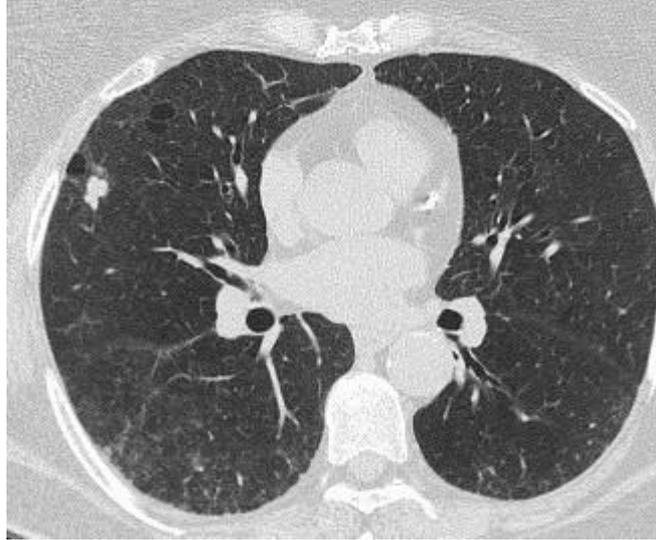
Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 01:30, tempo centrifugação sangue / freezer - 00:15,tempo coleta sangue/coleta tecido – 02:10, tempo coleta tecido / congelação- 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação.

. A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

#### **Paciente 05- codificação 19-05-18/01**

Paciente feminina de 70 anos, da raça branca, tabagista por 30 anos, com antecedentes de aneurisma da aorta abdominal, ilê ostomia esquerda e carcinoma espinocelular infiltrativo de pele no 2014. Apresenta aumento do tamanho do nódulo pulmonar

Na TC de tórax se evidencia nódulo subpleural no segmento lateral do lobo médio direito de contorno e espiculados medindo 1,8 x1,4 cm, com opacidades em vidro fosco centro lobulares subpleurais nos lobos inferiores, leve aumento de linfonodos mediastinais.



**Figura 38.TC de Tórax de paciente 19-05-18/01 com nódulo subpleural no segmento lateral do lobo médio direito**

O diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia percutânea com histologia de possível adenocarcinoma pulmonar, foi realizada biópsia de linfonodo axilar direito por ecografia com histologia de linfadenitis dermatópica, ausência de neoplasia. O tratamento de escolha foi a lobectomia média direita, com o diagnóstico pós cirúrgicos coincidindo com a imuno-histoquímica de adenocarcinoma predominante micro papilar pouco diferenciado, com invasão pleura visceral e linfo vascular. Como intercorrências na sala cirúrgica a demora em o efeito anestésico pôr o uso crônico de ansiolítico. As características visuais do tumor são de cor vermelho (vidro fosco), friável, com zonas de necrose. Complicações pós cirúrgicas são atelectasia e suboclusão intestinal. O tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia é de dois meses.

Exames complementares -difusão e espirometria normais, TC de crânio e de abdômen sem implante neoplásico. Ressonância abdominal – imagem nodular para vertebral a esquerda., suboclusão de asas de intestino delgado. Pet-ct- imagem nodular hiper metabólico no lobo médio do pulmão direito e linfonodos axilares em cadeia mamária. Mamografia bilateral normal. Estadiamento tumoral- pT1c p N0 pM0 Etapa IA3.

Amostras coletadas foram- 1 vacutainer de sangue com EDTA e em PBS 1 amostra de tumor para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 4 eppendorf com

soro, 5 eppendorf com plasma.. Em RNALater temos 1 amostra de tumor, 1 amostra de linfonodo; 1 amostra de tecido pulmonar sadio.

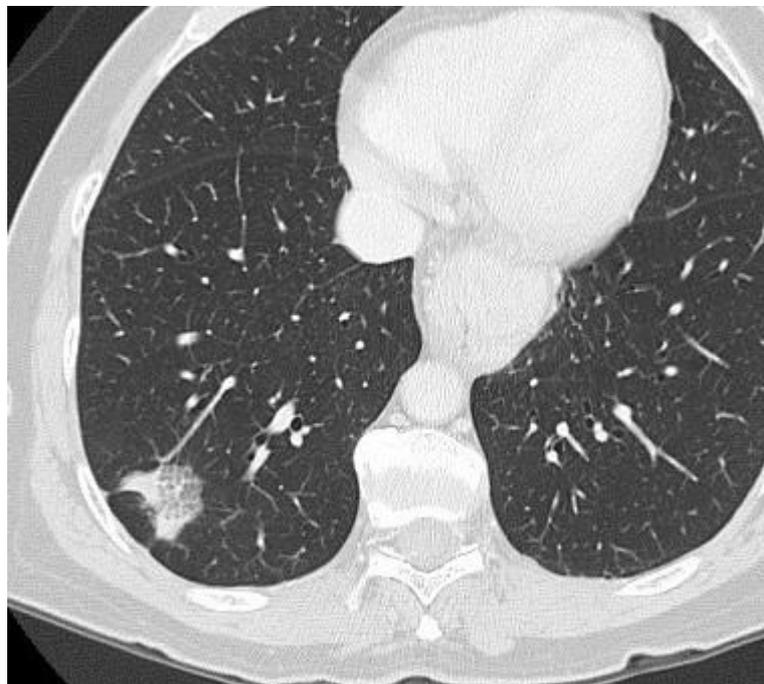
Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 01:20, tempo centrifugação sangue / freezer – 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido - 02:10, tempo coleta tecido / congelação – 00:30. O tempo máximo entre coleta e congelação 30 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação.

. A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

#### **Paciente 06- codificação 19-06-01/02**

Paciente feminina de 70 anos, da raça branca, tabagista por 30 anos, com antecedentes de hérnia hiatal e nódulo de tiroides. Assintomática

Na TC de tórax se identificou nódulo pulmonar heterogêneo sólido no segmento posterior da pirâmide basal direita que mede 2,0 x 0,8 cm, persiste nódulo de densidade de partes moles de 0,7cm no segmento lateral do lobo inferior direito. Não há linfonodomegalias mediastinais.



**Figura 39-TC de Tórax de paciente 19-06-01/02 nódulo pulmonar heterogêneo sólido no segmento posterior da pirâmide basal direita**

O diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia percutânea orientada por TC. tórax com uma histologia de adenocarcinoma de padrão acinar e lipídico. O tratamento de escolha foi a lobectomia inferior direita, com diagnóstico pós cirúrgico de adenocarcinoma de padrão acinar e lipídico, coincidindo os resultados da Imuno-histoquímica. Como características visuais do tumor de cor pardo acinzentado, arredondado e firme. As complicações pós cirúrgicas apresentadas foram derrame pleural, enfisema subcutâneo. Não houve intercorrências na sala cirúrgica. O tempo percorrido entre o diagnóstico e a cirurgia é de três meses.

Exames complementares- difusão e espirometria normal, TC de abdômen hérnia hiatal, não há implante neoplásico secundário. biópsia de tireoide negativa. TC crânio sem evidência neoplásica. Ressonância abdominal- cisto hepático, não evidência neoplásica. Estadiamento tumoral-pT1cpN0pM0 Etapa IA3

Amostras coletadas foram-1 vacutainer de sangue com EDTA e em PBS 1 amostra de tumor para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 4 eppendorf com soro, 4 eppendorf com plasma. Em RNALater temos 1 amostra de tumor, 1 amostra de linfonodo; 1 amostra de tecido pulmonar sadio.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 00:4, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido- 01:30, tempo coleta tecido / congelação- 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos.

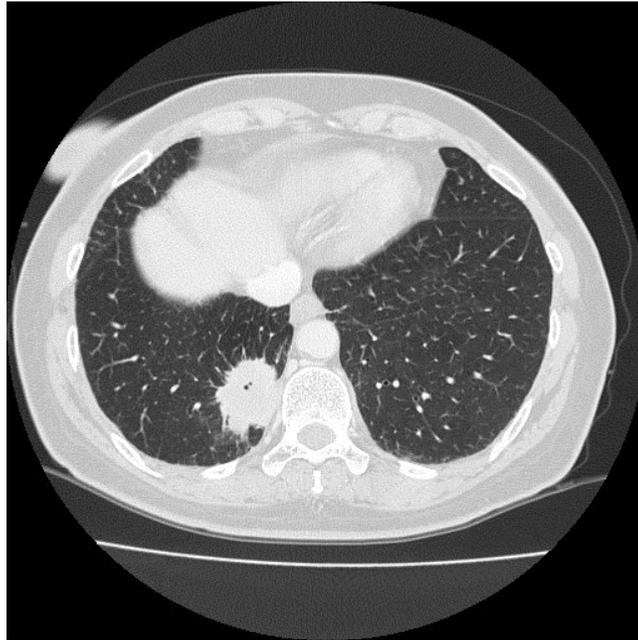
. . A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

### **Paciente 07- codificação 19-07-13/03**

Paciente feminina de 60 anos, da raça branca, tabagista por mais de 30 anos, com antecedentes de neoplasia de esôfago e neoplasia do colo do útero. Apresenta dispneia de esforço

A TC de tórax é apreciada massa subpleural localizada no segmento basal posterior do lobo inferior direito, medindo 3,8 x 3,1cm seus maiores eixos, de contornos espiculados com cavidade central e formação de nível hidroaéreo com ampla base pleural.

O diagnóstico pré-cirúrgico foi obtido por biópsia trans brônquica como carcinoma epidermóide de pulmão.



**Figura 40. TC de Tórax de paciente 19-07-13/03. com massa subpleural localizada no segmento basal posterior do lobo inferior direito**

O tratamento de escolha foi lobectomia inferior direita. O diagnóstico pós cirúrgico foi de carcinoma epidermóide coincidindo com imuno-histoquímica. Não houve intercorrências na sala cirúrgica as características visuais do tumor foram a cor acinzentado bem definido, espiculado. As complicações pós cirúrgicas foram hidropneumotórax e atelectasia O tempo percorrido entre o diagnóstico e a cirurgia é de três meses.

Exames complementares- a capacidade de difusão redução moderada. A espirometria normal. As tomografias computadorizadas de crânio e abdômen sem implante neoplásico. Pet-ct identifica massa hiper metabólica de contornos espiculados no lobo inferior do pulmão direito, contendo cavitações em seu interior, linfonodos mediastinais proeminentes pré vasculares à direita e paratraqueal direito, com aumento da atividade metabólica de caráter inespecífico. Estadiamento tumoral-pT2a pN0 pM0 Etapa IB.

Amostras coletadas foram: 1 vacutainer de sangue com EDTA e em PBS 1 amostra de tumor para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 3 eppendorf com soro, 3 eppendorf com plasma. Em RNALater temos 1 amostra de tumor.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 00:30, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:20, tempo coleta sangue/ coleta tecido- 02:40, tempo coleta tecido / congelação- 00:20. O

tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos.

. A cultura primária no paciente não foi realizada, não viável amostra em PBS.

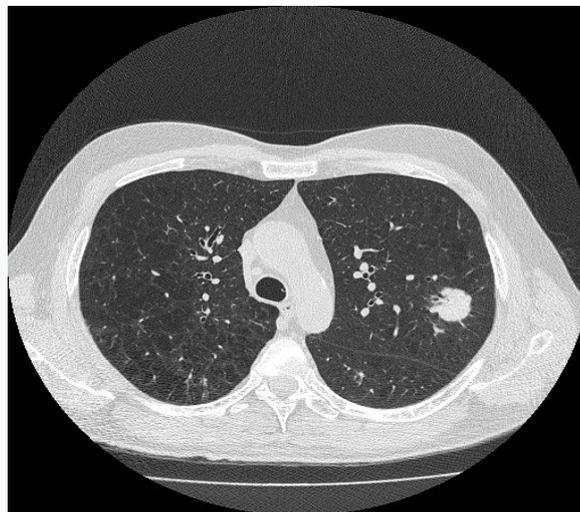
**Protocolo 3- Conservação da amostra de tecido tumoral a fresco em RPMI 1640 e conservação das amostras em RNALater de tecido tumoral de pulmão, tecido pulmonar adjacente sadio e linfonodos.**

Participaram 5 pacientes neste protocolo.

**Paciente 01- codificação 19-01-17/04**

Paciente masculino de 67 anos de idade, da raça branca, tabagista por mais de 30 anos, com antecedentes de laringectômica por papiloma de células escamosas, acidente vascular cerebral, e de hidro nefroses. Referir-se a dispneia de esforço

Na TC de tórax se aprecia nódulo de transição no segmento ápico posterior com anterior do lobo superior esquerdo que mede 2,8 x 2,5 cm com Enfisema centro lobular em 1/3 superior de ambos pulmões, fibroatelectásicas na pirâmide basilar direita, impressiona diminuição de tamanho tumoral, em relação a TC anterior.



**Figura 41 - TC de Tórax de paciente 19-01-17/04 com nódulo de transição no segmento ápico posterior com anterior do lobo superior esquerdo**

O diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia intraoperatória por congelação com histologia de proliferação celular atípica sugestiva de carcinoma neuroendócrino. O tratamento efetuado foi a ressecção em cunha, com diagnóstico pós cirúrgico de carcinoma neuroendócrino de grandes células, que compromete linfáticos e vasos de grande calibre, não

compromete a pleura. Diagnóstico histológico coincide com a imuno-histoquímica. Não houve intercorrências na sala cirúrgica, como complicações apresentadas tivemos enfisema subcutâneo, distensão de alças intestinais delgadas. Características visuais do tumor de cor amarelo, arredondado, necrótico e firme. O tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia foi três meses.

Exames complementares- capacidade de difusão redução leve e espirometria transtorno ventilatória obstrutivo leve. TC crânio e TC de abdômen não impregnação metastática. TC de quadril esquerdo-fratura do ramo inferior do púbis e ramo superior junto a eminência iliopúbica. Estadiamento tumoral-pT1cpN0pM0 Etapa IA3

Amostras coletadas foram: 1 vacutainer de sangue com EDTA para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 4 eppendorf com soro, 4 eppendorf com plasma. Em RPMI 1640 1 amostra de tumor para entrega no laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. Em RNALater temos 1 amostra de tumor e 1 amostra de tecido sadio pulmonar adjacente.

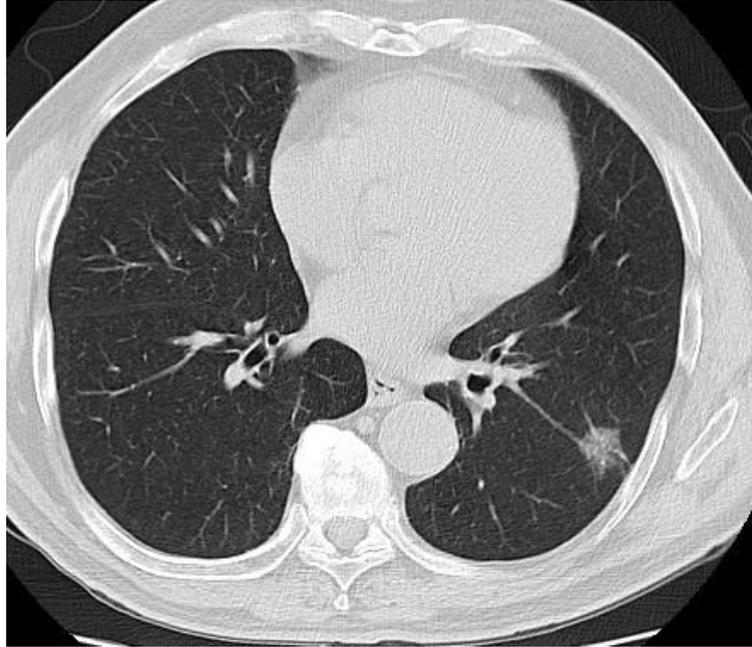
Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 01:00, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido— 02:00, tempo coleta tecido / congelação- 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos adequado.

Se realizou dissociação do tumor em perfeitas condições.

#### **Paciente 02- codificação 19-02-16/07**

Paciente de 82 anos, da raça branca, tabagista por mais de 50 anos, com antecedentes de adenoma de adrenal e HSA. Assintomático

Na TC de tórax é apreciado nódulos pulmonares à esquerda, o maior mede 1,8 x 1,4 cm sub sólido com atenuação em vidro fosco no segmento superior do lobo inferior esquerdo, e outro de 1,3 x 1,0 subpleural no segmento basal lateral do lobo inferior. Identifica-se pequenas opacidades nodulares com atenuação em vidro fosco bilateral. Inúmeros de linfonodos mediastinais e hilares de 1cm.



**Figura 42-TC de Tórax de paciente 19-02-16/07 com nódulos pulmonares à esquerda, o maior mede 1,8 x 1,4 cm sub sólido com atenuação em vidro fosco no segmento superior do lobo inferior esquerdo,**

O diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia percutânea com histologia de adenocarcinoma de padrão lipídico não mucinoso. O tratamento empregado foi lobectomia inferior esquerda por cirurgia robótica. O diagnóstico anátomo patológico foi adenocarcinoma invasor acinar unifocal com invasão a pleura visceral, tamanho tumoral 15mm, não invasão linfo vascular nem estruturas adjacentes. O diagnóstico imunohistoquímica coincide com o diagnóstico anátomo patológico (adenocarcinoma). Não houve intercorrências na sala cirúrgica. As características visuais do tumor foram a cor vermelho do lobo mais intenso na zona tumoral com lesão nodular ao tacto pétreo e irregular. Apresentou hidropneumotórax como complicação. O tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia foi dois meses.

Exames complementares- difusão e espirometria dentro de limites normais. TC crânio não implante metastático. TC abdômen com aumento volumétrico da próstata, não implante neoplásico Estadiamento tumoral- pT1c pN0p MX Etapa IA3

Amostras coletadas foram: 1 vacutainer de sangue com EDTA e em RPMI 1640 1 amostra de tumor para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 4 eppendorf com soro, 4 eppendorf com plasma. Em RNALater 1 amostra de tumor e 1 amostra de linfonodo

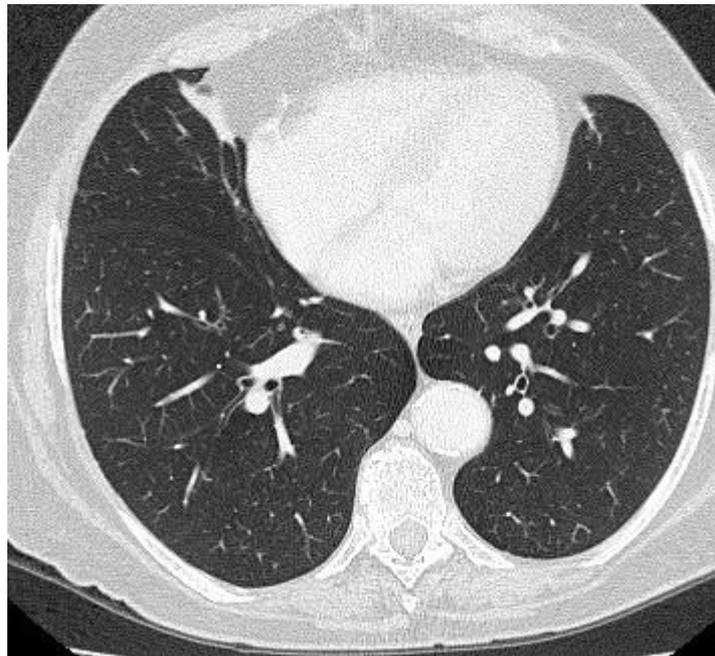
Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 01:00, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido- 02:00, tempo coleta tecido / congelação- 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos adequada, que não deve passar dos 30 minutos.

Desenho experimental-dissociação do tumor perfeita.

### **Paciente 03- codificação 19-03-26/07**

Paciente feminina de 71 anos, da raça branca, tabagista por mais de 30 anos, que apresenta aumento inespecífico da glândula salivar e DPOC. Refere-se à dispneia de esforço

Na TC de tórax se aprecia lesão no segmento apical do lobo superior direito com calcificações, medindo 3,3 x 2,5 cm, com alguns pequenos nódulos inespecíficos, um de 0,4 cm no lobo médio sub pleural.



**Figura 43. TC de Tórax de paciente 19-03-26/07 com lesão no segmento apical do lobo superior direito**

O diagnóstico pré cirúrgico foi feito por biópsia percutânea, com histologia de carcinoma pouco diferenciado com focos de necrose. Foi realizada lobectomia superior direita. Não houve intercorrências na sala cirúrgica. O diagnóstico anátomo patológico coincide com a imuno-histoquímica com o carcinoma pouco diferenciado com focos de

necroses unifocal que invade pleura visceral com invasão linfo vascular. As características visuais do tumor são de cor acinzentado, irregular, semissólido com áreas de necroses pétreas e com qualificações em seu interior. Complicações apresentadas enfisema subcutâneo, pneumonia, tromboembolismo da veia íleo femoral esquerda e tromboembolismo pulmonar. O tempo percorrido entre diagnóstico e cirurgia foi um mês.

Exames complementares :capacidade de difusão moderada redução, espirometria com transtorno severo obstrutivo. As tomografias de crânio e abdômen sem implante metastático tumoral. A pet-ct, aumento do metabolismo glicolítico em massa de contornos irregulares com calcificações em seu interior no segmento apical do lobo superior direito medindo 3,3 x 2,5 cm. Angiotomografia positiva. Estadiamento tumoral-pT2a pN0PMo Etapa 1B.

Amostras coletadas foram: 1 vacutainer de sangue com EDTA para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS, 3 eppendorf com soro, 3 eppendorf com plasma. Em RPMI 1640 1 amostra de tumor para entrega no laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. Em RNALater 1 amostra de tumor e 1 amostra de linfonodo.

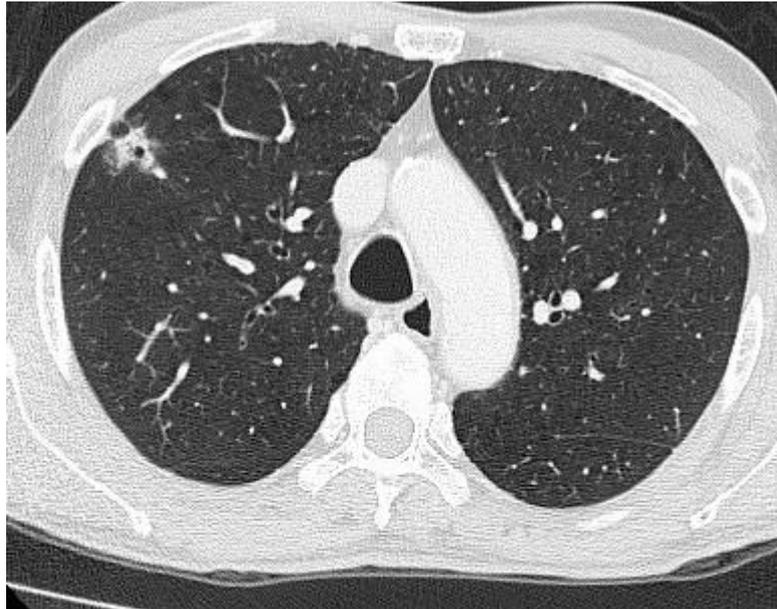
Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 02:00, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido- 01:30, tempo coleta tecido / congelação- 00:30. O tempo máximo entre coleta e congelação 30 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos adequada, que não deve passar dos 30 minutos.

Dissociação do tumor RPMI 1640 e RNALater positiva

#### **Paciente 04- codificação 19-04-09/10**

Paciente masculino de 69 anos, da raça branca, tabagista por 40 anos, antecedentes de DPOC, alcoolismo, neoplasia maligna da orofaringe 2017 e adenoma tubular de colón de baixo grau 2014. Refere-se à dispneia de esforço.

Na TC de tórax é apreciado lesão espiculada no segmento anterior do lobo superior direito, que mede 2,2 x 2,0 cm, opacidades de aspecto fibroatelectásicas nos ápices pulmonares, opacidade nodular no ápice de pulmão esquerdo que mede 1,1x 0,9 cm.



**Figura 44-TC de Tórax de paciente 19-04-09/10 com lesão espiculada no segmento anterior do lobo superior direito.**

O diagnóstico pré cirúrgico da lesão do lobo superior direita foi por biópsia percutânea com histologia de adenocarcinoma de padrão lipídico. Foi realizada lobectomia superior direita com diagnóstico anátomo patológico de adenocarcinoma de padrão lipídico não mucinoso com padrão acinar invasivo de 8mm, não invasão a pleura nem linfonodos. O diagnóstico imuno-histoquímica coincide com o anátomo patológico. Não houve intercorrências na sala cirúrgica. As características visuais do tumor são lesão acinzentada, necrótica, irregular, pétreo. As complicações pós cirúrgicas apresentadas foram atelectasia, hidropneumotórax, pneumomediastino e tromboembolismo pulmonar. O tempo percorrido entre o diagnóstico e cirurgia foi de três meses

Exames complementares foram: capacidade de difusão reduzida levemente e espirometria distúrbio ventilatório obstrutivo moderado. TC e ressonância de crânio sem implante neoplásico. TC abdômen com aumento de volume do lobo médio da próstata não implante neoplásico. Pet-ct aumento hiper metabólica na lesão espiculada no lobo superior direito e nódulo no ápice do pulmão esquerdo. Angiotomografia com defeito de enchimento na bifurcação entre os ramos arteriais segmentarias anteriores e lingular do lobo superior esquerdo. Ecocardiograma com degeneração de fibra cálcica com comprometimento da raiz da aorta e válvula aórtica, mínima insuficiência mitral e tricúspide. Estadiamento tumoral-p T1b pN0pM0 Etapa IA2.

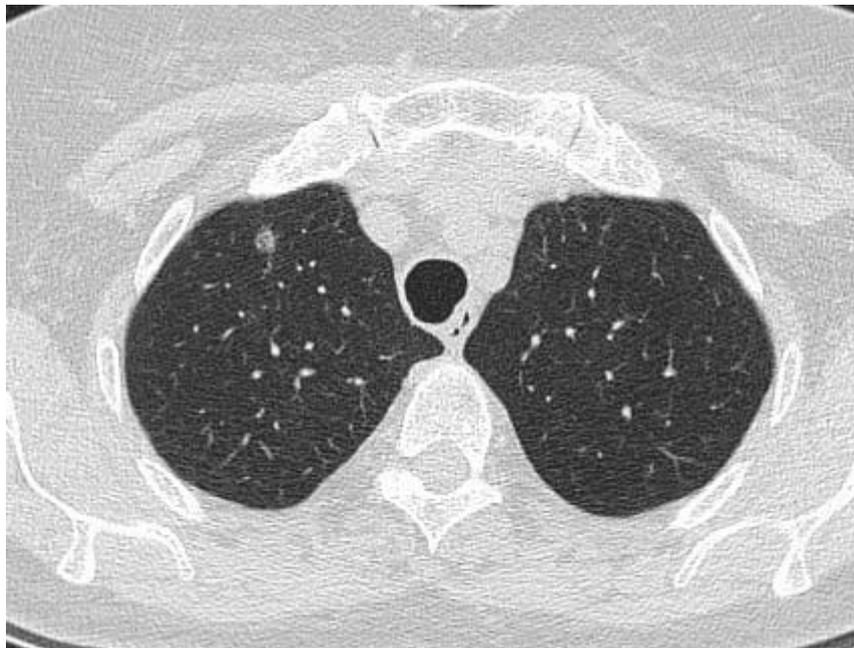
Amostras coletadas foram :1 vacutainer de sangue com EDTA para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 4 eppendorf com soro, 4 eppendorf com plasma. Em RPMI 1640 1 amostra de tumor para entrega no laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. Em RNALater 1 amostra de tumor.

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 01:00, tempo centrifugação /sangue freezer- 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido-01:30, tempo coleta tecido / congelação-00:30. O tempo máximo entre coleta e congelação 30 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos adequada, que não deve passar dos 30 minutos. Foi realizada imunofenotipagem com citometria de fluxo em sangue e tumor.

#### **Paciente 05- codificação 19-05-23/10**

Paciente feminina de 67 anos de idade, da raça preta, tabagista por 30 anos. Com antecedentes de diabetes mellitus tipo 2, transplante renal por estenoses da artéria renal, hepatites B e TB pulmonar antiga. Refere-se à dispneia de esforço

Na TC de tórax nós apreciamos opacidade nodular em vidro fosco medindo 2,3 x 1,8 cm localizada no segmento apical do lobo superior direito, com outro nódulo em vidro fosco no segmento ápico posterior do lobo superior esquerdo



**Figura 45-TC de Tórax de paciente 19-05-23/10 com opacidade nodular em vidro fosco localizada no segmento apical do lobo superior direito.**

O diagnóstico pré cirúrgico foi por biópsia percutânea do nódulo em lobo superior direito com histologia de adenocarcinoma de padrão lepidico. A técnica cirúrgica empregada foi a segmentectomia. O diagnóstico pós cirúrgico foi de adenocarcinoma de padrão lipídico não mucinoso com componente invasor de 0,6 cm, não invasão a pleura, presente invasão linfo vascular., que coincide com o diagnóstico imuno-histoquímica. As características visuais do tumor são de cor vermelho, friável, sangrento, de difícil definição ao tacto e visual. Não houve intercorrências na sala cirúrgica, nem complicações pós cirúrgicas. O tempo percorrido entre o diagnóstico e cirurgia foi de oito meses

Exames complementares :espirometria normal, capacidade de difusão redução moderada. TC de crânio e TC abdômen sem implante metastático, mamografia bilateral sem alterações neoplásicas, cintilografia positiva. Ecocardiograma com hipertrofia do septo interventricular, disfunção diastólica leve. Estadiamento tumoral -pT1cpN0pM0, Etapa IA3.

Amostras coletadas: 1 vacutainer de sangue com EDTA para entregar ao laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. 4 eppendorf com soro, 4 eppendorf com plasma. Em RPMI 1640 1 amostra de tumor para entrega no laboratório de Imunobioquímica da UFRGS. Em RNALater 1 amostra de tumor armazenada no laboratório da VAP a -80 graus de temperatura

Monitoramento da atividade cirúrgica para controlar o tempo entre coleta das amostras e congelação: tempo anestesia / coleta sangue- 00:30, tempo centrifugação sangue / freezer- 00:15, tempo coleta sangue/ coleta tecido- 01:30, tempo coleta tecido / congelação- 00:20. O tempo máximo entre coleta e congelação 20 minutos, compatível com o tempo estipulado para uma conservação de tecidos adequada, não deve passar dos 30 minutos.

Foi realizada imunofenotipagem com citometria de fluxo em sangue e tumor.

### **Análises Estatísticas**

A análise estatística dos dados foi processada e transcritos em o software SPSS for Windows release 14.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL, de forma descritiva para distribuição em frequências dos valores estudados, tendo em conta o pequeno número de pacientes estudados.

## Resultados

Para melhor identificação dos pacientes, eles foram agrupados em três protocolos de trabalho. No protocolo 1: coleta e conservação dos tecidos em Solução Salina Na CL 0,9% com soro fetal bovino em nitrogênio líquido (congelamento rápido) e em RNALater (congelamento lento) trabalhamos com 4 pacientes, representando o 25 % da amostra. O protocolo número 2: conservação da amostra de tecido tumoral de pulmão a fresco em PBS e conservação das amostras de tecido tumoral de pulmão, tecido pulmonar adjacente sadio e linfonodo, em RNALater representado por 7 pacientes, sendo 43% da amostra. E o protocolo 3: conservação da amostra de tecido tumoral a fresco em RPMI 1640 e conservação das amostras em RNALater de tecido tumoral, tecido pulmonar sadio adjacente e linfonodos, com 5 pacientes para 31% do total da amostra. A variedade de protocolos foi devido à procura do protocolo ideal para conservar a baixas temperaturas os tecidos pulmonares.

Os pacientes estudados foram divididos em dois grupos etários: de 35 a 60 anos e maior que 60 anos, em relação a idade de frequência do câncer de pulmão. Dos 16 pacientes, dentro do grupo de 35 – 60 anos foram 2 pacientes do sexo feminino sendo 13% do total. Entre o grupo maior de 60 anos temos 14 pacientes (88% do total), 9 mulheres (64%) e 5 homens (36%).

Trabalhamos com o tempo de uso do tabaco e não com a quantidade fumada, pois a quantidade tabáquica foi variável no mesmo paciente no tempo, dividindo-o em dois grupos, aqueles que fumaram até 30 anos da vida e aqueles que fumaram por mais de 30 anos. Verificamos que o 88% dos pacientes (n=14) eram brancos, deles 9 pacientes (64%) fumaram por mais de 30 anos, e 5 pacientes fumaram até 30 anos (36%). Da raça negra foram 2 pacientes (13%), dividido 50% (1 paciente) fumou por mais 30 anos e o outro até 30 anos.

O Adenocarcinoma foi o tipo histológico mais frequente no estudo, em 11 pacientes (69%), com maior distribuição entre os tabaquistas de mais de 30 anos, predominando no sexo feminino (6 pacientes). Quanto aos achados histológicos os adenocarcinomas foram invasivos (n=3-27%), acinar (n=4-36%) e micro papilar (n=3-27%), exceto um caso que é minimamente invasivo (10%). O segundo mais frequente foi o carcinoma indiferenciado com 3 (19%) pacientes tabaquistas de mais de 30 anos, com predomínio do subtipo neuroendócrino (n=2 -67%). O terceiro lugar mais frequente foi o carcinoma epidermóide em 2 pacientes (13%) tabagistas por mais de 30 anos.

Tabela 1- Localização tumoral

Pulmão	Lóbulo Superior	Lóbulo medio	Lóbulo Inferior	Total (n)	Porcentagens
	(n)	(n)	(n)		
Direito	6	1	4	11	68,8%
	54,5%	9,1%	36,3%		
Esquerdo	4		1	5	31,3%
	80%		20%		

**n- número de pacientes**

A localização tumoral foi baseada nos resultados da tomografia computadorizada de tórax realizada a cada paciente do projeto como parte do diagnóstico tumoral (tabela). O pulmão direito foi acometido em 11 pacientes, deles 6 pacientes no lobo superior (55%), 1 paciente (9%) no lobo médio e 4 (36%) no lobo inferior. O pulmão esquerdo é afeito em 5 pacientes (31%), com o lobo superior afeito em 4 pacientes (80%) e o lobo inferior em 1 paciente (20%). (tabela 1).

Os métodos utilizados para obtenção do diagnóstico histológico formam biópsia linfonodo axilar em 1 paciente (6,3%) sendo o resultado negativo, biópsia trans brônquica 1 paciente (6,3%), e biópsia percutânea em 10 pacientes (67,5%) com 2 resultados negativos (20%). O diagnóstico de maior confirmação diagnóstica foi intraoperatório com a biópsia por congelamento em 7 pacientes (44%). (tabela 2).

Tabela 2-Métodos utilizados para o diagnóstico histológico

Diagnóstico Cirúrgico	Frequência	Porcentagens	Negativa
	(n)		(n)
Biópsia por congelamento	7	43,8%	
Biópsia linfonodo axilar	1	6,3%	1
Biópsia transbrônquica	1	6,3%	
Biópsia Percutânea	10	62,5%	2

**n- número de pacientes**

Onze pacientes (69%), foram submetidos à lobectomia como tratamento cirúrgico. A segmentectomia foi a segunda escolha do tratamento, realizada em três pacientes (19%) com lesões tumorais entre 1 e 2 cm. A ressecção em cunha foi realizada em dois pacientes (12%). Duas lobectomias foram realizadas por videotoracoscopia (VATS) e uma cirurgia foi robótica.

**Tabela 3- Complicações pós cirúrgicas**

<b>Cirurgias</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Porcentagens</b>
<b>Complicadas</b>	<b>14</b>	<b>87,5%</b>
<b>Não complicadas</b>	<b>2</b>	<b>12,5%</b>
<b>Cirurgias realizadas</b>	<b>16</b>	<b>100%</b>

**n - número de cirurgias**

Dos 16 pacientes no estudo, 14 (87,5%) deles fizeram complicações pós operatórias em relação a lobectomia, com 2 (12,5%) pacientes sem complicações relacionadas com a segmentectomia. (tabela 3).

As complicações presentes nos pacientes foram: pneumonia (2-14%), pneumomediastino (1-7%), derrame pleural (3-21%), atelectasia (7-50%), enfisema subcutâneo (3-21%), tromboembolismo venoso profundo (veia iliofemoral) (1-7%), tromboembolismo pulmonar (3-21%), distensão gástrica (1-7%) , distensão de alças intestinais (2-15%) ,suboclusão Intestinal (1-7%) e hidropneumotórax (4-29%). O número maior de complicações se observou nas Lobectomias (tabela 4).

**Tabela 4- Complicações pós-operatórias por tipo de cirurgia feita**

<b>Complicações</b>	<b>Ressecção cunha(n)</b>	<b>Segmentectomia (n)</b>	<b>Lobectomia (n)</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Porcentagens</b>
Pneumonia		1	1	2	14,2%
Derrame pleural		1	2	3	21,4%
Atelectasia	1		6	7	50%
Tromboembolismo veia ileofemoral			1	1	7,14%
Tromboembolismo pulmonar			3	3	21,4%
Pneumomediastino			1	1	7,14%
Distensão gástrica			1	1	7,14%
Suboclusão intestinal			1	1	7,14%
Enfisema subcutâneo			3	3	21,4%
Hidropneumotórax			4	4	28,5%
Distensão alças intestinais	1		1	2	14,7%

**n- número de complicações**

Nos adenocarcinomas predominaram os tumores de tamanho entre 1-2 cm em 7 pacientes (64%), seguido dos tumores maiores de 2cm em 3 pacientes (27%) e tumor menor de 1cm em somente 1 paciente (10%). Nos dois casos de carcinomas epidermóides um tumor

era entre 1 e 2cm e o outro maior que 2cm. Os carcinomas indiferenciados de células grandes tinham tamanho maior que 2cm com calcificações em seu interior e alto índice de necrose.

### **3.1- Biomarcadores relacionados à imunomodulação de linfócitos B e T em pacientes com carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPCNP).**

Com as amostras coletadas a fresco e criopreservadas em RPMI 1640 no terceiro protocolo, foram realizados estudos de imunomodulação de linfócitos B e reguladores T, em 5 pacientes com CPNPC. Investigamos a relevância dos marcadores imunofenotípicos CD26, CD28, CD39 e CD73 para o prognóstico da CPNPC. O Painel de anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem com citometria no projeto foram os seguintes :CD3, CD4, CD8, CD19, CD26, CD39, CD69, CD73. Nos 5 pacientes do protocolo, foi realizada imunofenotipagem com citometria de fluxo sanguíneo periférico e em 2 pacientes com imunofenotipagem com citometria de fluxo do tecido tumoral, representando em tabelas os resultados.

A imunofenotipagem é uma técnica laboratorial utilizada para o estudo de proteínas de membrana expressas por leucócitos. É realizada diretamente em amostras de tecidos, suspensões celulares, etc. Consiste em colocar os leucócitos do doente em contacto com anticorpos específicos marcados (anticorpos monoclonais, proteínas produzidas no laboratório), dirigidos contra as proteínas da superfície da membrana celular, para promover a ligação antígeno-anticorpo e utilizando um citómetro de fluxo, um instrumento que utiliza lasers e analisa milhares de células por segundo; as células são diferenciadas ou rotuladas com elevada precisão. A análise imunofenotípica visa atribuir a linhagem à proliferação blástica uma vez definido o diagnóstico morfológico e é útil para prever o comportamento das populações linfócitos. (15,16,17)

Representamos com tabelas os resultados da imunotipagem com citometria de 3 pacientes, correspondendo a adenocarcinomas invasivos (2 pacientes) e carcinoma pouco diferenciado. Nossos resultados os comparamos com os valores normais dos anticorpos de indivíduos saudáveis referenciados na literatura, CD3-56-84% expressa linfócitos T , CD4-31-52% expressa linfócitos T coordena resposta imunitária, CD8-18-35% expressa linfócitos T(imunidade celular), CD19- 6-23% expressa linfócitos B, CD26 expressa linfócitos T ,

CD69 expressa linfócitos T, B, NK e macrófagos ativados recentemente, CD39- expressa linfócitos T, valor normal 60-85%, CD38 expressa linfócitos T ativados.(9,10)

### Imunofenotipagem e Citometria de fluxo. Resultados

**Tabela –5 Resultados de Imunofenotipagem por citometria de fluxo em sangue**  
**Paciente 1 19-04-09/10** Adenocarcinoma Lipídico invasivo, 8mm a tecido adjacente.

<b>CD3+</b>	<b>CD3+CD4+</b>	<b>CD39+ (granulócitos)</b>
71,7%	26,8%	55,1%
<b>CD3+CD8+</b>	<b>CD69+ (mononucleares)</b>	
46,3%	7,7%	
<b>CD19+</b>	<b>CD19+CD39-</b>	
9,6%	6,1%	
<b>CD16+CD56- (NKs)</b>	<b>CD4-</b>	
não avaliado	34,1%	
<b>CD3+CD4+CD39+ (Treg)</b>	<b>CD3+CD4+CD39- (Teff)</b>	
7,7%	29,1%	
<b>CD3+CD8+CD69+</b>	<b>CD69+ (granulócitos)</b>	
9,9%	24,5%	
<b>CD19+CD39+ (BREG)</b>	<b>CD4+CD39+ (Treg)</b>	
2,4%	6,3%	
<b>CD4+CD39- (Teff)</b>	<b>CD39+ (mononucleares)</b>	
51,2%	15,8%	

Encontramos CD3, CD4 dentro de valores normais, expressando presença de linfócitos T. Com CD19 dentro de valores normais representando linfócitos B. Presença de CD39 (linfócitos T citotóxicos, expressa diminuído o CD8) e CD69 nos falamos de linfócitos T, B e NK ativados presentes.

**Tabela 6-Resultados em Tumor Imunofenotipagem por Citometria,**  
**Paciente 1- 19-04-09/10**

<b>CD3+</b>
10,9 %
<b>CD3+CD8+</b>
9,2%
<b>CD19+</b>
4,5%

Presença de CD3, CD4 e CD19 diminuídos em relação aos valores normais expressando diminuídos os linfócitos T e B no tumor.

**Tabela 7-. Resultados de Imunofenotipagem por citometria de fluxo em sangue. Paciente 2 -19-05-23/10.** Adenocarcinoma lipídico, com invasão linfo vascular.

<b>CD3+</b>	<b>CD3+CD4+</b>	<b>CD39+ (granulócitos)</b>
59.4%	13.5%	62.8%
<b>CD3+CD8+</b>	<b>CD69+ (mononucleares)</b>	
23.1%	18.6%	
<b>CD19+</b>	<b>CD19+CD39-</b>	
10.8%	33.4%	
<b>CD3+CD4+CD39+ (Treg)</b>	<b>CD3+CD4+CD39- (Teff)</b>	
3.5%	95.8%	
<b>CD3+CD8+CD69+</b>	<b>CD69+ (granulocitos)</b>	
	51.3%	
<b>CD19+CD39+ (BREG)</b>	<b>CD19+CD38+CD39+ (BREG)</b>	
61.3%	14.6%	
<b>CD4+</b>	<b>CD4+CD39- (Teff)</b>	
39%	29.2%	
<b>CD4+CD39+ (Treg)</b>	<b>CD39+ (mononucleares)</b>	
8.8%	28.3%	

Presença CD3, CD4 (linfócitos T) dentro de valores normais, CD19 de valores normais (linfócitos B), presença de CD39 nos fala de diminuído CD8 (linfócito T), CD69 fala de ativação de linfócitos T, B e NK já existentes.

**-Tabela 8-Resultados de Imunofenotipagem por citometria de fluxo em tumor. Paciente 2 - 19-05-23/10.**

<b>CD3+</b>
17.9%
<b>CD3+CD8+</b>
17.6%
<b>CD19+</b>
2.2%
<b>CD3+CD8+CD69+</b>
5.2%

No tumor encontramos diminuídos CD3, CD19 e CD69 (linfócitos T, B NK) já existentes, com CD8 quase ausente.

**Paciente 3 -19-03-26/07** Carcinoma pouco diferenciado com invasão a pleura visceral e linfo vascular.

**Tabela 9 Resultados de Imunotipagem com citometria em sangue de paciente 3 -19-03-26/07**

<b>CD4</b>	<b>CD4+CD39+ (Treg)</b>	<b>CD4+CD39- (Teff)</b>	<b>CD4+CD39-CD26+</b>
57.1%	0.9%	56.3%	10%
<b>CD8+</b>	<b>CD8+CD69+</b>	<b>CD69+ (mononucleares)</b>	<b>CD69+ (granulócitos)</b>
52.2%	14.1%	27.7%	0.3%
<b>CD19+</b>	<b>CD19+CD39-</b>	<b>CD19+CD39+ (BREG)</b>	<b>CD19+CD38+CD39+ (BREG)</b>
6.5%	4.4%	3.7	16.4 (de CD19+CD39+)
<b>CD38+ (mononucleares)</b>	<b>CD38+ (granulócitos)</b>	<b>CD39+ (mononucleares)</b>	<b>CD39+ (granulócitos)</b>
16.9 %	1.2 %	7.5 %	4.3 %
<b>CD26+ (mononucleares)</b>	<b>CD26+ (granulócitos)</b>		
4.4%	0.1%		

Encontramos CD19 (normal), CD8 e CD4 (aumentados), CD26, CD38, CD39 e CD69 presentes. Todos os anticorpos como expressão dos linfócitos T, B e NK presentes comparados com os valores referenciais de pacientes saudáveis.

Nossos resultados da imunomodulação não são uma evidencia científica, pois não trabalhamos com grupo controle e o estudo foi realizado com um número escasso de

pacientes, com estes resultados expressamos funcionalidade das amostras conservadas, sendo isto a importância dos mesmos neste estudo.

### 3.2-Discussão

A cultura de células é um processo complexo e que necessita de padronização e de vários cuidados quanto a coleta, manuseio da amostra, armazenamento e viabilidade celular. Na literatura existem diferentes protocolos para diferentes tipos de células (17) Sendo assim, protocolos para cultura de células de epitélio brônquico podem variar em termos de tipo de nutrientes e tempo de incubação quando comparadas a hepatócitos, exemplo (18,19). Existem linhas de culturas celulares que são imortalizadas e são utilizadas para diferentes estudos, exemplo (20), normalmente estes tipos de células são linhagens de células tumorais, uma vez que elas têm capacidade de duplicação adequada e podem simular determinadas situações *in vivo*. No entanto, em termos para estudo de neoplasias pulmonares o ideal seria estudar *in vitro* as células viáveis de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão com objetivo de fornecer informações úteis tanto para o entendimento do processo neoplásico como para potenciais tratamentos que dariam benefícios a estes pacientes (21).

A cultura de células neoplásicas em humanos, apresenta problemas semelhantes aos de cultura de células especializados de tecido normal. As células tumorais devem ser separadas das células do tecido conjuntivo normal, utilizando um meio de cultura apropriado para células neoplásicas. Além disso, as neoplasias são normalmente compostas por uma grande variedade de células, tornando-se assim mais difícil a representatividade e reprodutibilidade da amostra. Em nosso estudo testamos três protocolos de coleta referente ao criopreservante para verificar a viabilidade das amostras tumorais de pulmão: NaCl 0,9%/SFB e RNALater; PBS/RNALater e RPMI/ RNALater. O protocolo com RPMI mostrou a presença de células viáveis (linfócitos T e B) e foi possível realizar imunofenotipagem e citometria de fluxo. A Solução salina com SFB e o RNALater mostrou-se segura em manter as amostras tumorais criopreservadas por onze meses com viabilidade para obtenção das suspensões celulares com a dissociação ou desagregação celular. O PBS como criopreservante impediu a cultura primária em RPMI 1640 ao não permitir o crescimento das amostras de tecido tumoral, provavelmente ao precipitar os cristais dos sais de fosfato e de NaCl que o compõem durante as trocas de temperatura (frio e calor).

Para a imunomodulação de linfócitos B e T realizamos imunotipagem com citometria de fluxo em sangue e em fragmentos de tumor em três pacientes do protocolo número três, comparando os resultados com os valores normais referenciados na literatura de indivíduos saudáveis. Os resultados da imunofenotipagem com citometria dos dois pacientes com adenocarcinoma não são estatisticamente representativos, devido ao número reduzido de pacientes estudados, e por não ter um grupo controle de indivíduos saudáveis. No entanto, demonstramos que foi possível realizar este tipo de análise e que estudos utilizando este tipo de metodologia podem ser muito úteis no entendimento do comportamento do componente imunológico das células tumorais.

Os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma apresentavam CD39 em sangue periférico e tumor em níveis diminuídos quando comparados a valores referenciais de indivíduos saudáveis. A função do CD39 é eliminar efetivamente o ATP extracelular tóxico, convertendo-o em ADP (adenosina, um fator imunossupressor muito potente), isto leva a mudanças de um ambiente pró-inflamatório controlado por ATP para um ambiente anti-inflamatório. Parodi et al. descreveram presença de células T CD8 + expressando CD39 em biópsias de tumores de pacientes com diferentes tipos de câncer <sup>(22)</sup> Atualmente é de conhecimento que a subpopulação de células T CD8+ esgotadas exibem um fenótipo disfuncional e contribuem para um controle imunológico deficiente de tumores e infecções virais crônicas, sendo assim o CD39 define a depleção celular em células T tumorais infiltram-te CD8+. Então sua diminuição seria um fator de mau prognóstico uma vez que haveria uma redução da depleção de linfócitos tumorais CD8 infiltram-te <sup>(23)</sup>. No câncer, as células T reguladoras acumulam-se no sangue periférico e no tumor dos pacientes e são fenotípica e funcionalmente expressas como CD39 e CD73 ao hidrolisar ATP para 5'-AMP e adenosina (ADO) sendo responsável pela supressão das respostas imunológicas antitumorais. Adicionalmente, encontramos diminuída a presença de CD8 no sangue e no tecido tumoral, indicando uma diminuição de linfócitos T citotóxicos, responsáveis pelo apoptose celular, uma resposta crucial contra o desenvolvimento tumoral <sup>(24,25)</sup>

Em nosso estudo, os valores de CD3 e CD4 estavam dentro dos parâmetros normais para um indivíduo saudável. A presença destes linfócitos T reacionais tem papel importante na imunidade celular e ativação dos macrófagos que contribuem para a morte tumoral sendo então um marcador de proliferação celular.

O CD19 em sangue encontrava-se dentro de valores normais comparados com os indivíduos saudáveis e indicando a presença de linfócitos B. Na citometria tumoral os valores de CD19 estavam diminuídos indicando ausência de linfócitos B imaturos e expressando imunodeficiência pela presença tumoral. Os linfócitos B desempenham um papel imunossupressor pela sua capacidade de atuar como células reguladoras ou Bregs, influenciando na diferenciação das células T e, portanto, as respostas inflamatórias mediadas por células T através da produção de IL-10. (26)

Pouco se conhece da biologia das células B (linfócitos B) no comportamento tumoral. Patel et al observaram o comportamento de células B tumorais em todas as fases de desenvolvimento do câncer do pulmão de não pequenas células, sua presença é variável de acordo com o estágio e subtipo histológico (27,28.) demonstrando que desempenham um papel importante tanto na imunidade humoral como celular, podendo bloquear tanto a capacidade de resposta como a toxicidade do tumor. Sendo assim, células B desempenham um papel vital no desenvolvimento do sistema imunológico, mas também são responsáveis pela homeostase imunológica.

A citometria de fluxo realizada em sangue periférico de um de nossos pacientes com carcinoma indiferenciado e com invasão a pleura visceral, mostrou presença de aumento CD26 o que pode estar associado a uma agressividade maior do tumor, uma vez que a presença de CD26 desempenha um papel importante na biologia tumoral e é útil como marcador de vários tipos de câncer, mostrando níveis aumentados na superfície celular e expressão plasmática em alguns tipos de neoplasias e reduzida em outros tipos de tumor (29)

Existe evidência de que células imunes, por exemplo células endoteliais, estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento da neoplasia de pulmão e que a atividade do CD26 / DPP4 em pacientes com câncer de pulmão em estágios iniciais é quatro vezes maior do que no tecido normal (30,31)

Outro marcador importante é o CD38, que em nosso paciente com carcinoma indiferenciado e invasão da pleura visceral, apresentou diminuição discreta (granulócito) e aumento marcado (monócitos). A presença de um aumento de CD38 caracteriza-se por uma evolução clínica desfavorável e estágio mais avançado da doença, má resposta à quimioterapia, pouco tempo para o início do primeiro tratamento e sobrevivência mais curta, sendo um marcador da ativação de células malignas.(32,33). Temos também a presença do

CD69 como expressão da ativação de linfócitos T e B, e de células assassinas naturais (NK) já presentes infiltrando o tumor, se conhece sua relação nos processos inflamatórios crônicos como modulador da resposta imune .(34,35,36)

Nosso estudo demonstrou que existem vários detalhes que devem ser levados em consideração quanto da coleta e armazenamento de materiais biológicos de câncer de pulmão. Uma vez tomados todos estes cuidados necessários, a obtenção de células viáveis é possível tanto de sangue periférico como tecido tumoral. O uso destas células para culturas primárias pode fornecer informações importantes sobre o comportamento biológico dos tumores e também sobre tratamentos personalizados para cada paciente. Os resultados da imunotipagem com citometria, indicam a presença / ausência de linfócitos T e B, expressam a funcionalidade das amostras coletadas de sangue periférico e do tecido tumoral, significando viabilidade e vitalidade das amostras. Demonstram também que os protocolos (metodologia) de imunotipagem com citometria de fluxo tecido tumoral e sangue periférico são eficazes para a identificação de biomarcadores imunofenotípicos no câncer de pulmão.

#### 4- CONCLUSÕES

1- Um mecanismo de estrutura organizada foi estabelecido para a coleta, preservação e armazenamento de amostras de sangue, tecido pulmonar saudável, tecido tumoral pulmonar e linfonodal em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas

2- Demonstramos a viabilidade de amostras de sangue periférico e tecido tumoral crio preservado que nos permite futuras pesquisas (neste caso Imunofenotipagem com Citometria de fluxo, obtendo linhagem celular com a dissociação ou desintegração dos tecidos em três momentos diferentes (aos onze meses, três meses após a criopreservação das amostras e com amostras frescas), com diferentes pacientes (portadores de adenocarcinoma e de carcinoma epidermóide) e com diferentes criopreservantes (Solução Salina NaCl 0,9% / SFB, RNALater e RPMI 1640).

3-Realizamos um treinamento adequado referente ao uso e desinfecção do material de laboratório, assim como treinamento para uso de equipos de laboratório e técnicas laboratoriais em sangue e tumor. Imunotipagem com Citometria de fluxo e cultura celular.

4- Demonstramos a viabilidade e funcionalidade das amostras de sangue periférico e tumor de pulmão ao realizar Imunotipagem com Citometria de fluxo com a presença ou ausência dos marcadores imunofenotípicos como CD3,CD4,CD8,CD19,CD26,CD38,CD39 e CD69 que são expressão da presença ou ausência de células do sistema imune os linfócitos T e B.

**5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1-www.who.int /. **Estatísticas OMS**. revisado junho2019
- 2-www.inca.gov/ **Estatísticas INCA**. revisado junho 2019
- 3-www.epsjv.fiocruz.br. **Cultivo celular**. EPSJV Fiocruz/ capitulo\_5\_vol2. revisado junho2019.
- 4- www.ehu.eus.biofisica. **Introducción al cultivo celular**.EHU. revisado junho 2019
- 5- www.conganat.org.com.**Bases Metodológicas e instrumentales**. (Parte 111). revisado junho 2019
- 6- ALDAROUISH M. W **Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy**. Department of Oncology, Zhongda Hospital, School of Medicine Southeast University Republic of China.**J Exp Clin Cancer Res**\_ 2016 (cited July 2019).29;35(1):157
- 7- BRANCHINI.G. Orientador BRUM.I.S. **Estabelecimento de cultura primária de células de carcinoma prostático e avaliação da resposta ao silenciamento por RNAi do receptor de androgênio e seu cor repressor NCoR**. Porto Alegre.2011. (citado junho 2019). lume.ufrgs.br.
- 8-BARRERA-RODRIGUEZ.R, PERALTA-ZARAGOZA.O. **Base molecular da Imunologia do Câncer** Departamento de Bioquímica da Imunologia do Câncer. México. 2018.(citado Junho 2019)saludpublica.mx > index.php >.
- 9-- SILVA FILHO.G.N. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos**. 2004.(citado junho 2018) Ed. da UFSC.
- 10-DE LEÓN.J. **Cancer immunology I: molecular and cellular bases of the antitumor immune response**. Lima. Perú. Horiz. Med. jul./set. 2018. (citado junho 2019) vol.18 no. 3.

11-- [www.uco.es/grupos/immunologia-molecular/immunologia](http://www.uco.es/grupos/immunologia-molecular/immunologia) **Immunology online**. Córdoba. Revisado junho 2019. Sweden Diagnostics.

12- -- FACULTAD DE MEDICINA. UASLP, **Preparación de phosphate buffered saline**. 04/2008. (citado junho 2018) Laboratorio de Genômica Viral y Humana.

13- SERRANO B.C; GUTIÉRREZ.I.R. **Manual de microbiologia UC**. ISBN (citado Junio 2018).2018.956-14-2347-2. OCLC 110880326.

14- CARBAJAL. A. **Meio de cultura celular**. University of Pittsburgh Medical Center, United States.2018. (citado junio 2018) [www.labome.es](http://www.labome.es).

15-[www.conganat.org.com](http://www.conganat.org.com). **Marcadores imunofenotipicos uteis**. revisado junho 2019

16-DAYDA.J, DECLERCK.P, HU-LIESKOVAN.S, HICKLING.T. P, JACOBS I.A, CHOU.J, SALEK-ARDAKANI.S, KRAVNOV.E. **Immunogenicity of immunomodulator antibody-based, oncology therapeutics**. Journal for Immunotherapy of Cancer, April.2019. (cited July 2019) Vol.7(1).

17- LEITE, DA SILVA ,JF; SARMENTO, A.B; MARQUES,M.P. **Influência do stresse oxidativo na morte de células de Leucemia Aguda em cultura : relação com os níveis de 5-hidroximetilcitosina**. FCTUC Ciências da Vida (Internet).2012(Citado Junho2019) Disponível <http://hdl.handle.net/10316/26193.2012>

18- -WANG, P; GAO, Q; SUO, Z; MUNTHE, E. **Identification and Characterization of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Primary Lung Cancer Cell Lines**. PLoS ONE. Mar2013, Vol. 8 Issue 3, p1-15. 15p. (Cited july 2019) DOI: 10.1371/journal.pone.0057020.

19- MEENAKSHI. A. **Medios de cultivo celular, una revisión.** University of Pittsburgh Medical Center, United States.2018. (citado Julho 2019) DOI //dx.doi.org/10.13070/mm.es.3.175.

20- SOLARI, GONZÁLEZ I.J; ANDRADE, FEIJÓ C; KLAMT, F; CHIELA, FILIPPI E.C **Avaliação da combinação quimioterápica na indução de morte imunogênica no tratamento de câncer de pulmão de não-pequenas células.** Revista Lume. ufrgs.br.(internet).2017.(CitadoJulho.2019).Disponível:<http://hdl.handle.net/10183/179718>. 2017.

21 - DÍES LÓPEZ-AYLLÓN B. **Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de cancer stem cells (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP).** Universidad Autonoma de Madrid. 2013.(citado Julio 2019) digital.csic.es.

22- - PARODI. A. **CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, United States. 2013.(cited July 2019) vol 62, page 851 -862).

23 CANALE.F.P. **CD39 as a marker of pathogenic CD8+ T cells in cancer and other chronic inflammatory diseases.** *Oncoscience*. Published online 04/2018, (cited July 2019)5(3-4): 65–66.

24- CANALE.F. P, RAMELLO.M.C, NÚÑEZ.N, ARAÚJO.F.C, BOSSIO S. **CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells.** Dpto Bioquímica. Universidad de Córdoba 2018. (cited July 2019) DOI.10.1158/0008-5472.CAN-16-2684.

25- ANTONIOLLI. L, PACHER P, SYLVESTER V. E, HASKÓ G. **CD39 and CD73 in immunity and inflammation**. Trends Mol Med., 2013. (cited Janeiro 2019) DOI.19(6): 355–367...

26- CANGUERINI.M. **Ativação de linfócitos B promove ação antitumoral**. 2019. AUN.Agência universitária de notícias. ISSN 2359-5191 (citado julho 2019) Disponível [www.paineira.usp.br](http://www.paineira.usp.br).

27- PATEL, AKSHAY J; RICHTER, A; DRAYSON MT; MIDDLETON, G W. **The role of lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer**. Cancer Immunol Immunother. 2020; Published online 2020 Jan 4. (cited jan2020) 69(3): 325–342. doi: 10.1007/s00262-019-02461-2

28- FULOP, T; FRANCESCHI, C; HIROKAWA, K; PAWELEC, G. **Older Human B Cells and Antibodies** .Handbook of Immunosenescence. 2019 Apr 11: 785–819.Published online 2019 Apr (cited July 2019) 11:785–819. doi: 10.1007/978-3-319-99375-1\_21 PMCID: PMC7121151.

29- MASTELIC-GAVILLET.B, NAVARRO. RODRIGUEZ.B, DECOMBAZ.L, WANG.HAIPING.E. G, AHMED.R, LOZANO.LEYDER. E, JANARO.A. **Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor infiltrating CD8+T cells**. Report Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019. (cited July 2019) Vol 7(1).

30- MASAKO. A, HAVRE.A. P, URASAKI.Y, OHNUMA.K, MORIMOTO .C, DANG.H. L, DANG.H. N. **Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines**..Abe et al. BMC Cancer ,2011 (cited July 2019) <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/51>).

31-RODRIGUEZ QUIROGA.M. **Análisis de la expresión de la proteína CD26 en relación con otros marcadores de células madre tumorales y estudios funcionales en líneas celulares de cáncer de colon**: 2019,3207.13 (cited July 2019) Oncología; 2302.21 Biología Molecular; .2302.27 Proteínas

32- HON CHAUNG.L. **Structure and Enzymatic Functions of Human CD38**. Mol Med .2016. (cited July 2019)12 (11-12 )317-323).

33- EHLERDING.E. B, ENGLAND.C. G, JIANG.D, GRAVES.S.A. **CD38 as a PET Imaging Target in Lung Cancer**. 07/2017. Mol. Pharma. MEDLINE ID 2017 Jul (cited July 2019)3;14(7):2400-2406. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00298.

34- DOMINGUEZ.L.A. Madrid. **Papel de CD69 en los mecanismos de la respuesta inmune inflamatoria**. Universidad Autónoma de Madrid.2009. (citado Julio 2019) <http://hdl.handle.net/10486/3990>

35 -LAGUNA.LOBO.M.T. **Regulación de la expresión de CD69 y sus efectos funcionales**. Universidad Complutense de Madrid. España.2013. (citado junio 2019) <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis>.

36- CIBRIÁN, D; SÁNCHEZ-MADRID, F. **CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper**. European journal immunology. First published:05 May 2017 (cited July 2019) <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>.

37-INFANTE.S. **Una de las mejores terapias contra el cáncer. La inmunoterapia**. Dpto Ciclo celular. Revista de Derecho, Empresa y Sociedad (REDS), 2016. (citado junho 2019) ISSN-e 2340-4647, págs. 93-106

38- ARQUÉ.M. **Conservação do tecido pulmonar congelado em OCT.**Plataforma de Biobanco Pulmonar. Ciberes. 2009.doc. N° de código8.2.006 versões.

39- ARQUÉ.M.. **Conservação tecido pulmonar em RNA Later.** Plataforma de Biobanco Pulmonar. Ciberes.2009 (citado junho 2019) doc. PNT 8.2. 002.versão.

41- VIDAÑA.L, PIÑERO. E, PONS D. **Conservação do tecido pulmonar em congelação rápida.** Ciberes. Plataforma biobanco pulmonar. 2016.(citado junho 2019) PNT\_8.2.004\_v1.2 N°de código: 8.2.003 C.

## 6-APÊNDICE

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do Projeto: ESTUDO PILOTO CLÍNICO EXPERIMENTAL REFERENTE A COLETA E ARMAZENAGEM DE MATERIAL DE CARCINOMA PULMONAR DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE PARA UTILIZAÇÃO EM PESQUISA BIOMÉDICA**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa, cujo objetivo é coletar, armazenar amostras de tecido tumoral pulmonar, tecido pulmonar sadio e sangue, para estabelecer padrões de conservação e utilização de amostras para realização de pesquisa biomédica. Esta pesquisa está sendo realizada pela estudante de doutorado em Ciências Pneumologias Rita Maria González García, junto dos Profs. Cristiano Feijó Andrade e Fabio Klamt, com a participação de outros pesquisadores do Serviço de Cirurgia Torácica e Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: coleta de 40 ml de sangue periférica, Broncoscopia, proceder endoscópico para realizar biopsia do tumor; e ressecção pulmonar; proceder cirúrgico para retirada do tumor como parte da terapêutica de sua doença ou como procedimento diagnóstico.

Os possíveis riscos decorrentes da participação na pesquisa são: pela retirada de amostra sanguínea, dor e hematomas (mancha roxa) no local na punção, que desaparecem em 1 ou 2 dias imediatamente após de sua realização. Pela Broncoscopia aparece tosse ou rouquidão que geralmente desaparecem nas primeiras horas após do procedimento; dor ou sangramento na via respiratória por um período variável, geralmente inferior a 24 horas; escape de ar para dentro da pleura (pneumotórax), podendo ser necessário na colocação do dreno dentro do tórax como tratamento; dificuldade respiratória devido ao edema pela passagem do aparelho; febre e calafrios geralmente nas primeiras 24 horas após o procedimento; espasmos das vias respiratórias durante no exame poderão necessitar intubação traqueal e ventilação mecânica como tratamento. No procedimento cirúrgico, poderão aparecer complicações técnicas durante a cirurgia que impeçam sua realização; suspensão da cirurgia por impossibilidade de realizar a anestesia, por condições técnicas ou clínicas surgidas imediatamente antes do ato cirúrgico; dor na região da incisão cirúrgica, requerendo medicamentos analgésicos, possibilidade de permanecer com um a dois drenos para drenar possíveis coleções internas

de líquido ou sangue, cicatrização esteticamente inadequada por fatores individuais (queloides, cicatriz hipertrófica, etc.); e risco associado ao ato anestésico.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são indiretos a você, mas o resultado da pesquisa nos permitirá no futuro um diagnóstico mais preciso e uma melhor modalidade de tratamento, que podem apresentar algum benefício nestes aspectos a sua pessoa.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, nas amostras serão armazenadas. Estes materiais além de serem utilizados neste estudo, poderão ser utilizados em outros estudos futuros de nosso grupo. Neste caso o novo projeto será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para novo consentimento do uso do material.

A participação em na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Em caso você decida não autorizar na participação, ou ainda retirar na autorização após de assinar o Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante de na pesquisa o possa vir a receber na instituição.

Não está prevista nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou danos, resultante da pesquisa, o todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não apareceram na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável-----  
-----pelo telefone, -----  
----; com o pesquisador -----, pelo telefone -----  
-----, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2do andar do HCPA, sala 2227, de segunda a sexta, das 8h às 17h.

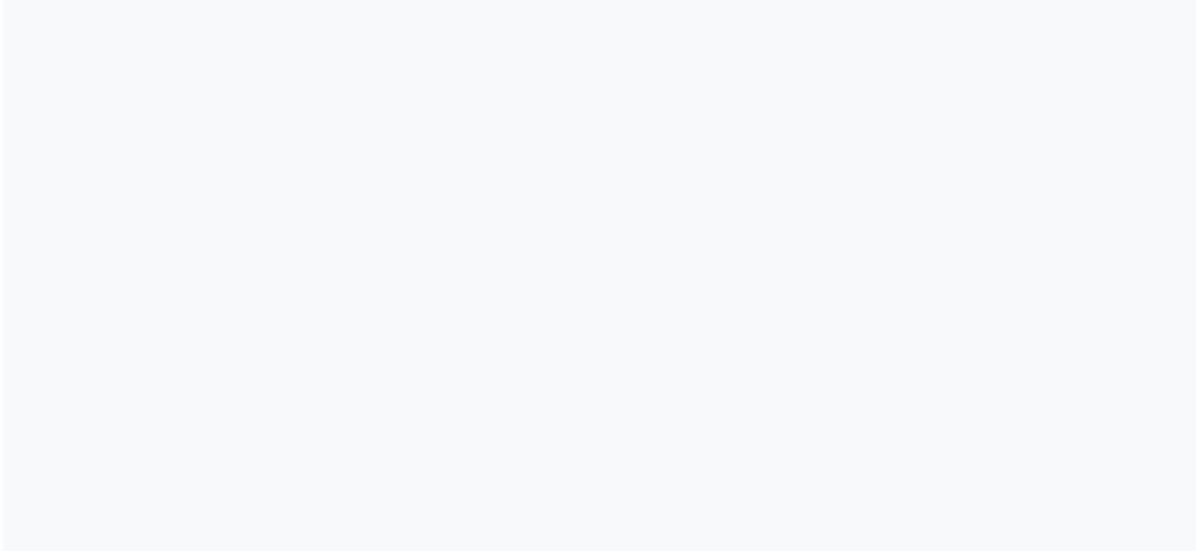
Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

( ) Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura (se aplicável).

A large, empty rectangular box with a light gray background, intended for the participant's signature or name.

## ARTIGO CIENTÍFICO

**Estudo piloto clínico experimental de coleta e armazenamento de material de carcinoma pulmonar para utilização em pesquisa biomédica**

**Pilot experimental, clinical study of collection and storage of material from pulmonary carcinoma for utilization in biomedical research**

Autores

Rita Maria González García, PhD/MD. (Orcid.org/-0000.0002.0247-7246), email ritamariagonzalez2015@gmail.com.

Fábio Klamt PhD Bioquímica (Orcid.org/0000-0001-9152-4229)

[email.fabio.klamt@ufrgs.br](mailto:email.fabio.klamt@ufrgs.br).

Fabrizio Figueiró, PhD Bioquímica, email fabriciofiguero@gmail.com

Juliete Nathali Scholl, MsC Bioquímica (Orcid.org/0000-0002-9509-2010) juliete.scholl@gmail.com

Fabiana Manica, Farmacêutica (Orcid.org/0000-0003-1673-2815), email manicafabiana@gmail.com

Cristiano Feijó Andrade PhD/MD (Orcid.org/0000-0002-6431-3079) email [cfandrade@hcpa.edu.br](mailto:cfandrade@hcpa.edu.br).

### Resumo

Apesar dos avanços no entendimento do comportamento biológico do câncer de pulmão e o surgimento de novas modalidades de tratamento, ainda existem muitas variáveis da biologia tumoral que são pouco estudadas e compreendidas. Por este motivo, desenvolvemos uma metodologia para coleta de material a fresco de tecido tumoral e sangue periférico de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão não de pequenas células para testar diferentes protocolos de preservação celular, sua viabilidade e análise de marcadores moleculares por citometria de fluxo. Com este estudo não foi possível realizar cultura celular primária dos tumores retirados, no entanto foi possível verificar a viabilidade celular de amostras armazenadas até onze meses após a sua retirada e dosar marcadores imunofenotípicos relacionados ao comportamento tumoral. Verificamos que o desenvolvimento e padronização de um método de coleta a fresco de material tumoral pode fornecer informações importantes sobre o comportamento do tumor de determinado indivíduo com potencial de ser utilizado para um provável tratamento personalizado e definição de prognóstico.

**Palavras-chave: neoplasias pulmonares; carcinoma de células não pequenas; imunologia; anticorpos**

## Abstract

Despite advances in the understanding of the biological behavior of lung cancer and the development of new treatment modalities, there are still many variables in tumor biology that are poorly understood. For this reason, we developed a methodology for collecting fresh samples from tumor tissue and peripheral blood from patients diagnosed with non-small cell lung cancer to test different cell preservation protocols, their viability and analysis of molecular markers by flow cytometry. With this study it was not possible to perform primary cell culture of the removed tumors, however it was possible to verify the cell viability of samples stored up to eleven months after their removal and to measure immunophenotype markers related to the tumor behavior. We found that the development and standardization of a method of harvesting fresh tumor samples can provide important information about the behavior of the tumor in a specific individual with the potential to be used for a personalized treatment and define prognoses.

**Keywords: lung neoplasms; non small cell carcinoma; immunology; antibodies.**

A conservação do patrimônio genético trouxe a necessidade de novas formas de diagnóstico e tratamento do câncer de pulmão, pelo qual faz-se necessário a coleta e conservação de tecidos frescos, de maior qualidade, que permitam o estudo dos fenômenos moleculares. A cultura de células é um processo complexo e que necessita de padronização e de vários cuidados quanto a coleta, manuseio da amostra, armazenamento e viabilidade celular. Na literatura existem diferentes protocolos para diferentes tipos de células, exemplo (1). Sendo assim, protocolos para cultura de células de epitélio brônquico podem variar em termos de tipo de nutrientes e tempo de incubação quando comparadas a hepatócitos, exemplo (2). Existem linhas de culturas celulares que são imortalizadas e são utilizadas para diferentes estudos, exemplo (3), normalmente estes tipos de células são de linhagens de células tumorais, uma vez que elas têm capacidade de duplicação adequada e podem simular determinadas situações *in vivo*. No entanto, em termos para estudo de neoplasias pulmonares o ideal seria estudar *in vitro* as células viáveis de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão com objetivo de fornecer informações úteis tanto para o entendimento do processo neoplásico como para potenciais tratamentos que dariam benefícios a estes pacientes (4).

Nosso estudo estabeleceu um mecanismo estrutural e organizacional para coleta, preservação, armazenamento, viabilidade e análise molecular de amostras de tecido tumoral pulmonar, tecido pulmonar adjacente saudável e sangue: provenientes de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão de não pequenas células. Investigamos possíveis biomarcadores relacionados à imunomodulação de linfócitos B e T, demonstrando a relevância dos marcadores imunofenotípicos CD26, CD28, CD39 e CD73 para o prognóstico

da CPNCP. Foi realizado como um ensaio piloto clínico experimental longitudinal, prospectivo e não randomizado no qual o mesmo indivíduo foi estudado em seu perfil genético e molecular através de diferentes amostras. A seleção da amostra foi feita por conveniência, não probabilística, não aleatória e intencional; em diferentes momentos de coleta, conservação e armazenamento, relacionados com a data da cirurgia; e criopreservantes e meios de cultura diferentes. Protocolo 1: 200µl solução salina NaCl 0,9 % / 20µl soro fetal bovino e 200µl RNALater; protocolo 2 com 300µl PBS e 200µl RNALater; protocolo 3: 4ml de RPMI 1640 e 200µl RNALater. Foram coletados a fresco 20ml de sangue periférico, duas amostras de tecido tumoral de pulmão, duas amostras de tecido adjacente de pulmão saudável, e linfonodo mediastinal por pacientes estudados.; criopreservadas a -80°C. Todos os pacientes do projeto assinaram o termo de consentimento para uso de suas amostras e dados. O projeto foi analisado e autorizado pelo Comitê de Ética em investigação em humanos da instituição sob o número 170311. Os tumores coletados foram adenocarcinoma (69%), carcinoma indiferenciado (19%) e carcinoma epidermóide (12%), de um total de 16 pacientes no estudo. As amostras de sangue periférico foram conservadas como soro e plasma a -80°C, O protocolo com RPMI 1640 mostrou a presença de células viáveis (linfócitos T e B) ao realizar imunofenotipagem e citometria de fluxo. A solução salina com SFB e o RNALater mostrou-se segura em manter as amostras tumorais criopreservadas por onze meses com viabilidade para obtenção das suspensões celulares com a dissociação ou desagregação celular. Não foi possível realizar cultura primária em RPMI 1640 com as amostras de tecido neoplásico armazenadas em PBS devido muito provavelmente que o PBS precipita os cristais dos sais de fosfato e de NaCl com as trocas de temperatura, comprometendo então a viabilidade celular, além não usamos nutrientes no PBS e também o tamanho da amostra pode infligir na falha da viabilidade. (5)

O tempo entre coleta e congelação das amostras foi inferior a 30 minutos. Para a imunomodulação de linfócitos B e T realizamos imunotipagem com citometria de fluxo em sangue e em fragmentos de tumor em três pacientes do protocolo 3 (RPMI1640), comparando os resultados com os valores normais de indivíduos saudáveis. Os resultados dos pacientes não são estatisticamente representativos, devido ao número reduzido de pacientes estudados, e por não ter um grupo controle de indivíduos saudáveis. No entanto, demonstramos que foi possível realizar este tipo de análise e que estudos utilizando este tipo de metodologia podem ser muito úteis no entendimento do comportamento do componente imunológico das células tumorais.

Os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma apresentavam CD39 em sangue periférico e tumor em níveis diminuídos quando comparados a valores referenciais de indivíduos saudáveis. A função do CD39 é eliminar efetivamente o ATP extracelular tóxico, convertendo-o em ADP (adenosina, um fator imunossupressor muito potente), isto leva a mudanças de um ambiente pró-inflamatório controlado por ATP para um ambiente anti-inflamatório. Parodi et al. descreveram presença de células T CD8 + expressando CD39 em biópsias de tumores de pacientes com diferentes tipos de câncer (6). Atualmente é de conhecimento que a subpopulação de células T CD8+ esgotadas exibem um fenótipo disfuncional e contribuem para um controle imunológico deficiente de tumores e infecções virais crônicas, sendo assim o CD39 define a depleção celular em células T tumorais infiltrantes CD8+. Então sua diminuição seria um fator de mau prognóstico uma vez que haveria uma redução da depleção de linfócitos tumorais CD8 infiltrantes (7,8). No câncer, as células T reguladoras acumulam-se no sangue periférico e no tumor dos pacientes e são fenotípica e funcionalmente expressas como CD39 e CD73 ao hidrolisar ATP para 5'-AMP e adenosina (ADO) sendo responsável pela supressão das respostas imunológicas antitumorais. Adicionalmente, encontramos diminuída a presença de CD8 no sangue e no tecido tumoral, indicando uma diminuição de linfócitos T citotóxicos, responsáveis pelo apoptose celular, uma resposta crucial contra o desenvolvimento tumoral (9).

No estudo, os valores de CD3 e CD4 estavam dentro dos parâmetros normais para um indivíduo saudável. A presença destes linfócitos T reacionais tem papel importante na imunidade celular e ativação dos macrófagos que contribuem para a morte tumoral sendo então um marcador de proliferação celular. O CD19 em sangue encontrava-se dentro de valores normais comparados com os indivíduos sadios e indicando a presença de linfócitos B. Na citometria tumoral os valores de CD19 estavam diminuídos indicando ausência de linfócitos B imaturos e expressando imunodeficiência pela presença tumoral. Os linfócitos B desempenham um papel imunossupressor pela sua capacidade de atuar como células reguladoras ou Bregs, influenciando na diferenciação das células T e, portanto, as respostas inflamatórias mediadas por células T através da produção de IL-10. (10,11,12).

A citometria de fluxo realizada em sangue periférico de um de nossos pacientes com carcinoma indiferenciado e com invasão a pleura visceral, mostrou presença de aumento CD26 o que pode estar associado a uma agressividade maior do tumor, uma vez que a presença de CD26 desempenha um papel importante na biologia tumoral e é útil como marcador de vários tipos de câncer, mostrando níveis aumentados na superfície celular e

expressão plasmática em alguns tipos de neoplasias e reduzida em outros tipos de tumor (13,14,15). O CD38, em nosso paciente com carcinoma indiferenciado e invasão da pleura visceral, apresentou diminuição discreta (granulócito) e aumento marcado (monócitos). A presença de um aumento de CD38 caracteriza-se por uma evolução clínica desfavorável e estágio mais avançado da doença, má resposta à quimioterapia, pouco tempo para o início do primeiro tratamento e sobrevivência mais curta, sendo um marcador da ativação de células malignas (16,17). Temos também a presença do CD69 como expressão da ativação de linfócitos T e B, e de células assassinas naturais (NK) já presentes infiltrando o tumor, se conhece sua relação nos processos inflamatórios crônicos como modulador da resposta imune (18,19,20).

Os resultados da imunotipagem com citometria, indicam a presença / ausência de linfócitos T e B, expressam a funcionalidade das amostras coletadas de sangue periférico e do tecido tumoral, significando viabilidade e vitalidade das amostras. Demonstram também que os protocolos (metodologia) de imunotipagem com citometria de fluxo tecido tumoral e sangue periférico são eficazes para a identificação de biomarcadores imunofenotípicos no câncer de pulmão.

Foi estabelecido um mecanismo de estrutura organizada para a coleta, preservação e armazenamento de amostras de sangue, tecido pulmonar saudável, tecido tumoral pulmonar e linfonodal em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas. Demonstramos a viabilidade de amostras de sangue periférico e tecido tumoral criopreservado que nos permitiu pesquisas como Imunofenotipagem com Citometria de fluxo, obtendo linhagem celular com a dissociação dos tecidos em três momentos diferentes ( onze meses, três meses após a criopreservação das amostras e com amostras a fresco), com diferentes pacientes (portadores de adenocarcinoma, carcinoma epidermóide e carcinoma indiferenciado) e com diferentes criopreservantes e meios de cultura (Solução Salina NaCl 0,9% / SFB, RNALater e RPMI 1640).Realizamos um treinamento adequado referente ao uso e desinfecção do material de laboratório, assim como treinamento para uso de equipos de laboratório e técnicas laboratoriais em sangue e tumor.. Demonstramos a viabilidade e funcionalidade das amostras de sangue periférico e tumor de pulmão ao realizar Imunotipagem com Citometria de fluxo com a presença ou ausência dos marcadores imunofenotípicos como CD3,CD4,CD8,CD19,CD26,CD38,CD39 e CD69 que são expressão da presença ou ausência de células do sistema imune: os linfócitos T e B.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Leite Da Silva JF, Sarmiento A.B, Márquez M.P. Influência do stresse oxidativo na morte de células de Leucemia Aguda em cultura : relação com os níveis de 5-hidroximetilcitosina. FCTUC Ciências da Vida (Internet).2012(Citado Junho2019) Disponível <http://hdl.handle.net/10316/26193.2012>.

2-Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E. Identification and characterization of cells with cancer stem cell: Prospecteis in Human Primary Lung Cancer Cell Lines. PLoS ONE. Mar2013, Vol. 8 Issue 3, p1-15. 15p. (Cited july 2019) DOI: 10.1371/journal.pone.0057020. Disponível :<http://www.journals.plos.org> 2019

3-Solari González I. J, Andrade Feijó C, Klamt F, Chiela, Filippi E.C. Avaliação da combinação quimioterápica na indução de morte imunogênica no tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células. Revista Lume. [ufrgs.br](http://ufrgs.br).(internet). 2017. (CitadoJulho.2019). Disponível: <http://hdl.handle.net/10183/179718>. 2017.

4- Díes López-Ayllón B. Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de cancer stem cells (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP). Madrid. Universidad Autonoma de Madrid. 2013.(citado Julio 2019) Disponível:<http://digital.csic.es>.2013.

5- Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina. UASLP Preparación de phosphate buffered saline. 04/2008. (citado junho 2018). Disponível: <http://www.genomica.uaslp.mx>. 2018

6- Parodi. A. CD39 is highly involved in mediastinum the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes. *Jornal Cancer Immunology, Immunotherapy, United States*. 2013.(cited July 2019) vol 62, page 851 -862. 2013.Disponível <http://www.orbi.uliege.be> 2013.

7- Canale.F.P. CD39 as a marker of pathogenic CD8+ T cells in cancer and other chronic inflammatory diseases. Unconscinded. Published online 04/2018, (cited July 2019)5(3-4): 65–66. Disponível [http// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) . 2014

8-Canale.F. P, Ramello.M.C, Núñez.N, Araújo.F.C, Bossio S. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8<sup>+</sup> T Cells. Dpto Bioquímica. Universidad de Córdoba 2018. (cited July 2019) DOI.10.1158/0008-5472..Disponível:<http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> 2019.

9- Antonelli L, Pacher P, Sylvester V. E, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med., 2013. (cited Janeiro 2019) DOI.19(6): 355–367.Disponível: <http://www.ncbi.nih.gov>. 2013

10-Canguerini.M. Ativação de linfócitos B promove ação antitumoral. **2019**. AUN.Agência universitária de notícias. ISSN 2359-5191 (citado julho 2019) Disponível <http://www.paineira.usp.br>. 2019

11-Patel Akshay J; Richter, A; Drayson MT; Middleton G W. The role of lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer. Cancer Immunol Immunother. 2020; Publisher online 2020 Jan 4. (cited jan2020) 69(3): 325–342. doi: 10.1007/s00262-019-02461-2.Disponível :<http://dx.doi.org> 2020

12-Fulop T; Franceschi, C; Hirokawa, K; Pawelec, G. Older Human B Cells and Antibodies .Handbook of Immunosenescence. 2019 Apr 11: 785–819.Published online 2019 Apr (cited July 2019) 11:785–819. doi: 10.1007/978-3-319-99375-1\_21  
PMCID: PMC7121151. Disponível: [http// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 2019

13-Mastelic-Gavillet.B, Navarro Rodriguez B, Decombaz. L, Wang Haiping E. G, Ahmed. R, Lozano Leyder E, Janeiro.A, Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor infiltrating CD8+T cells. Report Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019. (cited July 2019) Vol 7(1). Disponible: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 2019

14- Masako. A, Havre. A. P, Uramaki. Y, Ohnuma.K, Morimoto .C, Dang.H. L, Dang.H. N. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines..Abe et al. BMC Cancer ,2011 (cited July 2019) <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/51>. 2011

15 - Rodríguez Quiroga. Análisis de la expresión de la proteína CD26 en relación con otros marcadores de células madre tumorales y estudios funcionales en líneas celulares de cáncer de colon: 2019,3207.13 (cited July 2019) Oncología; 2302.21 Biología Molecular; .2302.27 Proteínas.Disponible: <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es> 2017

16-- Hon Chaung.L. Structure and Enzymatic Functions of Human CD38. Mol Med .2016. (cited July 2019)12 (11-12 )317-323). Disponible <http://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> 2016

17 – Ehlerding..E. B, England.C. G, Jiang..D, Graves.S.A. CD38 as a PET Imaging Target in Lung Cancer. 07/2017. Mol. Pharma. MEDLINE ID 2017 Jul (cited July 2019)3;14(7):2400-2406. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00298. Disponible: [http://www. pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) .2017

18-Dominguez.L.A. Madrid. Papel de CD69 en los mecanismos de la respuesta inmune inflamatoria. Universidad Autónoma de Madrid.2009. (citado Julio 2019) <http://hdl.handle.net/10486/3990> 2009

19- Laguna.Lobo.M.T. Regulación de la expresión de CD69 y sus efectos funcionales. Universidad Complutense de Madrid. España.2013. (citado junio 2019)  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis>.2013

20 -Cibrián, D; Sánchez-Madrid, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. European journal immunology. First published:05 May 2017 (cited July 2019)  
<https://doi.org/10.1002/eji.201646837>.2019