



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**AMANDA REGUEIRA FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS  
HEP-2 COMO BIOMARCADOR EM NEOPLASIAS HEPÁTICAS,  
PANCREÁTICAS E BILIARES**

**Recife**

**2020**

**AMANDA REGUEIRA FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS  
HEP-2 COMO BIOMARCADOR EM NEOPLASIAS HEPÁTICAS,  
PANCREÁTICAS E BILIARES**

Dissertação de mestrado apresentada à Banca do Programa de Pós graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

**Orientadora:** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Moacyr Jesus B. de Melo Rêgo

**Coorientadora:** Dr<sup>o</sup>. Henrique de Ataíde Mariz e Dr<sup>a</sup>. Ângela Luzia Branco P. Duarte

**Recife**

**2020**

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso  
(CRB4 1728)

Fernandes, Amanda Regueira

Avaliação da pesquisa de autoanticorpos em células Hep-2 como biomarcador em neoplasias hepáticas, pancreáticas e biliares / Amanda Fernandes Regueira – 2020.

82 f.: il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus B. de Melo Rêgo

Coorientadores: Henrique de Atayde Mariz e Ângela Luzia Branco P. Duarte

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Câncer 2. Autoanticorpos 3. FAN Hep-2 I. Rêgo, Moacyr Jesus B. de Melo (orient.) II. Mariz, Henrique de Atayde (coorient.) III. Duarte, Ângela Luzia Branco P. (coorient.) IV. Título

616.99

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-154

**AMANDA REGUEIRA FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS  
HEP-2 COMO BIOMARCADOR EM NEOPLASIAS HEPÁTICAS,  
PANCREÁTICAS E BILIARES**

Dissertação de mestrado apresentada à Banca do Programa de Pós graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

**Aprovado em: 31/07/2020**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Márcia Edilaine Lopes Consolaro**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Maria Danielly Lima de Oliveira**

---

**Dra. Priscilla Stela Santana de Oliveira**

“O que você faz, faz a diferença,  
e você tem que decidir que tipo  
de diferença você quer fazer.”

Jane Goodall

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) pela estrutura e inúmeras oportunidades fornecidas, que possibilitaram meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador Dr. Moacyr Jesus Barreto, pela oportunidade, conhecimento compartilhado e dúvidas esclarecidas. Aos coorientadores Dr. Henrique Mariz e Dra. Ângela Duarte e ao consultor estatístico Professor Edmilson Mazza.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), onde realizei este estudo, agradeço pelos materiais fornecidos para o trabalho e pela oportunidade de conviver com pessoas que fizeram a diferença na minha formação e aos amigos que me motivaram ao longo do caminho especialmente a Eduardo Davi, Lília Galdino, Eduarda carvalho e Alberto Xavier. Aos médicos parceiros do Serviço de Gastroenterologia, de Oncologia e da Clínica Cirúrgica do Hospital das Clínicas da UFPE pela indicação dos pacientes e amostras fornecidas.

A minha família, por todo o suporte, não só neste momento, mas desde o início de minha vida escolar. Ao meu noivo e a minha mãe, por acompanharem de perto com amor e paciência tanto os momentos de alegria quanto os de dúvidas e desespero. Por toda força recebida para continuar focada nas minhas escolhas.

Por fim, a todas as pessoas que contribuíram para este trabalho direta ou indiretamente e àquelas que cruzaram o meu caminho e me fizeram amadurecer, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As neoplasias do trato gastrointestinal vêm sendo apontadas como uma das mais incidentes, apresentando grande número de casos e mortes estimadas. Alguns estudos demonstram que pacientes com diversos tipos de tumor podem apresentar autoanticorpos detectáveis na circulação antes da forma sintomática da doença iniciar. Nosso objetivo foi investigar a presença desses autoanticorpos, direcionados contra antígenos celulares utilizando a imunofluorescência indireta com células HEp-2 (FAN-HEp2). Para tal, foi realizado um estudo de corte transversal, analítico e observacional com pacientes recém-diagnosticados com neoplasias hepáticas, pancreáticas e biliares. Foram estudados 75 pacientes com tumores e 40 pacientes como grupo controle sadio. De acordo com os ensaios de imunofluorescência realizados, no grupo doente, 44 (58,66%) foram positivos para o FAN em títulos de 1:80 ou superiores, enquanto o grupo sadio foi positivo em 7,5% dos casos. Observamos que a frequência de positividade foi maior nos pacientes com tumor Hepático-Biliar (100%) em comparação aos pacientes com neoplasia de pâncreas (41,5%). Os padrões de imunofluorescência mais frequentes foram o nuclear pontilhado fino denso e o nuclear pontilhado grosso. Também conseguimos associar a presença desses anticorpos com os marcadores tumorais CA19.9 e CA125. Os níveis desses marcadores estavam aumentados quando o FAN foi negativo. De acordo com nossos resultados, os autoanticorpos foram mais prevalentes no soro de pacientes com câncer, em relação ao grupo controle, porém ainda se faz necessário mais estudos acerca da natureza e efeitos biológicos dessas moléculas para melhor compreensão da técnica nesse grupo de pacientes, o que terá impacto no entendimento dos mecanismos de imunidade no câncer bem como no diagnóstico e prognóstico da doença.

**Palavras-chave:** Autoanticorpos. Câncer. FAN Hep-2.

## ABSTRACT

Some studies demonstrate that patients with different types of tumor may have detectable autoantibodies in the circulation before the symptomatic form of the disease begins. Our objective was to investigate the presence of these autoantibodies, directed against cellular antigens using indirect immunofluorescence with HEp-2 cells (ANA-HEp2). To this end, we studied 75 newly diagnosed patients with liver, pancreatic and biliary neoplasms and 40 patients as a healthy control group. According to the immunofluorescence tests performed, in the sick group, 44 (58.66%) were positive for ANA in titers of 1:80 or higher, while the healthy group was positive in 7.5% of cases. We observed that the frequency of positivity was higher in patients with liver-biliary tumor (100%) compared to patients with pancreatic cancer (41.5%). The most frequent immunofluorescence patterns were the dense fine speckled nuclear and the thick speckled nuclear. We were also able to associate the presence of these antibodies with tumor markers CA19.9 and CA125. The levels of these markers were increased when the ANA was negative. According to our results, autoantibodies were more prevalent in the serum of cancer patients, compared to the control group, but further studies on the nature and biological effects of these molecules are still needed to better understand the technique in this group of patients, the which will impact the understanding of the mechanisms of immunity in cancer as well as the diagnosis and prognosis of the disease.

**Key words:** ANA-HEp2. Autoantibodies. cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** – Mortalidade mundial estimada conforme a localização primária do tumor e sexo, 2018 – 2019..... 18
- FIGURA 2**– Taxas de sobrevivência relativa e estágio de diagnóstico das neoplasias de próstata, mama e pâncreas, segundo raça, nos estados unidos, 2008 – 2014....20
- FIGURA 3** – Incidência por câncer hepático, segundo sexo e idade, no mundo, 2018 – 2019..... 21
- FIGURA 4**– Diagrama esquemático de célula tumoral com alta carga mutacional e reconhecimento celular aumentado em comparação com célula tumoral com baixa carga mutacional. abreviações: FAS-l, ligando de FAS; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; PD-1, proteína de morte celular programada 1; TCR, receptor de células T..... 26
- FIGURA 5**- Cronograma de eventos significativos na imunidade ao câncer e o desenvolvimento de anticorpos..... 29
- FIGURA 6**- Algoritmo de classificação do consenso internacional sobre padrões de anticorpo antinuclear ..... 32
- FIGURA 7**– Padrões de fluorescência obtidos pela técnica do fan: a) padrão nuclear pontilhado fino denso, b) padrão nuclear homogêneo, c) padrão nuclear pontilhado grosso e d) citoplasmático pontilhado reticular..... 43
- FIGURA 8** - Demais padrões de fluorescência encontrados no grupo de pacientes com câncer: a) padrão citoplasmático pontilhado fino denso, b) citoplasmático pontilhado reticular, c) nucleolar, d) membrana nuclear..... 43
- FIGURA 9** – Correlação dos marcadores CA 19.9 e CA125 segundo o resultado de fan..... 45

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>QUADRO 1</b> – Principais marcadores tumorais utilizados no diagnóstico de neoplasias do trato gastrointestinal.....	24
<b>QUADRO 2</b> – Alguns autoantígenos associadas aos tipos de tumor.....	29
<b>QUADRO 3</b> – FAN HEp-2 em pacientes com câncer .....	33
<b>TABELA 1</b> – Avaliação da raça/cor, dados clínicos e hábitos de vida segundo o grupo de neoplasias pancreáticas e hepático biliar.....	38
<b>TABELA 2</b> – Avaliação da faixa etária, sexo e resultado da FAN segundo o grupo controle e de neoplasias pancreática e hepático biliar.....	39
<b>TABELA 3</b> – Laudo histopatológico de tumores presentes entre o grupo com neoplasias de pâncreas, fígado e vesícula biliar.....	40
<b>TABELA 4</b> – Avaliação da faixa etária, sexo e resultado da FAN segundo o grupo controle e de neoplasias pancreática e hepático biliar.....	41
<b>TABELA 5</b> – Valor da titulação do FAN segundo o grupo controle e de neoplasias pancreática e hepático biliar.....	41
<b>TABELA 6</b> – Padrões de imunofluorescência encontrados no grupo de pacientes controles e de pancreática e hepático biliar.....	42
<b>TABELA 7</b> – Avaliação da técnica FAN segundo os dados de caracterização, dados clínicos e hábitos de vida.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAN	Anticorpo de Ocorrência Natural
AFP	Alfa Feto Proteína
ANA	Anticorpos anti-núcleo
AR	Artrite Reumatóide
CEA	Antígeno Carcino Embrionário
CHC	Carcinoma Hepato Celular
CVB	Carcinoma de Vesícula Biliar
DPM	Dermatopolimiosite
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FAN	Fator anti-núcleo
FAS-L	Ligante de FAS
HBV	Vírus da Hepatite B
HC	Hospital das Clínicas
HCV	Vírus da Hepatite C
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ICAP	Consenso Internacional sobre Padrões de Anticorpo Antinuclear
IFI	Imunofluorescência Indireta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NPFD	Nuclear Pontilhado Fino Denso
NPG	Nuclear Pontilhado Grosso
NHO	Nuclear Homogêneo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PFD	Pontilhado Fino Denso
PR	Pontilhado Reticular
SAAF	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípídeo

AAN	Anticorpo de Ocorrência Natural
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SS	Síndrome de Sjögren
TATA	Antígeno de transplantação associado ao tumor
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGI	Trato Gastro Intestinal
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TMB	Carga Mutacional Tumoral
TSTA	Antígeno de transplantação específico do tumor
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VSH	Velocidade de Hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
1.1.1	Objetivo geral .....	16
1.1.2	Objetivos específicos .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1	CÂNCER NO TRATO GASTROINTESTINAL .....	17
2.1.1	CÂNCER DE PÂNCREAS .....	18
2.1.2	CÂNCER HEPÁTICO E BILIAR .....	21
2.2	MARCADORES TUMORAIS .....	23
2.3	IMUNOLOGIA TUMORAL .....	25
2.3.1	AUTOANTICORPOS NO CÂNCER .....	27
2.4	FAN HEp-2 .....	29
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
3.1	TIPO E LOCAL DE ESTUDO, TAMANHO DA AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM .....	35
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	35
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	35
3.4	AVALIAÇÃO DOS PACIENTES.....	36
3.5	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	36
3.6	AVALIAÇÃO LABORATORIAL.....	36
3.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	37
3.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	37

<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
4.2	FAN HE <sub>p</sub> – 2 EM TUMORES PANCREATICOS E HEPÁTICOS – BILIARES...	40
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
	<b>APÊNDICE – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA HPB .....</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública, afetando todas as idades e ambos os sexos. É caracterizado pelo crescimento anormal de células, que podem invadir partes adjacentes do tecido ou metastizar para outros órgãos. É a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes apenas em 2015 (OMS, 2019; SIEGEL, 2019).

As neoplasias do trato gastrointestinal vêm sendo apontadas como uma das mais incidentes, apresentando grande número de casos e mortes estimadas. O câncer colorretal é o mais comum neste grupo, seguido pelo câncer pancreático, hepático e gástrico. (SIEGEL, 2016; SIEGEL, 2018). Essa neoplasia, engloba o grupo de tumores malignos que afetam células do sistema digestivo, podendo atingir do esôfago ao ânus (POURHOSEINGHOLI, 2015). Podem ocorrer em células glandulares (adenocarcinomas), células estromais, células musculares (leiomiomas), neuroendócrinas e vasos sanguíneos, promovendo sinais e sintomas inespecíficos como perda de peso, náusea, dor e sangramentos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do câncer (INCA), o somatório das neoplasias do sistema digestivo corresponde ao segundo tipo mais incidente, depois do câncer de próstata em homens e mama nas mulheres (INCA, 2018). As taxas de sobrevida em 5 anos para este tipo de neoplasia se encontram entre as mais baixas, uma vez que mais da metade dos casos são diagnosticados em estágio avançado (SIEGEL, 2018, OMS, 2019).

Atualmente o diagnóstico das neoplasias digestivas é feito principalmente por exame histopatológico obtido através de biópsia associado a métodos de imagem como a tomografia computadorizada e ressonância magnética, pela endoscopia, ultrassonografia e colonoscopia (AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER, 2019). As técnicas de imagem, bem como alguns marcadores tumorais como o CA 19.9 ou CEA, utilizados para seguimento dos pacientes, apresentam baixa sensibilidade e especificidade, associadas muitas vezes com um custo elevado, o que dificulta ainda mais o diagnóstico precoce e triagem populacional adequados (FERNANDES, 2014; LIU, 2018). Portanto, esses dados levantam a urgência do desenvolvimento de novos biomarcadores não invasivos, no soro ou no plasma que possam ser utilizados para diagnóstico e prognóstico das neoplasias gastrointestinais.

Uma célula neoplásica pode expressar uma ampla diversidade de antígenos que podem ser reconhecidos pelos linfócitos T e B. Esses antígenos podem ser específicos do tumor, quando expressos apenas nas células tumorais (Neo antígenos) ou antígenos associados ao

tumor, “Self-antigens”, quando também são expressos em células normais (FINN, 2008; MILLER, 2015). Em geral, células neoplásicas que produzem muitos neo antígenos, são mais passíveis de sofrerem uma eliminação pelo sistema imune, sendo assim, existem diversos estudos voltados para esse tipo de imunidade (GUBIN, 2015).

Antígenos celulares próprios podem ser expressos pelo tumor de três maneiras: através de mutações, pela superexpressão de peptídeos e por modificações pós-traducionais (FINN, 2008). Normalmente, espera-se que os linfócitos reativos a antígenos próprios sejam deletados no timo, porém algumas dessas células podem escapar e migrar para a periferia, reconhecendo peptídeos próprios, causando uma autoimunidade (MILLER, 2015).

Alguns estudos demonstram que pacientes com diversos tipos de tumor podem apresentar autoanticorpos detectáveis na circulação, antes dos antígenos associadas ao câncer tornarem-se mensuráveis e antes mesmo da forma sintomática da doença iniciar (ZHANG, 2003; CHAPMAN, 2007; ZAENKER, 2013). Esses anticorpos no câncer, teriam comportamento semelhante aos autoanticorpos dirigidos a antígenos nucleares e citoplasmáticos no lúpus e em outras doenças sistêmicas autoimunes, demonstrando alto potencial para serem utilizados no diagnóstico do câncer (TAN; ZHANG, 2008).

A pesquisa do FAN por imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2 é amplamente utilizada para detecção de autoanticorpos, sendo o método de escolha para a triagem pela sua elevada sensibilidade (AGMON-LEVIN, 2014). As células HEp-2, células epiteliais derivadas do carcinoma humano de laringe, possuem um amplo espectro de autoantígenos e permitem uma boa visibilidade dos diferentes compartimentos da célula. A vantagem de usar essa técnica, é que esse teste pode nos fornecer uma visão geral desses autoanticorpos bem como suas concentrações (SACK, 2009).

Imai e colaboradores, utilizando a imunofluorescência indireta com células HEp-2, encontraram altos títulos de anticorpos para antígenos nucleares (ANA) em paciente com hepatocarcinoma (IMAI, 1995). Outro estudo conduzido por Nisihara e colaboradores, demonstrou que 44,4% (32/72) dos pacientes com câncer de mama possuíam imunofluorescência positiva para ANA (NISIHARA, 2018). Além disso, Fernandez-Suarez e colaboradores sugerem que os pacientes com câncer colorretal e FAN HEp-2 positivo apresentam pior prognóstico (FERNANDEZ-SUAREZ, 2016).

Dado o exposto, nosso objetivo é investigar a presença dos autoanticorpos, direcionados contra antígenos celulares utilizando a célula HEp-2, dentro do grupo das neoplasias de pâncreas, fígado e vias biliares.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 no soro de pacientes com neoplasias hepáticas, pancreáticas e de vias biliares.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os títulos e padrões, através da técnica de Imunofluorescência indireta em células Hep-2 (FAN-Hep2), apresentados em pacientes com neoplasias hepáticas, pancreáticas e de vias biliares.
- Avaliar a associação entre positividade, padrões e títulos apresentados na pesquisa FAN-Hep2 com parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com neoplasia de pâncreas, fígado e vias biliares.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER NO TRATO GASTROINTESTINAL

O termo câncer refere-se ao grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células, que podem invadir partes adjacentes do tecido ou metastizar para outros órgãos. É a segunda principal causa de morte no mundo, estimando-se cerca de 9.6 milhões de mortes apenas em 2018 (OMS, 2019). Mais de 60% dos casos ocorrem na África, Ásia e Américas Central e do Sul, e nessas regiões estão cerca de 70% das mortes por câncer (STEWART, 2014).

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública, afetando todas as idades e ambos os sexos. Entre os homens, o câncer pulmonar, prostático, coloretal e hepático são os mais frequentes, enquanto o câncer de mama, coloretal, de pulmão, de cérvix e de tireóide são os mais comuns entre as mulheres. Em termos de mortalidade, dentro do grupo de neoplasias digestivas, os tumores hepático, pancreáticos e de vias biliares apresentam os maiores números de mortes estimadas (OMS, 2019; SIEGEL, 2018; SIEGEL, 2019).

O aumento na incidência das doenças crônico-degenerativas se deve principalmente pela mudança demográfica observada em grande parte dos países, onde a redução das taxas de natalidade e mortalidade levam a um consequente aumento no número de idosos na população (HOFF, 2013). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as previsões quanto à incidência do câncer no mundo para os próximos anos são crescentes. Enquanto as estimativas para o ano de 2018 foram de, aproximadamente, 18 milhões, para o ano de 2040 estima-se cerca de 21 milhões de novos casos (IARC, 2019).

As neoplasias do trato gastrointestinal vêm sendo apontadas como uma das mais incidentes, apresentando grande número de casos e mortes estimadas. O câncer colorretal é o mais comum neste grupo, seguido pelo câncer gástrico, hepático e pancreático (SIEGEL, 2016; SIEGEL, 2018). Esse tipo de câncer, engloba o grupo de tumores malignos que afetam células do sistema digestivo, podendo atingir do esôfago ao ânus (POURHOSEINGHOLI, 2015). Podem ocorrer em células glândulares (adenocarcinomas), células estromais, células musculares (leiomioma), neuroendócrinas e vasos sanguíneos, promovendo sinais e sintomas inespecíficos como perda de peso, náusea, dor e sangramentos (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2019).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do câncer (INCA), o somatório das neoplasias do sistema digestivo corresponde ao segundo tipo mais incidente, depois do câncer de próstata em homens e mama nas mulheres. Com relação ao número de óbitos, os

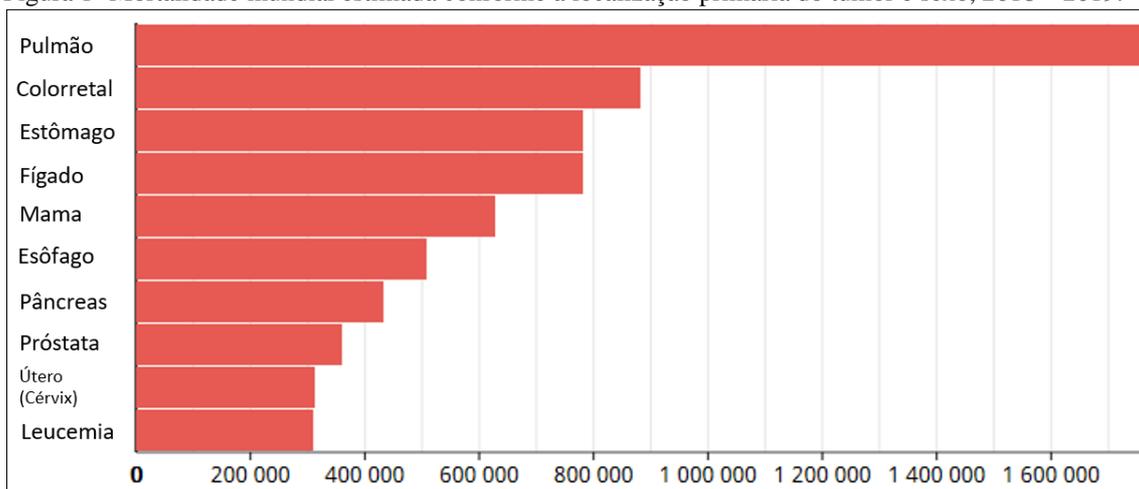
tumores de pâncreas, fígado e vias biliares estão entre os dez primeiros colocados (INCA, 2018).

Em 2016, um estudo conduzido por Siegel e colaboradores demonstrou que, em contraste com outros tumores como o de próstata, as taxas de sobrevida em 5 anos para este tipo de neoplasia se encontram entre as mais baixas. O câncer hepático, por exemplo, teve esse índice em 18%, o esofágico 14% e o pancreático 7% (SIEGEL, 2016). A baixa sobrevida ocorre, em parte, porque mais da metade dos casos, são diagnosticados em estágios avançados e já é sabido que um diagnóstico precoce contribui significativamente para o prognóstico da doença e é uma importante estratégia de saúde pública (SIEGEL, 2016, OMS, 2019). Além disso, grande parte dos avanços em termos de terapias antineoplásicas tem sido direcionada para tumores como o de pulmão e de mama e não os do trato gastrointestinal (BURSTEIN, 2017).

### 2.1.1 CÂNCER DE PÂNCREAS

O câncer de pâncreas é uma das neoplasias malignas mais letais em todo o mundo e está associado a um prognóstico ruim, destacado pela alta mortalidade (ILIC, 2016; KAMISAWA, 2016). Com base nas estimativas do GLOBOCAN, esse câncer causa mais de 440 mil mortes por ano, classificando-se como a sétima principal causa de morte por câncer no mundo em ambos os sexos (Figura 1) (IARC, 2019).

Figura 1- Mortalidade mundial estimada conforme a localização primária do tumor e sexo, 2018 – 2019.



FONTE: GLOBOCAN, 2019.

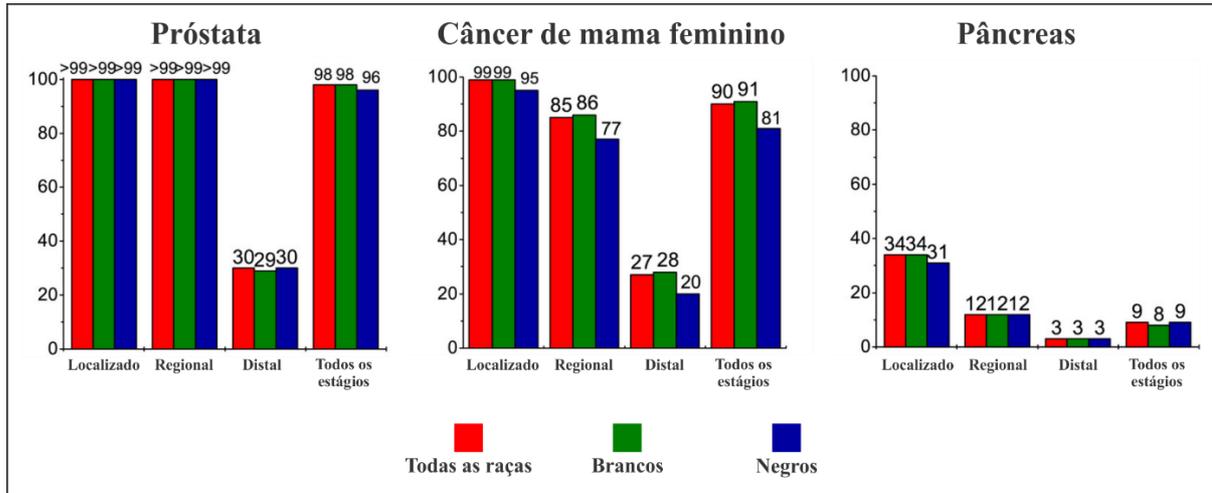
As causas do câncer de pâncreas ainda são pouco conhecidas, embora alguns fatores de risco tenham sido identificados, como tabagismo, histórico familiar, diabetes mellitus,

obesidade, fatores dietéticos, o uso de álcool e inatividade física (ILIC, 2016). A maioria das neoplasias malignas do pâncreas são os adenocarcinomas. Subtipos mais raros incluem tumores neuroendócrinos (que podem secretar hormônios como a insulina ou o glucagon) e carcinomas acinares (que podem liberar enzimas digestivas na circulação). Neoplasias de pâncreas ainda menos comuns incluem carcinomas coloides, pancreatoblastomas e neoplasias sólidas pseudopapilares (KLEEF, 2016).

Em estudo conduzido por Siegel e colaboradores, foram apresentadas as taxas de sobrevivência relativas em 5 anos para os diversos tipos de câncer. Neoplasias de próstata e de mama em mulheres apresentaram as maiores taxas de sobrevida, de respectivamente 98% e 90%, enquanto a sobrevida do câncer de pâncreas foi a menor (9%) somando todos os estágios de diagnóstico da doença (Figura 2) (SIEGEL, 2019).

O arsenal terapêutico do carcinoma pancreático permaneceram estagnadas ao longo dos anos. O uso de quimioterapias com gemcitabina, 5-fluorouracil e nab-paclitaxel, levou apenas a pequenas melhorias (menos de 6 meses) na sobrevivência desses pacientes (HOFF, 2013; ARSLAN, 2014). A baixa taxa de sobrevivência global em 5 anos é atribuída a vários fatores, dos quais talvez o mais importante seja o estágio tardio em que a maioria dos pacientes é diagnosticada (LEE, 2018). Em geral, os indivíduos com câncer de pâncreas são assintomáticos até a doença evoluir para um estágio avançado. Aliado a isso, faltam marcadores tumorais sensíveis e específicos e dificuldades nas técnicas de imagem para tumores em estágio inicial (KAMISAWA, 2016; KLEEF, 2016).

**Figura 2** - Taxas de sobrevivência relativa e estágio de diagnóstico das neoplasias de próstata, mama e pâncreas, segundo a raça, nos Estados Unidos, 2008 – 2014.



Fonte: Adaptado de SIEGEL, 2019.

Quando o diagnóstico de um câncer de pâncreas é suspeito, técnicas de imagem devem ser realizadas. A tomografia computadorizada multidetectores fornece informações do pâncreas e da vasculatura circundante e pode ser usado para avaliar outros órgãos para disseminação da doença (WOLFGANG, 2013). Para confirmação, normalmente são realizados exames patológicos, onde a maioria dos pacientes será submetida a ultrassonografia endoscópica com biópsia aspirativa por agulha fina (HARINCK, 2015). A PET (Tomografia por emissão de pósitrons) pode complementar essas tecnologias, particularmente quando se avalia linfonodos aumentados e massas de significado clínico incerto maiores (PARIKH, 2015). Aliado a essas técnicas, os níveis do marcador tumoral CA19.9, embora não sejam úteis para o rastreamento de indivíduos assintomáticos, podem ser úteis no monitoramento de pacientes com câncer pancreático já estabelecido (PORUK, 2013).

O câncer de pâncreas tem comportamento agressivo, com recidivas e metástases precoces à distância que impedem a ressecção cirúrgica curativa na maioria dos pacientes. É uma neoplasia caracterizada por uma notável resistência à maioria das opções de tratamento convencionais, incluindo quimioterapia, radioterapia e terapia molecular (KAMISAWA, 1995; KLEEF, 2016).

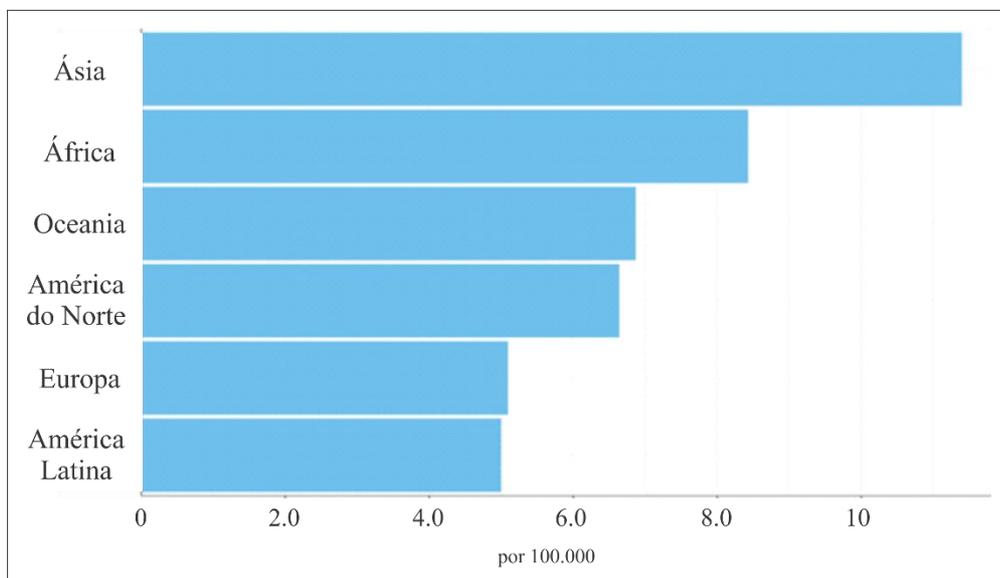
A cirurgia continua a ser a única chance de cura do câncer de pâncreas, porém sem terapia adicional, mais de 90% dos pacientes recaem e vão a óbito. Portanto, desafios atuais incluem a identificação das populações de risco para rastreamento e prevenção, detecção precoce por imagem e novos marcadores de câncer e opções terapêuticas que superem a resistência do câncer de pâncreas às modalidades atuais de tratamento, incluindo quimioterapia, radioterapia e terapias direcionadas (NEOPTOLEMOS, 2018).

### 2.1.2 CÂNCER HEPÁTICO E BILIAR

O câncer hepático representa um grande desafio para a saúde pública, sendo a quarta causa de morte relacionada a câncer no mundo (figura 1). Em 2018 foram cerca de 930 mil indivíduos afetados por essa neoplasia, onde maior parte dos casos ocorre em regiões como Ásia e África, que também são áreas endêmicas para o vírus da hepatite B (figura 3). No Brasil, estimou-se em cerca de 12 mil mortes por esse tipo de tumor em 2018 (IARC, 2019). Com relação ao sexo, os homens são afetados de 2 a 4 vezes mais que as mulheres (EL-SERAG, 2007).

Dentre os tumores primários de fígado, o carcinoma hepatocelular (CHC) é o mais frequente, ocorrendo em cerca de 80% dos casos. Outros tipos histológicos como o colangiocarcinoma (originado nos dutos biliares) representam 10 a 15% dos casos. Tipos mais raros incluem o angiossarcoma (origem nos vasos sanguíneos) e o hepatoblastoma, tumor maligno raro que atinge recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida (INCA, 2018). O prognóstico das neoplasias de fígado normalmente é ruim, com taxas de sobrevida em 5 anos são de aproximadamente 18% (SIEGEL, 2018; SIEGEL, 2019).

**Figura 3** - Incidência por câncer hepático, segundo sexo e idade, no mundo, 2018 - 2019.



FONTE: GLOBOCAN, 2019.

Os eventos moleculares ligados ao desenvolvimento e progressão do CHC não são bem conhecidos, porém é sabido que agentes que causem lesão hepática crônica e, eventualmente, cirrose, constituem potenciais agentes oncogênicos. Os mais relevantes são os vírus da hepatite

B (HBV) e da hepatite C (HCV), o consumo de álcool, a presença da síndrome metabólica e de diabetes (BRUIX, 2004; EL-SERAG, 2007). Outros cofatores como a aflatoxina B1 e o tabaco, aumentam a incidência da doença quando aliados aos fatores de risco (SIA, 2017).

A identificação dos fatores de risco permite a implementação da prevenção primária, enquanto o reconhecimento da população em risco permite uma vigilância efetiva para a detecção precoce e terapia efetiva. As melhores opções terapêuticas para pacientes em estágio inicial da doença são o transplante hepático e a ressecção cirúrgica (BRUIX, 2004; BRUIX 2011).

Já o diagnóstico do CHC é baseado nos níveis de Alfa-fetoproteína e as técnicas de imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrasonografia) e/ou biópsia podem auxiliar. Para indivíduos com doença hepática crônica, recomenda-se a triagem de rotina para carcinoma hepatocelular. Indivíduos sem doença hepática crônica, provavelmente serão diagnosticados em estágios avançados da doença (EL-SERAG, 2011). O rastreamento prospectivo, quando possível, assume duas formas: avaliação dos marcadores séricos e dos exames radiológicos. O marcador sérico mais utilizado é a  $\alpha$ -fetoproteína, embora seja ineficaz para lesões precoces (BOSMAN, 2010).

O carcinoma de vesícula biliar (CVB) é uma neoplasia maligna rara, porém altamente letal. Em áreas selecionadas de alta incidência, como Índia, Chile e Japão, é uma fonte significativa de mortalidade. Devido a baixa incidência na maioria dos países ocidentais, o CVB tem sido pouco estudado, levando a variações nas abordagens da avaliação patológica inicial, classificação e estadiamento da doença. (GOURGIOTIS, 2008; ALOIA, 2015).

A neoplasia de vesícula é silenciosa nas fases iniciais, assim, grande parte dos pacientes apresentam estágio avançado no momento do diagnóstico, implicando em um prognóstico ruim. A taxa de sobrevida média global para pacientes com câncer de vesícula biliar é de 6 meses, com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 5% (GOURGIOTIS, 2008; HUNDAL, 2014). A anatomia da vesícula biliar também é um fator que implica para a alta mortalidade, uma vez que seu tecido conjuntivo perimuscular é contíguo ao tecido conjuntivo hepático, permitindo a invasão do fígado e a progressão metastática (HUNDAL, 2014).

Entre outros fatores de risco, o sexo (três vezes mais frequente entre mulheres), condições genéticas, dietéticas, e infecções crônicas da vesícula biliar, têm sido associadas ao desenvolvimento dessa neoplasia. No entanto, os cálculos biliares representam um dos maiores fatores de risco para essa malignidade, estando presentes na maioria (~85%) dos pacientes com câncer de vesícula biliar. A identificação desses fatores é fundamental, fornecendo informações

sobre o mecanismo patogênico e gerando estratégias de prevenção e tratamento (LAZCANO-PONCE, 2001; KANTHAN, 2015).

A avaliação inicial é feita através de técnicas de imagem tais como: ultrasonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, tomografia por emissão de pósitron e colangiografia. Alguns marcadores tumorais como o Antígeno Carcinoembrionário (CEA) e o CA19.9 podem ser utilizados de modo complementar para seguimento desses pacientes. Apesar do uso dessas técnicas, ainda há grande dificuldade no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas na vesícula biliar (GOURGIOTIS, 2008; KANTHAN, 2015).

Pacientes diagnosticados em fases tardias e irrissecáveis sofrem de morbidade resultante da obstrução biliar, dor, caquexia e infecções. Neste subconjunto de pacientes, as manobras paliativas incluem a manutenção de drenagem biliar adequada por meio de implante de *stent* percutâneo ou endoscópico, suporte nutricional, controle da dor e manejo da gastroparesia. Agentes sistêmicos continuam sendo a base da terapia, não tendo havido muitos avanços terapêuticos nos últimos anos. A quimioterapia com gemcitabina e cisplatina são o tratamento de escolha (ALOIA, 2015; BURSTEIN, 2017).

## 2.2 MARCADORES TUMORAIS

Marcadores tumorais são moléculas produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo em resposta a presença da neoplasia, podendo ser detectados e quantificados na corrente sanguínea, fluidos biológicos e tecidos (DE OLIVEIRA, 2011). Podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando em processos de diagnóstico, prognósticos, estadiamento e avaliação da resposta terapêutica, por exemplo (MATOS, 2005).

Os marcadores tumorais mais comumente relacionados com tumores do Trato Gastrointestinal são: AFP (alfafetoproteína), CEA (antígeno carcinoembrionário), CA 72.4 e CA 19.9 (Quadro 1). A alfafetoproteína corresponde a uma glicoproteína com massa molecular de 69 a 70 kDa, com 590 aminoácidos e 4% de resíduos de carboidratos, e com homologia parcial com albumina, que não contém açúcares. É uma importante proteína do soro fetal, sendo sintetizado no fígado, saco vitelino e intestino do feto, desaparecendo nos primeiros anos de vida (MATTAR, 2002).

**Quadro 1** – Principais marcadores tumorais utilizados no diagnóstico de neoplasias do trato gastrointestinal.

MARCADOR TUMORAL	NEOPLASIAS	MORBIDADES ASSOCIADAS	PRINCIPAIS APLICAÇÕES
AFP	Câncer hepatocelular e células germinativas	Cirrose e hepatite	Avaliação do tratamento
CEA	Câncer colorretal e de Pulmão	Cirrose, doenças hepáticas	Prognóstico e avaliação do tratamento
CA 19.9	Carcinoma de Pâncreas e trato biliar	Patologias benignas de pulmão, fibrose cística	Alta especificidade para carcinomas de pâncreas e trato biliar

**FONTE:** Adaptado de DE OLIVEIRA, 2011

Em indivíduos sadios, os valores de AFP são baixos, entre 5ng/mL e 15ng/mL, sendo sintetizados no fígado e trato gastrointestinal, possuindo vida média de 5 a 7 dias. Níveis acima de 500ng/mL são altamente sugestivos de malignidade. Encontra-se em quantidade elevada em tumores gastrintestinais, hepatite, cirrose, hepatocarcinoma e gestantes. Também auxilia no manejo de pacientes com carcinoma hepatocelular em conjunto com a ultrassonografia abdominal, embora seja ineficaz em lesões em fases iniciais (MATTAR, 2002; VAZ, 2007; BOSMAN, 2010).

O CEA é uma glicoproteína de 200 kDa com funções desconhecidas, encontra-se sobre a superfície da membrana celular e normalmente em tecidos do aparelho digestivo e intestinal embrionário, está presente em 9% dos teratomas de testículo, e em aproximadamente 85% dos casos de carcinoma colorretal metastático. Níveis elevados também são encontrados nas neoplasias de pulmão (52% a 77%), neoplasias de pâncreas (61% a 68%), do trato gastrintestinal (40% a 60%) e do trato biliar (80%) (FIGUEIREDO, 2003). É útil na avaliação prognóstica do câncer gástrico e apresenta-se elevado em doenças benignas como a doença de Crohn e cirrose alcoólica. Os ensaios do CEA carecem de especificidade e da sensibilidade necessárias para a detecção de cânceres no estágio inicial (MATOS, 2005).

O CA 19.9 é um antígeno carboidrato de superfície celular, com peso molecular variando de 200 kDa a 1000 KDa, sendo também conhecido como antígeno de Lewis. Esse marcador é indicado no auxílio ao estadiamento e na monitoração de tratamentos. Apresenta-se em primeira escolha no câncer de pâncreas e do trato biliar, em segunda escolha, no câncer colorretal. Possui sensibilidade de 70% a 94% no câncer de pâncreas, 60% a 79% na neoplasia

de vesícula biliar, 30% a 50% no câncer gástrico e 40% a 60% na neoplasia colorretal. (ALMEIDA, 2007).

A maior aplicabilidade do CA19.9, é de avaliar resposta à quimioterapia do câncer de pâncreas, já que a utilização de métodos de imagem é bastante limitada para esse fim e não existem marcadores prognósticos ou preditivos confiáveis no câncer de pâncreas que possam ajudar a informar as decisões de tratamento (MATTAR, 2002; KLEEF, 2016).

Considera-se como marcador ideal aquele produzido por todos os tumores da mesma linhagem e seus níveis serem mensuráveis mesmo na presença de pequenas quantidades de células. Os níveis séricos devem refletir com precisão a evolução clínica e a regressão da doença, e sua negatificação deve estar associada à cura. Porém nenhum marcador estudado até o momento possui todas essas características e pecam por falta de especificidade e sensibilidade, por isso não são considerados de forma isolada e seus valores de diagnóstico e prognóstico são concluídos através de um painel de marcadores (DE OLIVEIRA, 2011; DUFFY, 2014; WU, 2018).

### 2.3 IMUNOLOGIA TUMORAL

O sistema imunológico na maioria das vezes detecta e elimina as células tumorais. Isso geralmente impede o desenvolvimento do câncer por meio de um processo denominado vigilância imunológica (WANG, 2016). Uma célula neoplásica pode expressar uma ampla diversidade de antígenos que podem ser reconhecidos pelos linfócitos T e B. Esses antígenos são normalmente classificados em dois grupos: antígenos de transplantação específicos de tumores (TSTAs), quando expressos apenas nas células tumorais (Neo antígenos) ou antígenos de transplantação associados a tumores (TATAs), “Self-antigens”, quando também são expressos em células normais (FINN, 2008; MILLER, 2015).

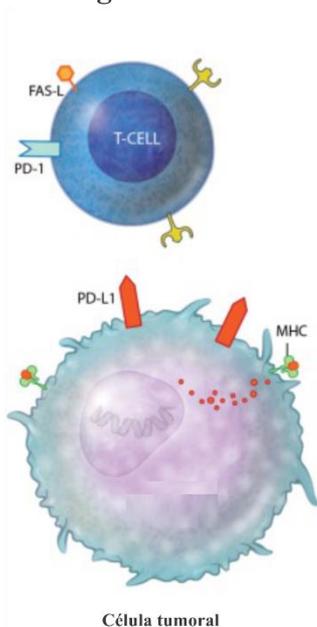
Os TSTAs são específicos a um tumor ou tipo de tumor, e, assim, não estão presentes no repertório de proteínas e oligopeptídeos normalmente expressos no organismo; podem ser codificados, por exemplo, por genomas virais ou por alelos mutados somaticamente (como ras, p53 ou bcr-abl), surgindo durante a progressão tumoral (TAN, 2008).

O número total de mutações (alterações) encontradas no DNA das células cancerosas é a carga mutacional do tumor, do inglês *Tumor Mutational Burden* (TMB), e pode ajudar a planejar melhor o tratamento. Tumores que têm um número elevado de mutações tem maior probabilidade de responder a certos tipos de imunoterapia (NIH, 2019).

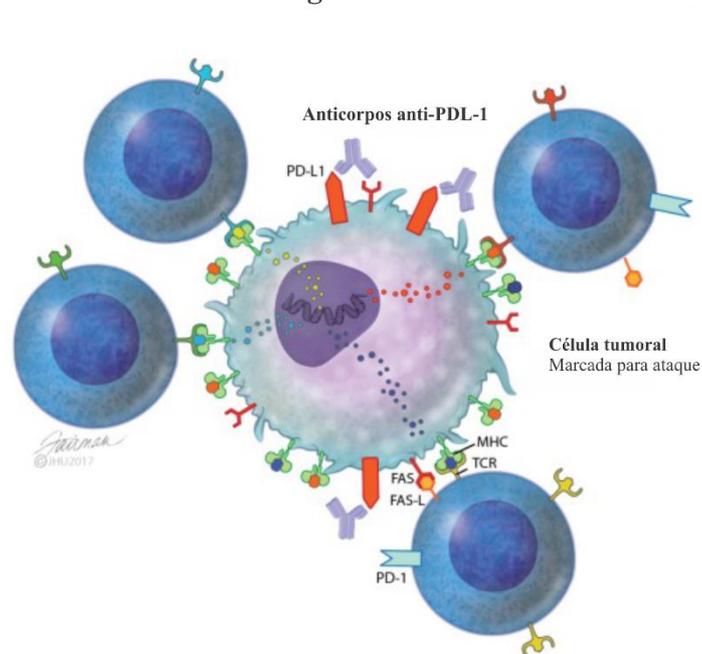
Células tumorais com alto TMB podem ter mais neoantígenos, com um aumento associado de células T de combate ao câncer no microambiente tumoral e na periferia (ALEXANDROV, 2013; YUAN, 2016) (Figura 4) Em geral, células neoplásicas que produzem muitos neoantígenos, também mencionadas sob o termo de tumores quentes, podem ser reconhecidas pelas células T e são mais passíveis de serem eliminadas pelo sistema imune. Em contrapartida, tumores com baixa carga mutacional e que recrutam poucas células do sistema imune, são os chamados tumores frios (GUBIN, 2015; HAANEN, 2017).

**Figura 4** - Diagrama esquemático de célula tumoral com alta carga mutacional e reconhecimento celular aumentado em comparação com célula tumoral com baixa carga mutacional. Abreviações: FAS-L, ligando de Fas; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; PD-1, proteína de morte celular programada 1; TCR, receptor de células T.

#### Baixa carga mutacional



#### Alta carga mutacional



**FONTE:** Adaptado de SHARABI, 2017.

A carga de mutação tumoral ainda tem que provar seu valor preditivo ou prognóstico para ser considerada como um biomarcador confiável. Descobertas entre ensaios e pontos de corte baseados no tipo de tumor ou imunoterapia comprometem o valor do biomarcador; porém, vários passos essenciais devem ser tomados antes da TMB poder se estabelecer como um marcador seguro. Isto inclui a padronização das diferentes técnicas e a validação prospectiva de um ponto de corte que poderia prever o aumento da sobrevida do paciente (ADDEO, 2019).

Os TATAs representam uma grande classe de proteínas normais, que falharam ao elicitar tolerância completa e, quando expressos por células tumorais, atraem a atenção do sistema imune (SCHUMACHER, 2015). Esses antígenos podem ser expressos pelo tumor de três maneiras: através de mutações, pela superexpressão dos peptídeos e por modificações pós-traducionais (FINN, 2008). Normalmente, espera-se que os linfócitos reativos ao próprio sejam deletados no timo (mecanismo de tolerância imunológica), porém algumas dessas células podem escapar e migrar para a periferia, reconhecendo esses peptídeos e gerando uma autoimunidade (MILLER, 2015).

Pacientes com câncer podem desenvolver doenças autoimunes e manifestações reumatológicas através da geração dos autoanticorpos (ABU-SHAKRA, 2001). Esse fenômeno ocorre por exemplo no melanoma, onde as células desse tumor podem super expressar certos antígenos que também estão presentes em melanócitos normais. A expressão dessas proteínas pelas células tumorais frequentemente provoca uma resposta marcante do sistema imune, que resulta em uma forma muito peculiar de autoimunidade – o vitiligo – despigmentação observada em grandes áreas da pele (TOUBI; SHOENFELD, 2007).

Células T de ocorrência natural dirigidas contra antígenos associados a tumores frequentemente podem ser detectadas em pacientes com câncer. A vigilância imunológica mostra-se mediada principalmente por linfócitos T CD8+ específicos para tumores. No entanto, macrófagos, células T CD4+ e NK também estão envolvidos (TOUBI; SHOENFELD, 2007). As células dendríticas também são de extrema importância nesse processo, pois atuam no processamento e apresentação dos antígenos tumorais e influenciam na secreção de citocinas (WANG, 2016). Para tumores sólidos do trato gastrointestinal, como o câncer gástrico e câncer colorretal, a presença de células do sistema imunológico tem sido associada com uma maior sobrevivência dos pacientes (ISHIGAMI, 2000; LEE, 2008; NOSHO, 2010).

### 2.3.1 AUTOANTICORPOS NO CÂNCER

Um autoanticorpo é um anticorpo que é direcionado contra uma ou mais proteínas próprias do indivíduo (autoantígenos). Esses antígenos podem compreender além de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios ou várias combinações destes. As causas da produção dos autoanticorpos são variadas e não bem compreendidas. No entanto, a excessiva destruição de células (necrose e apoptose) é uma das maiores causas dessa produção (MOHAMED, 2018). Autoanticorpos são bem conhecidos por serem utilizados para a classificação de doenças autoimunes como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). No Lúpus e distúrbios autoimunes

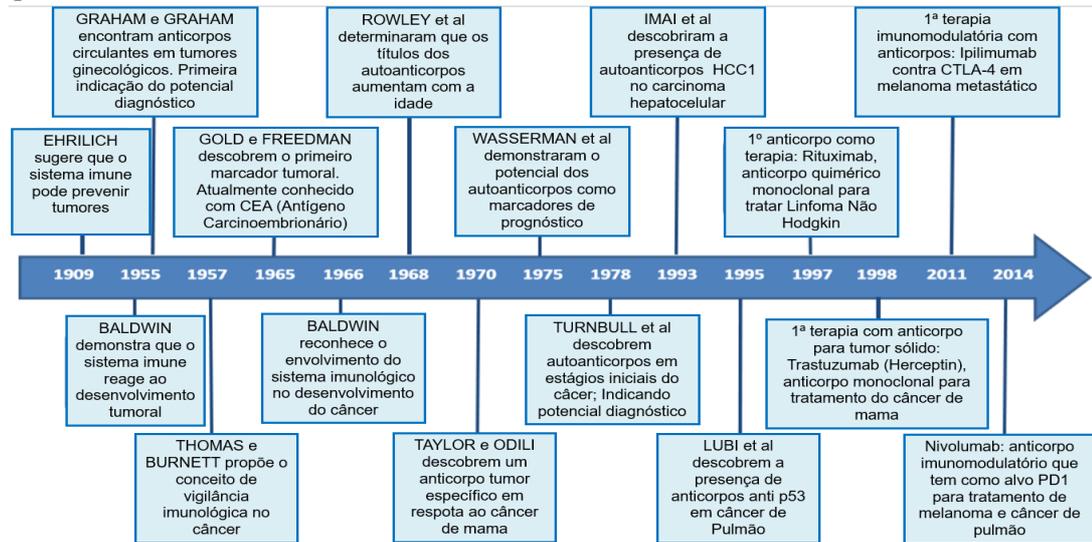
sistêmicos relacionados, os antígenos dominantes são as ribonucleoproteínas ou desoxirribonucleoproteínas (HAUGBRO, 2004).

Os autoanticorpos ditos naturais expressam poucas ou nenhuma mutação e exibem uma afinidade moderada por autoantígenos. Eles fornecem uma primeira linha de defesa contra infecções e contribuem para a homeostase do sistema imunológico (ELKON, 2008). Estão ligados a carboidratos em receptores específicos de tumores modificados e induzem a apoptose de células tumorais. Estes autoanticorpos de ocorrência natural (AAN), são produzidos principalmente por células B CD5+ e são extensivamente relatados desempenhando um papel protetor na prevenção da propagação do câncer (TOUBI; SHOENFELD, 2007).

Por outro lado, os autoanticorpos IgG de alta afinidade e somaticamente mutados refletem um processo patológico pelo qual as vias homeostáticas relacionadas à depuração celular, sinalização do receptor do antígeno ou funções efetoras da célula são perturbadas. Em alguns distúrbios autoimunes, os autoanticorpos podem estar presentes antes do início da doença, apresentam especificidade notável e servem como biomarcadores, proporcionando uma oportunidade para diagnóstico e intervenção terapêutica (ELKON, 2008).

Os autoantígenos são marcadores comumente usados no diagnóstico do câncer. Porém, possuem uso limitado em estágios iniciais da doença, uma vez que seus níveis aumentam com o tamanho do tumor. Frente a esse cenário os autoanticorpos tem emergido como fortes candidatos a biomarcadores do câncer (Figura 5), possuem meia vida de mais de 30 dias e maior estabilidade fora do organismo, comparados a outros marcadores (MACDONALD, 2017). Alguns estudos demonstram que pacientes com diversos tipos de tumor podem apresentar autoantígenos que induzem a presença de autoanticorpos detectáveis na circulação (Quadro 2), antes mesmo dos antígenos associadas ao câncer tornarem-se mensuráveis e até 5 anos antes da forma sintomática da doença iniciar (ZHANG, 2003; CHAPMAN, 2007; ZAENKER, 2013).

**Figura 5** – Cronograma de eventos significativos na imunidade ao câncer e o desenvolvimento de anticorpos.



FONTE: Adaptado de MACDONALD, 2017.

**Quadro 2** – Alguns autoantígenos associadas aos tipos de tumor, já descritos na literatura.

AUTOANTÍGENO	TIPO DE TUMOR	AUTOR/ANO
DNA topoiomerase II	Câncer hepático	Imai, 1995
ssDNA, dsDNA Cardiolipina, Actina, Miosina, Tropomiosina	Câncer gástrico	Konstandoulakis, 1998
p53	Colorretal	Takeda, 2001; Tang, 2001
NY-ESO-1, p53, HER2, MUC1	Câncer de pulmão	Chapman, 2007
ALK	Linfoma	Ait-Tahar, 2010
ENOA 1,2	Câncer de pancreas	Tomaino, 2011
ds DNA	Câncer de mama	Mohammed, 2018

FONTE: Autor, 2020.

Esses autoanticorpos lesionam tecidos e órgãos por meio do envolvimento da ativação do sistema complemento, bem como da internalização e ativação de receptores Toll-like. A ativação de receptores Toll-like intracelulares em células dendríticas plasmocitoides leva à produção de interferon tipo I, enquanto o envolvimento de receptores Toll-like intracelulares em células apresentadoras de antígenos estimula a ativação celular e a produção de outras citocinas inflamatórias. Assim, os complexos imunes podem perpetuar um feedback positivo que amplifica as respostas inflamatórias (ELKON, 2008).

A resposta imunológica no câncer é provavelmente iniciada por alterações no tumor que resultam em aumento da imunogenicidade ou perda da auto-tolerância (FONSECA, 2008). Teorias do processo de produção de autoanticorpos no câncer são complexas e ainda não totalmente compreendidas. Acredita-se que os processos imunológicos que causam sua produção sejam gerados pelo organismo em resposta a mutações, degradação, superexpressão de proteínas e/ou a liberação de proteínas do tecido danificado (CHEN, 2014; JÄRAS, 2014).

Esses anticorpos, teriam comportamento semelhante aos autoanticorpos dirigidos a antígenos nucleares e citoplasmáticos no Lúpus e em outras doenças sistêmicas autoimunes, demonstrando alto potencial para o diagnóstico (THAN; ZHANG, 2008). Mais estudos que respondam qual o papel exato da produção desses anticorpos são necessários para o melhor entendimento da resposta imune contra o câncer. Essa modalidade de biomarcador em potencial ainda precisa ter seu valor clínico validado, independente da técnica imunológica a ser utilizada. Salientando que o ensaio sorológico deve ser razoavelmente simples de conduzir, com resultados reprodutíveis e economicamente viável (MACDONALD, 2017).

#### 2.4 FAN HEp-2

Anticorpos antinucleares (ANAs) são autoanticorpos que são sintetizados em resposta ao conteúdo do núcleo da célula. Os conteúdos das células e seus núcleos aparecem no sangue por causa de apoptose ou necrose celular (MOHAMMED, 2018). A pesquisa de anticorpos antinúcleo por imunofluorescência indireta também conhecido como FAN (Fator antinúcleo) em células HEp-2 é amplamente utilizada para detecção desses autoanticorpos, sendo o método de escolha para a triagem de doenças autoimune pela sua elevada sensibilidade (AGMON-LEVIN, 2014).

Foi originalmente descrita em 1957, usando um ensaio imunofluorescente com tecido de fígado de roedor como substrato (HOLBROW, 1957). A técnica possibilitou a identificação de um universo mais amplo de auto-anticorpos que a pesquisa de células LE, primeiro ensaio laboratorial utilizado para a pesquisa de anticorpos antinucleares, FAN. Era um teste

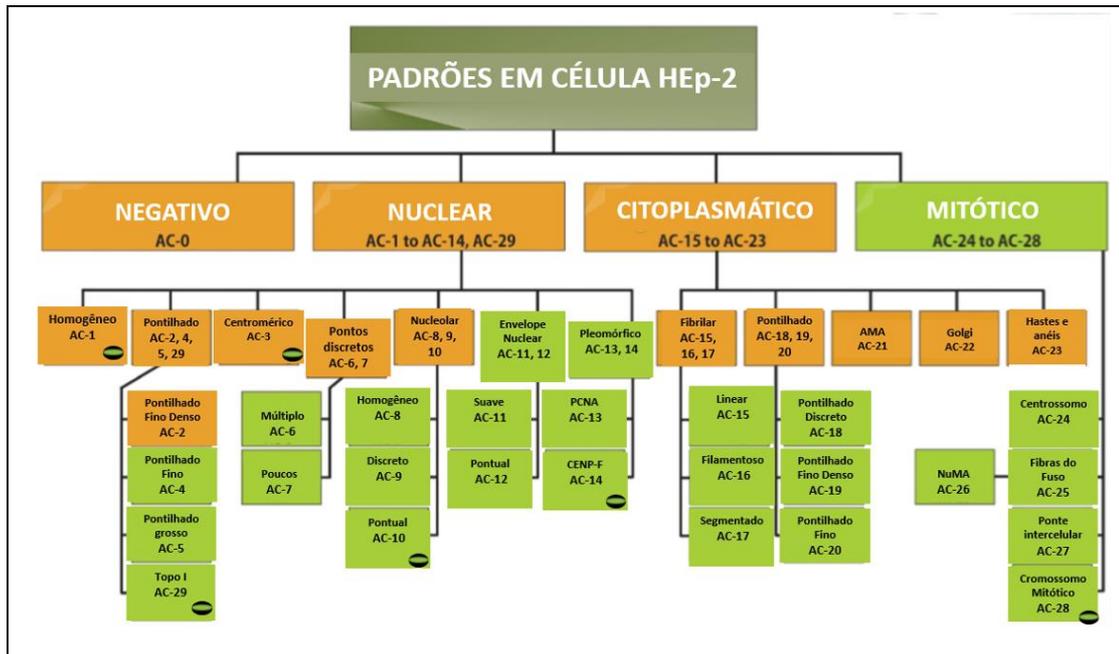
caracterizado por baixa reprodutibilidade e sensibilidade, interpretação complexa e técnica extremamente trabalhosa. Além disso, o ANA-IFI passou também a indicar a possível presença de alguns auto-anticorpos em pacientes com suspeita de outras doenças auto-imunes, como esclerose sistêmica e síndrome de Sjögren, o que não era possível com a pesquisa de células LE restrita a informações aplicadas apenas à suspeita de LES (DELLAVANCE, 2007).

Desde a sua descrição original, a técnica sofreu modificações metodológicas consideráveis e o substrato de tecido de roedor foi substituído por linhagens celulares tais como as células HEp-2 (GOSH, 2007). As células HEp-2, células epiteliais derivadas do carcinoma humano de laringe, possuem um amplo espectro de autoantígenos e permitem uma boa visibilidade dos diferentes compartimentos da célula, assim, padrões de fluorescência associados aos antígenos situados nos diferentes compartimentos celulares (núcleo, nucléolo, citoplasma, placa cromossômica metafásica e aparelho mitótico) que não estavam disponibilizados em tecidos de roedores passaram a ser observados (SACK, 2009).

Autoanticorpos contra alguns antígenos têm associação bastante específica com determinadas doenças autoimunes ou ao estado de autoimunidade em si, enquanto outros ocorrem indiscriminadamente em indivíduos autoimunes e não autoimunes. Dessa forma, determinados padrões de fluorescência são mais específicos de doença autoimune como os nucleolares, enquanto outros ocorrem com frequência em indivíduos saudáveis ou em pacientes com outras enfermidades não autoimunes como o padrão nuclear pontilhado fino e pontilhado fino denso (DELLAVANCE, 2009).

Atualmente, segundo o ICAP (Consenso Internacional sobre Padrões de Anticorpo Antinuclear) dos 30 tipos de padrões fluoroscópicos identificados (Figura 6), apenas 19 estão razoavelmente associados a quadros clínicos. Aos padrões foram atribuídos os respectivos códigos alfanuméricos AC, começando em AC-0, que corresponde ao padrão negativo, terminando em AC-29, que corresponde ao padrão composto de anticorpos anti-topoisomerase I (CRUVINEL, 2019). Atualmente, existem 2 padrões associados ao câncer registrados pelo ICAP, são eles: AC-14 (dirigido contra o antígeno CENP-F) e o AC-27 (contra a ponte intercelular) (ICAP, 2019).

**Figura 6** - Algoritmo de classificação do Consenso Internacional sobre Padrões de Anticorpo Antinuclear.



FONTE: Adaptado de ICAP, 2019.

Dentre os padrões nucleares, os mais frequentes consistem em fluorescência homogênea/periférica e fluorescência pontilhada. Os padrões relativamente frequentes incluem o centromérico, nucleolar e o tipo difuso. Os padrões citoplasmáticos são relativamente menos frequentes e consistem em fluorescência pontilhada, mitocondrial, fluorescência do filamento citoesquelético e do Aparelho de Golgi e lisossomas (TOZZOLI, 2002).

Um segundo ponto a ser considerado é o título do ANA-Hep-2, muito embora seu valor seja relativo. Na maioria dos laboratórios, a concentração de anticorpos é expressa com uma escala quantitativa de valores, usando títulos (última diluição reativa), esta informação permite o estabelecimento de diferentes níveis de corte, cada um com suas próprias características de sensibilidade e especificidade (TOZZOLI, 2002). Em geral, os pacientes com enfermidades tendem a apresentar títulos moderados (1/160 e 1/320) e elevados (1/640), enquanto os indivíduos sadios com ANA-HEp-2 positivo tendem a apresentar baixos títulos (1/80) havendo, no entanto, exceções de ambos os lados (MARIZ, 2011).

Por se tratar de um exame destinado ao rastreamento de auto-anticorpos, a descrição dos padrões de IFI tem como objetivo direcionar o clínico a testes específicos que identificam o antígeno/alvo reconhecido por um determinado auto-anticorpo e complementam os achados preliminares do teste ANA-IFI, buscando uma associação clínica específica (DELLAVANCE, 2007).

Como exposto no tópico de autoanticorpos no câncer, as Neoplasias podem gerar positividade para ANA, como demonstrando por alguns autores (Quadro 3). Uma vez que, ANAs são autoanticorpos para componentes celulares que são formados quando o conteúdo celular é exposto ao meio extracelular como na apoptose ou necrose, a morte dessas células tumorais poderia ser a fonte para a estimulação antigênica para a formação de autoanticorpos nas neoplasias e pode representar um mecanismo para conter a disseminação do tumor (MADRID, 2015; SENER, 2015; NISIHARA, 2018).

**Quadro 3** – Trabalhos encontrados na literatura, demonstrando a associação do FAN HEp-2 em pacientes com diversos tipos de câncer.

TUMOR	PADRÕES (N)	TÍTULOS	AUTOR
MAMA			
ENDOMÉTRIO			
PROSTATA	Homogêneo (8)		
PULMÃO	Pontilhado (2)	1/100	SENER, 2015
LINFOMA	Nucleolar (2)		
CÉREBRO	Anti-centrômero (2)		
RENAL	Misto (4)		
GÁSTRICO			
MAMA	Homogêneo (70) Pontilhado (45) Anti-nucleolar (59) Anti-centrômero (10) Anti-centrossomo (30) Anti-mitocôndrial (33) Nuclear (Múltiplos pontos) (8) Citoesqueleto (6) Misto (96)	1/100 – 146  1/320 - 1/640 – 97	MADRID, 2015
MAMA	Pontilhado Fino Denso 10/32 (31.2%) Pontilhado Fino 9/32 (28.1%) Pontilhado Grosso 8/32 (25.0%) Nucleolar 3/32 (9.4%) Homogêneo 2/32 (6.2%)	1/80 - 12/32 (37.5%)  1/160 - 13/32 (40.6%)  1/320 - 5/32 (15.6%)  1/640 - 2/32 (6.2%)	NISIHARA, 2018

Encontrar o FAN-HEp-2 positivo em pacientes com câncer, sem positividade nos parâmetros de autoimunidade, pode chamar a atenção para a possibilidade desta doença e pode ser uma pista para um diagnóstico precoce (NISHIHARA, 2018). Dado o exposto, o objetivo desse trabalho é investigar a presença dos autoanticorpos, direcionados contra antígenos celulares utilizando a célula HEp-2, dentro do grupo das neoplasias digestivas e estabelecer possíveis associações clínicas e laboratoriais.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO, TAMANHO DA AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

Foi realizado um estudo de corte transversal, analítico e observacional no serviço de Oncologia e de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em pacientes diagnosticados com neoplasias de fígado, de pâncreas e de vias biliares. Após a seleção foi realizada a pesquisa do FAN HEp-2, para avaliar título e padrão e caracterizar a amostra.

A amostragem foi do tipo conveniência. O grupo neoplasia foi formado por todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão (descritos a seguir), atendidos nas instituições supracitadas durante o período do estudo. O grupo controle foi constituído pelo mesmo número de indivíduos sem neoplasia e/ou doenças autoimunes, pareados por sexo e idade. Informações adicionais foram coletadas através do prontuário médico tendo como fonte o Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

#### 3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Idade acima de 18 anos.
- Diagnóstico de câncer de pâncreas, câncer hepático e câncer de vesícula biliar.
- Ausência de tratamento

#### 3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Diagnóstico estabelecido de doença reumatológica sistêmica (AR, LES, ES, SS, DPM, SAAF e Vasculites) autoimune e órgão específica (tireoidite Hashimoto, cirrose biliar primária, anemia hemolítica, diabetes mellitus tipo I, entre outras)
- Síndromes neoplásicas hereditárias e pacientes com histórico de outras neoplasias.

### 3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A partir da seleção, os pacientes elegíveis foram convidados a participar do estudo a fazer a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Em seguida foi realizada a coleta de 15 mL de sangue periférico em tubo seco e com heparina e após centrifugação (3000 RPM), o soro foi armazenado, em tubos eppendorf em cinco alíquotas de 1 ml em freezer com temperatura de -80°C no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) para realização dos testes.

### 3.5 VARIÁVEIS ANALISADAS

FAN Hep-2 e parâmetros clínicos como a idade, gênero, estadiamento da neoplasia do TGI, tipo histológico, níveis séricos de marcadores tumorais, realização de quimioterapia, realização de radioterapia, presença de hipertensão, diabetes tipo 2, doença arterial coronariana, etilismo, tabagismo, medicações de uso diário, sinais e sintomas clínicos, recidiva tumoral, óbito ou cura.

### 3.6 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

A pesquisa do FAN foi realizada no LINAT/UFPE, através da técnica da IFI em células de HEP-2 (carcinoma de laringe humano) em kit comercial do fabricante HEMAGEN diagnósticos, EUA. Em cada orifício da lâmina foram aplicados 10 µl de soro diluído a 1/80 em diluente do kit comercial e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso é retirado com “phosphatebuffered saline” (PBS) e as lâminas colocadas em uma cuba, contendo PBS com pH de 7,2 e lavadas duas vezes.

Posteriormente é acrescentado 10 µl de conjugado de anti-IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína. Após a repetição do procedimento de lavagem, as lâminas são montadas com glicerina e lamínula. A montagem dos kits seguiu as orientações dos fabricantes HEMAGEN diagnósticos®, EUA. Foram realizadas diluições progressivas até 1/640 apenas com os pacientes que possuem resultado positivo em títulos anteriores. Foram consideradas positivas amostras com título  $\geq 1/80$ . A leitura da fluorescência foi feita em microscópio Olympus BX 550 com aumento na ocular de 10x e na objetiva de 20x. Todas as leituras das

lâminas foram feitas por dois observadores experientes de forma “cega” e sem conhecimento prévio da procedência dos soros.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados descritivamente pelas frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e as medidas: média, desvio padrão (média  $\pm$  DP) e mediana para as variáveis numéricas. Para avaliar diferenças entre os grupos ou associação entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher quando condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada e para a comparação entre duas categorias em relação a variável numérica foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

A escolha do teste de Mann-Whitney ao tamanho da amostra inferior a 7 pacientes em cada categoria ou a ausência da normalidade dos dados para as amostras superiores ou iguais a 7 pacientes. A verificação da normalidade foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk.

A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

### 3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sob o CAAE de número: 02082318.0.3001.8807 (Anexo A).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas 75 amostras de pacientes com câncer de pâncreas, câncer de fígado e vias biliares e 40 pacientes do grupo controle. Na Tabela 1 analisa-se os dados sobre: raça/cor, variáveis clínicas e hábitos de vida no grupo total e cada um dos grupos pâncreas e hepático - biliar. Nesta tabela se enfatiza que: a maioria dos pacientes em cada grupo era da raça/cor parda, sendo 86,7% no grupo de Câncer de pâncreas e 75,0% no grupo Hepático biliar; no grupo hepático - biliar 90,9% tinham hipertensão arterial e no grupo pâncreas 66,7%; O grupo com câncer de pâncreas apresentou diabetes mellitus com frequência mais elevada em relação ao grupo hepático biliar (83,3% x 51,5%); O hábito de tabagismo foi maioria (70,0%) no grupo hepático biliar e 45,5% no grupo do pâncreas. Para a margem de erro fixada (5%) não foram registradas diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) para nenhuma das variáveis.

**Tabela 1** – Avaliação da raça/cor, dados clínicos e hábitos de vida segundo o grupo de neoplasias pancreáticas e hepático biliar.

VARIÁVEL	GRUPO				VALOR DE P
	PÂNCREAS		HEPÁTICO BILIAR		
	N	%	N	%	
<b>IDADE</b>	37	61,5	16	56,0	P <sup>(1)</sup> = 0,151
<b>RAÇA/COR</b>					P <sup>(1)</sup> = 0,195
BRANCA	3	10,0	-	-	
PARDA	26	86,7	3	75,0	
NEGRA	1	3,3	1	25,0	
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>4</b>	<b>100,0</b>	
<b>HAS</b>					P <sup>(1)</sup> = 0,133
SIM	21	67,7	10	90,9	
NÃO	10	32,3	1	9,1	
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>	<b>11</b>	<b>100,0</b>	
<b>DM</b>					P <sup>(1)</sup> = 0,086
SIM	17	51,5	10	83,3	
NÃO	16	48,5	2	16,7	
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>100,0</b>	<b>12</b>	<b>100,0</b>	
<b>HÁBITO DO TABAGISMO</b>					P <sup>(1)</sup> = 0,281
SIM	15	45,5	7	70,0	
NÃO	18	54,5	3	30,0	
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	
<b>HÁBITO DO ETILISMO</b>					P <sup>(1)</sup> = 0,152
SIM	13	40,6	7	70,0	
NÃO	19	59,4	3	30,0	
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	

(<sup>1</sup>) Pelo teste Exato de Fisher.

Na Tabela 2 se apresenta as estatísticas das variáveis numéricas por grupo com câncer, sendo que algumas variáveis só foram observadas no grupo com câncer de Pâncreas ou foram observadas apenas num paciente do grupo Hepático biliar e por estes motivos sem a presença dos testes comparativos. Entre as variáveis observadas com pelo menos dois pacientes em cada grupo verifica-se que com exceção de TGP, fosfatase alcalina e CEA nas demais variáveis as médias foram correspondentemente mais elevadas no grupo Pâncreas e com exceção do CEA as medianas foram também mais elevadas no grupo com câncer do Pâncreas. Diferenças significativas entre os grupos foram verificadas somente em Ca 19.9 e Ca 125.

**Tabela 2** – Estatística das variáveis numéricas segundo o grupo de neoplasias pancreáticas e hepática biliar.

VARIÁVEL	N P/HB	GRUPO		VALOR DE P
		PÂNCREAS MÉDIA ± DP (MEDIANA)	HEPÁTICO BILIAR MÉDIA ± DP (MEDIANA)	
ALBUMINA	11 / 8	8,81 ± 17,65 (3,50)	3,51 ± 0,57 (3,35)	p <sup>(1)</sup> = 0,934
TGO	19 / 7	118,49 ± 100,87 (135,00)	108,71 ± 109,34 (75,00)	p <sup>(1)</sup> = 0,885
TGP	20 / 7	122,57 ± 99,66 (101,50)	123,29 ± 145,15 (50,00)	p <sup>(1)</sup> = 0,956
BILIRRUBINA DIRETA	21 / 8	10,34 ± 21,59 (0,90)	2,43 ± 4,71 (0,30)	p <sup>(1)</sup> = 0,124
BILIRRUBINA INDIRETA	21 / 8	3,27 ± 5,03 (0,80)	1,08 ± 1,12 (0,55)	p <sup>(1)</sup> = 0,769
CA 19.9	19 / 7	2542,13 ± 4146,16 (1074,00)	137,10 ± 161,56 (29,00)	p <sup>(1)</sup> = 0,035*
CA 125	11 / 3	49,84 ± 72,38 (16,60)	4,69 ± 5,54 (2,40)	p <sup>(1)</sup> = 0,035*
CEA	19 / 6	67,63 ± 242,30 (5,56)	761,99 ± 1645,56 (11,87)	p <sup>(1)</sup> = 0,775

Na Tabela 3 são apresentados os laudos histopatológicos presentes nos grupos de pacientes com neoplasias pancreáticas e hepático-biliares. Dentre os pacientes com câncer de pâncreas o tipo de tumor mais encontrado foi o tumor de cabeça de pâncreas correspondendo a aproximadamente 77% dos casos. Já o Carcinoma hepatocelular foi o mais comum entre o grupo hepático-biliar.

**Tabela 3** – Laudo histopatológico de tumores presentes entre o grupo com neoplasias de pâncreas, fígado e vesícula biliar.

<b>LOCALIZAÇÃO TUMORAL</b>	<b>LAUDO HISTOPATOLÓGICO</b>	<b>N (%)</b>
<b>PÂNCREAS</b>	ADENOCARCINOMA	27 (77,14%)
	INSULINOMA	3 (8,5%)
	NEUROENDÓCRINO	2 (5,71%)
	NESIDIOBLASTOMA	1 (2,8%)
	CARCINOMA AMPULAR	1 (2,8%)
	GASTRINOMA	1 (2,8%)
<b>FÍGADO E VIAS BILIARES</b>	CARCINOMA HEPATOCELULAR	9 (60%)
	ADENOCARCINOMA DE VIAS BILIARES	3 (20%)
	COLANGIOPAPILÁRIO	2 (13,33%)
	PERIAMPULAR	1 (6,66%)

#### 4.2 FAN HEp – 2 EM TUMORES PANCREATICOS E HEPÁTICOS – BILIARES

Na Tabela 4 apresenta-se os resultados das características de faixa etária, sexo e os resultados do FAN nos três grupos estudados, onde se destaca: em relação a idade, a maior diferença percentual ocorreu na faixa etária 70 a 87 anos entre os grupos pâncreas (35,1%) e hepático biliar (12,5%); o percentual do sexo feminino foi de 50,0% no grupo hepático biliar e este percentual foi 52,8% a 57,9% nos outros dois grupos. Assim observa-se não haver diferença entre idade e sexo entre os grupos analisados; o percentual com FAN positivo foi 100,0% no grupo Hepático biliar, 41,5% no grupo do Pâncreas e foi 7,5% no grupo Controle. Na variável positividade do FAN, a diferença foi significativa entre os grupos.

**Tabela 4** – Avaliação da faixa etária, sexo e resultado da FAN segundo o grupo controle e de neoplasias pancreática e hepático biliar.

VARIÁVEL	GRUPO						VALOR DE P
	PÂNCREAS		HEPÁTICO BILIAR		CONTROLE		
	N	%	N	%	N	%	
<b>FAIXA ETÁRIA</b>							p <sup>(1)</sup> = 0,500
20 A 49	7	18,9	5	31,3	11	27,5	
50 A 59	7	18,9	4	25,0	12	30,0	
60 A 69	10	27,0	5	31,3	10	25,0	
70 A 87	13	35,1	2	12,5	7	17,5	
<b>TOTAL</b>	<b>37</b>	<b>100,0</b>	<b>16</b>	<b>100,0</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>	
<b>SEXO</b>							p <sup>(2)</sup> = 0,974
MASCULINO	25	47,2	11	50,0	19	47,5	
FEMININO	28	52,8	11	50,0	21	52,5	
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>	<b>22</b>	<b>100,0</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>	
<b>FAN</b>							p <sup>(2)</sup> < 0,001*
POSITIVO	22	41,5	22	100,0	3	7,5	
NEGATIVO	31	58,5	-	-	37	92,5	
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>	<b>22</b>	<b>100,0</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>	

(\*) Diferença significativa ao nível de 5,0%; <sup>(1)</sup> Pelo teste Exato de Fisher; <sup>(2)</sup> Pelo teste Qui-quadrado de Pearson.

Os resultados da titulação do FAN por grupo são apresentados na Tabela 5 onde se destaca que: o percentual de casos negativos foi maioria no grupo Controle (92,5%) e este percentual foi nulo no grupo Hepático biliar. Dos casos positivos a titulação 1/80 teve percentual de 54,5% no grupo Hepático biliar, foi 24,5% no Pâncreas e foi 5,0% no grupo Controle, a titulação 1/160 foi 36,4% no grupo Hepático biliar e variou de 2,5% a 5,7% nos outros dois grupos e as titulações 1/320 e 1/640 foi nulo no grupo Controle e variou de 9,1% a 11,3% nos outros dois grupos.

**Tabela 5** – Valor da titulação do FAN segundo o grupo controle e de neoplasias pancreática e hepático biliar.

FAN	GRUPO						VALOR DE P
	PÂNCREAS		HEPÁTICO BILIAR		CONTROLE		
	N	%	N	%	N	%	
0 (negativo)	31	58,5	-	-	37	92,5	
1/80	13	24,5	12	54,5	2	5,0	
1/160	3	5,7	8	36,4	1	2,5	p <sup>(1)</sup> < 0,001*
1/320 e 1/640	6	11,3	2	9,1	-	-	
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>	<b>22</b>	<b>100,0</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>	

(\*) Diferença significativa ao nível de 5,0%; <sup>(1)</sup> Pelo teste Exato de Fisher.

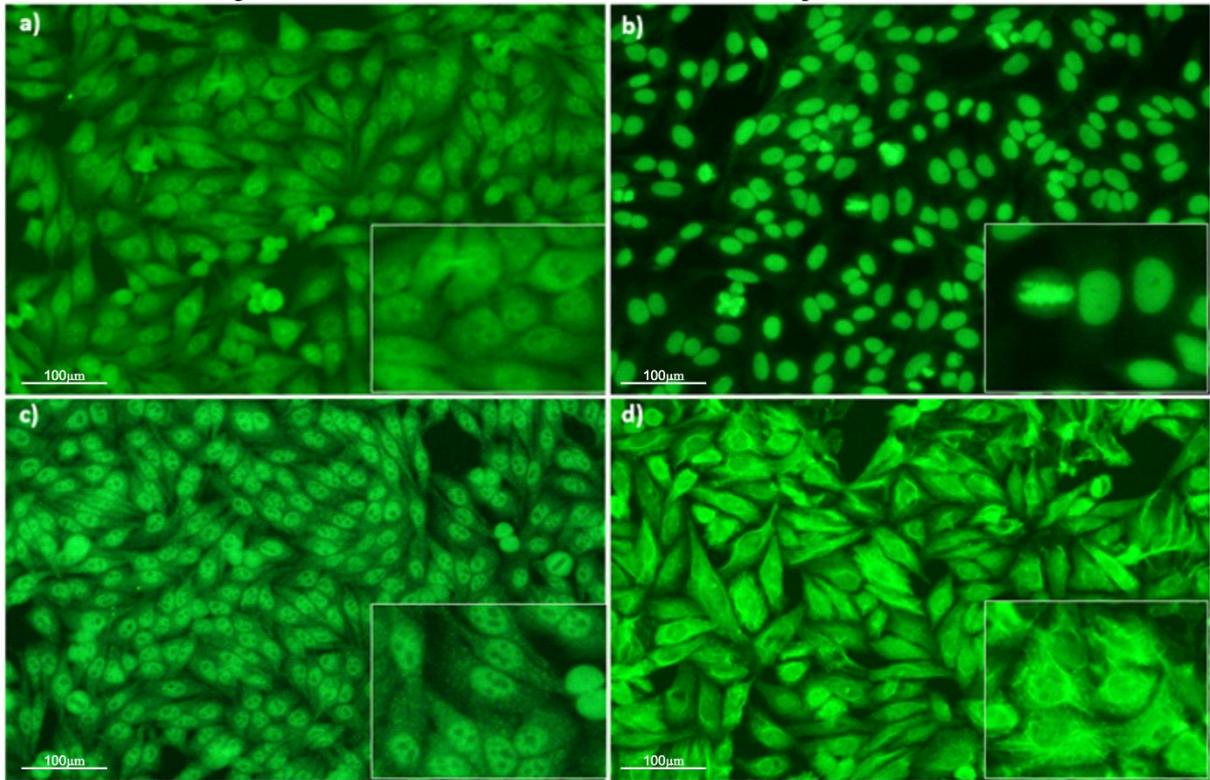
A tabela 6 mostra os padrões de fluorescência encontrados de acordo com o tipo de tumor. A frequência de positividade dentro de cada neoplasia foi maior no grupo Hepático e de vias biliares (100% dos pacientes), e 26,6% nos tumores de pâncreas. No grupo pancreático 50% apresentaram padrão nuclear pontilhado fino denso. Para o grupo Hepático-Biliar, o padrão mais prevalente foi o nuclear pontilhado grosso (45,00%).

**Tabela 6** – Padrões de imunofluorescência encontrados no grupo de pacientes controles e de pancreática e hepático biliar.

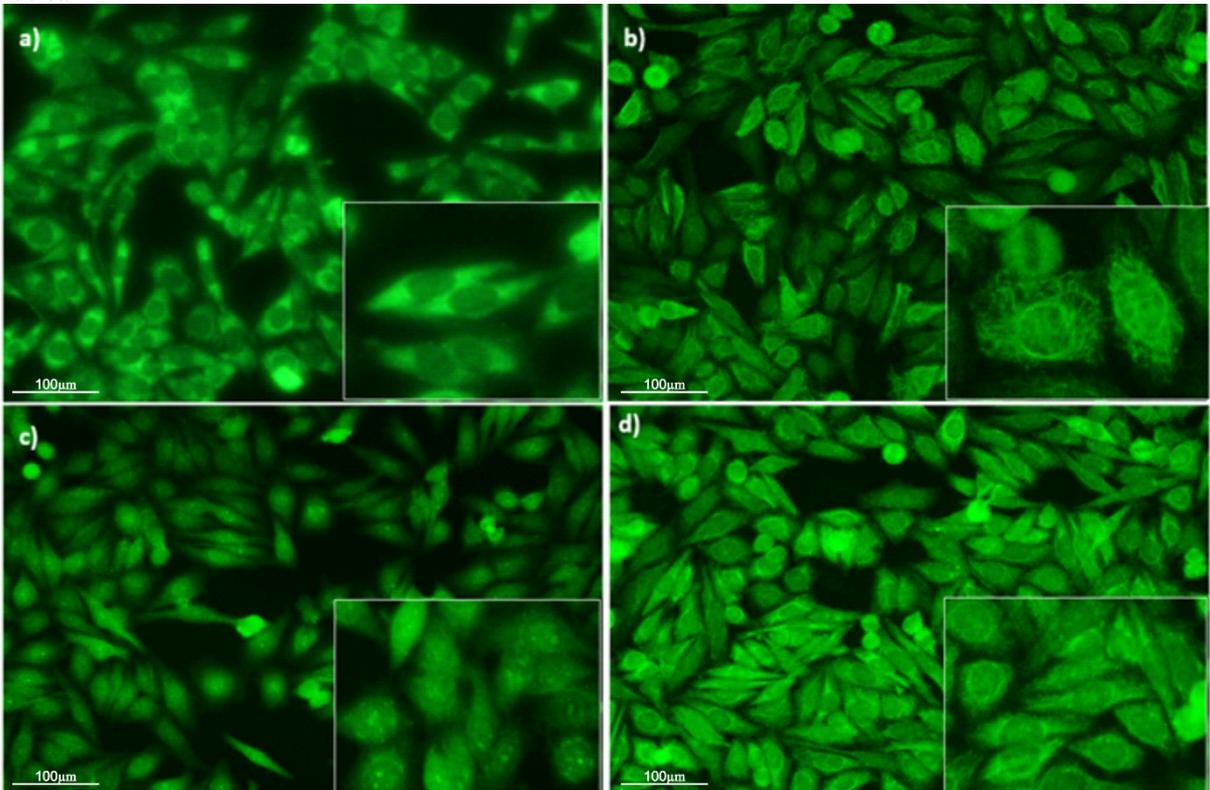
PADRÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	PANCREÁTICO N=22/53	HEPÁTICO- BILIAR N=22/22	CONTROLE N=3/40
NUCLEAR PONTILHADO FINO DENSO (NPF)	11 (50%)	7 (31,81%)	1 (33,33%)
NUCLEAR PONTILHADO GROSSO (NPG)		10 (45,00%)	2 (66,66%)
NUCLEAR HOMOGÊNEO (NH)	4 (18,18%)	1 (4,54%)	
NUCLEOLAR	2 (9,09%)		
CITOPLASMÁTICO PONTILHADO FINO DENSO (CPFD)	2 (9,09%)		
CITOPLASMÁTICO PONTILHADO RETICULAR (CPR)	2 (9,09%)	1 (4,54%)	
MEMBRANA NUCLEAR (MN)	1 (4,5%)		
MITÓTICO COM PONTE INTERCELULAR (PI)		3 (13,63%)	

Das 47 amostras com positividade no FAN HeP-2, aproximadamente 47% apresentaram padrão nuclear pontilhado fino denso (figura 7A), 11% nuclear homogêneo (figura 7B), 19% nuclear pontilhado grosso (figura 7C), e 6% citoplasmático pontilhado reticular (Figura 7D). Observa-se que a neoplasia de pâncreas foi a que apresentou a maior diversidade de padrões para o FAN. Já as neoplasias de vesícula biliar apresentaram o padrão NPG como o mais prevalente, diferindo do grupo de tumor de pâncreas e tumor hepático onde o NPF foi o mais encontrado. A figura 8 apresenta outros padrões também encontrados no grupo de neoplasia de pâncreas, como o padrão citoplasmático pontilhado fino denso (8A), citoplasmático pontilhado reticular (figura 8B), nucleolar (figura 8C) e membrana nuclear (figura 8D).

**Figura 7** – Padrões de fluorescência obtidos pela técnica do FAN: a) Padrão Nuclear Pontilhado Fino Denso, b) Padrão Nuclear homogêneo, c) Padrão Nuclear Pontilhado Grosso e d) Citoplasmático Pontilhado Reticular.



**Figura 8** - Demais padrões de fluorescência encontrados no grupo de pacientes com câncer: a) Padrão citoplasmático Pontilhado Fino Denso, b) Citoplasmático Pontilhado Reticular, c) Nucleolar, d) Membrana nuclear.



No estudo da associação entre os resultados do FAN com as variáveis de caracterização, clínicas e com os hábitos de vida não foram registradas associações significativas ( $p > 0,05$ ) conforme resultados apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Avaliação da técnica FAN segundo os dados de caracterização, dados clínicos e hábitos de vida.

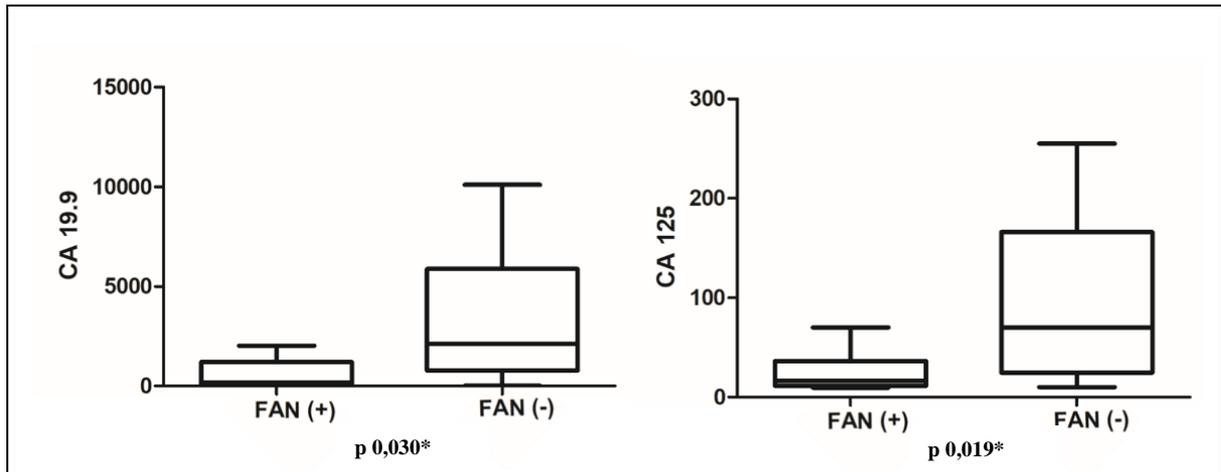
VARIÁVEL	FAN				GRUPO TOTAL		VALOR DE P
	POSITIVO		NEGATIVO		N	%	
	N	%	N	%			
<b>FAIXA ETÁRIA</b>							
20 A 49	7	30,4	16	69,6	23	100,0	$p^{(1)} = 0,570$
50 A 59	8	34,8	15	65,2	23	100,0	
60 A 69	10	40,0	15	60,0	25	100,0	
70 A 87	11	50,0	11	50,0	22	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>36</b>	<b>38,7</b>	<b>57</b>	<b>61,3</b>	<b>93</b>	<b>100,0</b>	
<b>SEXO</b>							
MASCULINO	20	36,4	35	63,6	55	100,0	$p^{(1)} = 0,347$
FEMININO	27	45,0	33	55,0	60	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>40,9</b>	<b>68</b>	<b>59,1</b>	<b>115</b>	<b>100,0</b>	
<b>RAÇA/COR</b>							
BRANCA	1	33,3	2	66,7	3	100,0	$p^{(2)} = 0,479$
PARDA	18	62,1	11	37,9	29	100,0	
NEGRA	2	100,0	-	-	2	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>61,8</b>	<b>13</b>	<b>38,2</b>	<b>34</b>	<b>100,0</b>	
<b>HAS</b>							
SIM	18	58,1	13	41,9	31	100,0	$p^{(2)} = 1,000$
NÃO	7	63,6	4	36,4	11	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>59,5</b>	<b>17</b>	<b>40,5</b>	<b>42</b>	<b>100,0</b>	
<b>DM</b>							
SIM	17	63,0	10	37,0	27	100,0	$p^{(1)} = 0,619$
NÃO	10	55,6	8	44,4	18	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>	<b>60,0</b>	<b>18</b>	<b>40,0</b>	<b>45</b>	<b>100,0</b>	
<b>HÁBITO DO TABAGISMO</b>							
SIM	16	72,7	6	27,3	22	100,0	$p^{(1)} = 0,092$
NÃO	10	47,6	11	52,4	21	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>60,5</b>	<b>17</b>	<b>39,5</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>	
<b>HÁBITO DO ETILISMO</b>							
SIM	15	75,0	5	25,0	20	100,0	$p^{(1)} = 0,096$
NÃO	11	50,0	11	50,0	22	100,0	
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>61,9</b>	<b>16</b>	<b>38,1</b>	<b>42</b>	<b>100,0</b>	

(1) Pelo teste Qui-quadrado de Pearson

(2) Pelo teste Exato de Fisher.

Na Figura 9 se apresenta as estatísticas das variáveis CA 19.9 e CA 125 de acordo com o FAN positivo em pacientes com câncer de pâncreas onde pode ser verificado que a média e mediana das duas variáveis foram correspondentemente mais elevadas quando o FAN era negativo. Nas duas variáveis se comprova diferenças significativas.

**Figura 9** – Correlação dos marcadores Ca 19.9 e Ca 125 segundo o resultado do FAN.



\*Diferença Significativa ao nível de 5,0%

## 5 DISCUSSÃO

Autoanticorpos séricos têm sido identificados em pacientes com tumores sólidos, incluindo câncer de mama, de próstata, de pulmão e em pacientes com neoplasias hematológicas (SENER, 2015, NISIHARA, 2018). Alguns autores vem apontando essas moléculas como potenciais biomarcadores, que podem vir a ser detectadas até anos antes do diagnóstico neoplásico ser estabelecido (CHAPMAN, 2007; JARAS, 2011; DJUREINOVIC, 2018).

Nossos resultados mostraram que pacientes com câncer de pâncreas, fígado e vias biliares apresentaram maior prevalência de positividade para ANA em comparação ao grupo controle. Em nosso grupo neoplásico a frequência do FAN foi de 58,6% enquanto no grupo sadio a positividade dos autoanticorpos foi de 7,5%, porém já é esperado que alguns pacientes aparentemente hígidos possam vir a apresentar FAN-HEp2 positivo em cerca de 2% a 12% dos casos (DELLAVANCE, 2007; MARIZ, 2011).

Em um estudo realizado por Mohammed e colaboradores foram avaliadas através de ELISA, 35 pacientes recém diagnosticados com câncer de mama e 18 mulheres sadias como grupo controle. O grupo se propôs a avaliar a concentração sérica de ANA nessas pacientes. Os resultados deste estudo mostraram que a concentração de ANA foi significativamente maior nos pacientes com câncer em comparação aos indivíduos controle (MOHAMMED, 2018). Outro estudo realizado por Nisihara e colaboradores, também avaliou a presença de autoanticorpos em pacientes com câncer de mama, assim como em nossa pesquisa foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta. A positividade para ANA neste caso foi de 44,4% nos pacientes com tumor de mama e de 5% no grupo controle (NISIHARA, 2018).

Mais um estudo de avaliação da presença de autoanticorpos, foi realizado por Madrid e colaboradores onde eles trabalharam com soros de 100 mulheres com carcinoma ductal in situ, 100 com carcinoma ductal invasivo e 100 com doença benigna da mama como controle principal. Foi relatado que os autoanticorpos foram detectados em praticamente todos os pacientes com câncer de mama. Além disso foi observada uma menor reatividade na imunofluorescência entre o grupo com carcinoma in situ e com doenças benignas da mama (grupo controle) com relação ao grupo com carcinoma invasivo. A técnica utilizada nesse estudo também foi a imunofluorescência indireta utilizando células HEp-2 (MADRID, 2015).

Esses resultados nos fazem acreditar que esses autoanticorpos estão envolvidos no processo de carcinogênese, visto que se encontram elevados em pacientes neoplásicos. Porém, a sua função no processo ainda não está bem estabelecida na literatura. Autores como Zou e

colaboradores, apresentam a hipótese de que os ANA teriam uma atividade antitumoral, explicada pela citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos e por citocinas que melhoram a função imune induzida pelos complexos imunes do ANA (ZOU, 2015).

Em nossos dados observamos que a frequência de positividade foi maior nos pacientes com tumor de vias biliares e tumor hepático (100%) em comparação aos pacientes com neoplasia de pâncreas (41,5%). Já é sabido que existe um painel de autoanticorpos associados com diversas doenças hepáticas como a hepatite autoimune ou a cirrose biliar primária, por exemplo, o que é demonstrado por alguns autores (CZAJA, 1997; BOGDANOS, 2008; LIBERAL, 2013). A detecção desses autoanticorpos em doenças do fígado e vesícula é de grande importância, devido à sua ligação com a resposta ao tratamento e ao prognóstico geral (VERGANI, 2004). Portanto essa presença elevada de anticorpos no grupo hepático-biliar já era esperada. Essa diferença na positividade entre os grupos também pode ter como justificativa a diferença no n amostral entre os grupos em nosso estudo.

Outro ponto a ser considerado é o título do FAN-HEp-2, muito embora seu valor seja relativo, uma vez que o título é apenas um dado semi-quantitativo. Em geral, os pacientes autoimunes tendem a apresentar títulos moderados (1/160 e 1/320) e elevados (1/640), enquanto os indivíduos sadios com FAN-HEp-2 positivo tendem a apresentar baixos títulos (1/80) (DELLAVANCE, 2007). Em nosso trabalho, 19 pacientes do grupo neoplásico, cerca de 25%, apresentaram títulos acima de 1/160. Apenas 1 paciente do grupo controle apresentou título de 1/160.

Uma pesquisa conduzida por Guyomard avaliou através de imunofluorescência e ELISA, a prevalência e padrões dos anticorpos antinucleares em pacientes com Linfoma Não Hodgkin. Nesse estudo, 19% dos pacientes com câncer apresentaram positividade para os autoanticorpos em títulos considerados moderados ou altos, ou seja, acima de 1/160 (GUYOMARD, 2003). Assim, acreditamos que a presença desses autoanticorpos esteja ligada a algum processo biológico presente na carcinogênese.

O padrão de IFI reflete a distribuição topográfica dos antígenos reconhecidos pelos auto-anticorpos em um determinado soro (DELLAVANCE, 2007). Em nosso trabalho o padrão de imunofluorescência mais prevalente foi o nuclear pontilhado fino denso, seguido do nuclear pontilhado grosso. No estudo de Madrid e colaboradores, já previamente citado, a IFI mostrou padrões diversos como o nuclear homogêneo, pontilhado fino denso e nucleolar. Embora esses padrões possam ser os mesmos encontrados em doenças autoimunes como o Lúpus, os autoanticorpos que foram identificados através do ELISA, tiveram um perfil com características

distintas (MADRID, 2015). O que em nosso estudo vem a ser uma limitação, pois não chegamos à fase de identificação dos autoanticorpos correlacionados.

O padrão nuclear pontilhado fino denso pode ser associado a indivíduos sem qualquer evidência de auto-imunidade, sendo assim, considerado um padrão controverso. Por isso, torna-se necessária a detecção do anticorpo a qual o padrão está associado (DELLAVANCE, 2007). No estudo de Agustinelli e colaboradores, foram avaliados 1217 indivíduos sadios através da técnica de FAN-HEp-2, foi verificado que 150 indivíduos apresentaram-se positivos para autoanticorpos, onde destes, 28% apresentaram o padrão nuclear pontilhado fino denso (AUGUSTINELLI, 2019).

O padrão nuclear pontilhado grosso, que foi mais presente entre nossos pacientes com tumor hepático-biliar, representa o mapa de distribuição das proteínas envolvidas no processamento (splicing) do RNA mensageiro. As principais proteínas do spliceossoma são exatamente aquelas reconhecidas pelos anticorpos anti-Sm e anti-RNP. Clinicamente, anticorpos anti-Sm estão fortemente associados ao LES, enquanto os anticorpos anti-RNP são mais frequentemente observados na doença mista do tecido conectivo (DMTC) e no LES (MIGLIORINI, 2005. DELLAVANCE, 2007).

O fato de a presença de autoanticorpo ter ligação com o processamento do RNA nos leva a refletir sobre a possibilidade de que essas moléculas poderiam estar envolvidas, por exemplo, na mutação de genes que participam do splicing, implicando conseqüentemente na biologia tumoral. Em estudos como o de Srebrow é possível ver uma lista de genes envolvidos no spliceossoma que quando mutados são associados ao câncer. Um deles é o gene CDH17, que tem relação com o parecimento do carcinoma hepatocelular (SREBROW, 2006). Poderia então, esse gene e suas proteínas correlatas justificarem em nosso estudo o aparecimento do padrão nuclear pontilhado grosso entre os pacientes de grupo Hepático-Biliar.

Diferente do esperado, não encontramos o padrão de fluorescência do tipo CENP-F. A literatura aponta para a suspeita de doença neoplásica em pacientes com este padrão. Trata-se de um padrão complexo, ocasionado por anticorpos contra uma proteína de 350 kDa, conhecida como CENP-F ou mitosina. Esta proteína tem função importante na organização do sistema de microtúbulos citoplasmáticos (FRANDESCANTONIO, 2014). A pesquisa realizada por Bonaci-Nikolic demonstrou a presença desse padrão em um paciente com câncer coloretal (BONACI-NIKOLIC, 2006).

Em nosso trabalho conseguimos traçar associações entre o FAN e os marcadores tumorais CA19.9 e CA125, que se mostaram mais elevados entre os pacientes com FAN negativo. Neste caso, ter o FAN positivo indicaria sinal de um bom prognóstico. Corroborando

com nossa hipótese, o estudo de Erkanli mostrou que a presença de ANAs circulantes em pacientes com câncer de pulmão e câncer de cólon estava relacionada à melhora na taxa de sobrevivência dos pacientes, uma explicação para tal efeito seria a atividade antitumoral dos autoanticorpos (ERKANLI, 2006).

Ainda são necessários estudos adicionais que venham a contribuir para a utilização do FAN HeP-2 como possível teste diagnóstico ou prognóstico, Muitos estudos têm associado a presença de neoplasias à indução de autoimunidade, caracterizada pela geração de autoanticorpos contra autoantígenos e a importância dessas moléculas como biomarcador. De acordo com nossos resultados, os autoanticorpos foram mais prevalentes no soro de pacientes com câncer, em relação ao grupo controle, porém ainda se faz necessário mais estudos acerca da natureza e efeitos biológicos dessas moléculas para melhor compreensão da técnica nesse grupo de pacientes, o que terá impacto no entendimento dos mecanismos de imunidade no câncer bem como no diagnóstico e prognóstico da doença.

## **6 CONCLUSÕES**

Muitos estudos têm demonstrado a associação entre câncer e a indução da autoimunidade, caracterizada pelo aparecimento de autoanticorpos dirigidos a antígenos celulares. De acordo com os nossos resultados, a frequência da positividade do FAN-HEp2 foi significativamente maior no grupo com câncer em comparação ao controle sadio. Os padrões de fluorescências mais encontrados foram o nuclear pontilhado fino denso e o nuclear pontilhado grosso.

Em nossa pesquisa vimos que pacientes negativos para o FAN, possuíram elevados níveis de marcadores tumorais.

## REFERÊNCIAS

ABU-SHAKRA, M. Cancer and autoimmunity: autoimmune and rheumatic features in patients with malignancies. **Annals of The Rheumatic Diseases**. v. 60, n. 5, p.433-441, 2001.

ADDEO, A.; BANNA, G. L.; WEISS, G. J.; Tumor Mutation Burden—From Hopes to Doubts. **JAMA Oncology**. V.5, n. 7, 2019.

AGMON-LEVIN, N. et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. **Ann Rheum Dis**. 73 (1), 17-23, 2014.

AIT-TAHAR, K. et al. Correlation of the autoantibody response to the ALK oncoantigen in pediatric anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma with tumor dissemination and relapse risk. **Blood**. 115 (16), 3314–3319, 2010.

ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**. v. 500, n. 7463, p.415-421, 2013.

ALOIA, T. A. et al. Gallbladder Cancer: expert consensus statement. **Hpb**. v. 17, n. 8, p.681-690, 2015.

ALTMAN, D. G. Chapman and Hall, Practical Statistics for Medical Research. **CRC press**. p. 611, 1991.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST)**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/gastrointestinal-stromal-tumor.html>. Acesso em: 02 maio 2019.

ARSLAN, A. A. et al. Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). **Arch Intern Med**. 170: 791–802, 2010.

AGUSTINELLI, R. A. et al. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEP-2 cells) in patients with non-autoimmune diseases. **Lupus**. 28 (5): 629-634, 2019.

BALDWIN, L.M. et al. Vignette-based study of ovarian cancer screening: do U.S. physicians report adhering to evidence-based recommendations? **Ann. Intern. Med**. 156, 182– 194, 2012.

BOGDANOS, D. P. et al. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. **World J Gastroenterol.** 14 (21): 3374-3387, 2008.

BONACI-NIKOLIC, B. et al. Autoantibodies to mitotic apparatus: association with other autoantibodies and their clinical significance. **J Clin Immunol.** 26 (5): 438-46, 2006.

BOSMAN, F. et al. **World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System.** Lyon: IARC Press, p. 266-274, 2010.

BRUIX, J. et al. Focus on hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell.** v. 5, n. 1, p.1-5, 2004.

BRUIX, J.; SHERMAN, M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. **Hepatology.** v. 53, n. 3, p.1020-1022, 2011.

CHAPMAN, C et al. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. **Annals Of Oncology.** v. 18, n. 5, p.868-873, 2007.

CHEN, H. et al. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer. **Cancer Lett.** 346, 178-187 88, 2014.

CONOVER, W. J. Practical Nonparametric Statistics. **John Wiley & Sons.** ed. 2, p. 495, 1980.

CRUVINEL, W. M. et al. V Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on hep-2 cells. **Advances In Rheumatology.** v. 59, n. 1, p.1-11, 2019.

CZAJA, A. J. et al. Antinuclear Antibodies and Patterns of Nuclear Immunofluorescence in Type 1 Autoimmune Hepatitis. **Dig Dis Sci.** 42, 1688-1696, 1997.

DE ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 53(3): 305-316, 2007.

DE OLIVEIRA, G. G., DA FONSECA, C. A. Uso de marcadores tumorais no diagnóstico e acompanhamento do tratamento do cancer. **Revista eletrônica de farmácia.** 3 (2), 60 – 74, 2011.

DELLAVANCE, A. et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células Hep-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em

células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. **Rev Bras Reumatol.** 49(2):89-109, 2009.

DELLAVANCE, A.; ANDRADE, L. E. C. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. **J Bras Patol Med Lab.** v. 43, n. 3, p. 157-168, 2007.

DJUREINOVIC, D. et al. Detection of autoantibodies against cancer-testis antigens in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 125, p.157-163, 2018.

DUFFY, M.J. et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. **International Journal of Cancer.** v. 134, n. 11, p.2513-2522, 2013.

EHRlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. In Beiträge zur Experimentellen Pathologie und Chemotherapie, pp. 117–164, 1909. in German, Akademische Verlagsgesellschaft.

ELKON, K.; CASALI, P. Nature and functions of autoantibodies. **Nature Clinical Practice Rheumatology.** v. 4, n. 9, p.491-498, 2008.

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. **Hepatol Res.** 37. 88-94, 2007.

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology.** 142: 1264-1273, 2011.

ERKANLI, A. L. et al. Application of Bayesian Modeling of Autologous Antibody responses against Ovarian Tumor-Associated Antigens to Cancer Detection. **Cancer Res February.** 1 (66) 1792-1798, 2006.

FERNANDES, J.; MICHEL, V.; CAMORLINGA-PONCE, M., et al Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention.** 23 (11), 2430-38, 2014.

FERNÁNDEZ-SUÁREZ, A. et al. Low positive rate of serum autoantibodies in colorectal cancer patients without systemic rheumatic diseases Low positive rate of serum autoantibodies

in colorectal cancer patients without systemic rheumatic diseases. **Autoimmunity**. 49 (6): 383-387, 2016.

FIGUEIREDO, L. C et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Rev. Bras. de Cancero**. 49(3): 179-183, 2003.

FINN, O. J. Cancer Immunology. **N Engl J Med**. 358: 2704-15, 2008.

FONSECA, C.; DRANOFF, G. Capitalizing on the immunogenicity of dying tumor cells. **Clin Cancer Res**. 14, 1603-1608, 2008.

FRANCESCANTONIO, P. L. et al. IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells. **Rev Bras Reumatol**. 2014; 54: 44-50.

GHOSH et al. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence: Optimum screening dilution for diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Indian J Med Res**. 126, 34-38, 2007.

GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. **J. Exp. Med**. 121, 439–462 141, 1965.

GOURGIOTIS, S. et al. Gallbladder cancer. **The American Journal of Surgery**. v. 196, n. 2, 252-264, 2008.

GRAHAM, J. B.; GRAHAM, R. M. Antibodies elicited by cancer in patients. **Cancer**. 8, 409–416 140, 1955.

GUBIN, M. M. et al. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**. v. 125, n. 9, p.3413-3421, 2015.

GUYOMARD, S. et al. Prevalence and pattern of antinuclear autoantibodies in 347 patients with non-Hodgkin's lymphoma. **British Journal of Haematology**. 123, 90–99, 2003.

HAANEN, J. B. A. G. Converting Cold into Hot Tumors by Combining Immunotherapies. **Cell**. v. 170, n. 6, p.1055-1056, 2017.

HARINCK, F. et al. A multicentre comparative prospective blinded analysis of EUS and MRI for screening of pancreatic cancer in high-risk individuals. **Gut**. v. 65, n. 9, p.1505-1513, 2015.

HAUGBRO, K. et al. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: The role of analytical diversity. **Ann Rheum Dis.** 63: 386-94, 2004.

HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de Oncologia.** São Paulo: Atheneu, 2013.

HOLBROW, E. J.; WEIR, D. M.; JHONSON, G. D. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. **Br Med J.** 2: 732-4, 1957.

HUNDAL, R.; SHAFFER, E. Gallbladder cancer: epidemiology and outcome. **Clinical Epidemiology.** p.99-109, 2014.

ICAP. **Internacional Consensus on ANA patterns.** 2019. Disponível em: <https://www.anapatterns.org/trees-full.php>. Acesso em: 14 ago. 2019.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology.** v. 22, n. 44, p.9694-9705, 2016.

IMAI, H. et al. Novel nuclear autoantigen with splicing factor motifs identified with antibody from hepatocellular carcinoma. **J. Clin. Invest.** 92, 2419–2426 64, 1995.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Global Cancer Observatory.** Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 06 jul. 2019.

ISHIGAMI, S. et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. **Cancer.** 88: 577-583, 2000.

JÄRÅS, K.; ANDERSON, K. Autoantibodies in cancer: prognostic biomarkers and immune activation. **Expert Review Of Proteomics.** v. 8, n. 5, p.577-589, 2011.

KAMISAWA, T.; WOOD, L. D.; ITOI, T. Pancreatic cancer. **Lancet.** v. 1, n. 388, p.73-85, 2016.

KANTHAN, R. et al. Gallbladder Cancer in the 21st Century. **Journal of Oncology.** v. 2015, p.1-26, 2015.

KLEEFF, J. et al. Pancreatic cancer. **Nature Reviews Disease Primers.** v. 2, n. 1, p.1-22, 2016.

KONSTANDOULAKIS et al. Autoantibodies in the Serum of Patients with Gastric Cancer: Their Prognostic Importance. **Hybridoma,** v. 5, n. 17, p.431-435, 1998.

LAZCANO-PONCE, E. C. et al. Epidemiology and Molecular Pathology of Gallbladder Cancer. **Ca Cancer J Clin.** v. 51, n. 1, p.349-364, 2001.

LEE, B. et al. Emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatment of upper gastrointestinal, pancreatic and hepatic cancers. **Seminars in Cancer Biology.** v. 52, p.241-252, 2018.

LEE, H. E. et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. **Br J Cancer.** 99: 1704-1711, 2008.

LIBERAL, R.; MIELI-VERGANI, G.; VERGANI, D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. **J Autoimmun.** 46: 17-24. 2013.

LIU, X. et al. Circulating exosomal mir-27a and mir-130a act as novel diagnostic and prognostic biomarkers of colorectal cancer. **American association for cancer research.** 2018.

LUBIN, R. et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. **Nat. Med.** 1, 701–702, 1995.

MACDONALD, I. K.; PARSY-KOWALSKA, C. B.; CHAPMAN, C. J. Autoantibodies: Opportunities for Early Cancer Detection. **Trends In Cancer.** v. 3, n. 3, p.198-213, 2017.

MADRID, F. F. et al. Autoantibodies in breast cancer sera are not epiphenomena and may participate in carcinogenesis. **Bmc Cancer.** v. 15, n. 1, p.1-15, 2015.

MARIZ, H. et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibodypositive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis Rheum.** 63(1): 191–200, 2011.

MATOS, L. L. et al. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arq. Med. ABC.** v. 30. n.1, 2005.

MATTAR. R. et al. Preoperative serum levels of CA 72-4, CEA, CA 19-9, and Alpha-fetoprotein in patients with gastric cancer. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.** 57(3): 89-92, 2002.

MIGLIORINI, P. et al. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. **Autoimmunity,** v. 38, p. 47-54, 2005.

MILLER, J. F. A. P.; SADELAIN, M. The Journey from Discoveries in Fundamental Immunology to Cancer Immunotherapy. **Cancer Cell**. v. 27, n. 4, p.439-449, 2015.

MOHAMMED, M. E.; ABDELHAFIZ, K. Autoantibodies in the sera of breast cancer patients: Antinuclear and anti-double stranded DNA antibodies as example. **J Can Res Ther**. 11: 341-4, 2018.

MORE: Mecanismo online para referências, versão 2.0. Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013. Disponível em: < <http://www.more.ufsc.br/> >. Acesso em: 20/08/2019.

MS/ INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em: 06 jul. 2019.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NIH. **NCI Dictionary of Cancer Terms**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/795825>. Acesso em: 08 ago. 2019.

NEOPTOLEMOS J. P. et al. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**. v. 1, n. 1, p.1-16, 2018.

NISHIHARA, R. et al. Antinuclear antibodies in patients with breast cancer. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 193, n. 2, p.178-182, 2018.

NOSHO, K. et al. Tumour infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. 222: 350-366. **J Pathol** 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 02 jul. 2019.

ORTONA, E.; PIERDOMINICI, M.; BERSTEIN, L. Autoantibodies to estrogen receptors and their involvement in autoimmune diseases and cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v. 144, p. 260-7, 2014.

PARIKH, U. et al. FDG PET/CT in pancreatic and hepatobiliary carcinomas: value to patient management and patient outcomes. **PET Clin**. 10, 327-343, 2015.

- PORUK, K. E. et al. The clinical utility of CA 19–19 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. **Curr. Mol. Med.** 13, 340–351, 2013.
- POURHOSEINGHOLI, M. A.; VAHEDI, M.; BAGHESTANI, A. R. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench.** 8(1): 19-27), 2015.
- ROWLEY, M. J. et al. Reciprocal change with age in antibody to extrinsic and intrinsic antigens. **Lancet.** 2, 24–26, 1968.
- SACK, U. et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on hep-2 cells. **Contemporary challenges in autoimmunity**, N.Y., n. 1173, p. 166–173, 2009.
- SCHUMACHER, T. N.; SCHREIBER, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p.69-74, 2015.
- SCHWARTZ M. Specialized techniques of cancer management and diagnosis. **Cancer markers.** 1993: 531-42, 1993. In: DEVITA, V.; HELLMAN, S. J. R.; ROSENBERG, S.
- SREBROW, A.; KORNBLIHTT, A. R. The connection between splicing and cancer. **Journal of Cell Science.** 119: 2635-2641, 2006.
- SENER, A. G.; TARHAN, E. F. Serodetection of Antinuclear Antibodies (ANA) in Patients with Various Cancer Types. **Journal Of Medicine And Med. Res.** v. 3, n. 3, p.15-20, 2015.
- SHARABI, A. et al. Exceptional Response to Nivolumab and Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) in Neuroendocrine Cervical Carcinoma with High Tumor Mutational Burden. **The Oncologist.** 22: 631–637, 2017.
- SHEN, J.; WANG, K. T. Clinical significance of serum LDH in non-hodgkin’s lymphoma. **Zhong Guo Yi Yao Zhi Nan.** 8: 116-117, 2010.
- SIA, D. et al. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. **Gastroenterology.** v. 152, n. 4, p.745-761, 2017.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians.** v. 66, n. 1, p.7-30, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 68, n. 1, p.7-30, 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 69, n. 1, p.7-34, 2019.

SOUSSI, T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. **Cancer Res.** 60 (7), 1777–1788, 2000.

STEWART, B. W. The International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report 2014**. Lyon: WHO Press, 2014. 630 p.

TAKEDA, A. et al. Monitoring of p53 autoantibodies after resection of colorectal cancer: relationship to operative curability. **Eur. J. Surg.** 167(1), 50–53, 2001.

TAN, E. M.; ZHANG, J. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. **Immunological Reviews**. v. 222: 328–340, 2008.

TANG, R. et al. Humoral response to p53 in human colorectal tumors: a prospective study of 1,209 patients. **Int. J. Cancer.** 94(6), 859–863, 2001.

TAYLOR, G.; ODILI, J. L. Tumour specific T-like antigen of human breast carcinoma. **Br. J. Cancer.** 24, 447–453, 1970.

TOMAINO, B. et al. Circulating autoantibodies to phosphorylated a-enolase are a hallmark of pancreatic cancer. **J. Proteome Res.** 10(1), 105–112, 2011.

TOUBI, E. and SHOENFELD, Y. Protective autoimmunity in cancer (Review). **Oncology reports.** 17: 245-251, 2007.

TOZZOLI, R. et al. Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases. **Am J Clin Pathol.** 117:316-324, 2002.

TRIVERS, G. E. et al. Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. **Clin. Cancer Res.** 2, 1767–1775, 1995.

TURNBULL, A. R. et al. Autoantibodies in early breast cancer: a stage-related phenomenon? **Br. J. Cancer.** 38, 461–463, 1978.

VAZ, J. A et al. **Imunoensaios Fundamentos e Aplicações: Ciências farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VERGANI, D.; ALVAREZ, F.; BIANCHI, F. B. et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol*. 41 (4): 677-683, 2004.

WANG, M. et al. Immunological battlefield in gastric cancer and role of immunotherapies. **World Journal of Gastroenterology**. v. 22, n. 28, p.6373-6384, 2016.

WASSERMAN, J. et al. Autoantibodies in patients with carcinoma of the breast: Correlation with prognosis. **Clin. Exp. Immunol**. 19, 417–422, 1975.

WATANABE, A. et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 892-900, 2004.

WOLFGANG, C. L. et al. Recent progress in pancreatic cancer. **CA Cancer J. Clin**. 63, 318–348, 2013.

WU, H. H.; LIN, W. C., TSAI, K. W. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: MiRNAs as emerging novel cancer markers. **Expert Rev Mol Med**. 16:1, 475, 480, 2018.

YUAN, J., et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. **Journal for Immunotherapy of Cancer**. V.4, n.3, 2016.

ZAENKER, P.; ZIMAN, M. R. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers – a review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**. 22, 2161–2181 69, 2013.

ZHANG, J. Y. et al. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 12 (2): 136–143, 2003.

ZOU, H. Y. et al. Detection of serum antinuclear antibodies in lymphoma patients. **Genetics And Molecular Research**. v. 14, n. 4, p.16546-16552, 2015.

## APÊNDICE – ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA HPB



**EVALUATION OF AUTOANTIBODIES IN HEP-2 CELLS AS A BIOMARKER IN  
HEPATIC, PANCREATIC AND BILIARY NEOPLASMS**

Amanda Regueira Fernandes<sup>1</sup>, Ângela Luzia B. P. Duarte<sup>2</sup>, Henrique de Ataíde Mariz<sup>2</sup>, José Guido Corrêa de Araújo Júnior<sup>3</sup>, Mario Rino Martins<sup>4</sup>, Maira Galdino da Rocha Pitta<sup>1</sup>, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Physiology, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

<sup>2</sup> Functional Unit of Rheumatology, Hospital das Clínicas, Recife, PE, Brazil;

<sup>3</sup> General Surgery Service, Hospital das Clínicas, Recife, PE, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Surgical Oncology, Pernambuco Cancer Hospital, Recife, PE, Brazil

**\*Corresponding author address:** Department of Biochemistry, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126-8576, e-mail address: moacyr.rego@gmail.com.

**ABSTRACT**

Some studies demonstrate that patients with malignancies may have detectable autoantibodies in serum before the symptomatic form of the disease begins. Our objective was to investigate the presence of these autoantibodies, directed against cellular antigens. To this end, we studied 75 newly diagnosed patients with pancreatic and liver-biliary neoplasms and 40 patients as a healthy control group. According to the immunofluorescence tests performed, in the sick group, 44 (58.66%) were positive for ANA in titers of 1:80 or higher, while the healthy group was positive in 7.5% of cases. We observed that the frequency of positivity was higher in patients with liver-biliary tumor (100%) compared to pancreatic cancer group (41.5%). The most frequent immunofluorescence patterns were the dense fine speckled nuclear and the thick speckled nuclear. We were also able to associate the presence of these antibodies with tumor markers CA19.9 and CA125. The levels of these markers were increased when the ANA was negative. According to our results, autoantibodies were more prevalent in the serum of cancer patients compared to the control group, but further studies on the nature and biological effects of these molecules are still needed to better understand the technique in this group of patients.

## INTRODUCTION

Gastrointestinal tract neoplasms have been cited as one of the most common incidents, with many cases and estimated deaths. Colorectal cancer is the most common in this group, followed by pancreatic, liver and gastric cancer [1,2,3]. The 5-year survival rates for this group of cancers are among the lowest since more than half of the cases are diagnosed at an advanced stage [2,3].

Currently, the diagnosis of digestive neoplasms is mainly made by imaging methods such as computed tomography and magnetic resonance, endoscopy, ultrasound, colonoscopy and confirmed by biopsies [4]. Imaging techniques, as well as some tumor markers such as CA 19.9 or CEA, used for patient follow-up, have low sensitivity and specificity, often associated with a high cost, which further complicates early diagnosis and adequate population screening. [5,6]. These data raise the urgency of developing new serum or plasma biomarkers that can be used for diagnosis and prognosis of gastrointestinal neoplasms.

A neoplastic cell can express a wide range of antigens that can be recognized by T and B lymphocytes. Self-cellular antigens can be expressed by the tumor in three ways: through mutations, overexpression of peptides, and post-translational modifications [7]. Normally antigen-reactive lymphocytes are expected to be deleted in the thymus, but some of these cells may escape and migrate to the periphery, recognizing their own peptides, causing autoimmunity [8].

Some studies show that patients with various types of tumor may have detectable autoantibodies in the circulation before cancer-associated antigens become measurable and even before the symptomatic form of the disease begins [9, 10,11]. These antibodies in cancer would behave similarly to autoantibodies directed to nuclear and cytoplasmic antigens in systemic lupus erythematosus and other autoimmune systemic diseases, showing potential to be used in the diagnosis [12].

Antinuclear antibodies (ANA) research by indirect immunofluorescence (IFI) in HEp-2 cells is widely used for the detection of autoantibodies, being the method of choice for screening due to its high sensitivity [13]. HEp-2 cells, epithelial cells derived from human laryngeal carcinoma, have a wide spectrum of autoantigens, and allow good visibility of different cell compartments. Some studies have used this technique in patients with some tumors, such as breast and lung cancer [14,15,16]. With this study, our goal was to investigate the presence of autoantibodies, directed against cellular antigens using the HEp-2 cell, within the pancreas, liver and biliary tract neoplasms.

## **METHODS**

This study was approved by the local Committee of Ethics in Research and all participants signed consent. We collected serum from a total of 75 patients from the Oncology and Gastroenterology Services of the Hospital das Clínicas and Cancer Hospital of Pernambuco (Pernambuco, Brazil) with pancreatic, hepatic and gallbladder cancer. The obtained sample was a convenience sample that included all patients that agreed to participate of the study. We excluded patients with previous diagnosis of autoimmune diseases and previous treatment. The average age of patients was 61 years old.

Fifteen ml of venous blood were drawn, aliquoted and preserved at -80°C until ANA tests were done. All the samples were screened to ANA by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells, using the commercially available kit ANA HEp-2 (Hemagen Diagnostics, Columbia, USA), as recommended by the manufacturer. A titer of 1:80 or higher was considered to indicate ANA positivity. The fluorescence patterns were interpreted following ICAP (International consensus on Antinuclear Antibodies) guidelines [17].

## RESULTS

We used 75 samples from patients with pancreatic cancer, liver cancer and biliary tract and 40 patients from the control group were used. The average age of Patients was 61 years old. Table 1 shows the histopathological reports present in the groups of patients with pancreatic and hepatic-biliary neoplasms. Among the patients with pancreatic cancer, the most common type of tumor was Adenocarcinoma, corresponding to approximately 77,14% of the cases. Hepatocellular carcinoma was the most common among the hepatic-biliary group.

**Table 1** – Histopathological report of tumors present in the group with neoplasms of pancreas, liver and gallbladder.

TUMOR LOCALIZATION	HISTOPATHOLOGICAL REPORT	N (%)
PANCREAS	ADENOCARCINOMA	27 (77,14%)
	INSULINOMA	3 (8,5%)
	NEUROENDOCRINE	2 (5,71%)
	NESIDIOBLASTOME	1 (2,8%)
	AMPULLARY CARCINOMA	1 (2,8%)
	GASTRINOMA	1 (2,8%)
LIVER AND BILIARY TRACT	HEPATOCELLULAR CARCINOMA	9 (60%)
	BILIARY TRACT ADENOCARCINOMA	3 (20%)
	CHOLANGIOCARCINOMA	2 (13,33%)
	PERIAMPULLARY	1 (6,66%)

The results of the ANA titles by group are shown in Table 2 where it is highlighted that: the percentage of negative cases was the majority in the Control group (92.5%) and this percentage was null in the Biliary liver group. Of the positive cases, the 1/80 titration had a percentage of 54.5% in the biliary liver group, 24.5% in the pancreas and 5.0% in the control group, 1/160 titration was 36.4% in the liver group biliary and varied from 2.5% to 5.7% in the other two groups and the titers 1/320 and 1/640 were null in the Control group and varied from 9.1% to 11.3% in the other two groups.

**Table 2** – ANA titles according to the control group and pancreatic and biliary liver neoplasms.

ANA	GRUPO						P VALUE
	PANCREAS		HEPATO-BILIARY		CONTROL		
	N	%	N	%	N	%	
0 (negative)	31	58,5	-	-	37	92,5	P <sup>(1)</sup> < 0,001*
1/80	13	24,5	12	54,5	2	5,0	
1/160	3	5,7	8	36,4	1	2,5	
1/320 e 1/640	6	11,3	2	9,1	-	-	
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>	<b>22</b>	<b>100,0</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>	

(\*) Significant difference at the level of 5.0%; <sup>(1)</sup> Fisher's exact test.

Table 3 shows the fluorescence patterns found according to the type of tumor. The frequency of positivity within each neoplasm was higher in the Hepatic and biliary tract group (100% of patients), and 26.6% in pancreatic tumors. In the pancreatic group 50% had a dense fine speckled nuclear pattern. For the group of Hepato-biliary neoplasms, the most prevalent pattern was the nuclear Coarse speckled (45,00%).

**Table 3** – Immunofluorescence patterns found in the group of control and pancreatic and hepatic biliary patients.

IMUNOFLUORESCENCE PATTERNS	PANCREATIC N=22/53	HEPATO-BILIARY N=22/22	CONTROL N=3/40
NUCLEAR FINE DENSE SPECKLED	11 (50%)	7 (31,81%)	1 (33,33%)
NUCLEAR COARSE SPECKLED		10 (45,00%)	2 (66,66%)
NUCLEAR HOMOGENEOUS (NH)	4 (18,18%)	1 (4,54%)	
NUCLEOLAR	2 (9,09%)		
CYTOPLASMATIC FINE DENSE SPECKLED	2 (9,09%)		
CITOPLASMATIC RETICULAR	2 (9,09%)	1 (4,54%)	
SMOOTH NUCLEAR ENVELOPE	1 (4,5%)		
INTERCELLULAR BRIDGE (PI)		3 (13,63%)	

Of the 47 samples with positivity in the FAN HeP-2, approximately 47% showed a Nuclear Dense Fine Speckled pattern (figura 7A), 11% Nuclear Homogeneous (figura 7B), 19%

Nuclear Coarse Speckled (figura 7C), and 6% Cytoplasmic reticular (Figura 7D). It is observed that the pancreatic neoplasm was the one that presented the greatest diversity of patterns for ANA. Hepato-biliary neoplasms, on the other hand, presented the Coarse speckled pattern as the most prevalent.

Figure 1 – Fluorescence patterns obtained by the ANA-HEp-2 technique: a) Nuclear Dense Fine Speckled b) Nuclear homogeneous c) Nuclear coarse speckled and d) Cytoplasmic reticular.

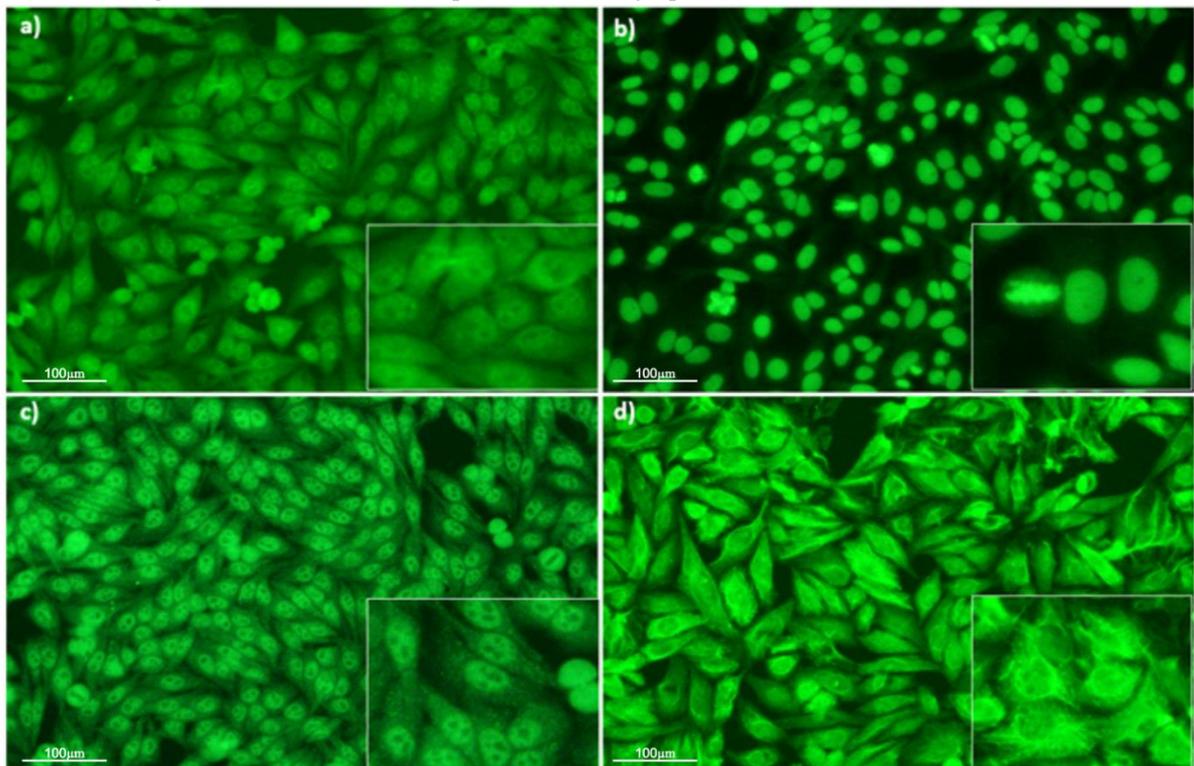
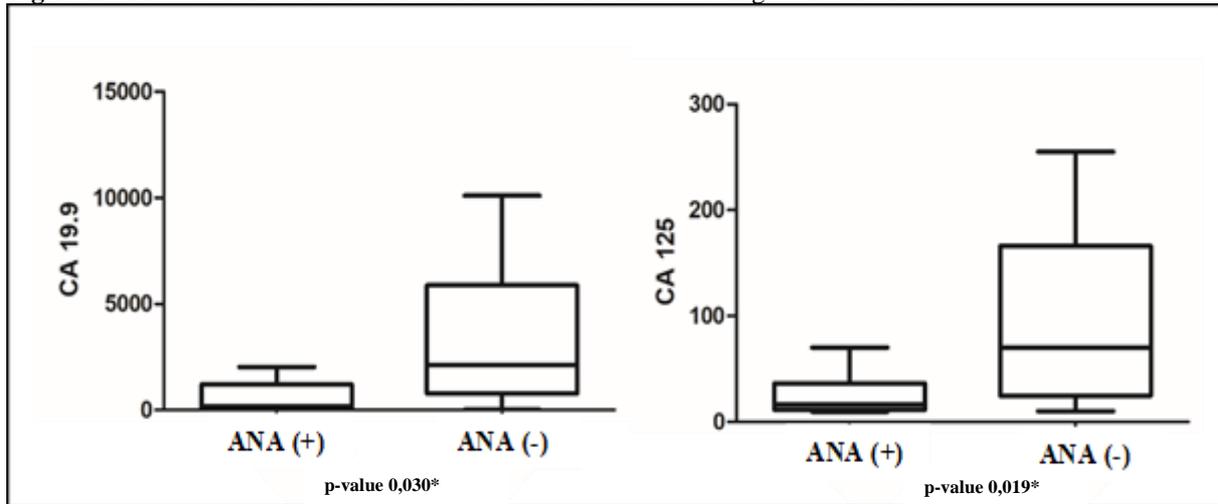


Figure 2 shows the association of CA 19.9 and CA 125 according to the positive ANA in patients with pancreatic cancer. The mean and median of the two variables were correspondingly higher when the ANA was negative. In the two variables, significant differences are proven.

**Figure 2** – Association of the markers CA 19.9 and CA 125 according to the ANA results.



\*Significant difference at the level of 5,0%

## DISCUSSION

Serum autoantibodies have been identified in patients with solid tumors, including breast, prostate, lung and in patients with hematological neoplasms [16, 18]. Some authors have pointed out these molecules as potential biomarkers, which may be detected even years before the neoplastic diagnosis is established [10, 19,20].

Our results showed that patients with cancer of the pancreas, liver and biliary tract had a higher prevalence of ANA positivity (58,66%) compared to the control group. In the healthy group, the positivity of autoantibodies was 7.5%, but it is already expected that some apparently healthy patients may come to present positive ANA-HEp2 in about 2% to 12% of cases [21, 22].

In a study carried out by Mohammed and colleagues, 35 newly diagnosed patients with breast cancer and 18 healthy women as a control group were evaluated using the ELISA. The results of this study showed that the ANA concentration was significantly higher in cancer patients compared to control subjects [23]. Another study by Nisihara and collaborators also evaluated the presence of autoantibodies in patients with breast cancer using indirect immunofluorescence technique was used just as in our research. The positivity for ANA in this case was 44.4% in patients with breast tumor and 5% in the control group [16]. These results

make us believe that these autoantibodies are involved in the process of carcinogenesis, since they are elevated in neoplastic patients. However, its role in the process is not well established in the literature. Authors like Zou and collaborators, hypothesize that ANA would have an antitumor activity, explained by the cytotoxicity mediated by antibody-dependent cells and by cytokines that improve the immune function induced by ANA immune complexes [24].

In our data, we observed that the frequency of positivity was higher in patients with biliary tumor and liver tumor (100%) compared to patients with pancreatic cancer (41.5%). It is already known that there is a panel of autoantibodies associated with several liver diseases such as autoimmune hepatitis or primary biliary cirrhosis, for example, which is demonstrated by some authors [25, 26]. The detection of these autoantibodies in diseases of the liver and gallbladder is of great importance, due to their connection with the response to treatment and the general prognosis [27]. Therefore, this high presence of antibodies in the hepatic-biliary group was already expected. This difference in positivity between groups can also be justified by the difference in the sample n between groups in our study.

Another point to be considered is the title of ANA-HEp-2. In general, autoimmune patients tend to have moderate (1/160 and 1/320) and high (1/640) titers, while healthy individuals with positive ANA-HEp-2 tend to have low titers (1/80) [21]. In our study, 19 patients in the neoplastic group, about 25%, had titers above 1/160. Only 1 patient in the control group had a 1/160 titer.

A survey conducted by Guyomard assessed through immunofluorescence and ELISA, the prevalence and patterns of antinuclear antibodies in patients with Non-Hodgkin's Lymphoma. In this case, 19% of cancer patients were positive for autoantibodies in titers considered moderate or high, that is, above 1/160 [14].

The IFI pattern reflects the topographic distribution of antigens recognized by autoantibodies in serum [21]. In our study, the most prevalent immunofluorescence pattern was

the dense fine speckled nuclear, followed by the Coarse speckled nuclear. In the study by Madrid and collaborators, previously mentioned, the IFI showed different patterns such as homogeneous nuclear, fine dense and nucleolar speckles. Although these patterns may be the same as those found in autoimmune diseases such as Lupus, the autoantibodies that were identified through ELISA, had a profile with different characteristics [15]. What in our study is a limitation, as we have not reached the stage of identifying correlated autoantibodies.

The coarse speckled nuclear pattern, which was more present among our patients with hepatic-biliary tumor, represents the distribution map of the proteins involved in the processing (splicing) of messenger RNA. The main proteins of the spliceosome are exactly those recognized by anti-Sm and anti-RNP antibodies. Clinically, anti-Sm antibodies are strongly associated with SLE, while anti-RNP antibodies are more frequently seen in mixed connective tissue disease (DMTC) and in the SLE [21, 28].

The fact that the presence of autoantibody is linked to RNA processing leads us to reflect on the possibility that these molecules could be involved, for example, in the mutation of genes that participate in splicing, consequently implicating tumor biology. In studies like Srebrow's, it is possible to see a list of genes involved in the spliceosome that when mutated are associated with cancer. One of them is the CDH17 gene, which is related to the appearance of hepatocellular carcinoma [29]. So, this gene and its related proteins could justify in our study the appearance of a coarse speckled nuclear pattern among patients in the Liver-Biliary group.

In our study, we were able to trace associations with ANA results and tumor markers CA19.9 and CA125, which were higher among patients with ANA negative. In this case, having a positive FAN would indicate a good prognosis. Corroborating with our hypothesis the study by Erkanli, showed that the presence of circulating ANA in patients with lung cancer and colon cancer was related to the improvement in the survival rate of patients, an explanation for this effect would be the antitumor activity of autoantibodies [30].

Additional studies are still needed to contribute to the use of FAN HeP-2 as a possible diagnostic or prognostic test, pointing out that this technique has advantages because it is a less invasive and inexpensive blood test compared to imaging tests. Many studies have associated the presence of neoplasms with the induction of autoimmunity, characterized by the generation of autoantibodies against autoantigens and the importance of these molecules as a biomarker. According to our results, autoantibodies were more prevalent in the serum of cancer patients, compared to the control group, but further studies on the nature and biological effects of these molecules are still needed to better understand the technique in this group of patients, the which will impact the understanding of the mechanisms of immunity in cancer as well as the diagnosis and prognosis of the disease.

**REFERENCES**

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. 2016;70(1):7-30. Doi: 10.3322/caac.21590.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(1):7-30. Doi: 10.3322/caac.21442.
- [3] World Health Organization, WHO. Cancer. Available on: <https://www.who.int/cancer/en/>. Access: 02 jul. 2019.
- [4] American Cancer Society. Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST). 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/gastrointestinal-stromal-tumor.html>. Acesso em: 02 maio 2020.
- [5] Fernandes J, Michel V, Camorlinga-Ponce M, Gomez A, Maldonado C, De Reuse H, Torres J, Touati E. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2014;23(11):2430-38. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0471.
- [6] Liu X, Pan B, Sun L, Chen X, Zeng K, Hu X, Xu T, Xu M, Wang S. Circulating exosomal mir-27a and mir-130a act as novel diagnostic and prognostic biomarkers of colorectal cancer. *American association for cancer research*. 2018;27(7):746-754. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0067.
- [7] Finn OJ. Cancer Immunology. *N Engl J Med*. 2008;358: 2704-15.
- [8] Miller JFAP, Sadelain M. The Journey from Discoveries in Fundamental Immunology to Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):439-49. Doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.007.

- [9] Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EKL, Tan EN. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(2):136-43.
- [10] Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, Thorpe A, Woolston C, Sahin U, Barnes A, Robertson J. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Annals Of Oncology.* 2007;18:868-873. Doi: 10.1093/annonc/mdm007.
- [11] Zaenker P, Ziman MR. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers – a review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013;22(12):2161-81. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0621.
- [12] Tan EM, Zhang J. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunological Reviews.* 2008;222:328-40. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00611.x.
- [13] Agustinelli RA, Rodrigues SH, Mariz HA, Prado MS, Andrade LEC. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEp-2 cells) in patients with non-autoimmune diseases. *Lupus.* 2019;28(5):629-634. doi:10.1177/0961203319838348
- [14] Guyomard S, Salles, Coudurier M, Rousset H, Coiffier B, Bienvenu J, Fabien N. Prevalence and pattern of antinuclear autoantibodies in 347 patients with non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology.* 2003;123(1):90-9. Doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04587. x.
- [15] Madrid FF, Maroun MC, Oliveiro OA, Long M, Stark A, Grossman LI, Binde W. Autoantibodies in breast cancer sera are not epiphenomena and may participate in carcinogenesis. *Bmc Cancer.* 2015;15;15:407. Doi: 10.1186/s12885-015-1385-8.

- [16] Nisihara R, Machoski MCC, Neppel A, Maestri CA, Messias-Reason I, Skare TL. Antinuclear antibodies in patients with breast cancer. *Clinical & Experimental Immunology*. 2018;193(2): 178–182. Doi: 10.1111/cei.13136.
- [17] Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA, Andrade LEC. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns (ICAP) 2015;20:6:412. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00412.
- [18] Sener AG, Tarhan EF. Serodetection of Antinuclear Antibodies (ANA) in Patients with Various Cancer Types. *Journal Of Medicine And Med. Res.* 2015;3 (3), p.15-20. Doi: 10.1016/j.rdc.2011.09.006.
- [19] Järås K.; Anderson K. Autoantibodies in cancer: prognostic biomarkers and immune activation. *Expert Review Of Proteomics*. 2011;8(5):577-89. Doi: 10.1586/epr.11.48.
- [20] Djureinovic D, Djureinovic D, Crnković TD, Hellström C, Holgersson G, Bergqvist M. Detection of autoantibodies against cancer-testis antigens in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2018;125:157-163.
- [21] Dellavance A, Andrade LEC. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(3)v. 43:157-168. Doi: 10.1590/S1676-24442007000300004

- [22] Mariz H, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibodypositive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):191-200. Doi: 10.1002/art.30084.
- [23] Mohammed ME, Abdelhafiz K. Autoantibodies in the sera of breast cancer patients: Antinuclear and anti-double stranded DNA antibodies as example. *J Can Res Ther.* 2015;11(2):341-4. Doi: 10.4103/0973-1482.157314.
- [24] ZOU HY, Gu, XW, Yu Z, Wang Z, Jiao M. Detection of serum antinuclear antibodies in lymphoma patients. *Genetics And Molecular Research.* 2015;14(4):16546-52. Doi: 10.4238/2015.December.11.1.
- [25] Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol.* 2008;14(21):3374-3387. doi:10.3748/wjg.14.3374.
- [26] Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2013;46:17-24. doi:10.1016/j.jaut.2013.08.001.
- [27] Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol.* 2004;41(4):677-683. Doi:10.1016/j.jhep.2004.08.002
- [28] Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity.* 2005;38(1):47-54. doi: 10.1080/08916930400022715.

[29] Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science*. 2006;119: 2635-2641. Doi: 10.1242/jcs.03053.

[30] Erkanli AL, Taylor DD, Dean D, Eksir F, Egger D, Geyer J, Nelson BH, Stone B, Fritsche HA, Roden RBS. Application of Bayesian Modeling of Autologous Antibody Responses against Ovarian Tumor-Associated Antigens to Cancer Detection. *Cancer Res*. 2006;66(3): 1792-1798. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0669.

## ANEXO A - PARECER DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

UFPE - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da pesquisa de autoanticorpo em células HeP-2 (FAN) como biomarcador para o diagnóstico precoce e desfecho em neoplasia do trato gastrointestinal.

**Pesquisador:** AMANDA REGUEIRA FERNANDES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 02082318.0.3001.8807

**Instituição Proponente:** EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSEERH

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.076.137

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa da aluna Amanda Regueira Fernandes, cuja finalidade é a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. Tem como orientador o Prof.Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo. O estudo visa realizar pesquisa de autoanticorpos em células

HEP-2(FAN) como biomarcador para o diagnóstico precoce e desfecho em neoplasia do trato gastrointestinal. Trata-se de um exame de rastreamento de autoanticorpos utilizado como suporte para o diagnóstico de doenças autoimunes sistêmicas e órgão-específica. Em tais doenças os autoanticorpos apresentam importância no diagnóstico, monitoramento e prognóstico, existindo a possibilidade de que as neoplasias tenham comportamento semelhante, no entanto, poucos estudos foram realizados para essa avaliação.

O estudo é de corte transversal, analítico e observacional, a ser realizado no serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da UFPE no período de fevereiro de 2019 a novembro de 2019. A amostra será de conveniência e os voluntários recrutados no ambulatório de oncologia, cirurgia oncológica e gastroenterologia. Serão formados dois grupos: um de oncologia, constituído pelos que preencherem os critérios de inclusão e outro de controle, formado pelo mesmo número de pacientes, porém sem neoplasia, os quais serão pareados por sexo e idade. É estimada a inclusão de 200 voluntários maiores de 18 anos.

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** ospfcufpe@gmail.com



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da pesquisa de autoanticorpo em células HeP-2 (FAN) como biomarcador para o diagnóstico precoce e desfecho em neoplasia do trato gastrointestinal.

**Pesquisador:** AMANDA REGUEIRA FERNANDES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 02082318.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.060.883

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa da aluna Amanda Regueira Fernandes, cuja finalidade é a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. Tem como orientador o Prof.Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo. O estudo visa realizar pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2(FAN) como biomarcador para o diagnóstico precoce e desfecho em neoplasia do trato gastrointestinal. Trata-se de um exame de rastreamento de autoanticorpos utilizado como suporte para o diagnóstico de doenças autoimunes sistêmicas e órgão-específica. Em tais doenças os autoanticorpos apresentam importância no diagnóstico, monitoramento e prognóstico, existindo a possibilidade de que as neoplasias tenham comportamento semelhante, no entanto, poucos estudos foram realizados para essa avaliação.

O estudo é de corte transversal, analítico e observacional, a ser realizado no serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da UFPE no período de fevereiro de 2019 a novembro de 2019. A amostra será de conveniência e os voluntários recrutados no ambulatório de oncologia, cirurgia oncológica e gastroenterologia. Serão formados dois grupos: um de oncologia, constituído pelos que preencherem os critérios de inclusão e outro de controle, formado pelo mesmo número de pacientes, porém sem neoplasia, os quais serão pareados por sexo e idade. É estimada a inclusão de 200 voluntários maiores de 18 anos. Os voluntários serão submetidos a punção venosa para coleta de 15 mL de sangue para pesquisa

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE  
 NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA SUELY GALDINO - NUPIT-SG  
 LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS (LINAT)



(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULA HEP-2 (FAN) COMO BIOMARCADOR PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE E DESFECHO EM NEOPLASIA DO TRATO GASTROINTESTINAL), que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) (Amanda Regueira Fernandes, do Laboratório de Imunomodulação e novas abordagens terapêuticas, situado na Universidade Federal de Pernambuco. Telefones para contato: (81) 998545060 ou (81) 986384899 e no e-mail: [amanddar@hotmail.com](mailto:amanddar@hotmail.com). Endereço: Rua Maestro Nelson Ferreira, 61, Rio Doce, Olinda, PE. CEP: 53.150-160.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: (Lucas Gabriel Sousa Santos e Raquel Claudiano da Silva Telefones para contato: (81) 99619-0418 e 98710-1234 e está sob a orientação de: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo Telefone: (81) 99794-3799, e-mail [Moacyr.rego@gmail.com](mailto:Moacyr.rego@gmail.com).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A Pesquisa tem como objetivo avaliar a positividade do FAN HEP-2 em pacientes com diagnóstico de neoplasias do trato gastrointestinal (TGI), descrever os padrões e títulos de imunofluorescência com os tipos de neoplasias do TGI, avaliar a relação entre a positividade do FAN HEP-2 e o estadiamento das neoplasias do TGI e determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do FAN HEP-2 nas neoplasias do TGI.

Ao aceitar participar da pesquisa o paciente será submetido a um questionário clínico com perguntas de fácil entendimento, e complementado com as informações extraídas do prontuário médico. Em seguida será coletado amostra de sangue para a pesquisa do FAN HEP-2, hemograma, bioquímica, provas de atividade inflamatória e marcadores tumorais. A punção para a coleta de sangue (15 mL o que corresponde a uma colher de sopa) em veia de antebraço com a agulha e seringas estéreis (Procedimento igual ao que é realizado para a coleta de exames de rotina). Será realizada por um profissional experiente, minimizando assim o número de tentativas para a coleta e complicações como hematoma (área arroxeadada na pele) no local, que desaparece totalmente após alguns dias sem necessidade de tratamento.

Durante o estudo você continuará em seguimento normal no ambulatório de Oncologia dos Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE) e o senhor (a) terá plena liberdade de recusar a participar ou retirar o seu consentimento em quaisquer fases da pesquisa, sem qualquer forma de penalização ou prejuízo ao seu tratamento no HC-PE.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

\_\_\_\_\_  
(assinatura do pesquisador)

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULA HEP-2 (FAN) COMO BIOMARCADOR PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE E DESFECHO EM NEOPLASIA DO TRATO GASTROINTESTINAL”** como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.** (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

Impressão  
digital  
(opcional)