



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

SAMUEL SILVA FERREIRA

**EXPRESSÃO DE DLL3 E ASCL1 E SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS NO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO
PULMÃO**

FORTALEZA

2024

SAMUEL SILVA FERREIRA

EXPRESSÃO DE DLL3 E ASCL1 E SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS NO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Patologia Torácica, Oncologia.

Data de aprovação: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Universidade Federal do Ceará

Dra. Ellen Caroline Toledo do Nascimento
Universidade de São Paulo

Dr. André Costa Teixeira
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S583e Silva Ferreira, Samuel.

Expressão de DLL3 e ASCL1 e sua relação com aspectos clínico-patológicos no Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão / Samuel Silva Ferreira. – 2024.
123 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora.

1. Câncer de Pulmão. 2. Carcinoma de Pequenas Células. 3. Patologia Pulmonar. 4. DLL3.
5. ASCL1. I. Título.

CDD 571.9

“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas qualidades.” (J.K.Rowling)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora**, por ter me concedido a oportunidade e me auxiliado durante o processo de desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ainda pelo apoio e acompanhamento durante minha jornada de formação como Pós-Graduando, me inspirando e contribuindo com valiosos ensinamentos em Patologia. Agradeço por sempre me desafiar e incentivar a buscar a excelência através das ricas discussões e *insights* científicos. Tenho uma profunda admiração pelo senhor como profissional e pesquisador.

À **Dra. Juliana Cordeiro de Sousa** que foi imprescindível para que este trabalho fosse concluído com êxito, trazendo conhecimentos excepcionais em Patologia Molecular, Fisiopatologia e Estatística que foram fundamentais nas análises desta pesquisa. Agradeço ainda pela sua importante contribuição em minha vida acadêmica e profissional, ao me dar a oportunidade de conhecer o Dr. Fábio Távora e acompanhar meu desenvolvimento, sempre estando presente e me ajudando.

À todos amigos e colegas do grupo de pesquisa situado no Laboratório Argos Patologia, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Távora e Dra. Juliana Cordeiro de Sousa. Agradeço especialmente à **Taynara Xavier** que me ensinou com grande expertise a realização da técnica de imunoistoquímica. À **Laura Cardoso** que esteve presente em todas as etapas da realização deste trabalho, me auxiliando na realização das validações e técnicas em bancada. Ao **Guilherme Velozo** que me auxiliou no escaneamento de lâminas e me ensinou de forma formidável a utilizar o software *QuPath* para as análises das lâminas digitais.

Ao **Laboratório Argos Patologia** por abrir as portas para minha formação e meu desempenho como aprendiz em Patologia, me dando a oportunidade de agregar todos os conhecimentos fundamentais adquiridos nas análises e discussões deste trabalho. Agradeço em especial à **Daniella Martins** pela oportunidade de desenvolver este trabalho junto ao Laboratório Argos e a todos os colaboradores dessa instituição que contribuíram com minha formação e meu desenvolvimento científico.

Aos meus amigos e familiares por todo o suporte que recebi durante minha caminhada acadêmica. Em especial ao **Vinicius Curti** por todos os momentos de descontração e o apoio recebido.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

O carcinoma de pequenas células do pulmão(CPCP) é um subtipo de câncer caracterizado pela presença de células pequenas com fenótipo neuroendócrino. É responsável por 15% dos tumores de pulmão e torna-se uma doença muito desafiadora devido às limitações terapêuticas e ao prognóstico ruim com um curto tempo de sobrevida. Nos últimos anos, foi identificada a atividade da proteína *achate scute homologue 1* (ASCL1) como reguladora neuroendócrina associada à progressão do CPCP. Também foi observada a atividade da proteína *Delta Like Ligand 3* (DLL3) como reguladora da proteína Notch, a qual possui um papel supressor tumoral. Foram então desenvolvidos estudos clínicos com inibidores farmacológicos que possuem como alvo o DLL3, levando em 2024 à aprovação do Tarlatamab, que possui como alvo o DLL3 e os linfócitos CD3. O presente trabalho buscou avaliar a expressão do DLL3 e ASCL1 e correlaciona-la com as demais proteínas neuroendócrinas do CPCP, assim como a sobrevida. Foi realizado um estudo retrospectivo de coorte transversal com 84 casos diagnosticados com CPCP em Fortaleza-CE. A partir dos blocos de parafinas dos pacientes incluídos no estudo, foi realizada imunoistoquímica (IHQ) para DLL3, ASCL1, TTF1 e KI67. As lâminas foram escaneadas e avaliadas no software QuPath. A partir dos resultados e dos dados clínico-patológicos obtidos foram realizadas análises estatísticas de associação com o teste T de Student, de correlação com o teste de Pearson, avaliação de sobrevida por Log-rank e análise multivariada com regressão logística de COX. No estudo, foi identificada associação entre as proteínas TTF1 com DLL3 e o ASCL1 indicando que os paciente com maior positividade paras TTF1 possuíram mais expressão de DLL3 e ASCL1. Foi verificada ainda correlação estatística entre o TTF1 e o DLL3 e relação do ASCL1 com a sobrevida, tendo os casos negativos para ASCL1 menor sobrevida. O presente estudo trata-se de um estudo pioneiro na avaliação do DLL3 e do ASCL1 na região, e a alta positividade dessas proteínas indica uma nova possibilidade terapêutica para os pacientes do Ceará além de gerar uma nova perspectiva acerca do complexo mecanismo carcinogênico do CPCP.

Palavras-chaves: Câncer de Pulmão; Carcinoma de Pequenas Células; Patologia Pulmonar; DLL3; ASCL1; Terapia Alvo.

ABSTRACT

Small cell lung carcinoma (SCLC) is a cancer subtype characterized by the presence of small cells with a neuroendocrine phenotype. It accounts for 15% of lung tumors and becomes a very challenging disease due to therapeutic limitations and poor prognosis with a short survival time. In recent years, the activity of the protein acetate scute homologue 1 (ASCL1) has been identified as a neuroendocrine regulator associated with the progression of SCLC. The activity of the protein Delta Like Ligand 3 (DLL3) has also been observed as a regulator of the Notch protein, which has a tumor suppressor role. Clinical studies were then developed with pharmacological inhibitors that target DLL3, leading in 2024 to the approval of Tarlatamab, which targets DLL3 and CD3 lymphocytes. The present study sought to evaluate the expression of DLL3 and ASCL1 and correlate with other neuroendocrine proteins of SCLC, as well as survival. A retrospective cross-sectional cohort study was conducted with 84 cases diagnosed with SCLC in Fortaleza-CE. Immunohistochemistry (IHC) for DLL3, ASCL1, TTF1 and KI67 was performed on the paraffin blocks of the patients included in the study. The slides were scanned and evaluated using QuPath software. Statistical analyses of association with Student's t-test, correlation with Pearson's test, survival assessment by log-rank and multivariate analysis with COX logistic regression were performed based on the results and clinical-pathological data obtained. In the study, an association was identified between TTF1 proteins with DLL3 and ASCL1, indicating that patients with higher positivity for TTF1 had higher expression of DLL3 and ASCL1. A statistical correlation was also observed between TTF1 and DLL3 and the relationship between ASCL1 and survival, with cases negative for ASCL1 having lower survival. The present study is a pioneering study in the evaluation of DLL3 and ASCL1 in the region, and the high positivity of these proteins indicates a new therapeutic possibility for patients in Ceará, in addition to generating a new perspective on the complex carcinogenic mechanism of SCLC.

Keywords: Lung Cancer; Small Cell Lung Carcinoma; Pulmonary Pathology; DLL3; ASCL1; Target Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Mortes por câncer de pulmão em 2020 em ambos os sexos.....	13
Figura 02 – Subtipos histológicos dos carcinomas pulmonares.....	13
Figura 03 – Lâminas de HE de CPCP.....	18
Figura 04 – Imunocomplexos formados por reação de IHQ.....	19
Figura 05 – Coloração de HE, CD56, SyP e CgA em células de CPCP.....	21
Figura 06 – CPCP em estágio limitado, infiltrando somente um lobo do pulmão e um linfonodo, e estágio avançado infiltrando diferentes lobos e podendo sofrer metástases.....	23
Figura 07 – Mecanismo de sinalização celular da via Notch-ASCL1-DLL3 em células normais e em células tumorais.....	26
Figura 08 – Expressão de ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 e CgA demonstrando subgrupos distintos de CPCP.....	28
Figura 09 – Diferentes métodos de tratamento do CPCP baseados em biomarcadores alvos como o DLL3 e a imunoterapia como o uso de anti-PD1/PDL1.....	32
Figura 10 – Expressão de DLL3 por IHQ e detecção de células positivas no QuPath.....	45
Figura 11 – Expressão de DLL3, TTF1, ASCL1 e KI67 em casos de CPCP.....	48
Figura 12 – Relação entre a expressão de DLL3 versus imunoexpressão de TTF1 e ASCL1 nos casos avaliados.....	49
Figura 13 – Expressão de TTF1 em relação a idade e a expressão de ASCL1.....	50
Figura 14 – Expressão de ASCL1 em relação ao sexo e ao status de SyP.....	52
Figura 15 – Função de sobrevida em relação aos grupos de idade.....	56
Figura 16 – Função de sobrevivência em relação ao sexo dos pacientes.....	57
Figura 17 – Função de sobrevivência em relação ao KI67.....	58
Figura 18 – Expressão de TTF1 qualitativa (positivo e negativo) em relação a função de sobrevivência.....	59
Figura 19 – Expressão de TTF1 quantitativa em relação a sobrevida.....	59
Figura 20 – Expressão de TTF1 por HS em relação a função de sobrevida.....	60
Figura 21 – Expressão de DLL3 qualitativa (positivo e negativo) em relação a função de sobrevida.....	61

Figura 22 – Expressão de DLL3 quantitativa (%) em relação a sobrevida.....	61
Figura 23 – Expressão de DLL3 por HS em relação a sobrevida.....	62
Figura 24 – Expressão de ASCL1 qualitativa e impacto na sobrevida em relação ao tempo do diagnóstico	63
Figura 25 – Expressão de ASCL1 em HS e impacto na sobrevida em relação ao tempo de diagnóstico.....	63
Figura resumo do estudo.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínico-patológicas dos pacientes.....	41
Tabela 2 – Expressão de CgA, SyP, CD56 e KI67.....	42
Tabela 3 – Expressão de DLL3, TTF1 e ASCL1.....	44
Tabela 4 – Caracterização dos pacientes com CPCP de acordo com a expressão qualitativa de TTF1.....	51
Tabela 5 – Relação entre TTF1, DLL3 e ASCL1 com as variáveis clínico-patológicas.....	53
Tabela 6 – Correlação de Pearson entre expressão de KI67, TTF1, DLL3 e ASCL1.....	55
Tabela 7 – Regressão de Cox para a expressão de TTF1 e DLL3.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCL1	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
C-CPCP células	Carcinoma de pequenas células combinado com não pequenas células
Cromogranina A	CgA
CNPCP	Carcinoma de não pequenas células do pulmão
CPCP	Carcinoma de pequenas células do pulmão
CTLA-4	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
DAB	Diaminobenzidina
DLL3	<i>Delta-like ligand 3</i>
EGFR	Fator de Crescimento Epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HS	<i>H-Score</i>
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NCAM	Molécula adesora de células neuronais
NE	Neuroendócrino
NICD	Domínio intracelular do Notch
NNK	Nitrosaminoacetona
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
SOE	Sem outras especificações
Sinaptofisina	SyP
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	<i>Tumor mutation burden</i>

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
1.1	Epidemiologia do Câncer de Pulmão.....	12
1.2	Visão geral do carcinoma de pequenas células de pulmão.....	14
1.3	Etiologia.....	15
1.4	Histologia.....	17
1.5	Imunoistoquímica.....	19
1.6	Estadiamento patológico.....	21
1.7	Mecanismos do receptor Notch e relação com ASCL1 no CPCP.....	23
1.8	DLL3.....	24
1.9	Novas classificações do CPCP.....	27
1.10	Terapias emergentes.....	29
2.	Justificativa.....	33
3.	Objetivos.....	34
3.1	Objetivo geral.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4.	Materiais e métodos.....	35
4.1	Pacientes.....	35
4.1.1	Crítérios de inclusão.....	35
4.1.2	Crítérios de exclusão.....	35
4.2	Imunoistoquímica.....	36
4.3	Patologia digital.....	38
4.4	Crítérios de escores par análise de IH1.....	39
4.5	Análise estatística.....	40
5.	Resultados.....	41
5.1	Caracterização epidemiológica.....	41
5.2	Caracterização imunoistoquímica.....	42
5.2.1	Expressão de marcadores neuroendócrinos.....	42
5.2.2	Expressão de TTF1, DLL3 e ASCL1.....	43
5.2.3	Relação entre as variáveis clínicas com imunoexpressão de proteínas neuroendócrinas, DLL3, TTF1 e KI67.....	46
5.2.4	Variáveis clínicas.....	46

5.2.5	Marcadores neuroendócrinos.....	47
5.2.6	DLL3.....	47
5.2.7	TTF1.....	49
5.2.8	ASCL1.....	51
5.3	Correlação da imunoexpressão de TTF1, DLL3 e ASCL1.....	54
5.4	Sobrevida global.....	56
5.4.1	Idade.....	57
5.4.2	Sexo.....	57
5.4.3	Expressão de KI67.....	57
5.4.4	Expressão de TTF1.....	58
5.4.5	Expressão de DLL3.....	60
5.4.6	Expressão de ASCL1.....	62
5.5	Regressão de Cox - análise multivariada.....	64
6.	Discussão.....	65
6.1	Variáveis epidemiológicas.....	65
6.2	Expressão dos biomarcadores por IHQ.....	66
6.3	Relação entre as proteínas TTF1, DLL3 e ASCL1.....	68
6.4	Aspectos prognósticos relacionados às proteínas estudadas.....	71
6.5	Limitações do estudo.....	72
7.	Considerações finais.....	73
8.	Conclusão.....	75
9.	Referências.....	77
	ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO.....	82
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	115

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Epidemiologia do Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é uma das neoplasias mais frequentes e mais associadas à morte no adulto. É a neoplasia mais incidente em homens e a terceira em mulheres e é o primeiro em mortalidade em homens e o segundo em mulheres sendo responsável por aproximadamente um quarto de mortes associadas a câncer em todo o mundo. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a doença foi responsável por 28.618 mortes no Brasil em 2020. Em 2023, a incidência foi de 18.020 novos casos em homens e 14.540 novos casos em mulheres. Já de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incidência foi de 1.8 milhões de mortes no mundo em 2020 (Figura 01) (BRASIL, 2022; WHO, 2023).

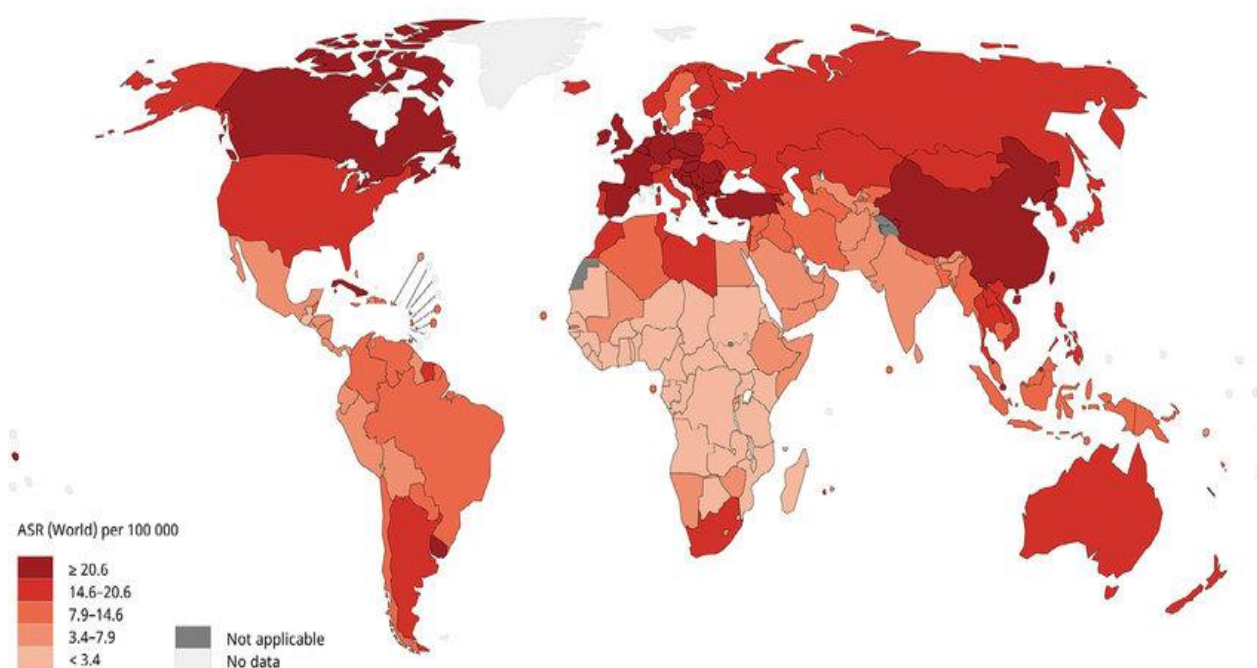


Figura 01: Mortes por câncer de pulmão em 2020 em ambos os sexos.

Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2020.

O câncer de pulmão possui como principal fator de risco o tabagismo e desde os anos 80 foi observada uma redução no número de casos desse tipo de câncer. A

redução da incidência reflete o declínio no consumo do tabaco, o que esteve fortemente associado a campanhas de órgãos governamentais de saúde em todo o mundo. Entre 2006 e 2018, no Brasil, houve uma redução média de 44% do consumo do tabaco, e entre 2011 e 2015 foi observada uma diminuição de 3.8% de casos de câncer de pulmão ao ano entre mulheres e 2.3% em homens refletindo a redução do consumo de tabaco (BRASIL, 2019; BRASIL, 2022).

No triênio de 2023-2025, é estimada a ocorrência de 32.560 novos casos de câncer de pulmão no Brasil, sendo responsável pela taxa de 6.7% de acometimentos de câncer e sendo o 4º mais frequente entre homens e mulheres, ficando atrás do câncer de mama em mulheres, próstata em homens e tumores colorretais em ambos os sexos. Em números absolutos, a região com mais acometimento é a região sudeste (13.960), seguida pela região sul (8.060), nordeste (6.570), centro-oeste (2.440) e norte (1.530) (BRASIL, 2022).

O câncer de pulmão pode ser dividido histologicamente em dois grandes subtipos: carcinoma de não pequenas células (CNPCP) e carcinoma de pequenas células (CPCP) (Figura 02). O CNPCP é responsável por 85% dos casos de câncer de pulmão e o CPCP é responsável por aproximadamente 15% dos casos. O CPCP é mais frequente em pessoas do sexo masculino e é mais frequente entre pessoas com idade entre 60-80 anos. Esse tumor possui entre os pacientes diagnosticados uma sobrevida média de 7 meses (Basumalik, 2023).

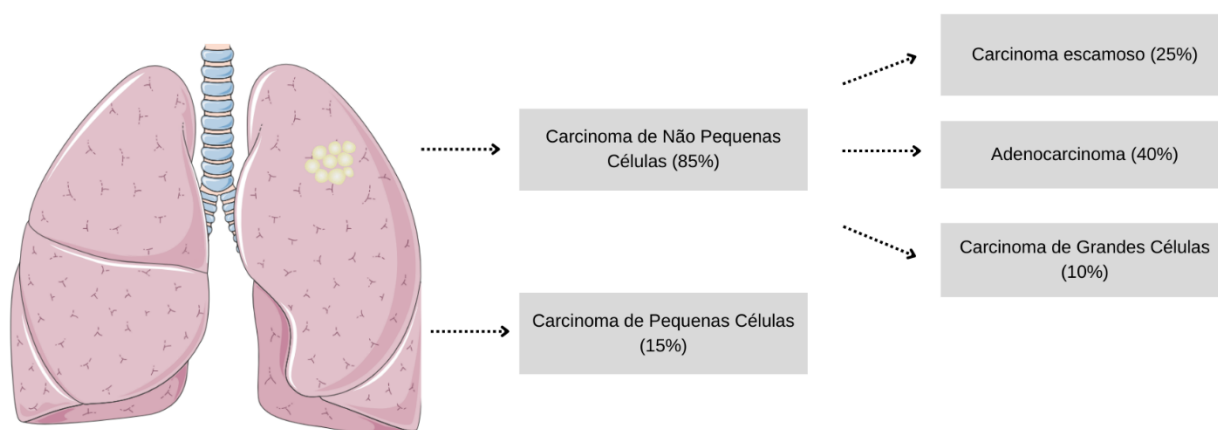


Figura 02: subtipos histológicos dos carcinomas pulmonares.

Fonte: autor próprio.

1.2 Visão geral do carcinoma de pequenas células de pulmão

O CPCP é um tumor caracterizado pela proliferação de células pequenas, e com fenótipo neuroendócrino. Morfologicamente, as células são de formato redondo ou fusiforme, com citoplasma escasso e cromatina finamente granular. É possível observar comumente a presença de necrose tumoral e alta taxa de mitoses por mm². O padrão de crescimento histológico é frequentemente difuso. Entretanto, as células podem se organizar em arquitetura de paliçada, fitas, e aninhados organoides ou rosetas (TRAVIS, 2009).

À imunohistoquímica (IHQ), o CPCP é caracterizado pelo alto índice de proliferação, avaliado pela proteína KI67 com expressão geralmente maior que 50%, e possui positividade para diferentes marcadores neuroendócrinos como CD56, CgA, SyP e INSM1. O TTF1 é expresso em 60 a 90% dos casos e, frequentemente, pode ocorrer positividade para BCL2, c-KIT/CD117 e p16. Há negatividade para RB, Napsina A, podendo ser útil na diferenciação de CPCP e carcinomas não pequenas células. A utilização de um painel robusto de IHQ permite o diagnóstico diferencial do CPCP e ainda permite distinguir em carcinoma de baixo/alto grau com a avaliação do KI67 (THUNISSEN, 2017).

O estadiamento do CPCP frequentemente acontece em dois estágios conforme a classificação do *Veterans' Administration Lung Study Group* (VALSG) e da Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão (IALTS) e classifica a doença em estágio limitado (LS) e estágio avançado (ES). O LS-CPCP fica confinado a um hemitórax do pulmão, podendo possuir extensão local, sem metástase extratorácica, porém podendo abranger metástase em linfonodos mediastinais ou supraclaviculares contralaterais. Na classificação do VALSG, para ser classificado como LS-CPCP, o tumor primário e os linfonodos regionais devem ser abrangidos por uma porta de radiação. Já o ES-CPCP é definido como a doença que não possui característica de doença limitada, havendo metástases extratorácicas (Micke et al., 2002).

É observado que, na prática clínica, ambos os critérios são utilizados para a definição do estadiamento, utilizando o envolvimento de linfonodos mediastinais contralaterais ou supraclaviculares ipsilaterais como LS-CPCP. Anteriormente, o tratamento padrão de primeira linha era somente a quimioterapia isolada, tipicamente

com um agente à base de platina (cisplatina ou carboplatina) combinado com etoposídeo (Wang et al., 2019). Recentemente, a adição de imunoterapia, especificamente atezolizumabe ou durvalumabe, ao regime de platina-etoposídeo tornou-se padrão com base na melhora dos resultados de sobrevivência.

As diretrizes da NCCN (National Comprehensive Cancer Network) endossam esses regimes de combinação como opções preferenciais para ES-SCLC (Ganti et al., 2021). No cenário de segunda linha, topotecano é o único agente aprovado pelo FDA para pacientes que apresentam progressão ou recidiva após a terapia inicial. Outros agentes, como irinotecano, paclitaxel e amrubicina (no Japão), também são utilizados com base no julgamento clínico e em fatores específicos do paciente (Ganti et al., 2021).

Em resumo, o tratamento sistêmico padrão para SCLC envolve um regime de quimioterapia à base de platina, com radioterapia torácica concomitante e PCI (profilaxia craniana) para doença em estágio limitado, e a adição de imunoterapia para doença em estágio extensivo. Essas recomendações são apoiadas pelas diretrizes da NCCN e da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) (Rudin et al., 2015; Ganti et al., 2021).

1.3 Etiologia

O CPCP é o subtipo histológico de câncer de pulmão que está mais intimamente ligado a exposição ao tabagismo, sendo raros os casos de não-fumantes acometidos. Além do tabagismo, como fator exógeno ligado a carcinogênese, existem outros que podem estar relacionados com o desenvolvimento do CPCP como a exposição a amianto e radônio entre outras substâncias carcinogênicas que podem induzir lesões aos ácidos nucleicos (Basumallik, 2023).

Os carcinogênicos presentes no cigarro são compostos capazes de ativar diversas vias celulares associadas ao crescimento celular, proliferação e migração. Dentre esses compostos é possível citar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, nitrosaminoacetona (NNK) derivada de nicotina, cloreto de vinila e arsênico (Basumallik, 2023).

As NNKs são substâncias semelhantes aos agonistas beta adrenérgicos, e são capazes de ativar esses receptores presentes no epitélio pulmonar. A ativação desses

receptores, acoplados à proteína G, induz uma cascata de sinalização celular que gera a atividade da adenilato ciclase e AMP cíclico oriundo do ATP, que conseqüentemente irá ativar a proteína quinase A, que irá ativar a fosfolipase A2, e como consequência haverá liberação aumentada de ácido araquidônico, o qual irá aumentar a síntese DNA em um processo de transdução dependente de ácido araquidônico. A proteína quinase A pode fosforilar ainda a proteína CREB que irá induzir a ativação de diversos genes associados ao ciclo celular e à apoptose como as ciclinas, o BCL2 e o BCL-XL. A atividade do AMP cíclico após a ativação dos receptores beta adrenérgicos, pode ainda levar a transativação do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) (HECHT, 1998; HECHT, 2002).

A nicotina ainda pode se ligar a regiões dos receptores nicotínicos de acetilcolina, atuando como um agonista, levando a ativação de vias de sinalização celular que irão gerar a ativação de fatores de crescimento. A ligação da nicotina ou da NNK à região alfa 7 dos receptores nicotínicos de acetilcolina, gera o aumento de influxo de Ca^{2+} nas células de CPCP, o qual induz a ativação da via de transdução de sinal mitogênico e a conseqüente proliferação neuroendócrina. O aumento do influxo de Ca^{2+} , pode ainda induzir a ativação da proteína quinase C, o qual irá gerar ativação de RAF-1 e MAPK, que irá levar a síntese de DNA e a proliferação de células neuroendócrinas (HECHT, 2002; GE, 2015). Essas diferentes vias, em conjunto com a lesão ao DNA associada a exposição fumo irá induzir a proliferação celular e ativação de diferentes genes associados à fisiopatologia (GE, 2015).

1.4 Histologia

À microscopia, o CPCP é caracterizado por uma massa de células pequenas, de formato arredondado ou fusiforme, com citoplasma escasso, cromatina granulada e nucléolo imperceptível ou ausente (Figura 03). É possível observar frequentemente “crushing” celular, onde as células ficam com aspectos esmagados, e ainda moldagem nuclear (Figura 03).

É possível identificar uma alta taxa mitótica, com aproximadamente 40 mitoses por mm^2 de área, que pode ser confirmada por IHQ com positividade acima de 50% para o marcador KI67 (índice de proliferação celular). As células podem organizar-se

de forma difusa, paliçada, fitas, rosetas, túbulos ou ninchos organoides. A presença de necrose intratumoral também é frequentemente observada (Travis, 2012).

Uma característica identificada por Azzopardi et al. em 1959, e posteriormente denominado efeito azzopardi, é a presença do incrustamento de vasos por debris celulares e restos de DNA provenientes das células que sofreram necrose nos vasos sanguíneos.

O CPCP pode-se ainda comportar-se como um tumor combinado com CNPCP, denominado C-CPCP, onde este terá pelo menos 10% de células, sejam escamosas ou adenocarcinomas, e relatado como um tumor também de progressão mais rápida. Morimoto et al. reportou em 2022 um caso de C-CPCP, onde um paciente do sexo masculino apresentou-se ao pronto socorro com dificuldades respiratórias, nos exames de imagem e na biópsia foi identificado inicialmente a presença do CPCP com presença também de um tumor de células fusiformes.

O paciente agravou rapidamente e veio a óbito no 31º dia, e na autópsia, foi identificada a presença de um tumor no pulmão composto por 60% de células de CPCP, 30% de células fusiformes e 10% de células de adenocarcinoma, confirmando o diagnóstico de C-CPCP (Morimoto et al., 2022).

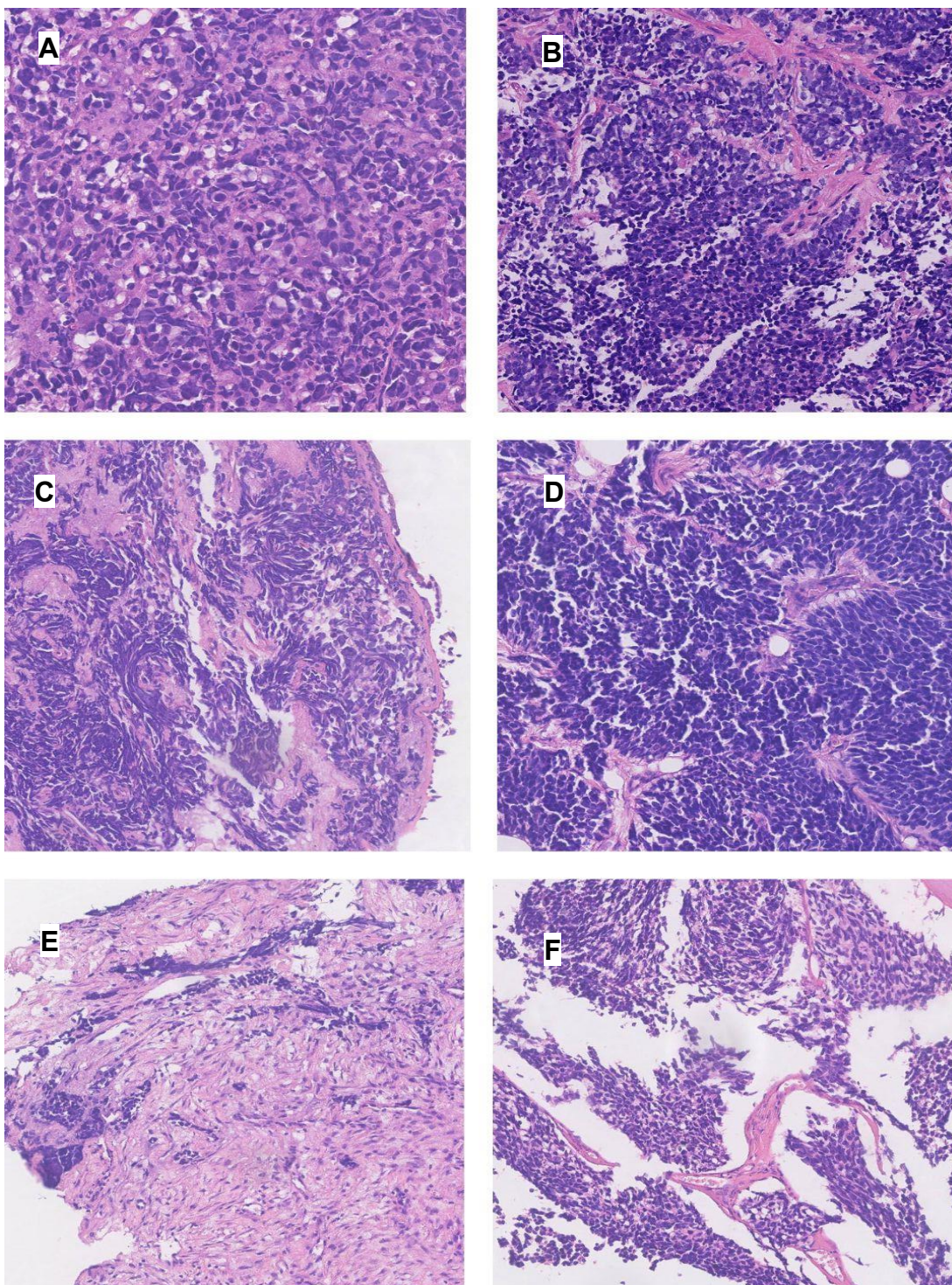


Figura 03. Lâminas de HE de CPCP.

Figuras de A-F demonstram estrutura tecidual do CPCP em lâmina obtida através de corte histológico e coloração de HE. Histologicamente, é possível observar células de pequeno porte de formato arredondado/fusiformes em organização difusa em tecido pulmonar.

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.5 Imunoistoquímica

A IHQ é uma técnica amplamente utilizada nos laboratórios de pesquisa e diagnóstico como uma ferramenta complementar às análises histopatológicas para a compreensão de diversas patologias. Essa técnica baseia-se na identificação de antígenos, e ligam-se a anticorpos específicos, formando uma estrutura denominada imunocomplexo (Figura 04). Essa ligação acontece na membrana, núcleo ou citoplasma, permitindo assim a visualização da expressão da proteína no tecido *in situ*. Essa ligação é marcada com um conjunto de reagentes de detecção e um cromógeno, geralmente esse sendo diaminobenzidina (DAB) (IDIKIO, 2009).

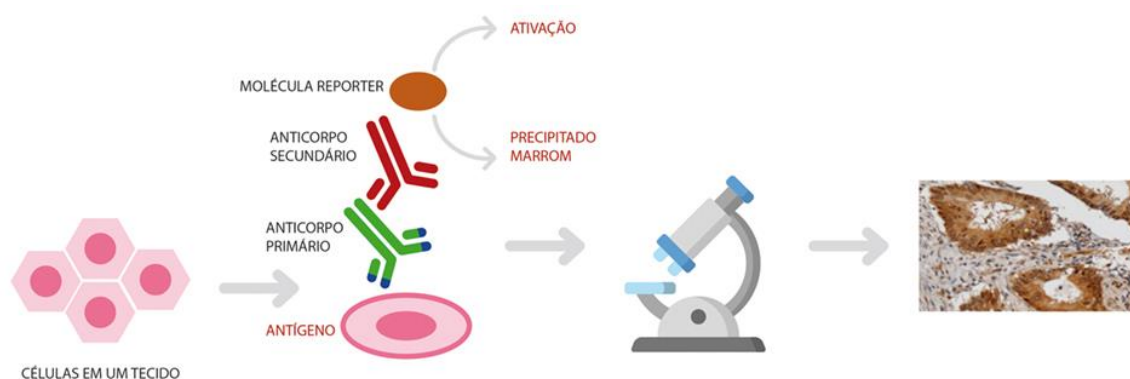


Figura 04: Imunocomplexo formado pelo antígeno alvo, um anticorpo primário, anticorpo secundário ligado a um HRP, e molécula repórter (DAB).

Fonte: Argos Patologia, [s.d.].

A visualização da marcação da proteína ao microscópio permite assim identificar a sua positividade. Com o advento da Patologia Digital, o uso de lâminas digitais e Softwares com Inteligência Artificial, permite a análise de IHQ através da detecção de células positivas e algoritmos específicos permite a análise profunda de características morfológicas e histológicas da IHQ.

No campo de diagnóstico, a IHQ permite a definição de sítio primário, a classificação de doenças, a avaliação do grau de determinadas neoplasias, o prognóstico e também a identificação de alvos elegíveis a terapias oncológicas específicas (IDIKIO, 2009).

No diagnóstico do CPCP, a IHQ é utilizada para confirmação do tipo de tumor, complementar ao exame histopatológico. Em casos de CPCP, é possível identificar a

presença de marcadores neuroendócrinos como a Sinaptofisina (SyP), Cromogranina A (CgA), CD56 e INSM1, uma expressão alta de KI67, e a positividade de TTF1 (Figura 05) (WALLACE, 2019).

A CgA, SyP, CD56 e INSM1 são estudados no diagnóstico do CPCP e são fundamentais para a caracterização do fenótipo celular. Esses marcadores estão associados com mecanismos de regulação sináptica de células neuroendócrinas normais, e são amplamente expressos em tumores neuroendócrinos também.

Estudos apontam, que devido à heterogeneidade do CPCP, este pode sofrer alterações na expressão de marcadores neuroendócrinos ao longo do desenvolvimento da doença. A perda dos marcadores pode estar associada a uma característica de dediferenciação celular associada a alterações moleculares da célula. Um estudo conduzido em 2021 por Ireland et al., demonstrou que o CPCP pode sofrer dediferenciação e perda de marcadores neuroendócrinos, assim como, a perda de ASCL1 devido a ativação do Notch através da mutação no gene ASCL1. Outro estudo demonstrou que essa alteração também pode estar relacionada ao microambiente tumoral e a presença de fibroblastos associados ao tumor, o qual induz a dediferenciação por mecanismos associados a interleucina 6 (Li et al., 2024).

O TTF1 é um importante marcador de caracterização de células pulmonares, entretanto, no CPCP é observado que esse é expresso em somente 90% dos casos. Alguns estudos apontam que o TTF1 pode estar associado não somente a mecanismos celulares de caracterização celular, mas pode estar associado também a alterações patogênicas dos carcinomas neuroendócrinos. Um estudo desenvolvido por Cancel et al. (2021) demonstrou a expressão de TTF1 em carcinoma neuroendócrino prostático, e que este estava associado ao prognóstico da doença, entretanto, os mecanismos associados ao TTF1 no CPCP ainda não foram esclarecidos.

O uso da técnica de IHQ na pesquisa de biomarcadores para CPCP gera a possibilidade de um estudo aprofundado das características fenotípicas do CPCP. Observa-se, ainda, que devido a essa doença ainda não ter tratamento alvo-específico, a avaliação de diferentes biomarcadores expressos localmente e que possuem impacto no prognóstico e fisiopatologia pode demonstrar promissores alvos farmacológicos.

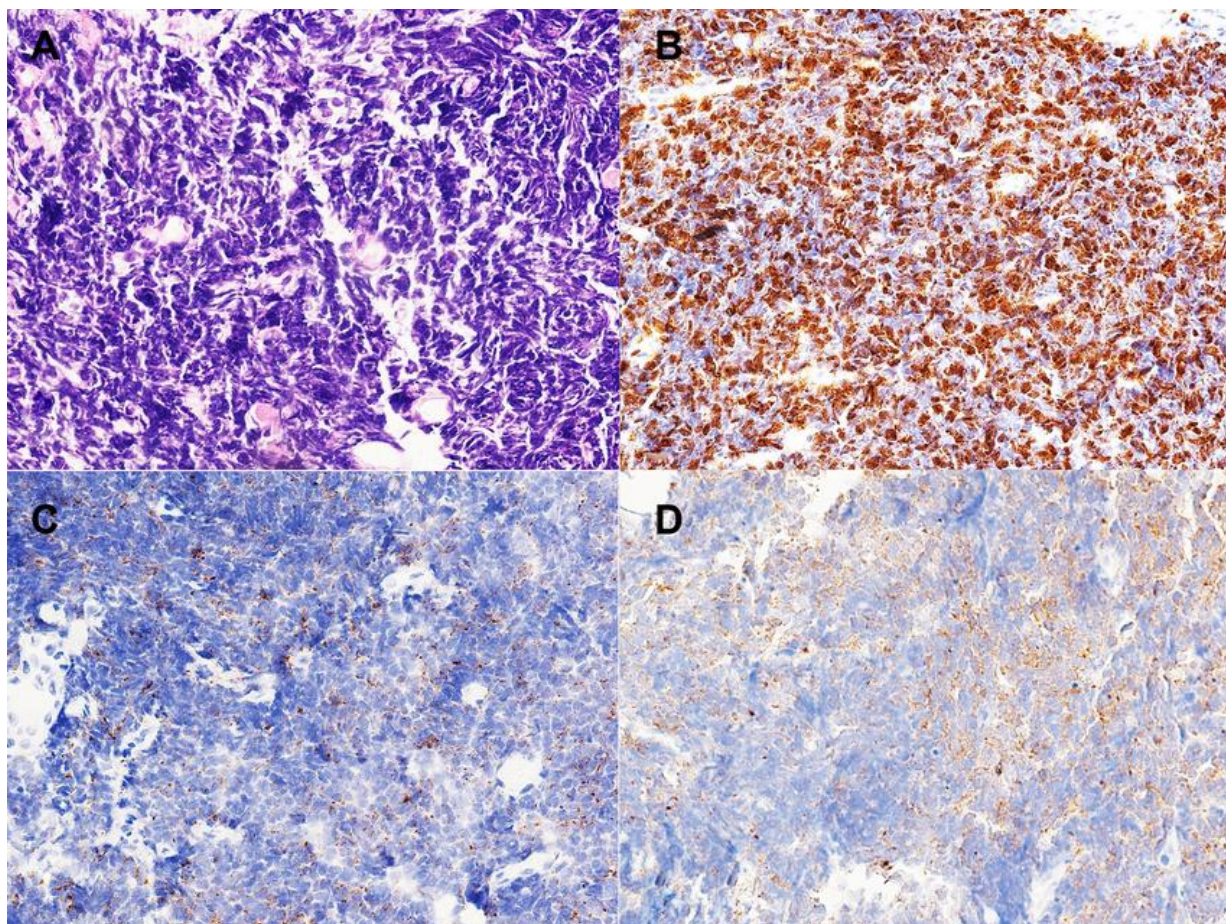


Figura 05: Coloração de HE (A), CD56 (B), SyP (C) e CgA (D) em CPCP.

Fonte: Shi et al. 2016.

1.6 Estadiamento patológico

Os estadiamentos clínico e patológico são muito úteis na avaliação do grau de acometimento regional e necessita de confirmação anatomopatológica de imagem, de exame físico e de radiologia anatomopatológicos.

O esquema de estadiamento patológico em dois estágios para CPCP foi inicialmente proposto em 1950 e tem sido usado desde então (Figura 06). Esse esquema categoriza a doença em estágio limitado e estágio avançado. Em seu estado limitado, o tumor confina-se a somente um hemitórax, não ocorrendo metástases e havendo o comprometimento somente dos linfonodos supraclaviculares ipsilaterais ou mediastinais contralaterais. Nesse estágio, toda extensão do tumor deve ser possível de receber radiação de uma única porta (STAHEL, 1989; MICKE, 2002).

Em 1989, a Associação Internacional de Estudos de Câncer de Pulmão (IASLC) sugeriu uma atualização nesse sistema, recomendando a inclusão também do comprometimento de linfonodos mediastinais e supraclaviculares contralaterais, além de acometimento pleural por invasão, como doença limitada. Já a doença avançada caracteriza-se então como o comprometimento extensivo do pulmão e metástases (MICKE, 2002).

Posteriormente, foi proposta a utilização do esquema de estadiamento TNM em CPCP. Esse esquema baseia-se em três evidências patológicas do crescimento do tumor. O T refere-se a dimensão em centímetros da massa tumoral, podendo este ser T0, T1, T1a, T1b, T2, T2a, T2b, T3 e T4. O N refere-se a quantidade de linfonodos comprometidos, podendo ser N0, N1, N2 e N3. E o M, a presença de metástases, podendo ser M0, M1, M1a e M1b

Esse esquema de classificação apresenta-se muito útil na avaliação do paciente com CNPCP, desde a avaliação de prognóstico, a predição de resposta terapêutica e a avaliação para a ressecção cirúrgica (SHEPHERD, 2007).

Questiona-se muito a aplicabilidade do modelo TNM em CPCP, pois este não apresenta tanto poder de predição prognóstica como acontece em casos de CNPCP, porém, também é muito útil na avaliação da possibilidade da ressecção cirúrgica em pacientes com estadiamento T1-T2N0. Além disso, esse modelo também é útil para a estratificação de casos para ensaios clínicos e pesquisas científicas (NICHOLSON, 2016).

O uso do modelo em dois estágios continua sendo o mais utilizado, visto que, a maioria dos pacientes são diagnosticados com a doença em seu estágio avançado. Entretanto, é importante considerar ambos os métodos de estadiamento para a avaliação prognóstica e também para a geração de dados que poderão ser utilizados em pesquisas clínicas futuras.

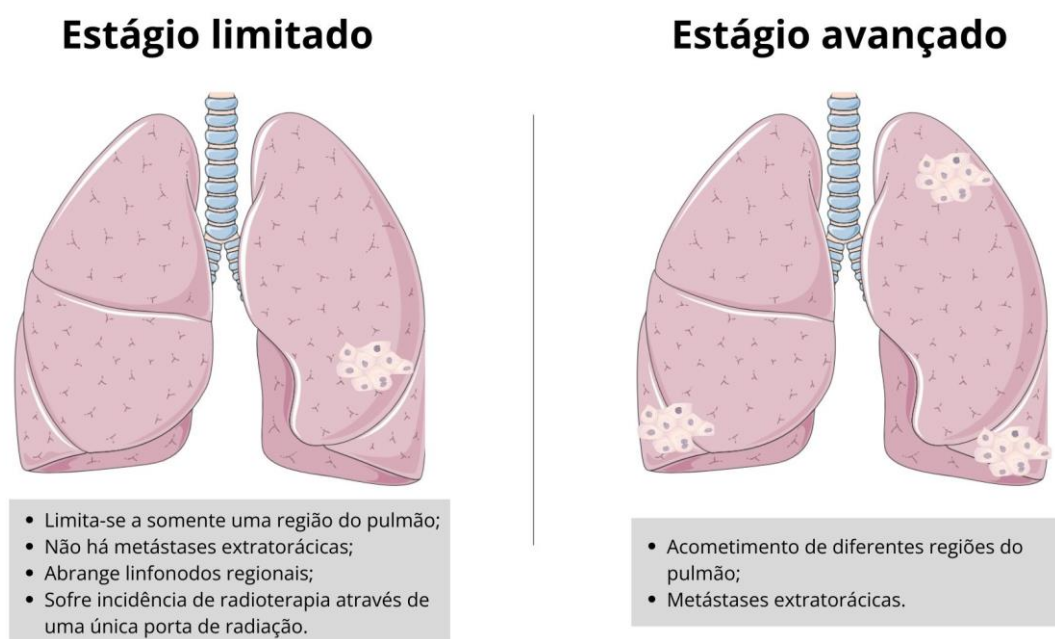


Figura 06: CPCP em estágio limitado, infiltrando somente um lobo do pulmão e um linfonodo, e estágio avançado infiltrando diferentes lobos e podendo sofrer metástases.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.7 Mecanismos do receptor Notch e relação com ASCL1 e DLL3 no CPCP

A via associada ao Notch está relacionada a diversos mecanismos celulares normais. Entretanto, essa proteína pode ter papel importante em alguns tipos de câncer, regulando a tumorigênese, seja atuando como oncogênica ou supressora tumoral. Essa via de sinalização é composta por quatro receptores Notch (Notch 1-4) e ligantes sendo duas famílias JAG (JAG1 e JAG2) e 03 proteínas delta-like (DLL1, DLL3 e DLL4) (Zhang et al., 2023; Borromeo et al., 2016).

No CPCP, o Notch possui um papel de supressor tumoral, ao parar o ciclo celular em fase G1 e inibir a atividade da proteína achaete-scute homólogo 1 (ASCL1). O ASCL1, por vez, é responsável pela neurogênese, carcinogênese e diferenciação neuroendócrina do CPCP. O Notch, então, atua como um regulador do crescimento tumoral (Borromeo et al., 2016).

A sinalização do Notch inicia-se a partir da ligação com um ligante e a ubiquitilação do ligante na membrana, o qual induz a liberação do domínio intracelular de Notch (NICD) e a translocação para o núcleo. O NICD liga-se então a um complexo

de duas proteínas (RBPJ/MAML), esse complexo ligado ao NICD atua como um fator de transcrição ativando a transcrição dos genes *HES1/HEY1*, o qual inibem o ASCL1 (Figura 07) (Zhang et al. 2023; Nelson et al. 2009).

A ligação do Notch acontece a partir da ligação do receptor **de membrana** com os ligante JAG ou DLL. Essa ligação pode ocorrer de forma trans, a partir da interação intercelular, ou cis, a partir da ligação intracelular. O DLL3 atua como um ligante não-canônico de interação trans, com efeito inibitório do receptor Notch (Kim, 2022).

O DLL3 ao inibir a sinalização do Notch, gera uma regulação negativa dos genes *HES1/HEY1*, aumentando a atividade do ASCL1, o que por vez atua como um fator de transcrição, induzindo a diferenciação neuroendócrina do tumor, e também promovendo a expressão do DLL3, gerando um efeito de retroalimentação positiva (Figura 07) (Nelson et al., 2009).

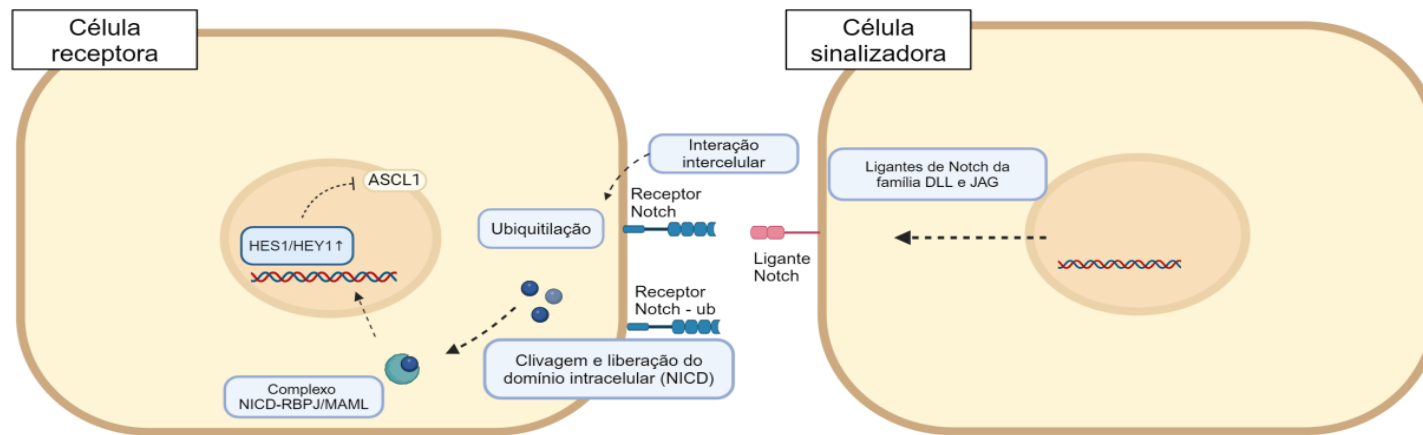
Devido sua importância na diferenciação celular e na tumorigênese, a via NOTCH-ASCL1-DLL3 tornou-se um importante alvo de estudo para a compreensão da biologia do CPCP, e também para a identificação de novas estratégias farmacológicas que possam beneficiar os pacientes acometidos com essa doença.

1.8 DLL3

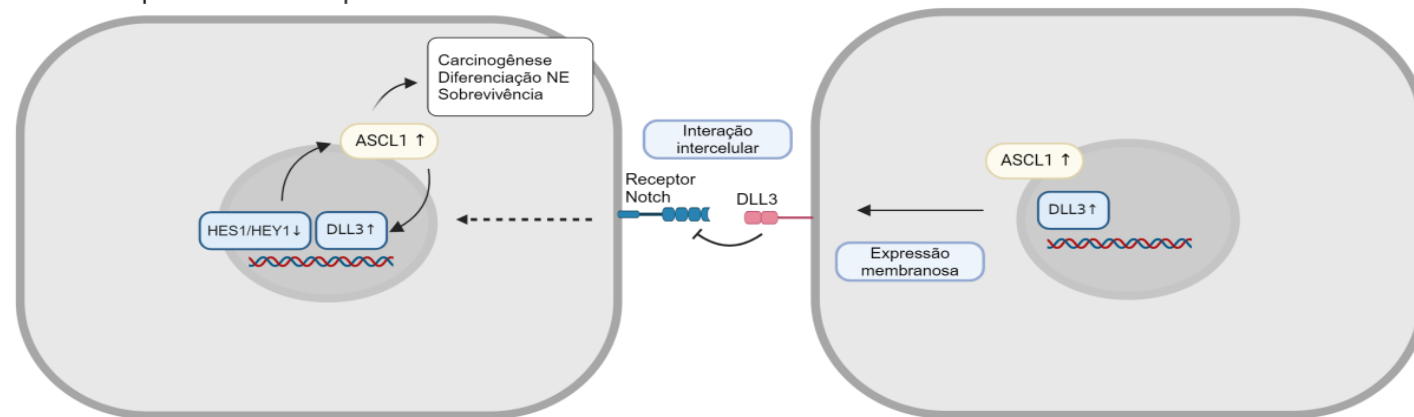
O DLL3 é um ligante da família delta like, que se difere dos outros ligantes devido a sua localização intracelular em corpúsculos de Golgi, porém, também pode ter expressão na membrana celular. A interação do DLL3 com o Notch possui algumas controvérsias na literatura. Alguns trabalhos mostram que não há atuação do DLL3 como antagonista do Notch. Entretanto, estudos mais recentes demonstraram que existe uma interação entre as duas proteínas, e que ambas adentram a célula após inativação do Notch, sendo ambas clivadas por vesículas lisossomais (Kim, 2022).

Nos últimos anos, houve uma crescente de estudo dessa proteína no CPCP e o seu envolvimento na inibição de sinal da via Notch. Diversos estudos demonstraram uma prevalente expressão do DLL3, mas todos os mecanismos celulares associados a inativação do Notch ainda não estão totalmente esclarecidos. Porém, sabe-se que o DLL3 se relaciona com a transformação neuroendócrina das células do pulmão a partir da interação com a via do ASCL1 a partir da inativação do Notch (Nelson et al., 2009).

Com os diversos estudos que demonstraram a alta expressão do DLL3, iniciou-se a busca de terapias-alvo para essa molécula. Além da sua ampla expressão em CPCP, o DLL3 também é indetectável em células de tecidos normais, diminuindo assim, a probabilidade de potenciais efeitos adversos. A primeira terapia estudada anti-DLL3 foi o Rolvapituzumab-tesirina, o qual, em triagens clínicas, não apresentou tanta eficácia. Foram-se estudadas outras modalidades de terapias com base na regulação do DLL3, foi-se então desenvolvida uma terapia alvo biespecífica (BiTE) e terapia com o uso de células T com receptores quiméricos para antígenos (CAR-T). Em 2024, foi aprovado pelo FDA o Tarlatamab, a primeira terapia que possui como alvo o DLL3 baseada em uma terapia BiTE (Nelson et al., 2009; Yang et al. 2023).



A. Célula epitelial normal do pulmão



B. Carcinoma de Pequenas Células do Pulmão

Figura 07. Mecanismo de sinalização celular da via Notch-ASCL1-DLL3 em células normais (A) e em células tumorais (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.9 Novas classificações do CPCP

O CNPCP possui diversas classificações patológicas que possuem relevância no prognóstico da doença e na resposta à terapia. Os CNPCP classificados como adenocarcinomas possuem assinaturas genéticas distintas dos carcinomas escamosos, e conseqüentemente, alguns protocolos terapêuticos podem mudar conforme as assinaturas genéticas e o perfil imunofenotípico e histológico do tumor. Já o CPCP, até há poucos anos, não possuía classificação, e todos os tumores eram classificados como neuroendócrinos de alto grau

Diversos mecanismos epigenéticos, moleculares e celulares estão associados ao desenvolvimento desse tumor, como foi descrito anteriormente. Entretanto, compreender as assinaturas genéticas e celulares a nível proteômico pode gerar novas classificações e gerar uma melhor compreensão do prognóstico associado a cada subclassificação da doença.

Baine et al. em 2020 publicou um novo modelo de classificação ao realizar uma coorte de 174 pacientes com base na IHQ para quatro proteínas distintas: ASCL1, NEUROD1, POU2F3 e YAP1. Foi observado em sua coorte que a maioria dos casos possuíram expressão dominante de ASCL1 (69%) e/ou NEUROD1 (17%), caracterizando esses tumores como fortemente neuroendócrinos (86%) (Figura 08). Em seu trabalho, a dupla expressão de ASCL1 e NEUROD1, ou a expressão de um dos dois marcadores associou-se a uma alta positividade dos marcadores neuroendócrinos, DLL3 e TTF1.

Os casos que não expressaram ASCL1 e/ou NEUROD1 representaram 14% dos casos, e desses, 7% expressaram POU2F3, os outros 7% não apresentaram um marcador de regulação transcricional que gerasse uma classificação sendo denominado como CPCP sem outras especificações (SOE). Os 7% dos casos que apresentaram uma expressão dominante de POU2F3 associaram-se a uma baixa expressão dos marcadores neuroendócrinos, DLL3 e TTF1, gerando assim um subgrupo fracamente neuroendócrino.

A expressão de YAP1 não é frequente nos grupos de CPCP; entretanto, trabalhos anteriores já sugeriram que esse marcador define um subtipo de CPCP não-neuroendócrino, quando associado a dupla negatividade de ASCL1 e NEUROD1.

Entretanto, o papel dessa proteína não é tão claro, devido a expressão dessa ser em baixos níveis nos casos estudados por Baine et al. (2020).

Essa proposta de classificação gera novas possibilidades na caracterização dos pacientes com CPCP utilizando um painel de IHQ, e gera novas perspectivas de estudos visando o perfil molecular associado a cada grupo. A assinatura genética desses subgrupos ainda não é aceita. Poucos estudos que buscam compreender as alterações transcriptômicas e genômicas podem ser encontrados. A partir dessa nova proposta, abrem-se novas possibilidades para o estudo e a caracterização das populações com CPCP.

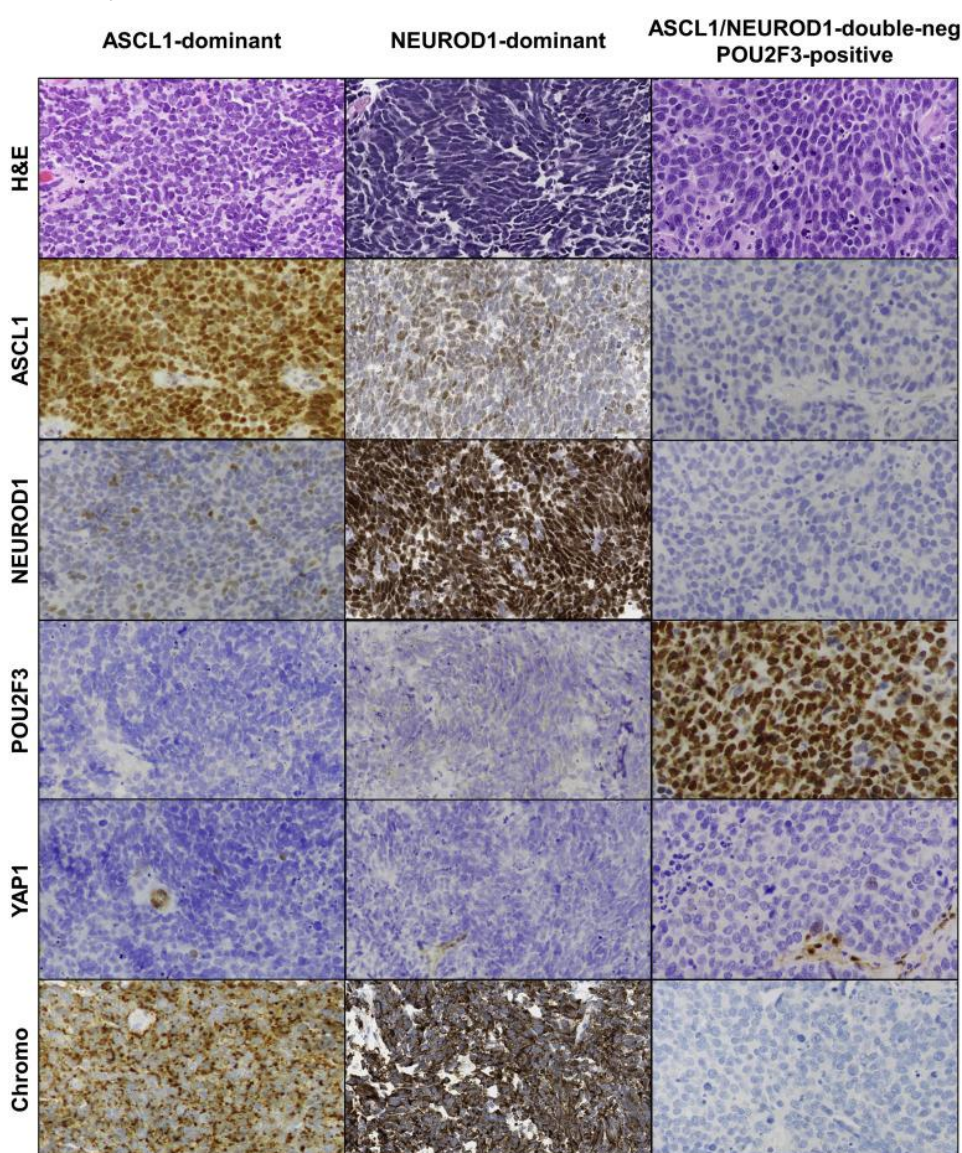


Figura 08: Expressão de ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 e CgA demonstrando subgrupos distintos de CPCP.

Fonte: Baine et al. 2020.

1.10 Terapias emergentes

Nota-se que o CPCP é uma doença muito desafiadora para a prática oncológica pela sua agressividade, pouca compreensão dos seus mecanismos e pela limitação terapêutica. Muitos métodos podem ser aplicados para o manejo e o tratamento do paciente oncológico. Alguns dos principais métodos são a cirurgia de ressecção, a quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e as terapias-alvo.

No manejo do CPCP a intervenção cirúrgica é pouco recomendada, sendo a lobectomia uma opção em potencial para doenças com estadiamento TNM em estágio I (T1N0M0). A primeira linha de quimioterapia padrão é com etoposídeo ou irinotecano em associação com platina. A sobrevida média global de pacientes que fazem uso desse protocolo padrão é de 10 meses (Dingemans, 2021).

Devido a esse desafio e as limitações encontradas, nos últimos anos, tem-se despertado um interesse em protocolos terapêuticos mais eficazes, com maior especificidade, e que possam ser aplicados de forma individualizada e personalizada, (Figura 09). Surge-se então a denominada medicina de precisão, onde busca-se estudar alvos ou grupos de alvos farmacológicos específicos de doenças de forma personalizada, para os aspectos fenotípicos e moleculares de cada paciente. Surgem então drogas que possuem como alvos a modulação do sistema imune, denominadas imunoterapias, e drogas que possuem como alvo, proteínas, produtos metabólicos, mutações genéticas e até modulações epigenéticas que se associam com a carcinogênese de determinados tumores (Patel, 2023).

No CPCP, as imunoterapias, já estudadas e ainda em estudo, têm como objetivo a modulação do escape imunológico, e o reconhecimento das células tumorais pelo sistema imune. Algumas drogas estudadas são o Ipilimumab, o Atezolizumab, o Nivolumab, o Durvolumab e o Pembrolizumab (Yang, 2019).

O Atezolizumab, o Nivolumab, o Durvolumab e o Pembrolizumab são anticorpos monoclonais que possuem como alvo o bloqueio da ligação PD-L1/PD-1. O PD-L1, quando expresso por uma célula tumoral age como um *checkpoint* imunológico gerando assim o escape imunológico. Em diversos tumores como CNPCP, tumores mamários e tumores gástricos, essa molécula é amplamente expressa, e o tratamento farmacológico tem um ótimo impacto na sobrevida global (Yang, 2019).

No CPCP, a expressão de PD-L1 não é tão frequente, entretanto, em estudos prévios, o atezolizumab apresentou-se como uma droga promissora em casos com positividade para PD-L1 em combinação com quimioterapia. O pemprolizumab apresentou-se eficaz em casos de PD-L1 positivos, aumentando a sobrevida global dos pacientes avaliados em um estudo clínico de fase II, e também apresentou eficácia em pacientes com a doença recorrente (Chung et al., 2019).

O nivolumab possui como alvo o PD-1, e foi aprovado nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA), por mostrar uma eficácia na melhora do prognóstico de pacientes com CPCP, com poucas reações adversas. O Durvalumab, possui como alvo o bloqueio do PD-L1, e apresentou-se como promissor em estudos de fase I, com poucos efeitos adversos, tendo resposta clínica em casos resistentes ou sensíveis ao tratamento com platina (Antonia et al., 2018; Cho et al. 2018).

Além do bloqueio da regulação imunológica, existem outras moléculas muito promissoras como alvo farmacológico no CPCP. Um exemplo é a família de enzimas da Poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) que está associada ao reparo de dano no DNA, mas quando superexpressa gera a resistência à quimioterapia (Pietanza et al., 2018).

Estudos anteriores demonstram que o PARP está mais expresso em células de CPCP, quando comparados ao tecido epitelial normal do pulmão. Sugere-se que a inibição dessa proteína com o veliparib, pode melhorar a sensibilidade do CPCP à quimioterapia, e conseqüentemente, melhorar o prognóstico. Em um estudo clínico de fase II, foi observado um pequeno aumento na sobrevida média global de pacientes que usaram o veliparib combinado com etoposídeo mais platina em comparação à pacientes que fizeram uso de placebo combinado a quimioterapia (10,3 vs. 8.9 meses) (Pietanza et al., 2018).

Outra molécula que se mostrou como promissora em diversos estudos clínicos é o DLL3. Essa molécula possui como alvo a regulação negativa dos receptores Notch, e a conseqüente carcinogênese e diferenciação neuroendócrina através do ASCL1. Inicialmente, identificou-se o rovalpituzumab-tesirina, um anticorpo conjugado a uma droga, que possui como alvo o DLL3. Foram realizados diversos estudos clínicos com essa droga, entretanto, não foi observada eficácia superior ao topotecan, o qual pode ser usado como tratamento de segundo linha, sendo assim descontinuado (Giffin et al., 2018; Owen, 2023).

Entretanto, há diversos outros estudos clínicos que buscam diferentes abordagens terapêuticas com o DLL3 como alvo, como o tarlatamab, que é uma imunoterapia biespecífica acopladora de células CD3 e DLL3, também conhecida como terapia BiTE

. Essa terapia apresentou resultados bastante positivos em estudos pré-clínicos, assim como, uma terapia CAR T cell denominada AMG 119, o qual utiliza-se um pool de células geneticamente modificadas que ao serem injetadas no organismo, possuem como alvo a molécula DLL3 (Giffin et al., 2018).

As diferentes estratégias terapêuticas citadas acima que possuem como alvo o DLL3 ainda estão em estudo clínico, entretanto, se aprovadas, será possível melhorar consideravelmente o quadro de novos pacientes diagnosticados com CPCP.

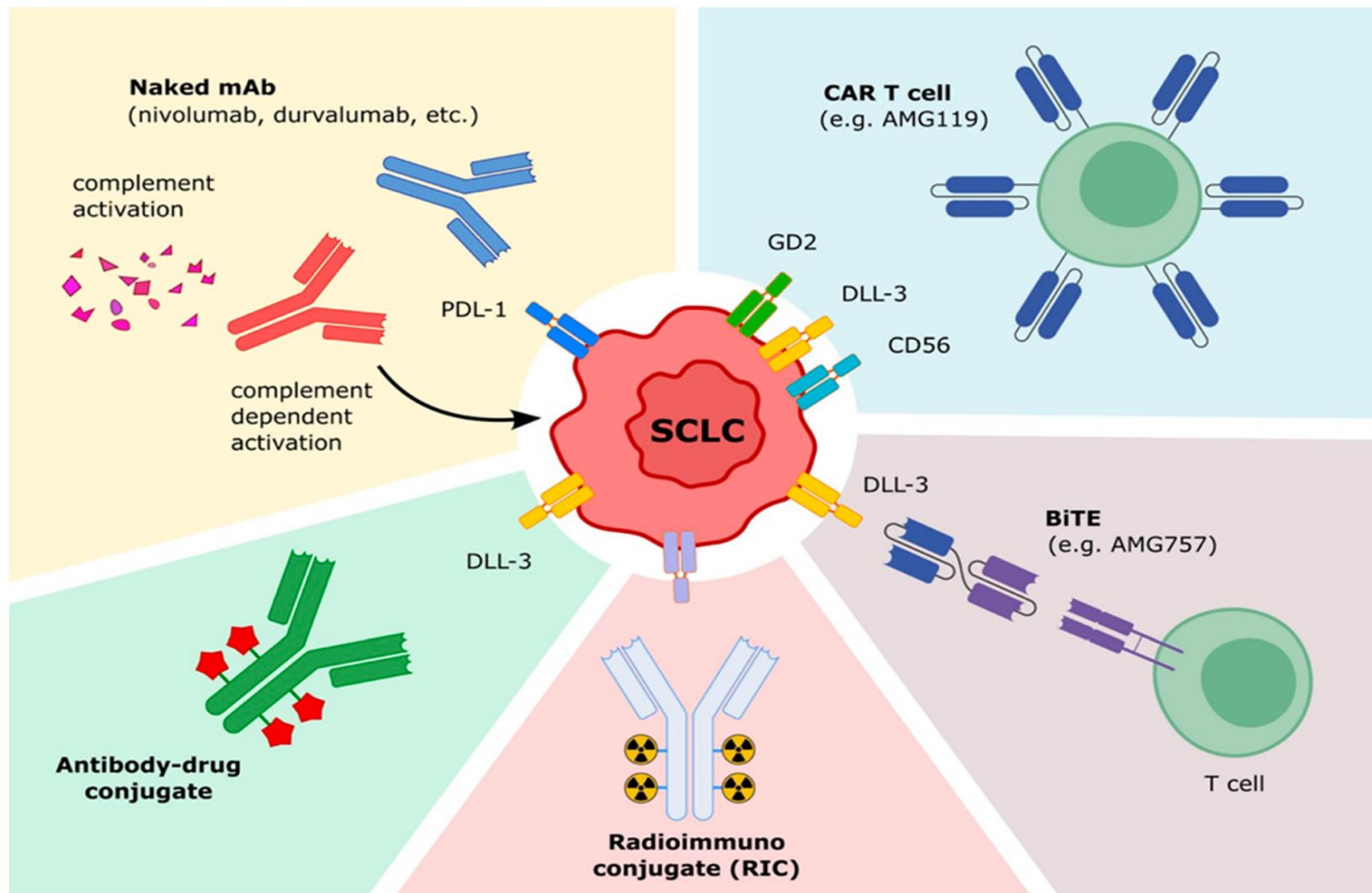


Figura 09: diferentes métodos de tratamento ao CPCP, baseado em biomarcadores alvos como o DLL3, e a imunoterapia como o uso de anti-PD1/PDL1.

Fonte: Guitoli et al., 2022.

2. Justificativa

O câncer de pulmão está associado a primeira causa de morte em homens e o terceiro em mulheres, e possui como principal fator etiológico o tabagismo. Mesmo sendo uma doença evitável, ainda possui uma alta taxa de incidência e óbito.

O CPCP é uma doença desafiadora para a prática oncológica devido a sua rápida progressão, a baixa taxa de sobrevida e as opções terapêuticas limitada. Além disso, há poucos estudos associados aos mecanismos desse tumor, principalmente na nossa população. Os mecanismos patológicos associados a resistência terapêutica no CPCP ainda é pouco claro, quando comparado ao CNPCP.

Com isso, o estudo do perfil fenotípico e a identificação de biomarcadores que podem se comportar como alvos terapêuticos é fundamental e possibilita a compreensão do comportamento dessa doença na população brasileira e também pode possibilitar a predição de resposta terapêutica às terapias em desenvolvimento com alvos biológicos específicos, como o DLL3.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de DLL3, TTF1 e ASCL1 em pacientes com CPCP e relacionar esses biomarcadores com aspectos clinicopatológicos e sobrevida global.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os aspectos demográficos e patológicos de casos de CPCP no Estado do Ceará;
- Avaliar e quantificar a expressão por imunohistoquímica de DLL3, ASCL1, TTF1 e KI-67 em tecidos embebidos em parafina através de um software de patologia digital;
- Avaliar a correlação das proteínas DLL3 e ASCL1 com TTF1, KI67 e marcadores NE;
- Realizar a associação dos biomarcadores estudados com os aspectos clínicos e sobrevida de pacientes com CPCP;

4 Materiais e Métodos

4.1 Pacientes

Foi realizado um estudo retrsopectivo de coorte transversal com 83 casos com diagnóstico confirmado de CPCP entre os anos de 2018 e 2021 (Figura 10). Os casos tiveram diagnóstico confirmados por um patologista torácico com base nos critérios atuais da OMS. As amostras de pacientes incluídos no estudo consistiram em blocos de parafina, lâminas coradas em hematoxilina e eosina e dados clínicos-patológicos disponíveis no Hospital Dr. Carlos Alberto Studart e no Laboratório Argos Patologia, ambos com sede em Fortaleza. Todos os blocos e lâminas incluídas no estudo foram referentes ao momento do diagnóstico. Foram utilizadas lâminas que estavam disponíveis dos marcadores CgA (anticorpo monoclonal, clone: LK2H10), SyP(anticorpo monoclonal, clone: DAK-SYNAP) e CD56 (anticorpo monoclonal, clone:123C3). Os dados epidemiológicos de idade e sexo foram obtidos dos laudos médicos disponíveis nos serviços de patologia supracitados. Os resultados acerca de sobrevida foram obtidos a partir de dados disponíveis no sistema de informação associado ao Sistema de Verificação de Óbitos. O trabalho foi realizado sob o comitê de ética em pesquisa de número 59399322.9.0000.5049. Devido à utilização somente de dados epidemiológicos e material biológico disponíveis nos serviços de Anatomia Patológica foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.1.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico confirmado de CPCP por histologia e por IHQ;
- Adultos de ambos os sexos e com idade igual ou superior a 18 anos;
- Material (amostra) em bloco de parafina suficiente, com celularidade adequada, para realização da pesquisa;

4.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com diagnósticos de outras neoplasias concomitantes;

- Pacientes com diagnóstico de CNPCP ou carcinoma de grandes células;
- Pacientes com dados clínicos ou diagnóstico incompatíveis com o objetivo do estudo.

4.2 Imunoistoquímica

Para a preparação das lâminas histológicas, foram utilizados os blocos de parafinas incluídos com tecido biológico humano que já estavam disponíveis nos serviços de patologia e já possuíam diagnóstico confirmado de CPCP. A partir dos blocos, foram realizados cortes histológicos de 2 µm em lâminas hidrofóbicas com carga positiva.

Foram realizadas reações de IHQ indireta para DLL3 (clone: EPR22592-18, diluição: 1:100 ABCAM®, ab220902, Cambridge, UK), ASCL1 (Policlonal, diluição: 1:200, Invitrogen®, PA5-77868, Massachusetts, USA), KI67 (clone: 30-9, pronto pra uso IVD, Roche Medical Systems®) e TTF1 (clone: SP141, pronto pra uso IVD, Roche Medical Systems®). Os anticorpos denominados *Research Use Only* (RUO) foram o DLL3 e ASCL1 e para a sua utilização foram realizados processos de validação para determinar a concentração de diluição do anticorpo e adequação de tempo da reação, (baseado em controles) para garantia do funcionamento e a adequabilidade das reações. As reações dos anticorpos TTF1 e KI67 (IVD) foram seguidas conforme manual do fabricante. Alguns dos casos que já possuíam lâminas realizadas para KI67 e/ou TTF1, ao diagnóstico anatomopatológico e imunoistoquímico, não foram submetidos a uma nova reação, sendo realizado somente a reação para DLL3 e ASCL1.

De forma geral, para a preparação das lâminas para a realização da IHQ, após o corte histológico, as lâminas foram colocadas para secar em estufa aquecida a 65°C durante 1 hora para melhor fixação do tecido na lâmina e iniciar o processo de desparafinação.

Após o tempo de secagem, as lâminas seguiram para a realização da reação automatizada com o equipamento Ultra Benchmark Ventana (Roche Medical Systems®) e foi utilizado o kit de detecção de Ultraview DAB detection KIT (Roche Medical Systems®). Foi adotado o protocolo de reação automatizada para a diminuição de erros humanos no processamento.

Segue a descrição das etapas do protocolo de detecção realizado pelo equipamento: a desparafinação foi feita pela exposição das lâminas ao reagente Ez Prep à 72°C. O próximo passo realizado pelo equipamento foi a recuperação dos sítios antigênicos, realizada em temperatura de 95°C com a solução Ultra CC1 com pH 9.0. Após a recuperação antigênica realizou-se a reação com o bloqueio da peroxidase endógena das células com o reagente Ultraview Inhibitor e o próximo passo foi a incubação das lâminas com o anticorpo primário.

Após a ligação do anticorpo primário e a lavagem para remoção do que não se ligou ao tecido, foi realizada uma incubação com um anticorpo secundário ligado à uma enzima HRP e um polímero, com especificidade Anti-IG. Após a ligação do polímero, foi adicionado DAB, o qual precipitou a partir da oxidação pelo HRP, formando uma coloração acastanhada na região onde está a proteína de interesse. Ao final da reação, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris para facilitar a visualização das estruturas histológicas.

Após as etapas da reação automatizada, as lâminas foram secadas em estufa a 65°C, e montadas com meio de montagem e lamínula para a visualização ao microscópio e escaneamento das lâminas para aquisição das imagens digitais.

Para todas as lâminas confeccionadas foram utilizados um controle positivo, sendo o controle positivos para DLL3, ASCL1, TTF1 e KI67, glioblastoma, tumor neuroendócrino, tireoide e tonsila, respectivamente. Para cada circuito de 29 lâminas realizadas, foi colocada uma lâmina de controle negativo, para garantia da ausência de marcação inespecífica.

4.3 Patologia digital

Após obtenção das lâminas de IHQ. As lâminas foram escaneadas com o auxílio dos escaners de lâminas MoticEasyScan® e KFBio®. Os arquivos das lâminas foram organizados em pastas eletrônicas por grupo de biomarcador. Os arquivos foram renomeados com o nome do marcador e identificação do caso.

Os arquivos das lâminas foram carregados em diferentes projetos para cada biomarcador no software QuPath (código-fonte do QuPath, documentação, links para o download do software estão disponíveis em <https://qupath.github.io>). As imagens foram analisadas, feitas as anotações e todos os núcleos separados por densidade de cor. Foi realizado o comando de anotação para seleção de área com boa representatividade tumoral para análise celular.

Para cada lâmina, os vetores de coloração foram recalibrados em “*Estimate Stain Vector*” com calibração automática. A detecção positiva de células foi analisada pela avaliação do núcleo de acordo com os parâmetros padrão em cada anotação, o limite de intensidade de coloração do núcleo foi definido como 0,1 e a expansão celular foi padrão. O limiar de intensidade DAB foi padronizado de acordo com cada marcador. Para DLL3 o “*thresholdCompartment*” foi definido como “*Cytoplasm: DAB OD Mean*”, e para ASCL1, KI67 e TTF1 o “*thresholdCompartment*” foi definido como “*Nucleus: DAB OD Mean*”.

Para análise do Histo-Score (HS), os parâmetros de limite de intensidade foram definidos com três pontos de limite, o “*thresholdPositivo1*” foi definido como 0,2, o “*thresholdPositivo2*” foi definido como 0,4 e o “*thresholdPositivo3*” foi definido como 0,6. A análise para cada marcador e os resultados obtidos foram expressos em positivos e negativos, percentual e HS. O HS trata-se de um padrão de análise semi-quantitativa, onde o valor estimado é a partir de uma razão da intensidade da coloração do DAB por células positivas, gerando um resultado que leva em consideração ambos os parâmetros e sendo muito utilizado na pesquisa científica.

O HS é obtido a partir da seguinte fórmula $[(0 \times \% \text{ de células negativas}) + (1 \times \% \text{ de células positivas fracas}) + (2 \times \% \text{ de células positivas moderadas}) + (3 \times \% \text{ de}$

células positivas fortes)], e obtém-se um resultado que vai de 0 a 300. O software QuPath aplicou esse cálculo de forma automatiza.

Os resultados obtidos foram exportados em planilhas de Excel, contendo os dados da quantidade de células detectadas de cada lâmina presente em cada projeto, a porcentagem de células positivas e negativas por lâmina, a quantidade de células positivas em 1+, 2+ e 3+, e o HS. Os dados foram copiados para o banco de dados eletrônico no SPSS para a realização das análises estatísticas.

4.4 Critérios de escores para análise de IHQ

Para a análise do KI67, foi atribuída uma avaliação por um método quantitativo clássico, onde foi realizada a contagem de células positivas em um total de 100 células tumorais, e o resultado foi descrito em porcentagem. Para a avaliação de CgA e SyP foram coletados dados qualitativos (positivo e negativo) a partir dos laudos de IHQ e foi realizada uma análise semiquantitativa utilizando as lâminas disponibilizadas pelas instituições. Para análise semiquantitativa os resultados foram dados a partir da intensidade em 1+ (fraco), 2+ (moderado) e 3+(forte) para cada lâmina. A análise do CD56 foi feita somente de forma qualitativa, obtendo-se os resultados de positivo e negativo quando existia pelo menos 1% de células com expressão positiva. A avaliação da CgA, da SyP e do CD56 foi realizada por patologista visualmente com as lâminas digitais.

Os escores de TTF1, DLL3 e ASCL1 foram realizados de forma qualitativa, com resultado de positivo e negativo, quantitativa em porcentagem e HS. Para avaliação qualitativa de TTF1 e DLL3, foi determinado como positivo quando havia um valor igual ou superior a 1% de células positiva e o HS igual ou superior a 1. Em relação ao ASCL1, foi determinado como positivo quando a expressão era igual ou superior a 10% de células ou HS igual ou superior a 10 (Baine et al., 2020; Hu et al., 2022).

Na avaliação quantitativa em porcentagem do TTF1, DLL3 e ASCL1 consideraram-se três grupos: negativo, % low quando a expressão era inferior a 50% e % high quando a expressão era igual ou superior a 50. Já para a análise do HS, os casos positivos para TTF1, DLL3 e ASCL1 foram também subdivididos em três grupos: negativos, *HS* low quando a expressão era inferior a 149 e *HS* high quando a

expressão era igual ou superior à 150. Os valores de ponto de corte foram definidos com base em estudos anteriores (Baine et al., 2020)

4.5 Análise estatística

As variáveis categóricas foram apresentadas de forma descritiva em frequências e porcentagens, e as contínuas em média \pm desvio padrão ou mediana. A distribuição das amostras foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Para a análise da diferença de expressão entre as variáveis e a associação entre si, as variáveis contínuas foram transformadas em variáveis categóricas a partir dos critérios de escore de IHQ descritos previamente. Foi assumido que as variáveis incluídas no estudo foram de padrão normal, e foi adotado o teste T de student para a análise da diferença das médias. A avaliação das correlações entre as variáveis foi realizada através do teste de correlação de Pearson.

A sobrevida global foi avaliada pelo método de Kaplan-Meier. Para a sobrevida global, foi considerado como evento o óbito por qualquer causa, sendo o tempo de acompanhamento a data de diagnóstico até a data do óbito. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram feitas pelo teste de LogRank. Posteriormente, a relação (conjunta) das características clínicas e moleculares em relação a sobrevivência foi realizada através da regressão de COX múltipla. Para todo o estudo foi assumido um valor de significância de 5%.

Todos as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* IBM SPSS v.26, as tabelas foram montadas com os resultados obtidos através do *software* Excel e os gráficos foram feitos com o auxílio do *software* *GraphPad Prism* (v.8.0; GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. Resultados

5.6 Caracterização demográfica e clínico-patológica

Foram avaliados 83 casos de pulmão com diagnóstico confirmado de CPCP. O diagnóstico deu-se através da avaliação histopatológica com os padrões morfológicos e imunoistoquímicos indicativos de CPCP. Todos os casos avaliados foram analisados por patologistas torácicos em dois centros de diagnóstico de Anatomia Patológica em Fortaleza, Ceará e os dados obtidos estão descritos na Tabela 01.

Nesse estudo, foram incluídos 38 (46,30%) pacientes do sexo masculino e 44 (53,70%) eram do sexo feminino. A média de idade foi de 71 anos (mínima: 48 anos e máxima: 93 anos), sendo que desses, 55 (67,90%) estavam abaixo de 75 anos, e 26 (32,10%) possuíam idade igual ou superior a 75 anos.

Dos casos avaliados, 75 (96,30%) eram amostras biopsiadas de sítio pulmonar, incluindo pulmão e biópsias oriundas de pleuras acometida com CPCP, e 3 (3,70%) foram biópsias de tecido metastático, sendo dois casos de metástases linfonodais e um caso de metástase óssea. Dos 83 casos, foi possível confirmar o dado de sobrevida de 49 (59,00%) casos, sendo 100% desses casos com óbito confirmado, e sendo atribuído aos casos com status de sobrevida não confirmados, status desconhecido.

Tabela 01. Características clínico-patológicas dos pacientes.

Variáveis	Categoria	Total	Porcentagem das variáveis (%)
Sexo	Masculino	38	46,30%
	Feminino	44	53,70%
Idade	Média, (min - max)	71 (48 - 93)	-
	<75	55	67,90%
	≥75	26	32,10%
Sítios histológicos	Primário	78	96,30%
	Avançado	3	3,70%
Status de sobrevida	Óbito confirmado	49	59,00%
	Desconhecido	17	23,30%

5.6.1 Avaliação imunoistoquímica

5.6.1.1 Expressão de marcadores neuroendócrinos

Foram avaliados através de IHQ a expressão de marcadores neuroendócrinos. Dos casos avaliados, 29 (61,70%) foram positivos para o marcador CgA e 18 (38,30%) foram negativos. Dos casos positivos, 13,90% apresentaram, a partir de análise semi-quantitativa escore de 1+, 16,70% com expressão de 2+ e 19,4% com alta expressão de 3+.

O marcador SyP foi positivo em 40 (85,10%) casos e negativo em 7 (14,90%). Na avaliação semiquantitativa, foram identificados 23,50% de casos com expressão em 1+, 17,60% com expressão em 2+ e 38,20% com expressão em 3+, sendo a maioria dos casos avaliados, então, como alto expressor de SyP, sendo um importante indicador do fenótipo neuroendócrino.

Foi ainda avaliada a expressão de CD56, a análise foi realizada somente de forma qualitativa como positivo e negativo. Somente 4 casos (8,70%) foram negativos e 42 (91,30%) positivos para a expressão de CD56, evidenciando junto à expressão da CgA e da SyP, o aspecto neuroendócrino dos casos avaliados. Em todos os casos, ao menos, um marcador neuroendócrino foi positivo, e todos possuíam características histológicas de carcinoma de pequena célula para a confirmação junto ao painel de marcadores neuroendócrinos.

As lâminas apresentaram positividade nuclear para o marcador KI67 em todos os casos, tendo uma média de expressão de 71,03% de células positivas, e sendo 55,1% dos casos com expressão de KI67 acima de 75%, sendo assim caracterizados como tumores de alto grau, demonstrando um alto índice proliferativo.

Tabela 2. Expressão de CgA, SyP, CD56 e KI67 em pacientes com CPCP

Variável	Categoria	N	(%)
Chromogranin A	Negativo	18	38,30%
	Positivo	29	61,70%
	1+	5	13,90%

Continuação da tabela 2. Expressão de CgA, SyP, CD56 e KI6U em pacientes com CPCP

	2+	6	16,70%
	3+	7	19,4%
Synaptophysin	Negativo	7	14,90%
	Positivo	40	85,10%
	1+	8	23,50%
	2+	6	17,60%
	3+	13	38,20%
CD56	Negativo	4	8,70%
	Positivo	42	91,30%
KI67	Média	71,03%	

5.6.1.2 Expressão de TTF1, DLL3 e ASCL1

Foi realizada uma análise detalhada de TTF1, DLL3 e ASCL1, com parâmetros qualitativos e quantitativos. Nos casos estudados, 40 (50,0%) foram negativos para a expressão de TTF1 e 40 casos (50,0%) foram positivos. A partir de uma análise quantitativa, identificaram-se 5 casos (6,30%) com expressão de TTF1 inferior a 50% de células positivas, e 35 casos (43,80%) com expressão igual ou superior a 50%, sendo a média de expressão de 39,62% (mínimo: 00 e máximo: 99,30%) de células positivas para TTF1. Na análise do H-score, 15 casos (18,80) tiveram expressão inferior a 149, e 25 (31,30%) teve expressão de TTF1 igual ou superior à 150. A média do H-score para TTF1 foi de 90,24 (mínimo: 00, máximo: 296,52).

Com a análise do DLL3 qualitativa, 25 casos (30,10%) foram negativos para e 58 casos (69,90%) foram positivos (Figura 11). Na avaliação quantitativa, 34 (41,00%) casos tiveram expressão inferior a 50% de células positivas, 24 (28,90%) apresentaram expressão igual ou superior a 50% de células positivas, sendo uma média de 29,93% de células positivas (mínima: 00 e máxima: 99,30%). A avaliação do H-score demonstrou que 51 (61,40%) dos casos foram inferiores a 149, e 7 (8,40%)

dos casos foram iguais ou superiores a 150. A média do HScore foi de 90,24 (mínimo: 00 e máximo de 296,52).

Dos casos avaliados para ASCL1, 69 (94,50%) casos foram positivos e 4 (5,48%) negativos. Na análise quantitativa foi identificado que 34 (46,60%) possuíam positividade inferior a 50%, enquanto 35 (48,00%) possuíam positividade igual ou a cima de 50%, sendo a média de expressão de 44,77% de células positivas (mínima: 00 e máxima: 99,90). Na análise de HScore, 50 casos (68,50%) foram positivos com valores inferiores a 149, e 07 casos (9,60%) foram positivos com valores iguais ou superiores a 150, com uma média de HScore de 62,35 (mínimo: 00 e máximo: 268,66). Observa-se assim que a maioria dos casos apresentaram positividade para DLL3 e ASCL1.

Tabela 3. Expressão de DLL3, TTF1 e ASCL1.

Variável	Categoria	N	%
DLL3	Negativo	25	30,10%
	Positivo	58	69,90%
	<50%	34	41,00%
	≥50%	24	28,90%
	Média, (mín. - máx.)	29,93 (00 -99,30)	-
	H-Score 1 - 149	51	61,40%
	H-Score ≥150	7	8,40%
	Média do H-score, intervalo (mín. - máx.)	48,81 (00 - 289,00)	-
	Negativo	40	50,00%
	Positivo	40	50,00%
TTF1	<50%	5	6,30%
	≥50%	35	43,80%
	Média, intervalo (mín. - máx.)	39,62 (00 - 99,90)	-
	H-Score 1 - 149	15	18,80%

Continuação Tabela 3. Expressão de DLL3, TTF1 e ASCL1.

	H-Score ≥ 150	25	31,30%
	Média do hscore, intervalo (mín. - máx.)	90,24 (00 - 296,52)	-
ASCL1	Negativo	16	21,92%
	Positivo	57	78,08 %
	<50%	22	30,13%
	$\geq 50\%$	35	47,94%
	Média, intervalo (mín. - máx.)	44,77 (00 - 99,90)	-
	H-Score 11 - 149	50	68,50%
	H-Score ≥ 150	7	9,60%
	Média do H-score, intervalo (mín. - máx.)	62,35 (00 - 268,66)	-

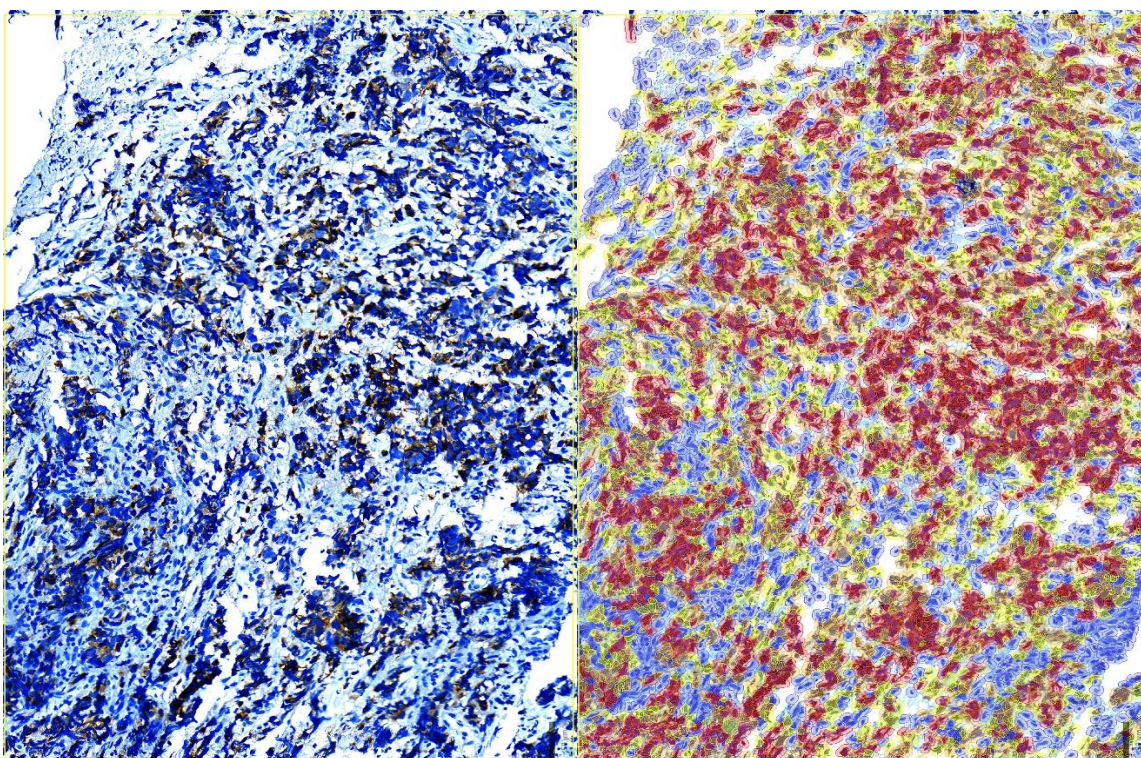


Figura 11. Expressão de DLL3 por IHQ e detecção de células positivas no QuPath. Na figura a esquerda, marcação por IHQ de DLL3. Na direita é possível observar a detecção celular realizada pelo QuPath, com a segregação dos grupos celulares a

partir de diferentes cores de acordo com a intensidade de coloração do DAB, sendo em azul as células negativas, amarelo as células positivas fracas, laranja positividade moderada, e vermelho positividade forte.

5.7 Relação entre as variáveis clínicas com imunoexpressão de proteínas neuroendócrinas, DLL3, TTF1 e KI67

Foi realizado o teste T de student para a análise da diferença das médias de expressão IHQ das proteínas avaliadas e as características clínicas incluídas no estudo, para a identificação da relação estatística entre as variáveis no CPCP. Para a aplicação do teste, foram levados em consideração os parâmetros quantitativos, qualitativos e o HS para os biomarcadores incluídos na análise. As variáveis clínicas foram distribuídas de forma categórica.

5.7.1 Variáveis clínicas

Foi identificada uma relação entre o sexo e a expressão de ASCL1, tanto quantitativa ($p=0,039$), quanto em HS ($p=0,012$), onde foi observado que a expressão foi maior em pacientes do sexo masculino, com uma média de 56,26% para o sexo masculino nas análises quantitativas e 40,36% para o sexo feminino, e com média de HS de 80,54 para os pacientes do sexo masculino e 47,05 para o sexo feminino (Tabela 04, figura 15). Não houve relação estatística entre o sexo e a expressão de TTF1 e DLL3.

Em relação a idade, os pacientes foram distribuídos em duas categorias, sendo elas, menor do que 75 anos e maior ou igual a 75 anos. Foi observado que os pacientes com idade menor do que 75 anos, apresentaram uma expressão maior de TTF1, com uma média quantitativa de 47,23% e média para o HS de 106,24, enquanto os pacientes com idade maior ou igual a 75 anos, apresentaram uma média quantitativa de 23,91%, e a média para o HS foi de 54,73. O valor de p da diferença de expressão quantitativa e idade foi de 0,018, e o p valor da diferença do HS foi de 0,035 (Tabela 4, figura 14). Não foi identificada significância estatística entre idade e a expressão de DLL3 e ASCL1. Não houve relação estatística entre os sítios histológicos e a expressão dos biomarcadores estudados.

5.7.2 Marcadores neuroendócrinos

Foi realizada a avaliação da associação estatística entre os marcadores CgA, SyP e CD56 com o TTF1, DLL3 e ASCL1. Não houve relação estatística entre a expressão de CgA e CD56, com a expressão de TTF1, DLL3 e ASCL1. Entretanto, foi observada uma relação estatística da expressão de SyP, com o ASCL1. Foi observado que os pacientes com SyP positiva, apresentaram uma expressão aumentada do ASCL1, com uma média de expressão quantitativa do ASCL1 de 50,06% ($p=0,003$) e HS de 72,23 ($p=0,001$), quando comparados aos pacientes negativos com média quantitativa de 16,41% e HS de 18,78.

5.7.3 DLL3

Foi observada a relação estatística entre o DLL3 com o TTF1 e o ASCL1 através de diferentes parâmetros (Figura 13). Na análise qualitativa, foi observado que os pacientes negativos para DLL3, possuíam uma média de expressão de 37,50% de TTF1, enquanto, os positivos apresentaram uma média de 40,48% ($p=0,003$). Quanto aos casos de DLL3 quantitativos, estes foram categorizados em % *high* (igual ou superior a 50%) e % *low* (inferior a 50%). Os pacientes com expressão % *low* de DLL3 apresentaram uma média de expressão de 26,04% de TTF1, comparados aos casos com expressão % *high*, o qual apresentaram uma média de expressão de 64,08% de TTF1 ($p=0,003$).

Já para a comparação do H-score do DLL3 em relação a análise quantitativa do TTF1 (Figura 10), os casos foram categorizados em HS *low* e HS *high*. Os casos com HS *low* para DLL3, apresentaram média de 33,55 de expressão de TTF1, já os casos HS *high* apresentaram média de 94,17% de expressão de TTF1 ($p=0,003$) (Figura 13).

Foi analisado também a relação estatística entre a expressão do DLL3 com o H-score do TTF1. Foi observado que os pacientes negativos, apresentaram uma média de TTF1 HS de 68,53, enquanto os positivos apresentaram uma média de 96,59. Já o DLL3 quantitativo %*low*, apresentou uma média de expressão de 62,12 de TTF1 HS, enquanto o DLL3 %*high*, apresentou média de 152,96. Na avaliação do HS do DLL3, os casos de DLL3 HS *low*, apresentaram a média de 82,93 de TTF1 HS,

enquanto o DLL3 HS high, apresentou a média de 240,55 ($p=0,001$). Em relação ao ASCL1, não foi identificada diferença de expressão significativa entre os parâmetros do DLL3, com os parâmetros quantitativos e HS do ASCL1.

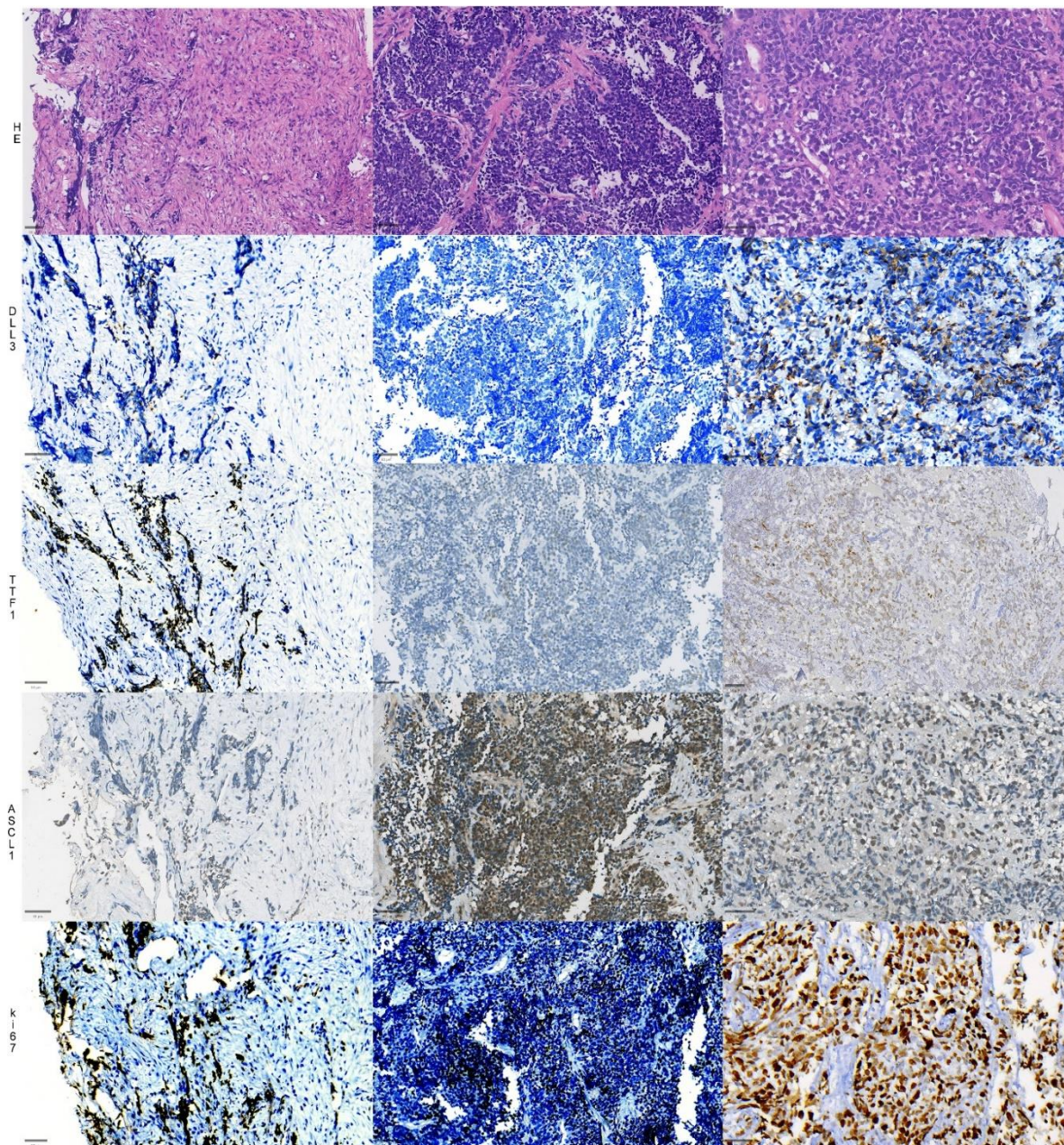


Figura 12. Expressão de DLL3, TTF1, ASCL1 e KI67 em CPCP.

Na figura são apresentados três casos de CPCP com as respectivas colorações de HE e IHQ. Na primeira linha é demonstrada a coloração de HE, na segunda a coloração de DLL3, na terceira a coloração de TTF1, na quarta a coloração de ASCL1 e na quinta a marcação de KI67. É evidenciado a heterogeneidade no padrão de marcação dos biomarcadores.

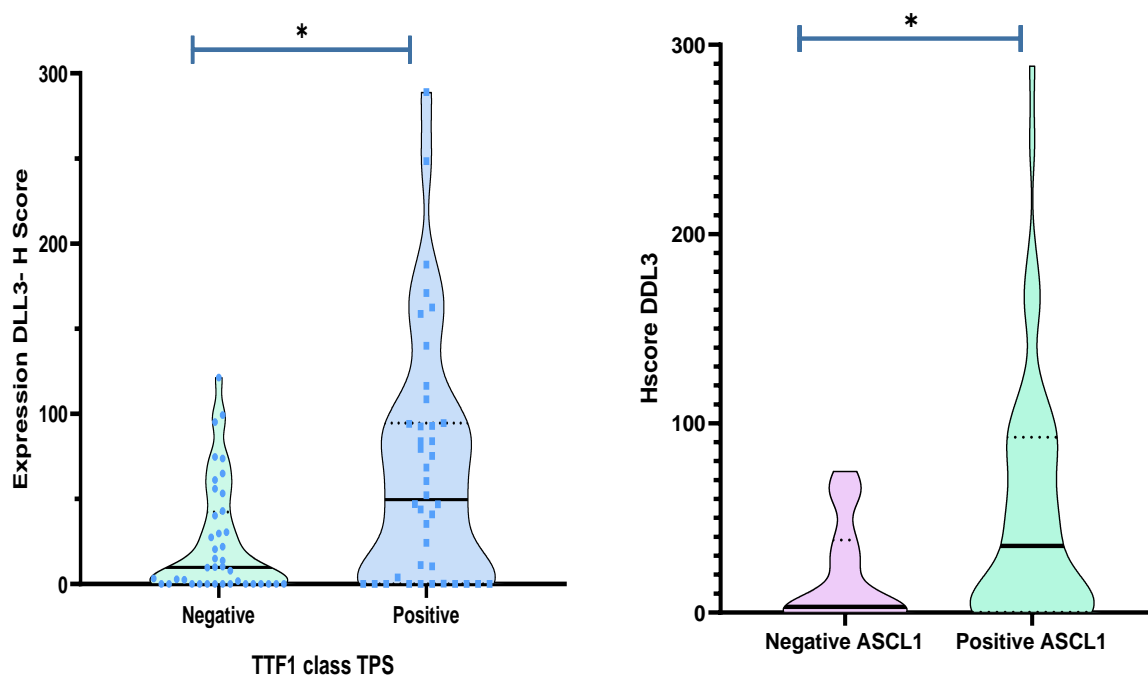


Figura 13. Relação entre a expressão de DLL3 versus imunoexpressão de TTF1 e ASCL1 nos casos avaliados ($p < 0,005$).

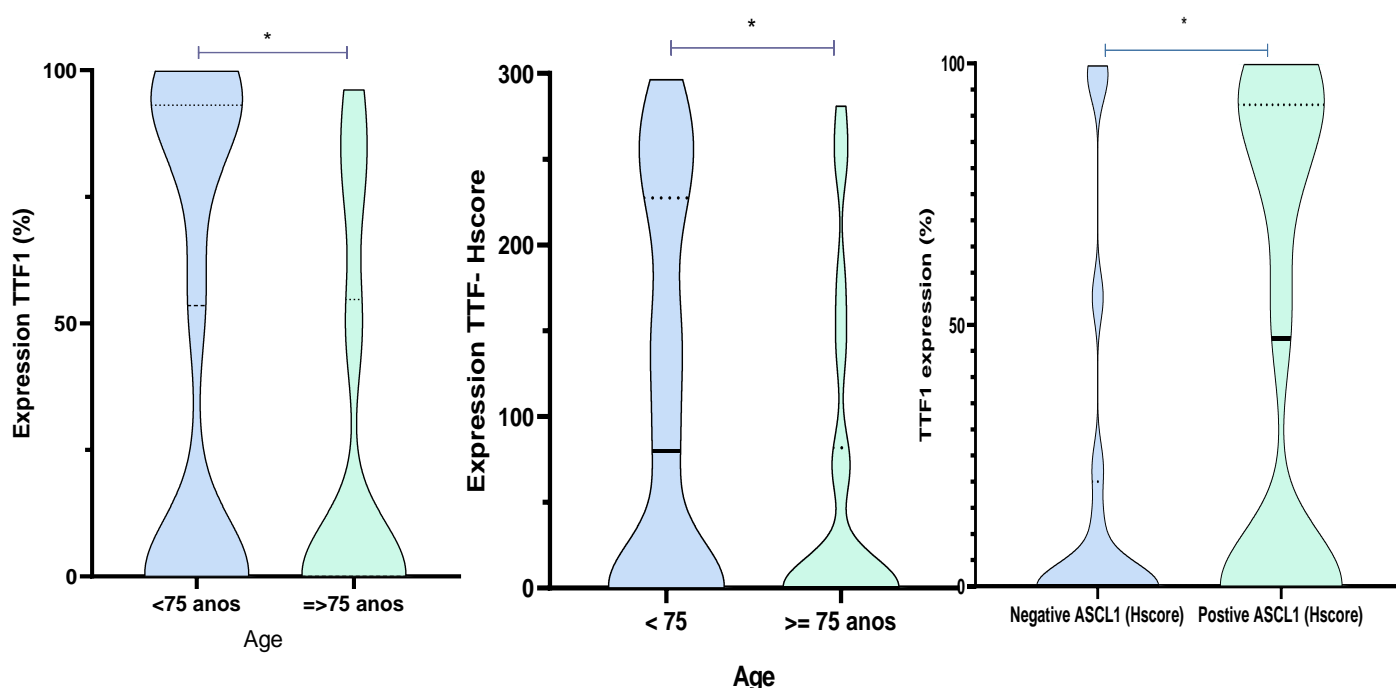
5.7.4 TTF1

Ao realizar as análises da diferença de expressão de TTF1 em relação as outras variáveis, foi identificado somente relação estatística com o DLL3 (Figura 12). Na análise qualitativa, foi observado que os pacientes com TTF1 negativo, possuíam uma média de 19,15% de células positivas para DLL3 ($p = 0,001$), e HS de 24,73 ($p = 0,003$). Enquanto os casos positivos, apresentaram média de 38,95% células positivas para DLL3, e HS de 68,09.

Assim como o DLL3, para a análise de associação das variáveis, o TTF1 foi categorizado em %*low* e %*high*. Os casos com TTF1 %*low*, apresentaram uma média de 35,6 de celularidade positiva para DLL3 ($p = 0,001$) e HS de 39,43 (0,003), enquanto os casos com TTF1 %*high* apresentaram média de 39,43% células positivas para DLL3 e HS de 69,07.

O HS de TTF1 também foi categorizado em HS *low* e HS *high*. Nos casos que apresentaram HS low, foi verificado que estes expressavam DLL3 em média de 39,43% de células ($p=0,001$), e HS de DLL3 com média de 38,27 ($p=0,003$). Já os casos TTF1 HS high, apresentaram uma média de 47,69% de células positivas para DLL3 com média de HS do DLL3 de 85,98. Assim, confirmou-se a relação entre a expressão de TTF1 com o DLL3 no CPCP. Não foi identificada relação estatística entre a expressão de TTF1 com a expressão quantitativa de ASCL1.

Figura 14. Expressão de TTF1 em relação a idade e a imunoposição de ASCL1.



Todos os casos que possuíram o TTF1 avaliado foram distribuídos em dois grupos, um grupo TTF1 negativo e um grupo TTF1 positivo. Foi realizada uma análise para verificação da diferença das variáveis entre os grupos com expressão positiva/negativa de TTF1. Os grupos foram caracterizados na Tabela 04 e para as variáveis analisadas não houve diferença estatística entre os dois grupos analisados.

Tabela 4. Caracterização dos pacientes com SCLC de acordo com a marcação de TTF1.

		TTF1 classes						p valor
		Negativo			Positivo			
		N	% de N da linha	% de N da coluna	N	% de N da linha	% de N da coluna	
Idade	< 75	22	42,3%	55,0%	30	57,7%	75,0%	0,061
	>= 75	18	64,3%	45,0%	10	35,7%	25,0%	
Sexo	Feminino	21	48,8%	52,5%	22	51,2%	55,0%	0,823
	Masculino	19	51,4%	47,5%	18	48,6%	45,0%	
CgA	Negative	6	37,5%	35,3%	10	62,5%	37,0%	0,907
	Positive	11	39,3%	64,7%	17	60,7%	63,0%	
CgA semiquantitativo	0	6	37,5%	50,0%	10	62,5%	47,6%	0,153
	1+	0	0,0%	0,0%	5	100,0%	23,8%	
	2+	4	66,7%	33,3%	2	33,3%	9,5%	
	3+	2	33,3%	16,7%	4	66,7%	19,0%	
SyP	Negative	2	28,6%	11,8%	5	71,4%	18,5%	0,928
	Positive	15	40,5%	88,2%	22	59,5%	81,5%	
SyP semiquantitativo	0	2	28,6%	20,0%	5	71,4%	23,8%	0,596
	1+	2	25,0%	20,0%	6	75,0%	28,6%	
	2+	2	40,0%	20,0%	3	60,0%	14,3%	
	3+	4	36,4%	40,0%	7	63,6%	33,3%	
CD56	Negative	1	25,0%	6,3%	3	75,0%	11,1%	0,563
	Positive	15	38,5%	93,8%	24	61,5%	88,9%	

5.7.5 ASCL1

Na análise da diferença da expressão qualitativa de ASCL1 em relação a expressão quantitativa de TTF1 e DLL3, foi observado uma associação estatística entre a expressão do ASCL1 com o TTF1, tendo os casos negativos para ASCL1 uma média de expressão de 17,85% de células positivas para TTF1, enquanto os casos positivos, apresentaram 43,71% ($p=0,019$) (Figura 14).

Verificou-se também que os casos negativos para ASCL1 apresentaram a média de 14,49% de células positivas para DLL3, enquanto que os casos positivos apresentaram a média de 33,63% de celularidade positiva ($p=0,007$) (Tabela 4). Em relação ao HS, os casos negativos para ASCL1 apresentaram a média de 19,61 de

HS do DLL3, enquanto os casos positivos apresentaram uma média de 54,67 (p=0,002).

Identificou-se uma interessante associação entre a imunoposição do ASCL1 com o processo de diferenciação neuroendócrina ao se associar com o marcador SyP (Figura 15, Tabela 04), com o DLL3 e com o TTF1.

Figura 15. Expressão de ASCL1 em relação ao sexo e ao status de SyP.

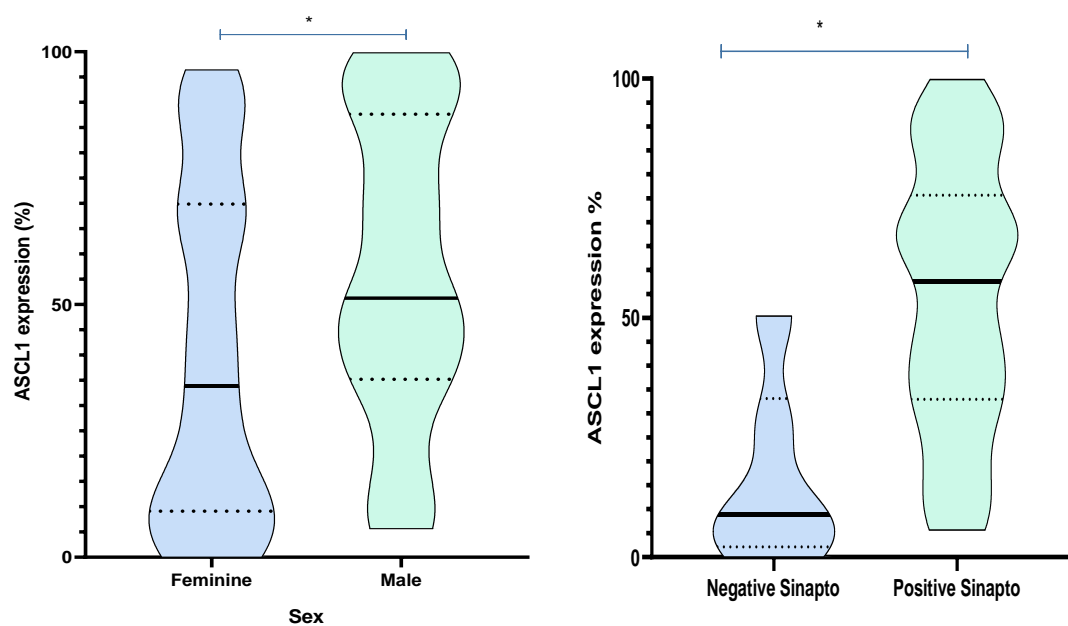


Tabela 5. Relação entre TTF1, DLL3 e ASCL1 com variáveis clínico-patológicas.

		TTF1 (%)		TTF1 HS		DLL3 (%)		DLL3 HS		ASCL1 (%)	
		Média	p	Média	p	Média	P	Média	p	Média	P
Sexo	Masculino	36,33	0,746	83,75	0,618	32,09	0,492	54,31	0,389	56,26	0,039
	Feminino	41,27		91,64		27,34		42,52		40,36	
Idade	<75	47,23	0,018	106,24	0,035	31,44	0,283	53,19	0,320	51,93	0,128
	≥75	23,91		54,73		25,34		37,28		39,09	
CgA	Negativo	49,52	0,256	102,17	0,147	23,82	0,218	37,89	0,125	53,89	0,473
	Positivo	48,9		108,88		31,67		56,01		45,44	
SyP	Negativo	41,57	0,478	72,27	0,487	23,74	0,702	41,11	0,369	16,41	0,003
	Positivo	50,55		112,9		29,53		50,46		54,06	
CD56	Negativo	55,93	0,887	104,1	0,987	12,27	0,589	18,52	0,897	52,38	0,798
	Positivo	49,69		109,41		30,59		52,82		46,50	
TTF1 Class 1	Negativo	,00	-	,00	-	19,15	0,001	24,73	0,003	48,85	0,204
	Positivo	79,24		180,48		38,95		68,09		45,43	
TTF1 Class 2	Negativo	,00	-	,00	-	34,50	0,889	34,50	0,784	40,57	0,781
	(%) low	27,90		57,70		35,6		61,23		19,01	
	(%) high	86,57		198,02		39,43		69,07		48,95	
DLL3 Class 1	Negativo	37,5	0,887	68,53	0,879	,00	0,220	0,01	0,281	41,38	0,405
	Positivo	40,48		96,59		41,40		67,51		50,53	
DLL3 Class 2	Negativo	19,15	0,145	19,15	0,274	,00	-	,00	-	41,38	0,287
	(%) low	26,04		62,12		22,76		30,22		50,75	
	(%) high	64,08		152,96		71,24		124,18		50,22	
ASCL1 HS	Negativo	17,85	0,019	46,71	0,080	14,49	0,007	19,61	0,002	11,69	-
	Positivo	43,71		97,79		33,63		54,66		30,47	

5.8 Correlação da imunexpressão de TTF1, DLL3 e ASCL1.

Foi aplicado o teste de correlação de Pearson para a identificação da correlação da expressão entre as variáveis avaliadas na IHQ, assumindo-se um valor de significância de $p < 0,05$.

Não foi identificada correlação entre as variáveis de sexo e idade com a expressão dos marcadores estudados; não foi identificada correlação também entre os marcadores neuroendócrinos CD56, CgA, SyP e KI67 com a expressão de TTF1, DLL3 e ASCL1.

Entretanto, quando avaliados entre si, houve uma correlação positiva entre a imunexpressão de TTF1 com DLL3. Na análise da caracterização das médias de forma quantitativa do TTF1, identificou-se correlação positiva entre o TTF1 e a expressão de DLL3 quantitativa ($r = 0,358$; $p = 0,001$), assim como houve correlação positiva também com a expressão em HS do DLL3 ($r = 0,396$; $p = 0,000$) (Tabela 5).

Em relação a avaliação do HS de TTF1, foi observado também uma correlação positiva ainda superior entre essa análise com a análise da expressão do DLL3, tanto quantitativo ($r = 0,411$; $p = 0,000$), quanto por HS ($r = 0,454$; $p = 0,000$). Apesar da identificação de uma relação através do teste T de Student, não foi identificada correlação estatística entre esses dois marcadores com o ASCL1.

Tabela 6. Correlação de Pearson entre expressão de KI67, TTF1, DLL3 e ASCL

		KI67	TTF1 (%)	TTF HS	DLL3 (%)	DLL3 HS	ASCL1 (%)	ASCL1 HS
KI67	<i>r</i> valor	1	0,070	0,050	0,038	0,043	0,211	0,192
	<i>p</i> valor		0,563	0,641	0,745	0,716	0,092	0,126
TTF1 (%)	<i>r</i> valor	0,070	1	0,947	0,358	0,396	0,004	-0,052
	<i>p</i> valor	0,563		0,000	0,001	0,000	0,973	0,665
TTF1 HS	<i>r</i> valor	0,056	0,947	1	0,411	0,454	-0,014	-0,071
	<i>p</i> valor	0,641	0,000		0,000	0,000	0,906	0,552
DLL3 (%)	<i>r</i> valor	0,038	0,358	0,411	1	0,902	0,065	0,056
	<i>p</i> valor	0,745	0,001	0,000		0,000	0,585	0,637
DLL3 HS	<i>r</i> valor	0,043	0,396	0,454	0,902	1	0,018	0,010
	<i>p</i> valor	0,716	0,000	0,000	0,000		0,878	0,935
ASCL1 (%)	<i>r</i> valor	0,211	0,004	-0,014	0,065	0,018	1	0,918
	<i>p</i> valor	0,092	0,973	0,906	0,585	0,878		0,000
ASCL1 HS	<i>r</i> valor	0,192	-0,052	-0,071	0,056	0,010	0,918	1
	<i>p</i> valor	0,126	0,665	0,552	0,637	0,935	0,000	

5.9 Sobrevida global

Para a análise de sobrevida, utilizaram-se dados coletados de prontuários e em banco de dados informatizados presentes nos locais de estudo, como *intranet* e sistema informatizado do serviço de patologia a qual foi realizada a coleta dos dados dos pacientes para estudo. De todos os casos, 49 (59,00%) pacientes tiveram óbito confirmado, e 17 (23,30%) dos casos não foi possível a obtenção dos dados de sobrevida. Foi então realizado um teste de Log Rank utilizando-se dos dados dos casos com óbito confirmado, para a compreensão da sobrevida global relacionando o tempo de diagnóstico ao desfecho, com relação às diferentes variáveis.

5.9.1 Idade

Ao categorizar os pacientes com idade inferior à 75 anos, e igual ou superior à 75 anos, não foi observada diferença estatística em relação aos dois grupos utilizando-se a relação do tempo do diagnóstico ao óbito (Figura 16).

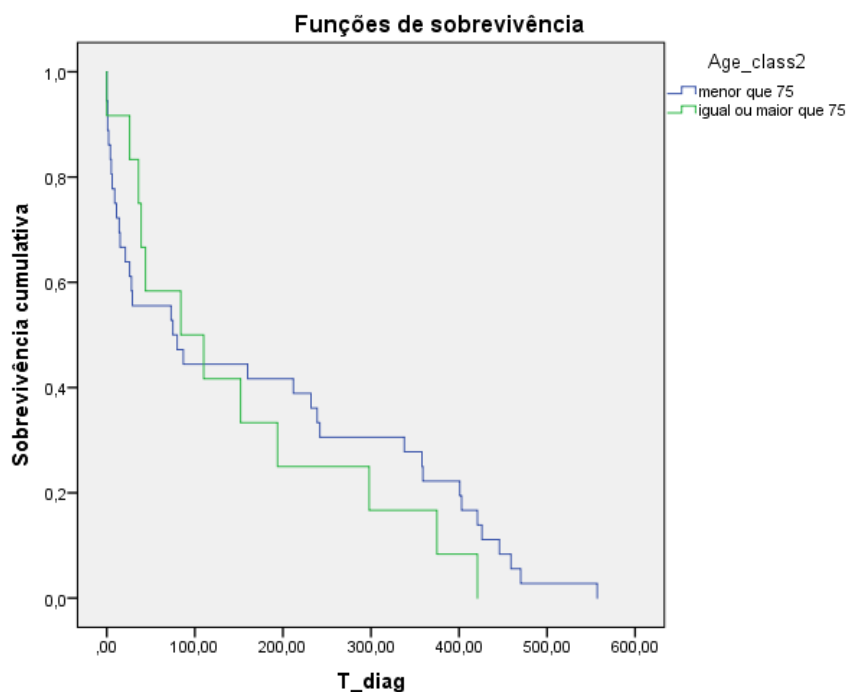


Figura 16. Função de sobrevida em relação aos grupos de idade ($p > 0,005$).

5.9.2 Sexo

Não foi observada significância estatística referente à sobrevivência em função do tempo de diagnóstico quanto ao sexo dos pacientes (Figura 17).

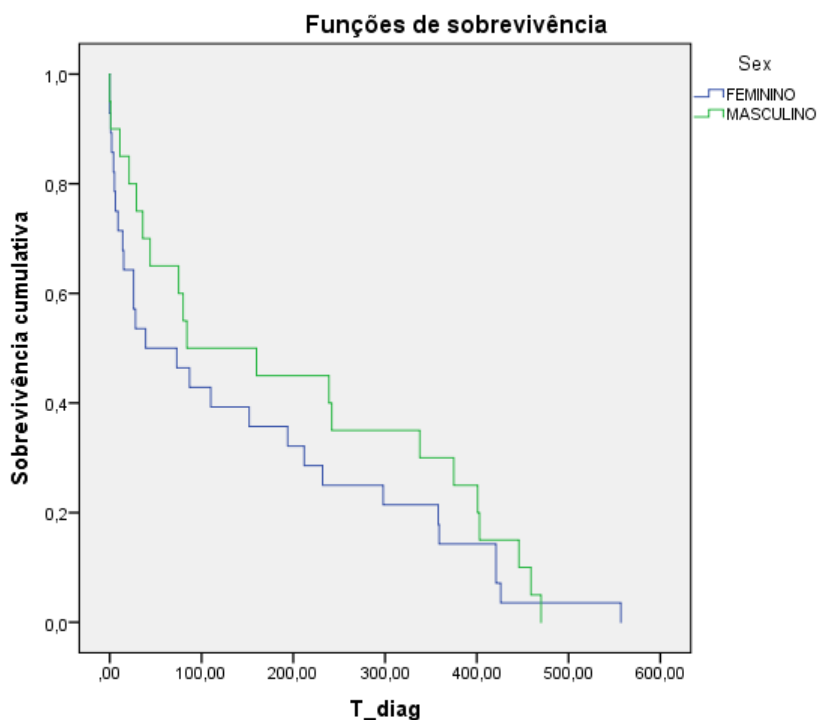


Figura 17. Funções de sobrevida em relação ao sexo dos pacientes ($p > 0,005$).

5.9.3 Expressão de KI67

Para análise de sobrevivência em relação ao KI67, este foi categorizado utilizando-se de ponto de corte de 50% de células positivas nucleares para KI67 (Baine et al., 2020). Foram obtidos dois grupos, sendo um denominado *KI67 low* com expressão inferior a 50% e o outro grupo denominado *KI67 high* com expressão superior a 50%. Apesar de ser um importante marcador para a compreensão do grau de proliferação do tumor, ao realizar a análise através do log rank, não se identificou diferença de sobrevida do tempo de diagnóstico ao desfecho clínico em relação a esse marcador (Figura 18).

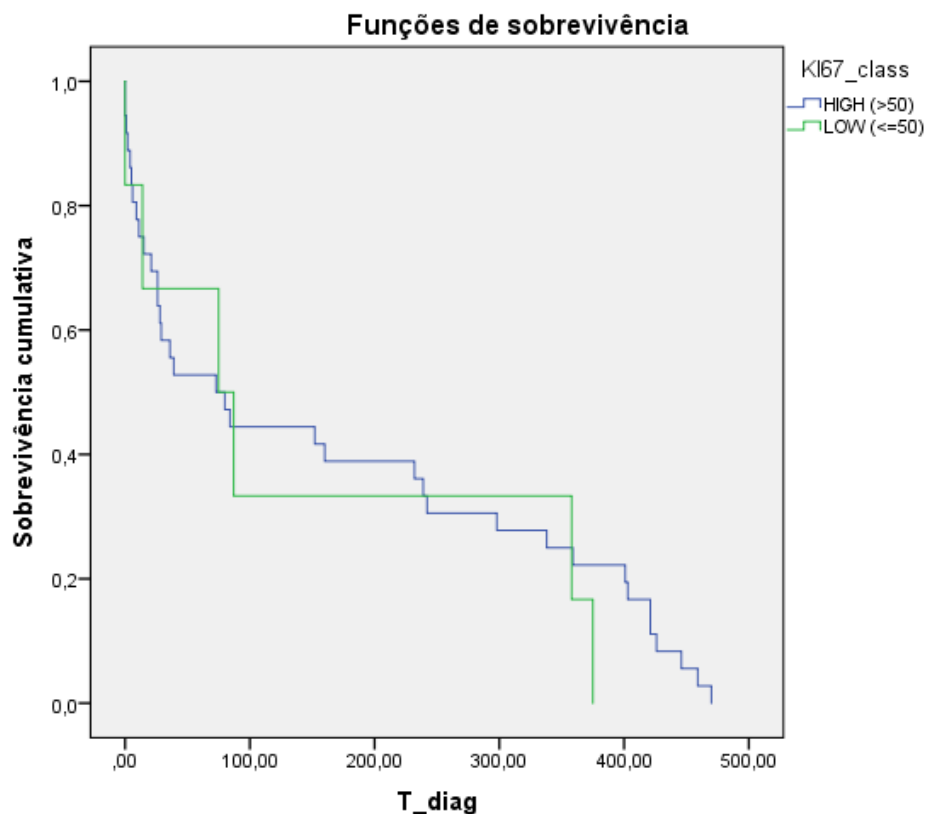


Figura 18. Função de sobrevida em relação ao KI67 ($p > 0,005$).

5.9.4 Expressão de TTF1

Para a avaliação do impacto da expressão de TTF1 na sobrevida dos pacientes, foi-se aplicado o teste de log rank para os três tipos de resultados obtidos e categorizados da expressão de TTF1. Utilizou-se primeiramente da avaliação qualitativa, categorizando os pacientes em positivos e negativos (Figura 19), depois, aplicou-se o teste utilizando-se os resultados quantitativos em porcentagem categorizados *low* e *high* (Figura 20), e posteriormente os resultados da análise de HS, também categorizada em *low* e *high* (Figura 21). Não houve significância estatística da expressão de TTF1 nas diferentes classes de resultados em relação a sobrevida.

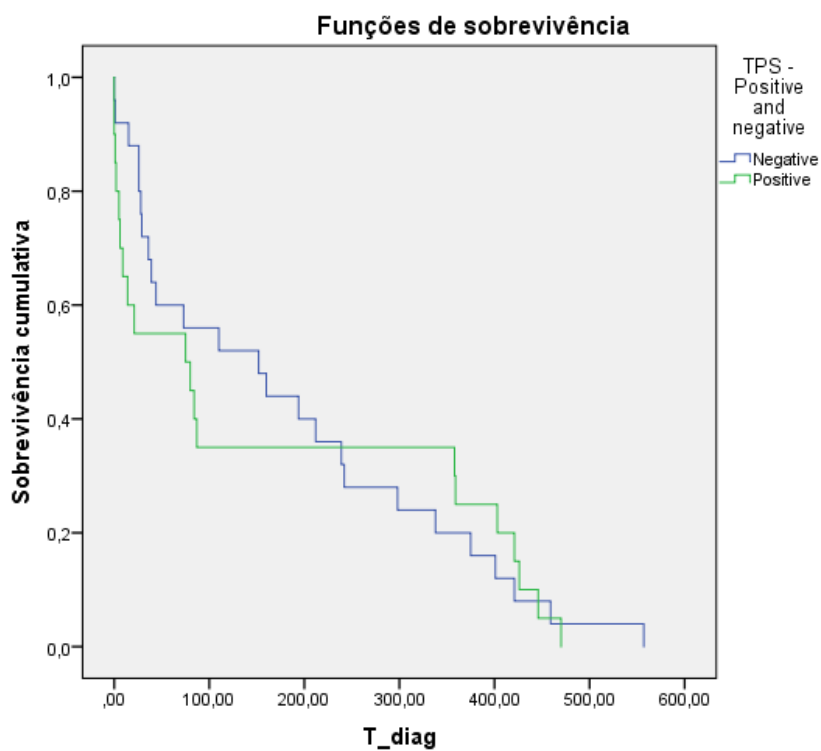


Figura 19. Expressão de TTF1 qualitativa (positivo e negativo em relação a função de sobrevivência ($p>0,005$)).

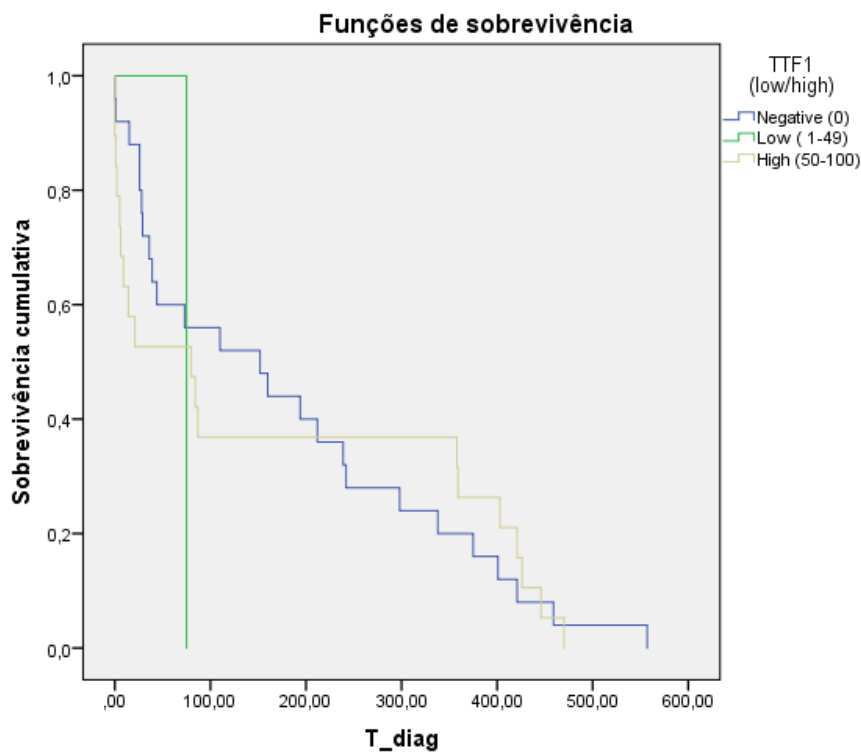


Figura 20. Expressão de TTF1 quantitativa (%) em relação a função de sobrevivência ($p>0,005$).

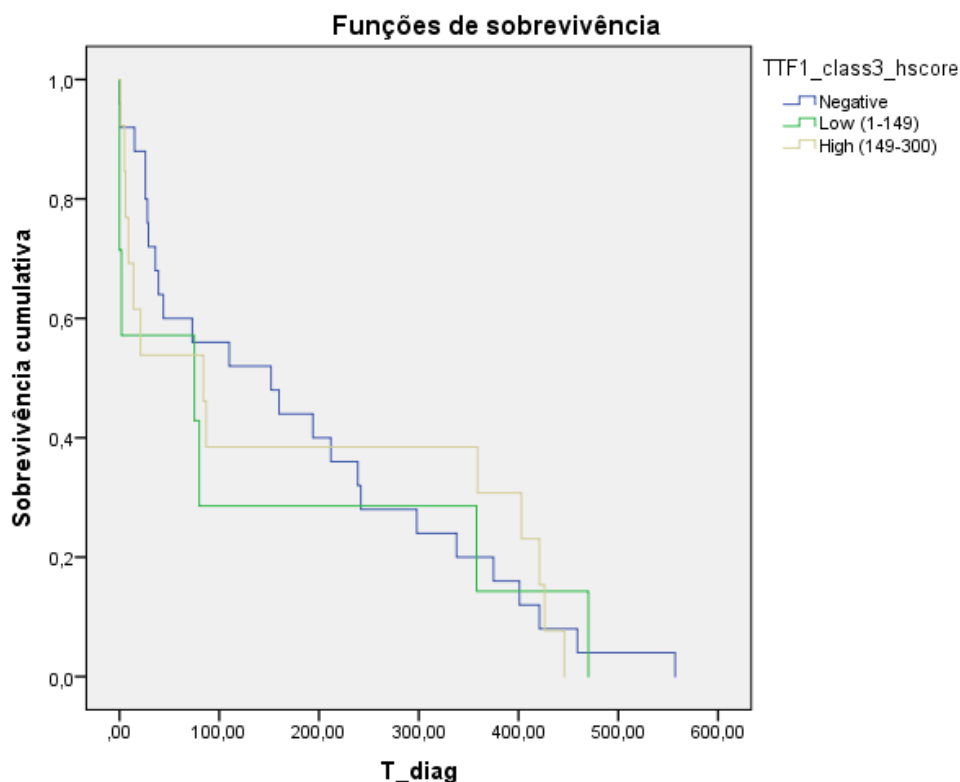


Figura 21. Expressão de TTF1 por HS em relação a função de sobrevida ($p > 0,005$).

5.9.5 Expressão de DLL3

Assim como para o TTF1, foi analisado o impacto da expressão de DLL3 na sobrevida em relação ao tempo de diagnóstico. Utilizou-se do teste de Kaplan-Meier para a comparação entre os diferentes grupos identificados. Para essa avaliação, utilizou-se como base as três formas de análises utilizadas no estudo.

Na análise qualitativa (Figura 22) os casos foram categorizados em positivos e negativos, na quantitativa (Figura 23) os casos foram categorizados em *low* e *high* com base na expressão em porcentagem de células positivas, e no HS (Figura 24) os casos foram categorizados em *low* e *high*. Não ~~foi~~ houve significância estatística da expressão de DLL3 no tempo de sobrevida em análise univariada.

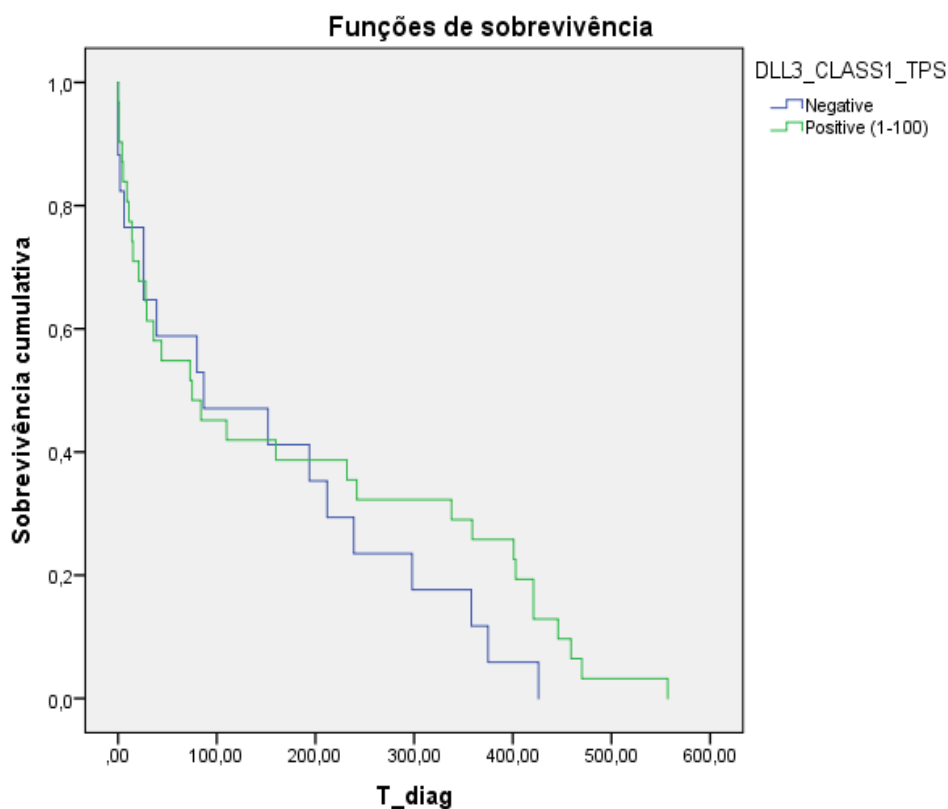


Figura 22. Expressão de DLL3 qualitativa (positivo e negativo) em relação a sobrevida ($p > 0,005$).

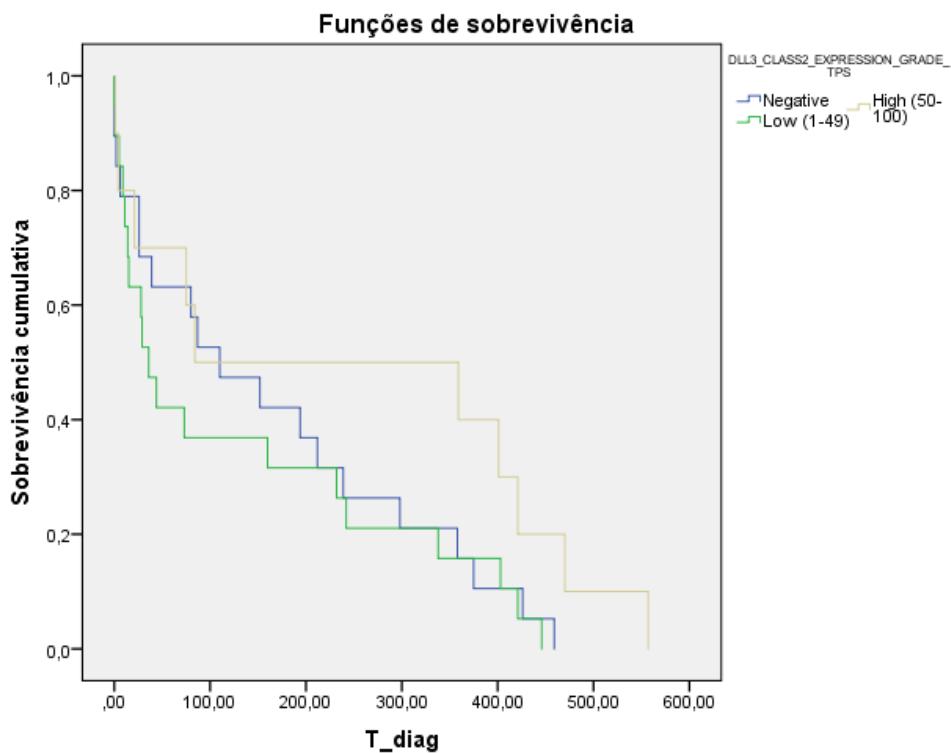


Figura 23. Expressão de DLL3 quantitativa (%) em relação a sobrevida ($p > 0,005$).

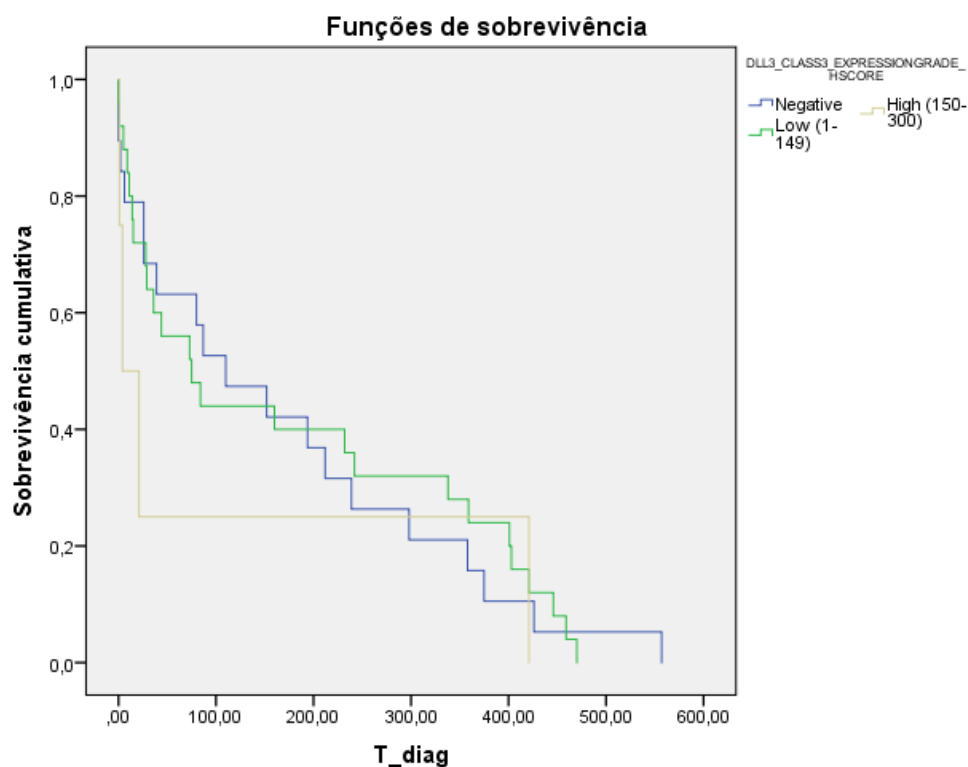


Figura 24. Expressão de DLL3 por HS em relação a sobrevida ($p>0,005$).

5.9.6 Expressão de ASCL1

Para a avaliação do impacto do ASCL1 na sobrevida dos pacientes incluídos no estudo em relação ao tempo de diagnóstico, foi feita uma análise através do teste de log rank utilizando a expressão do ASCL1 qualitativa (Figura 25) e do HS (Figura 26). Na análise qualitativa, os casos foram categorizados como positivos e negativos, e na análise por HS, os casos foram categorizados como negativos, *low* e *high*.

Foi identificada correlação estatística entre a expressão de ASCL1 e sobrevida global. Pacientes com expressão reduzida ou ausência de expressão de ASCL1 no momento do diagnóstico apresentaram menor sobrevida global, tanto quando avaliado a diferença de sobrevida em relação a expressão qualitativa ($p=0,013$) e em HS ($p=0,046$).

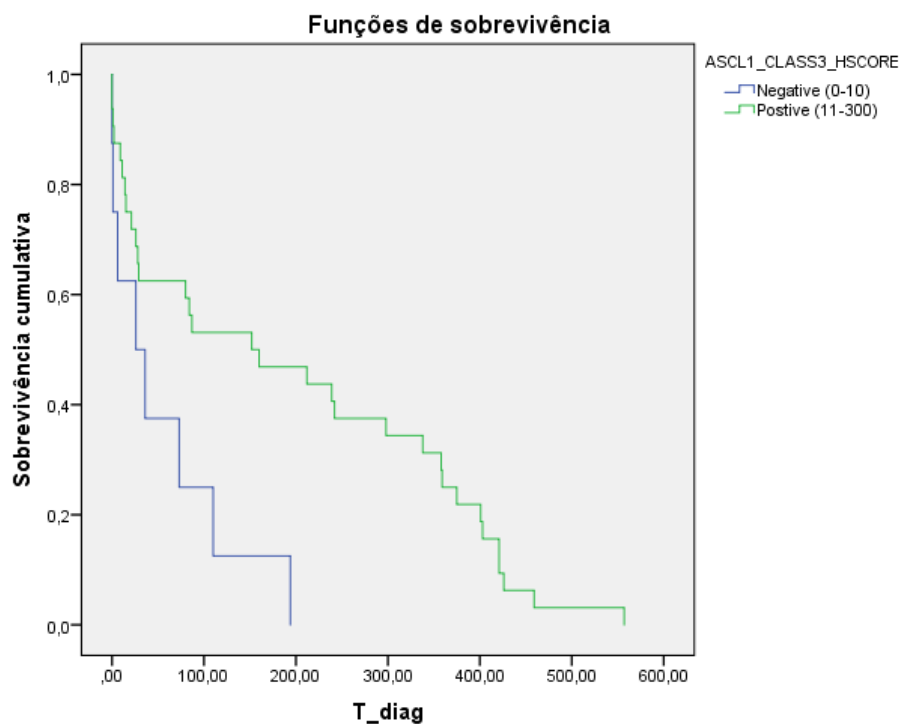


Figura 25. Expressão de ASCL1 qualitativa e impacto na sobrevida em relação ao tempo de diagnóstico ($p=0,013$).

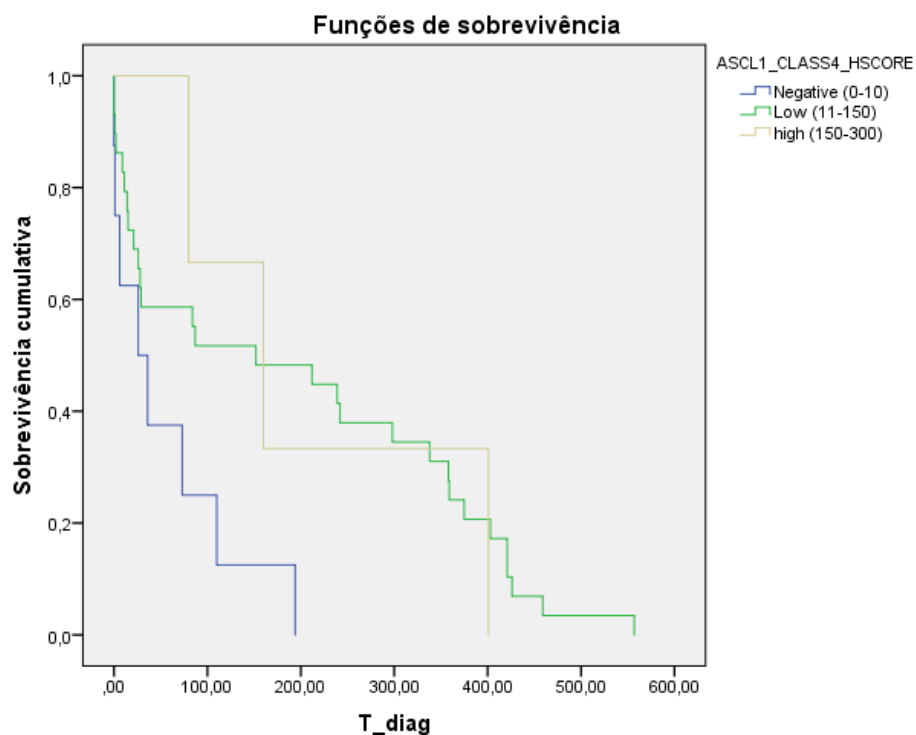


Figura 26. Expressão de ASCL1 em HS e impacto na sobrevida em relação ao tempo de diagnóstico ($p= 0,046$).

5.10 Regressão de Cox – análise multivariada

Para análise multivariada foram utilizadas as variantes epidemiológicas tais como sexo e idade e as variantes associados aos biomarcadores TTF1 e DLL3, mesmo que as variantes não tenham significância nas análises univariadas. As variáveis epidemiológicas e a expressão de TTF1 não demonstrou significância.

Entretanto, foi observado que pacientes DLL3 positivo é um marcador de pior prognóstico em pacientes com SCLC ($p=0,027$; $HR=4,979$), ou seja, que pacientes com DLL3 positivo possuem 4.9 de chances de evoluir para óbito, apresentando uma pior sobrevida (Tabela 06).

Tabela 7. Regressão de Cox para a expressão de TTF1 e DLL3.

Variáveis	Classe	Exp(B)	95% CI for Exp(B)		p valor
			Limite Inferior	Limite Superior	
TTF1 (%)	Low (<50%)	0,993	0,376	2,625	0,989
	High (≥50%)	7,489	0,611	91,82	0,115
DLL3 qualitativo (pos./neg.)	Positivo	4,979	1,199	20,68	0,027
	Negativo	2,199	0,319	15,147	0,423
DLL3 HS	Low (<149)	0,089	0,007	1,197	0,068
	High (≥150)	0,123	0,033	1,501	0,123

6. Discussão

6.1 Variáveis epidemiológicas

Dos casos incluídos no estudo, a maioria foi do sexo feminino, divergindo da literatura, que demonstra que pacientes do sexo masculino são acometidos mais frequentemente. Franco et al. 2021, ao realizar uma coorte com 956 pacientes americanos, demonstrou que desses 78,6% eram do sexo masculino.

Já um estudo desenvolvido na Holanda entre os anos de 1989 e 2020, que buscou demonstrar as mudanças na população acometida por CPCP, indicou que durante os anos de 1989 e 1994 a razão do sexo entre pacientes masculinos-femininos que eram acometidos por CPCP era de 3.6-1. Porém observou-se durante os anos de estudo que o acometimento à população masculina diminuiu em relação a feminina. Como justificativa para tais mudanças, hipotetiza-se o aumento do tabagismo entre as mulheres (Dumoulin et al., 2023).

No presente estudo, foi identificada a prevalência do CPCP em pacientes do sexo feminino, gerando-se a hipótese da relação da carcinogênese com o tabagismo ativo ou passivo, visto que ainda não foi identificada variante germinativa associada à carcinogênese do CPCP. O tamanho pequeno da coorte pode também ter influenciado e causado algum viés.

Não foi possível realizar a obtenção de dados referentes ao hábito de tabagismo e a dados clínicos como a escala de desempenho *Eastern Cooperative Oncologic Group* (ECOG) que podem ser importantes variáveis na avaliação do prognóstico. A ausência desses dados dá-se devido às limitações dos dados dispostos em prontuários eletrônicos ao serviço de patologia. Admite-se que essa é uma das potenciais fraquezas desse trabalho.

A média de idade 71 anos e idade dos mais frequentemente acometidos inferior a 75 anos (67,9%), corrobora com o que é apresentado na literatura (Kalenkerian et al., 2013).

6.2 Expressão dos biomarcadores por IHQ

Para a confirmação do diagnóstico de CPCP, as biópsias avaliadas são submetidas a um exame de IHQ onde busca-se identificar a expressão de marcadores neuroendócrinos. Os principais marcadores avaliados e identificados altamente expressos foram a CgA, a SyP e o CD56.

A SyP é uma glicoproteína integral da membrana de vesículas pré-sinápticas secretoras presentes no cérebro e em células neuroendócrinas. Esse marcador em conjunto com a CgA e o CD56 participam de mecanismos associados à secreção em proteínas neuroendócrinas e frequentemente são expressos em células neuroendócrinas normais.

Em diversos trabalhos é relatado o uso desses biomarcadores na compreensão da diferenciação neuroendócrina e uso destes na diferenciação do CPCP para os carcinomas de grandes células, principalmente ao se realizar o diagnóstico patológico por IHQ (Ganti et al., 2021). No presente trabalho, foi observada a positividade para ao menos um dos marcadores neuroendócrinos para a confirmação do diagnóstico de CPCP. Das proteínas avaliadas, foi observada expressão mais frequente da SyP e CD56.

Outro importante marcador incluído no presente estudo foi o KI67. O KI67 é um marcador nuclear muito utilizado em patologia para a identificação do grau de proliferação celular, visto que é um excelente marcador do índice mitótico. É descrito na literatura que o KI67 pode ser um indicador de proliferação celular até melhor do que a contagem de mitoses por análise histopatológica.

Além disso, o KI67 pode ser utilizado também para a diferenciação de tumores malignos e benignos, assim como um indicador do grau do tumor, diferenciando tumores de alto grau (tumores com alta expressão e muito proliferativos) de tumores de baixo grau (tumores com baixa expressão e pouco proliferativos). O KI67 pode ainda ser utilizado em tumores de mama, próstata e bexiga como indicador de prognóstico, quando alto expresso sendo um indicativo de um pior prognóstico.

No CPCP, é descrito na literatura que o KI67 é observado frequentemente em alta expressão indicando que esse tumor é de alto grau e altamente proliferativo. Além do papel na avaliação do grau tumoral, alguns estudos demonstram o papel do KI67 na compreensão da responsividade à radioterapia (Ishibashi et al. 2017).

Ishibashi et al. em 2017 observou que os pacientes diagnosticados com CPCP com o índice de KI67 igual ou superior a média de expressão dos casos avaliados, apresentaram uma melhor resposta à radioterapia, destacando que esse resultado pode representar uma radiosensibilidade maior nos casos que tem um grau de expressão maior.

Porém, para a compreensão do prognóstico, principalmente em relação ao desfecho de óbito, o KI67 não se apresenta como um forte marcador. Ishibashi et al., 2017, não verificaram uma diferença estatística na sobrevida dos casos com alta e baixa expressão de KI67. No presente trabalho, o KI67 também não se relacionou com a sobrevida global dos pacientes.

Um fator que pode estar associado a dificuldade na compreensão do papel do KI67 no prognóstico desta doença pode ser a rápida progressão dos pacientes ao óbito, o qual pode estar associada a diversos fatores além do KI67. Mais estudos são necessários para a compreensão do efeito dessa proteína no mecanismo fisiopatológico do CPCP.

Alguns outros biomarcadores que podem ser utilizados no estudo do CPCP têm como fim uma melhor classificação. Em 2020 foi feita a proposta de um novo modelo de classificação com base na expressão das proteínas ASCL1, NEUROD1, POU2F3 e YAP1 (Baine et al., 2020). A avaliação desses quatro biomarcadores e como eles se comportam entre si foi realizada em uma coorte de 174 pacientes diagnosticados com CPCP. Foi observada uma expressão concomitante de ASCL1 e NEUROD1 na maioria dos casos de CPCP, caracterizando esses tumores como CPCP de fenótipo fortemente neuroendócrino. Outros marcadores que se associam com esse fenótipo são o BCL2, o DLL3, o CHGA, EZH2, SOX2, NCAM1, TTF1 e RET.

Já os tumores que são de fenótipo neuroendócrino fraco, têm uma baixa expressão de ASCL1 e/ou NEUROD1, e podem expressar os marcadores AURKA, MYC, NCAM1 e INSM1. Foi identificado também CPCP de fenótipo não-neuroendócrino com a ausência da expressão do ASCL1/NEUROD1 e a partir da expressão de POU2F3 e YAP1. Os tumores expressores de POU2F3 podem expressar também outros marcadores como AURKA, BCL2, ASCL2, IGF-1R, MYC, SOX9 e ATM. Os tumores que expressam YAP1 caracterizam-se com um fenótipo inflamado, expressando também TAZ, RB1, PLK, SOX9, PD-L1, mTOR, integrina, laminina e CDK4/6. O efeito dessas diferentes classificações com base nos

marcadores proteicos ainda não está clara, ainda não foi identificada a relação desses biomarcadores com o prognóstico, a sobrevida e a resposta ao tratamento (Baine et al., 2020; Chan et al. 2021).

Alguns estudos demonstram ainda a perda de expressão de ASCL1 e outros marcadores neuroendócrinos com as alterações da plasticidade celular no CPCP indicando que esse tumor pode sofrer muita perda estática do fenótipo, e consequentemente, uma limitação de uso de um único modelo de tratamento específico. Essa perda do ASCL1 se dar devido uma mutação e amplificação do gene *MYC* e a interação dessa mutação com a reativação do Notch e a desdiferenciação da célula para um perfil não-neuroendócrino. As células que sofrem essa alteração poderiam não se beneficiar de terapia anti-DLL3 devido à perda da expressão desse marcador com a progressão da doença (Ireland et al., 2020).

Outro estudo demonstrou que esse mecanismo pode sofrer influência ainda da presença de fibroblastos associados ao tumor no microambiente tumoral que podem levar a um aumento da expressão de *MYC* a partir a via JAK/STAT3 induzida por IL6. No presente trabalho, não foi possível mensurar esses mecanismos associados à plasticidade devido a não realização da avaliação do *MYC* e mecanismos relacionados ao microambiente tumoral (Lu, 2024).

São necessários mais estudos para a compreensão do papel de todos os biomarcadores identificados no desenvolvimento da doença e como a perda dos marcadores durante a progressão do tumor interfere na resistência a quimioterapia, e na resistência de drogas alvo-específicas. A compreensão desses mecanismos pode permitir o uso de protocolos terapêuticos mais específicos que podem beneficiar os pacientes diagnosticadas com CPCP.

6.3 Relação entre as proteínas TTF1, DLL3 e ASCL1

Na presente análise, a positividade para TTF1 diverge do que é descrito na literatura, onde é relatado que o TTF1 é expresso em aproximadamente 90% de casos de CPCP. A divergência encontrada pode dar-se devido ao tamanho da casuística do estudo e também a diferença da população avaliada já que não há muitos dados disponíveis sobre CPCP no grupo estudado. Entretanto, devido a apresentar uma forte

relação com o ASCL1 e DLL3, sugere-se uma possível relação do TTF1 também com mecanismos fisiopatológicos da carcinogênese do CPCP.

Alguns estudos relatam a positividade de TTF1 em tumores neuroendócrinos prostáticos, sugerindo que o TTF1 não tem somente efeito para diferenciação de células pulmonares, mas que também tenha efeito na diferenciação neuroendócrina. Zarco et al. (2017) e Cancel et al. (2021) demonstram uma relação do TTF1 com carcinoma neuroendócrino prostático e indicam o TTF1 como um marcador associado ao prognóstico com relação a sobrevida global.

A maioria dos nossos casos foram positivos para DLL3 e para ASCL1. A alta positividade para ASCL1 e DLL3 sugere que os casos estudados possuem mecanismo fisiopatológico de desregulação neuroendócrina. A positividade para DLL3 e ASCL1 no trabalho corrobora com o que é demonstrado na literatura, que a maioria dos CPCP de subtipo neuroendócrino expressam ambos os marcadores e são possíveis alvos a terapia anti-DLL3. Em uma coorte de 1073 pacientes, Rojo et al. (2020) demonstraram positividade para DLL3 em 85% dos casos. Furuta et al. (2019) realizaram também um estudo onde foram avaliadas 95 amostras de ressecção cirúrgica, e desses casos 83% foram positivos para DLL3, sendo 44 desses casos com expressão de DLL3 superior a 75%. Ao avaliar o ASCL1, observaram positividade de 64% dos casos e uma forte correlação do DLL3 e o ASCL1.

Além das associações entre DLL3 e TTF1, a partir dos resultados qualitativos, quantitativos e semi-quantitativos (HS), foram realizados testes de associação entre os três biomarcadores e as características epidemiológicas. Ao realizar a análise de associação, foi observada uma diferença significativa entre o sexo e a expressão quantitativa de ASCL1, onde os pacientes do sexo masculino apresentaram uma média maior de células positivas para ASCL1 comparados aos pacientes do sexo feminino. Hu et al. (2022) demonstraram resultados parecidos com o descrito anteriormente em relação ao sexo dos pacientes, onde foi apresentado que 70,85% dos pacientes que apresentaram expressam de ASCL1 eram do sexo masculino enquanto que 29,15% eram do sexo feminino. Porém, não foram identificados efeitos biológicos e prognóstico da relação do sexo com a expressão do ASCL1.

Em relação a idade, foi observada uma associação da expressão de TTF1 com a idade, os pacientes com idade menor do que 75 anos apresentaram expressão de TTF1 diminuída, enquanto que pacientes com idade igual ou superior a 75 anos

obtiveram menor expressão do TTF1. Nenhum estudo anterior demonstrou uma relação entre a expressão de TTF1 com outras variáveis clínicas. A função do TTF1 no CPCP ainda não é clara, e devido à rápida progressão do tumor com a resistência a terapia e o desfecho em óbito, torna-se um desafio compreender a importância do TTF1 nos diferentes grupos de idades, visto que não foi observado uma relação entre a idade e o prognóstico.

Ao se realizar a comparação da diferença das médias de expressão da SyP, CgA e CD56 com o TTF1, DLL3 e ASCL1 só foi observada uma diferença de expressão qualitativa da SyP em relação ao HS do ASCL1, onde nos casos positivos para SyP obteve-se uma média de 54,06% de células aumentada de ASCL1. Esse achado sugere uma relação molecular do ASCL1 com a atividade neuroendócrina a partir da expressão da SyP, sustentando o poder da avaliação da SyP como principal marcador de diferenciação neuroendócrina.

Para avaliar a diferença de expressão de TTF1 em relação às outras proteínas e para destacar os diferentes tipos de análises patológicas, dividiu-se a avaliação do TTF1 em duas classes, sendo a primeira qualitativa e a segunda quantitativa. Em relação a primeira classe de TTF1, foi observada uma diferença da média de expressão de DLL3 em relação aos grupos positivos e negativos. Os casos que foram negativos para TTF1 apresentaram uma média menor (19,15%) de células positivas para DLL3, em relação aos casos positivos (38,95%), e ao realizar a mesma análise para comparação das médias de HS do DLL3 em relação aos grupos qualitativos de TTF1, verificou-se a média de HS 24,73 nos casos negativos para TTF1, enquanto que nos casos positivos a média de HS foi de 68,09. Ao realizar a avaliação da classe quantitativa do TTF1, não foi identificada diferença estatística para expressão de DLL3 em relação à baixa e alta expressão de TTF1. Esses achados sugerem que o TTF1 qualitativo pode se comportar como um preditor da expressão de DLL3. A relação biológica entre essas duas proteínas não é clara, mas sabe-se que o TTF1 tem um papel na morfogênese das células do pulmão e o DLL3 tem um papel na diferenciação neuroendócrina a partir da regulação do ASCL1. Carnell et al. (2017) realizaram um estudo com cultura de células, onde avaliou a correlação entre a expressão de mRNA de TTF1 e DLL3 e observou uma alta correlação com o índice de 0,53 ($p < 0,001$).

No estudo clínico *TRINITY* em fase I desenvolvido no hospital *MD Anderson* onde era testado a droga rovalpituzumab tesirina, haviam disponíveis os resultados

qualitativos para ambos os marcadores estavam disponíveis em 26 casos, e foi observada uma concordância em 23 dos 26 pacientes estudados ($p=0,031$). Demonstra-se então que a avaliação qualitativa do TTF1 pode ser um importante marcador para prever a expressão do DLL3 e a resposta a terapias alvos (Cardnell et al. 2017).

6.4 Aspectos prognósticos relacionados às proteínas estudadas

Obteve-se o dado de sobrevida de 49 pacientes, e a partir disso foi conduzido teste de Log Rang para se compreender o impacto das variáveis estudadas na sobrevida, utilizando como a data inicial, a data do diagnóstico, e a data de desfecho sendo a data de óbito. Não foi observado significância estatística em relação a idade e o sexo, indicando que essas variáveis epidemiológicas não possuem relevância para o prognóstico. Em relação as proteínas avaliadas, não houve significância estatística da expressão de KI67, TTF1 e DLL3.

Apesar de ser um marcador de proliferação celular, nenhum estudo anteriormente indicou o KI67 como marcador de relevância prognóstica para o CPCP, visto que todos os casos possuem alta expressão dessa proteína. Entretanto, alguns estudos já demonstraram a relação do DLL3 com uma pior sobrevida. No estudo de Furuta et al. (2019) foi observado que os pacientes com alta expressão de DLL3 possuíam uma média de 24,4 meses de sobrevida global, enquanto os pacientes com baixa expressão apresentaram 33,3 meses.

No presente trabalho, apesar de não ter apresentado significância para a avaliação da sobrevida global pelo teste de Log Rank, realizou-se uma regressão de Cox para sobrevida global e verificou-se que nos pacientes que possuem DLL3 positivo possuem 4,9 vezes mais chance de óbito comparado aos pacientes negativos sugerindo que o DLL3 pode possuir um papel relevante no prognóstico, entretanto, a comprovação dessa hipótese é dificultada devido ao baixo N amostral e aos poucos dados de sobrevida obtidos.

Ao avaliar a sobrevida dos pacientes em relação ao ASCL1, foi observado que os pacientes que possuíam ASCL1 negativo apresentaram uma menor sobrevida global em relação aos pacientes ASCL1 positivo. O ASCL1 possui um importante papel na regulação da doença e caracteriza o CPCP como do subtipo neuroendócrino,

de acordo com a classificação de Baine et al (2020). Quando o ASCL1 está negativo, então sugere-se que o mecanismo que está conduzindo relaciona-se a perda do perfil neuroendócrino associando-se a um pior prognóstico.

Esse achado evidencia a importância de uma melhor caracterização dos casos de CPCP, não somente em um subtipo baseado na histologia e no perfil de marcadores neuroendócrinos, mas no comportamento biológico da doença através dos marcadores que são expressos. Apesar de ser uma doença há muito tempo conhecida ainda pouco se compreende em relação ao seu perfil genômico, transcriptômico e proteômico e o papel dessas vias no prognóstico e na resposta terapêutica.

6.5 Limitações do estudo

O CPCP é uma doença desafiadora em suas diferentes faces. Os pacientes que recebem esse diagnóstico possuem uma baixa taxa de sobrevida e a condução terapêutica é bem limitada. O desenvolvimento de um estudo que foca nos mecanismos patológicos da população torna-se também desafiador devido a esses fatores. Devido ser um diagnóstico pouco frequente, o N amostral também é diminuído, impedindo-se assim que se tenha uma boa representatividade dos pacientes.

A pouca frequência desse diagnóstico entre os casos diagnosticado com câncer de pulmão torna-se um fator limitante, visto que os pacientes após o diagnóstico possuem um tempo de sobrevida bem curto, devido ao próprio mecanismo da doença, impedindo assim a coleta de mais dados clínicos relevantes ao estudo e impedindo um melhor acompanhamento do comportamento da doença.

Um fator limitante também no desenvolvimento do estudo com CPCP é a escassez do material biológico nas biópsias pulmonares, impedindo a possibilidade da realização de todos os biomarcadores por IHQ em todas as amostras incluídas no estudo. Outro fator é a escassez dos dados clínicos e a fraca comunicação entre o serviço clínico e o serviço de patologia, o que dificulta a coleta de mais dados clínicos.

O estudo patológico é uma ferramenta essencial para o diagnóstico e a caracterização do CPCP e denota-se a importância da melhor comunicação entre o oncologista clínico e a equipe de patologia, para uma melhor condução desde o

diagnóstico ao cuidado com o paciente e até o desenvolvimento de pesquisas que possam beneficiar os pacientes incluídos nos estudos.

7. Considerações finais

No presente estudo, foi identificado a frequente expressão dos marcadores DLL3 e ASCL1 nos casos diagnosticados com CPCP na população avaliada. Esse é o primeiro trabalho que busca compreender as características biológicas associadas a essa doença na população do Ceará. Durante o desenvolvimento do trabalho, foi observada uma distinta relação entre as variáveis incluídas no estudo. Foi identificada uma relação entre a expressão do marcador TTF1 e a diferença de idade, onde esse marcador demonstrou-se como mais frequente em pacientes com idade inferior a 75 anos. Além disso, verificou-se também uma relação entre a expressão de ASCL1 e o sexo, tendo uma maior expressão dessa proteína nos pacientes do sexo masculino. A função dessas duas proteínas em relação as variáveis epidemiológicas ainda não está claro, visto que há poucos estudos que abordem a fisiopatologia dessa doença.

Foi evidenciada também uma relação entre a expressão de TTF1, DLL3 e ASCL1 e uma correlação estatística entre a expressão de TTF1 e DLL3. A relação biológica entre o DLL3 e o ASCL1 é bem clara, entretanto, ainda não é claro a relação biológica entre essas e o TTF1. Entretanto, sabe-se que o TTF1 é um fator de transcrição que atua na diferenciação de células pulmonares. São necessários mais estudos para compreender os mecanismos biológicos que surgem a partir da interação dessas três proteínas.

O DLL3 é uma importante proteína que é regulada pelo ASCL1 e é expressa em alguns tumores neuroendócrinos e possui a função de regulação do Notch. O Notch é um receptor que no CPCP possui um papel oncoprotetor ao regular a expressão do ASCL1, gerando um mecanismo de retroalimentação. O DLL3 foi expresso na maioria dos casos avaliados, e foi identificado através de uma análise multivariada com o teste de regressão de Cox que os pacientes que expressam DLL3 possuem quatro vezes mais chances de vir a óbito, quando considerado as outras variáveis do estudo.

O interesse no estudo dessa proteína cresceu nos últimos 5 anos devido ao surgimento de estudos com o Rolvapituzumab-tesirina, um anticorpo monoclonal com propriedades anti-DLL3. Em estudos clínicos posteriores, foi observado que esse fármaco não possuía eficácia clínica. Entretanto, surgiram novas modalidades terapêuticas que buscaram utilizar essa proteína como alvo terapêutico no CPCP. Devido a essa possibilidade de ser um alvo terapêutico e a relação biológica com o ASCL1, a alta expressão do DLL3 nos casos incluídos no estudo abre novas janelas no campo da patologia e oncologia para novas abordagens dos pacientes com CPCP.

Além da alta expressão do DLL3, a identificação da alta expressão de ASCL1 foi um importante achado patológico. Sabe-se que o ASCL1 possui um importante papel na carcinogênese e neurodesenvolvimento das células do CPCP, alguns trabalhos demonstram essa proteína como a principal associada a diferenciação neuroendócrina do CPCP. Essa proteína foi expressa na maioria dos casos avaliados e foi identificado que os pacientes que expressavam o ASCL1 possuíam uma maior sobrevida em relação aos pacientes que não expressaram. O papel dessa proteína no prognóstico também é pouco claro, visto que uma pequena porcentagem dos casos não expressou o ASCL1. Estudos anteriores, demonstraram grupos distintos de CPCP associados a falta de expressão de ASCL1, a baixa expressão de marcadores neuroendócrinos e TTF1. Um fator limitante importante para a análise de sobrevida foi a pouca quantidade de dados clínicos disponíveis como início do acompanhamento clínico e a indisponibilidade de dados de sobrevida de alguns casos.

Com todos os dados gerados, a avaliação dessa via do DLL3 e ASCL1, e a identificação de diferentes grupos biológicos associados à essa proteína, torna-se algo muito promissor. São geradas novas possibilidades de estudo que visem os mecanismos genômicos e transcriptômicos que podem estar associados à diferentes grupos biológicos descritos em estudos prévios, e a expressão diferencial do DLL3 e ASCL1, assim como o prognóstico e a resposta a terapia.

8. Conclusão

Pode-se concluir que há uma relação evidente entre o DLL3, ASCL1 e o TTF1 nos casos, e esse achado junto com o que é demonstrado na literatura indica que essas proteínas possuem um papel relevante no desenvolvimento do CPCP, além de poderem estar relacionadas ao prognóstico e a sobrevida. Além disso, a perda da expressão de marcadores neuroendócrinos com a diminuição da expressão de ASCL1 sugerem processos de dediferenciação que se relacionam a mecanismos moleculares que podem contribuir com a resistência a quimioterapia. São necessários mais estudos que visem as alterações moleculares com os mecanismos patológicos que sustentam a progressão da doença, e como esses mecanismos podem contribuir com a resistência terapêutica e a relação desses com as proteínas estudadas e com a progressão da doença.

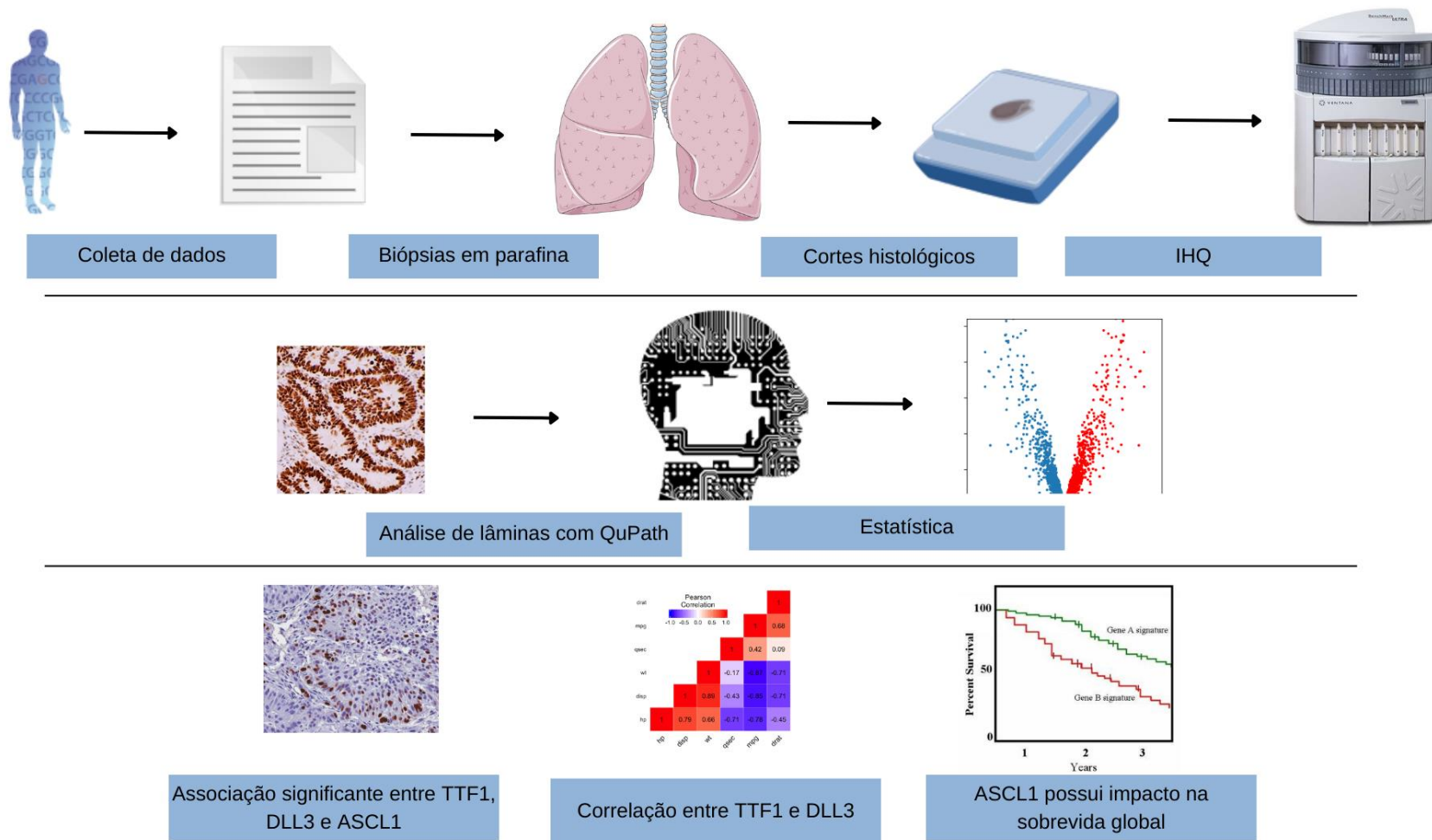


Figura resumo do trabalho

9. Referências

ANTONIA, S. J. et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 7, p. 883–895, jul. 2016.

ARRIOLA, E. et al. Outcome and Biomarker Analysis from a Multicenter Phase 2 Study of Ipilimumab in Combination with Carboplatin and Etoposide as First-Line Therapy for Extensive-Stage SCLC. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1511, 1 set. 2016.

AZZOPARDI, J. G. Oat-cell carcinoma of the bronchus. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 78, n. 2, p. 513–519, out. 1959.

BAINE, M. K. et al. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 12, p. 1823–1835, 1 dez. 2020.

BASUMALLIK, N.; AGARWAL, M. Small Cell Lung Cancer. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482458/?log>>. Acesso em: 28 jun. 2024.

BORROMEO, M. D. et al. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. **Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1259–1272, 2 ago. 2016.

BOUYAHYA, A. et al. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 367, 25 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Câncer de Pulmão.[Brasília]:Ministério da Saúde. 04 jun. de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>. Acesso em: 05 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. ESTIMATIVA - Incidência de Câncer no Brasil 2020. [Brasília]: [2019?]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 06 ago. 2023.

CARDNELL, R. J. et al. Protein expression of TTF1 and cMYC define distinct molecular subgroups of small cell lung cancer with unique vulnerabilities to aurora kinase inhibition, DLL3 targeting, and other targeted therapies. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 73419–73432, 1 set. 2017.

CARLOS MARTINEZ RUIZ et al. Genomic–transcriptomic evolution in lung cancer and metastasis. **Nature**, v. 616, n. 7957, p. 543–552, 12 abr. 2023.

CHEN, Y.; LI, H.; FAN, Y. Shaping the tumor immune microenvironment of SCLC: Mechanisms, and opportunities for immunotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 120, p. 102606, 1 nov. 2023.

CHO, D. C. et al. Safety and clinical activity of durvalumab in combination with tremelimumab in extensive disease small-cell lung cancer (ED-SCLC). **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 15_suppl, p. 8517–8517, 20 maio 2018.

CHUNG, H. C. et al. Pembrolizumab After Two or More Lines of Previous Therapy in Patients With Recurrent or Metastatic SCLC: Results From the KEYNOTE-028 and KEYNOTE-158 Studies. **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 15, n. 4, p. 618–627, 1 abr. 2020.

D, H.; RA, W. The Hallmarks of Cancer. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10647931/>>.

DUTTA, R. et al. Mapping the immune landscape in small cell lung cancer by analysing expression of immuno-modulators in tissue biopsies and paired blood samples. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3739, 6 mar. 2023.

EUA. American Cancer Society. Small Cell Lung Cancer Stages. [EUA]: American Cancer Society: atualizado em 29 jan. 2024. Disponível em: [https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging-sclc.html#:~:text=For%20treatment%20purposes%2C%20most%20doctors,try%20to%20cure%20the%20cancer](https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging-sclc.html#:~:text=For%20treatment%20purposes%2C%20most%20doctors,try%20to%20cure%20the%20cancer.). Acesso em: 04 mai. 2024.

FURUTA, M. et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer (HOT1702). **Oncologist**, v. 24, n. 11, p. e1172–e1179, 8 maio 2019.

GANTI, A. K. P. et al. **Small Cell Lung Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology**. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 19, n. 12, p. 1441–1464, 1 dez. 2021.

GE, G.-Z.; XU, T.-R.; CHEN, C. Tobacco carcinogen NNK-induced lung cancer animal models and associated carcinogenic mechanisms. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 47, n. 7, p. 477–487, 3 jun. 2015.

GEORGE, J. et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 47–53, 13 jul. 2015.

GIFFIN, M. J. et al. P3.12-03 Targeting DLL3 with AMG 757, a BiTE® Antibody Construct, and AMG 119, a CAR-T, for the Treatment of SCLC. **Journal of Thoracic Oncology**. v. 13, n. 10, p. S971–S971, 1 out. 2018.

GREPHMED. SCLC staging, [s.d.]. Disponível em: <https://www.grepmed.com/images/12465/lung-cancer-staging-diagnosis-smallcell>
Acesso em: 05 jun. 2023.

HARBECK, N. et al. Adjuvant abemaciclib combined with endocrine therapy for high-risk early breast cancer: updated efficacy and KI67 analysis from the monarchE study. **Annals of Oncology**, v. 32, n. 12, p. 1571–1581, 1 dez. 2021.

HECHT, S. S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 6, p. 559–603, 1 jun. 1998.

HECHT, S. S. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 8, p. 461–469, ago. 2002.

HU, C. et al. ASCL1 and DLL3 expressions and their clinicopathological implications in surgically resected pure small cell lung cancer: A study of 247 cases from the National Cancer Center of China. **Thoracic Cancer**, v. 13, n. 3, p. 338–345, 1 fev. 2022.

IDIKIO, H. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 3, n. 2, p. 169–176, 25 nov. 2009.

ISHIBASHI, N. et al. Correlation between the KI67 proliferation index and response to radiation therapy in small cell lung cancer. **Radiation Oncology**, v. 12, n. 1, 13 jan. 2017.

JOHNSON, D. B. et al. Prolonged administration of oral etoposide in patients with relapsed or refractory small-cell lung cancer: a phase II trial. v. 8, n. 10, p. 1613–1617, 1 out. 1990.

KALEMKERIAN, G. P. et al. **Small cell lung cancer**. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, v. 11, n. 1, p. 78–98, 2013.

KIM, J. W.; KO, J. H.; SAGE, J. DLL3 regulates Notch signaling in small cell lung cancer. **iScience**, v. 25, n. 12, p. 105603, dez. 2022.

MICKE, P. et al. Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer—what limits limited disease? **Lung Cancer**, v. 37, n. 3, p. 271–276, set. 2002.

MORIMOTO, T. et al. Autopsy case of a patient with rapidly progressive combined small-cell lung carcinoma with spindle-shaped cell tumor. **Thoracic Cancer**, v. 13, n. 15, p. 2279–2282, 1 ago. 2022.

NA, F. et al. KMT2C deficiency promotes small cell lung cancer metastasis through DNMT3A-mediated epigenetic reprogramming. **Nature Cancer**, v. 3, n. 6, p. 753–767, 1 jun. 2022.

NELSON, B. R. et al. Acheate-scute like 1 (Ascl1) is required for normal Delta-like (Dll) gene expression and Notch signaling during retinal development. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 9, p. 2163–2178, 1 set. 2009.

NICHOLSON, A. G. et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the Clinical and Pathologic Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. **Journal of thoracic oncology** : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, v. 11, n. 3, p. 300–11, 2016.

NUSSINOV, R. et al. Review: Precision medicine and driver mutations: Computational methods, functional assays and conformational principles for interpreting cancer drivers. **PLoS Computational Biology**, v. 15, n. 3, 28 mar. 2019.

OWEN, D. H. et al. DLL3: an emerging target in small cell lung cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, 18 jun. 2019.

PATEL, S.; DAS, M. Small Cell Lung Cancer: Emerging Targets and Strategies for Precision Therapy. **Cancers**, v. 15, n. 16, p. 4016–4016, 8 ago. 2023.

PEIFER, M. et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. **Nature Genetics**, v. 44, n. 10, p. 1104–1110, 1 out. 2012.

PIETANZA, M. C. et al. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Temozolomide in Combination With Either Veliparib or Placebo in Patients With Relapsed-Sensitive or Refractory Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 23, p. 2386–2394, 10 ago. 2018.

RUDIN, C. M. et al. Treatment of Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the American College of Chest Physicians Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 34, p. 4106–4111, 1 dez. 2015.

SHEPHERD, F. A. et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals Regarding the Clinical Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming (Seventh) Edition of the Tumor, Node, Metastasis Classification for Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 2, n. 12, p. 1067–1077, dez. 2007.

SHI, X. et al. Genetic alterations and protein expression in combined small cell lung cancers and small cell lung cancers arising from lung adenocarcinomas after therapy with tyrosine kinase inhibitors. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, 28 abr. 2016.

Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, 20 abr. 2021.

STAHSEL, R. A. Diagnosis, staging, and prognostic factors of small cell lung cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 3, n. 2, p. 306–311, abr. 1991.

THUNNISSEN, E. et al. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 12, n. 2, p. 334–346, fev. 2017.

TIAN, Y. et al. Potential immune escape mechanisms underlying the distinct clinical outcome of immune checkpoint blockades in small cell lung cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, 28 jun. 2019.

TRAVIS, W. D. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. **Modern Pathology**, v. 25, n. S1, p. S18–S30, jan. 2012.

WALLACE, W. A.; DORWARD, D. A.; SALTER, D. M. Immunohistochemistry for small - cell carcinoma: a potential diagnostic pitfall. **Histopathology**, v. 74, n. 5, p. 792–794, 28 jan. 2019.

WANG, S. et al. Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 8, p. 1599–1622, ago. 2019.

WANG, Y. et al. New insights into small-cell lung cancer development and therapy. **Cell Biology International**, v. 44, n. 8, p. 1564–1576, 1 ago. 2020.

WEBPATHOLOGY.Small Cell Lung Cancer, [s.d]. Disponível em: <https://www.webpathology.com/>. Acesso em: 15 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Lung Cancer. [Geneva]: World Health Organization. 26 jun. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>. Acesso em: 06 ago. 2023.

YANG, S.; ZHANG, Z.; WANG, Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, 2 maio 2019.

ZHANG, H. et al. Targeting the Notch signaling pathway and the Notch ligand, DLL3, in small cell lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 159, p. 114248, mar. 2023.

ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO

Relationship between the expressions of DLL3, ASC1, TTF-1 and Ki-67

First steps of precision medicine at SCLC

Samuel Silva^{1,2}, Juliana Cordeiro, PhD², Cleto Nogueira^{1,2}, Raquel Feijo ^{1,3}, Francisco Martins Neto, MD³, Laura Cardoso Marinho,^{1,2}, Guilherme Sousa, MS², Denninghoff V^{4,5}, PhD, Fabio Tavora, MD, PhD*^{1,2}

1. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Fortaleza (Ceará), Brazil.
2. ARGOS Laboratory, Fortaleza (Ceará), Brazil.
3. Messejana Heart and Lung Hospital, Brazil.
4. Molecular Oncology Clinical Lab, University of Buenos Aires (UBA)—National Council for Scientific and Technical Research (CONICET), Argentina.
5. Liquid Biopsy and Cancer Interception Unit, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research (Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government), Granada, Spain.

*Corresponding Author: Fabio Tavora. Federal University of Ceará. Monsenhor Furtado, s/n. 60430-275. Fortaleza, Brazil. E-mail:fabio.tavora@argospatologia.com

Disclosure of funding: the study received no external funding of any sort.

Abstract

This study presents an observational, cross-sectional analysis of 64 patients diagnosed with small cell lung cancer (SCLC) at a reference laboratory for thoracic pathology between 2022 and 2024. The primary objective was to evaluate the expression of Delta-like ligand 3 (DLL3) and other neuroendocrine markers such as TTF-1, Ki-67, Chromogranin, and Synaptophysin, utilizing both traditional immunohistochemistry and digital pathology tools. Patients were primarily older adults, with a median age of over 71, and most biopsies were obtained from lung parenchyma. Immunohistochemistry (IHC) was performed using specific monoclonal antibodies, with DLL3 showing variable expression across the samples. Notably, DLL3 was expressed in 72.3% of the cases, with varied intensities and a semi-quantitative H-score applied for more nuanced analysis. TTF-1, traditionally not a conventional marker for the diagnosis of SCLC, was positive in half of the cases, suggesting its potential as a biomarker. The study underscores the significant variability in the expression of neuroendocrine markers in SCLC, with implications for both diagnosis and potential therapeutic targeting. DLL3, particularly, shows promise as a therapeutic target due to its high expression rate in the cohort. The use of digital pathology software QuPath enhanced the accuracy and depth of analysis, allowing for detailed morphometric analysis and potentially informing more personalized treatment approaches. The findings emphasize the need for further research into the role of these markers in the management and treatment of SCLC, considering the poor prognosis and high mortality rate observed in the cohort.

Introduction

Small cell lung cancer (SCLC) is an aggressive type of lung cancer that contributes to approximately 15% of lung cancer cases annually. [1] Patients with SCLC have a poor prognosis, with a 5-year survival rate ranging from 3% to 27%, depending on the stage of the disease. [2] SCLC is a highly proliferative lung cancer that is not amenable to surgery in most cases due to rapid growth, early spread, and a tendency to develop drug resistance and relapse. [3] Genes and genomics/proteomic modifications related to the development, plasticity, and progression of SCLC, which could be identified as possible biomarkers for targeted therapy of this deadly disease, were already described: TP53/RB1 (98%/91%), TP73 (13%), PI3K3CA (15%), PTEN (9%), FGFR1 (8%), Hedgehog Signaling Pathway (80%), MYC (20%), KMT2D (13%), and NOTCH1 signaling (25%). [4]

By July 19, 2022, 107 patients received Tarlatamab in dose exploration (0.003 to 100 mg; n = 73) and expansion (100 mg; n = 34) cohorts. The median progression-free and overall survival were 3.7 months (95% CI, 2.1 to 5.4) and 13.2 months (95% CI, 10.5 to not reached), respectively. Exploratory analysis suggests that selecting for increased DLL3 expression can increase clinical benefit. [5] On May 16, 2024, the US Food and Drug Administration (FDA) granted accelerated approval to tarlatamab-dlle for extensive-stage small cell lung cancer (ES-SCLC) with disease progression on or after platinum-based chemotherapy. [6] A phase 2 study was conducted on subjects with relapsed/refractory SCLC after two or more prior lines of treatment. [7] Efficacy, safety, tolerability, and pharmacokinetics of Tarlatamab were evaluated in 99 patients enrolled in DeLLphi-301, an open-label, multicenter, multi-cohort study. [7] Tarlatamab, administered at a 10-mg dose every two weeks, showed antitumor activity with durable objective responses and promising survival outcomes in patients with previously treated SCLC. No new safety signals were identified. [7] Tarlatamab (AMG 757) is the first DLL3-targeting bispecific T-cell engager therapy that activates a patient's T cells to attack DLL3-expressing tumor cells, which is a

4

bispecific T-cell engager molecule that binds both DLL3 and CD3, leading to T-cell-mediated tumor lysis. [8]

DLL3 is a protein that plays a critical role in the Notch signaling pathway, which is involved in cell differentiation, proliferation, and apoptosis. [9] [10] In humans, DLL3 is predominantly expressed in neuroendocrine tissues. It has been aberrantly expressed on the surface of up to 80-85% of SCLC cells and minimally expressed in normal tissues, making it a compelling therapeutic target [5], such as in other neuroendocrine carcinomas. [10] [11] It is expressed both in the cytoplasm and in the membrane of SCLC cells. [12] Despite the growing body of knowledge on the role of DLL3 in lung cancer, there remains a significant gap in our understanding of the actual expression rate of DLL3 when assessed by immunohistochemistry (IHC) in routine clinical laboratories. In a real-world study of DLL3 as an SCLC therapeutic target, positive DLL3 expression (defined as ≥ 25 % of tumor cells) was identified in 895/1050 (85%) patients with one specimen and evaluable DLL3 expression; 719/1050 (68 %) patients had high DLL3 expression (defined as ≥ 75 % of tumor cells). There was no significant difference in median overall survival from SCLC diagnosis for evaluable patients with non-missing data based on DLL3 expression (negative DLL3 expression [n = 139], 9.5 months; positive DLL3 expression [n = 747], 9.5 months; all evaluable patients [n = 893, 9.5 months). [13] With the advent of anti-DLL3 therapies, studies of interrelationships between different molecules still need to be included, such as thyroid transcription factor-1 (TTF-1), which is involved in the differentiation of lung epithelial cells and is commonly expressed in high-grade lung and neuroendocrine adenocarcinomas, or Ki-67 protein (MKI67) which is a cellular marker for proliferation, found in the nucleus of cancer cells that are actively growing and dividing. [14] [15] These relationships could provide insights into the tumor biology of SCLC and rare tumors such as the Large-Cell Neuroendocrine Carcinomas (LCNEC), representing 1-3% of all primary lung cancers, and potentially guide treatment decisions and prognostication in a clinical setting. [16] [17]

5

In this study, the qualitative and quantitative protein expression of DLL3, ASCL1, TTF-1, and Ki-67 was retrospectively analyzed by digital pathology in patients with SCLC, and this expression was linked to median overall survival using a multivariate mathematical model.

Methods

Cohort description

This observational, cross-sectional, and analytical study had a cohort of sixty-four sequential patients recruited between May 2018 and November 2022. Biopsies were analyzed in a reference thoracic pathology laboratory. Data were collected from electronic medical records in the respective hospital units where each patient was diagnosed and followed up. Inclusion criteria were defined as adults over 18 years of age with transbronchial biopsy of a primary SCLC tumor confirmed by histological analysis, sufficient material for the study of HE, DLL3, ASCL1, TTF-1, and Ki-67, and clinical follow-up to death. Exclusion Criteria were under 18, insufficient material for IHC analysis, lack of clinical data, or loss of clinical follow-up. This protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee at the Federal University of Ceará (Protocol CAAE 59399322.9.0000.5049). The study was conducted under the Good Clinical Practice Guidelines and the Helsinki Declaration.

Immunohistochemistry

Each tumor formalin-fixed, and paraffin-embedded tissue block was sectioned at 2 μ m. A hematoxylin and eosin (HE) staining was performed. Slides were stained with anti-DLL3-specific monoclonal antibody (dilution 1:100; clone EPR22592-18; cat. no. ab229902; Abcam, Cambridge, UK); anti-ASCL1 polyclonal antibody (dilution 1:200; cat. no. PA5-77868; Invitrogen, Massachusetts, USA); anti-TTF-1 specific monoclonal antibody (prediluted; clone 8G7G3/1; cat. no. 790-4398; Ventana Medical Systems, Inc.); and anti-Ki-67 monoclonal specific antibody (prediluted; clone 30-9; cat. no. 790-4286; Ventana Medical Systems, Inc.). We used the Ultraview DAB IHC Detection Kit (cat. no. 760-500; Ventana Medical Systems, Inc.), which includes a blocking reagent and a secondary antibody conjugated with polymer. Staining was performed using standard automated immunostaining equipment (Ultraview

7

Benchmark Ventana; Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) according to the manufacturer's protocol. IHC slides had a positive control tissue: glioblastoma for DLL3, neuroendocrine tumor for ASCL1, thyroid tissue for TTF-1, and tonsil tissue for Ki-67. Positive and negative control slides were included in each assay. The slides were analyzed by optical microscopy to evaluate the positive and negative controls.

Digital Pathology analysis

ASCL1, DLL3, TTF-1 and Ki-67 slides were scanned using the KFBIO scanner equipment at 40x magnification. The SVS files were then imported to QuPath® software v. 0.5.0 as "DAB Brightfield," which allowed sample analysis. The files were loaded onto a project in QuPath software (QuPath source code, documentation, and links to the software download are available at <https://qupath.github.io>).

QuPath's segmentation feature can detect thousands of cells, identify them as objects in a hierarchical manner below the annotation or cases, and measure cell morphology and biomarker expression simultaneously (12). QuPath has recently been used as annotation software in deep learning to distinguish small-cell from large-cell neuroendocrine lung cancer. [18]

For each slide the stain vectors were recalibrated on "Estimate Stain Vector" with automatic calibration. The positive cell detection was performed by the nucleus evaluation according to default parameters; the nucleus staining intensity threshold was set as 0.1, and the cell expansion was set to default. The DAB intensity threshold was standardized according to each marker. For DLL3, the "thresholdCompartment" was set to be "Cytoplasm: DAB OD Mean," and for ASCL1, Ki-67, and TTF-1 the "thresholdCompartment" was set to be "Nucleus: DAB OD mean."

For H-Score analysis, the intensity threshold parameters were set with three threshold points: the "thresholdPositive1" was set to 0.2, the "thresholdPositive2" was set to 0.4, and the "thresholdPositive3" was set to 0.6. The analysis was performed for each marker and the results were obtained as positive and

8

negative, percentage and HScore. Figure 1 depicts an example of DLL3 expression in a tumor showing the deployment of QuPath algorithm to assess cells with zero, low, moderate and high expressions, which is color coded and curated by an experienced pathologist. Snapshots of representative images were exported to ImageJ for storage and illustrations (Figures 1 and 2), exported in high quality using TIFF extensions with 300 dpi and at least 5 inches in the shortest axis.

Scoring criteria Biomarkers

For DLL3, ASCL1, and TTF-1, IHC scoring was performed in two ways. First, the staining was semi-quantitatively evaluated using an immunohistochemical H-score (HS) method by an experienced thoracic pathologist and also by using a algorithm developed and of free access by QuPath. [30-33] The H-score method was applied based on the extent and intensity of cytoplasmic staining (1, 2, or 3) multiplied by the percentage of cells positive (proportion score), with a potential score ranging from 0 to 300.

The H-score is a classic semi-quantitative method used in pathology to assess the intensity and distribution of immunohistochemical staining in tissue samples. It is particularly valuable in research for evaluating the expression levels of various proteins within specific cells or tissue regions, which can be crucial for diagnosing and determining the prognosis of diseases, especially cancer. It has been used in several organ systems and cancer types, including oral squamous cancer, kidney cancer, breast cancer and lung cancer. [19-25]

Over the past decade, several studies [19–27] have developed automated algorithms for the quantitative assessment of IHC images. However, significant efforts are still needed to improve quantification accuracy and efficiency. [26-29] More recently, several articles have automated the use of H-scoring to increase accuracy and reproducibility, using the QuPath software, as in the current study. [30-33]

The second way was the analysis of the percentage of positive cells (0 - 100%). The cut-off of negative and positive, low and high, was according to each protein expression profile and was used as described in previous studies. [34] DLL3 and TTF-1 were considered positive if at least 1% of tumor cells had cytoplasmic and/or membranous on DLL3 and nuclear staining on TTF-1. Both proteins were considered low expression if positive in less than 50% of tumor cells, while high expression was assumed if the protein was positive in more than 50% of tumor cells. ASCL1 was considered positive if at least 10% of tumor cells had nuclear staining. ASCL1 – H-score patients ≤ 10 were considered negative, H-scores of 11-149 were considered low expressed, and 150-300 were considered high expressed.

Chromogranin and synaptophysin were considered positive if at least 5% of tumor cells had cytoplasmic and/or membranous staining. In addition, a semi-quantitative scoring of 1, 2, and 3 intensity of staining was estimated by at least one pathologist. CD56 staining was considered only as positive when shown a membranous staining, or negative. [35] [36]

The most recent 2021 WHO classification identifies the three markers indicative of neuroendocrine (NE) differentiation: chromogranin A, synaptophysin, and CD56. In addition, it mentions INSM1 as a potential new marker. [37] Determining positivity for these markers lacks defined thresholds, necessitating consideration of morphological features. Chromogranin and synaptophysin are genuine indicators of NE differentiation, as they bind to epitopes present in neurosecretory granules or synaptic vesicles. In SCLC, focal positivity for chromogranin A in some tumor cells is diagnosed. [38, 39]

Statistical analysis

Univariate descriptive statistics were performed on the recollected data. Normal variables were reported by their mean and standard deviation, and non-normal counterparts by median and interquartile range; count data were reported by absolute frequency and percentage. Overall survival analysis included univariate Kaplan-Meier curves using different biomarker strata according to DLL3, ASCL1, and TTF-1

10

presence, expression levels, and gender. Multivariate analysis included a correlation plot over the numerical variables and Cox regression analysis using a backstep variable selection strategy.

Results

Patients' characteristics

Sixty-four cases were included (mean age 71 ± 10), with a balanced relation between gender (32 females and 32 males, Table 1). The mean age for males was 72 ± 10 years, and for females, 70 ± 10 years ($p=0.460$). Most patients were older than 60 (54 patients, 84,4%), as depicted in the population pyramid (Fig. 1A).

The majority of cases were biopsied from lung parenchyma, either by transbronchial/endobronchial biopsies or transthoracic CT-guided procurement (56 cases, 90,3%). Four cases were pleural biopsies, and two were metastasis in lymph nodes.

Chromogranin was positive in 70,3% of cases, with 15,4% showing 1+ intensity, 19,2% 2+ intensity, and 23,1% 3+ intensity. Synaptophysin was positive in 83,8% of cases, with 24,0% showing 1+ intensity, 20,0% 2+ intensity, and 32,0% 3+ intensity. CD56 was positive in 94,4% of cases, and its intensity was not evaluated (Table 1). All cases had at least one classical neuroendocrine marker positive and conventional small-cell carcinoma morphology.

Fifteen patients (18%) were followed by palliative care and did not receive chemotherapy. All remaining patients included in the study received standard chemotherapy for small-cell neuroendocrine carcinoma. The follow-up was complete until the patients died from the disease. The mean overall survival was 77.5 days with a 95% confidence interval of 36 to 116 days (Table 1, Figure 3), with a maximum of 557 days.

TTF-1 expression

While TTF-1 is not usually considered a conventional marker for diagnosing small cell carcinoma in most centers, it is positive in most of them. In the current cohort, it was positive in 33 cases (52%) and negative in 31 cases (48%) (Table 1). The percentage of tumor cells with TTF-1 averaged 39.6% (SD 43.4). Eleven (11, 18.3%) had 100% of TTF

-1 positivity. When assigned a histologic score of percentage versus intensity of positivity, cases had an H-score median of 37,30 (SD 110,08). Twenty-one cases (21, 33%) had an H-score of 150 or higher (Table 1).

ASCL1 expression

Tissue was available for the study of ASCL1 in 73 cases. The H-score had a median of 57,08 (SD 54.55). Only two cases (3%) were completely negative for this antibody, while the majority (55 cases, 86%) had an H-score of 10-150 and were considered low-expressors. Seven cases (7, 11%) were considered high expression. Only one case (1.4%) had an H-score of more than 250 (Table 1).

DLL3 expression

DLL3-positive SCLC tissue was used as a positive control, and DLL3-negative lung adenocarcinoma tissue was used as a negative control. As per previously published data, the staining pattern was cytoplasmic and membranous. [13, 40]

Forty-six (46, 72%) had some expression of DLL3 (18 negative, 28%). Nineteen cases (30%) expressed DLL3 in less than 50% of tumor cells, while 27 (42%) expressed it in more than 50% of cells. When the h-score was calculated, only five cases (8%) scored above 150 (Table 1).

Association between DLL3, ASC1, TTF-1 and Ki-67 immunoeexpression

Both TTF-1 and DLL3 were evaluated by the percentage of positive cells and H-score. ASCL1 was evaluated by H-score. As expected, ASCL1 expression was strongly associated with synaptophysin positivity ($p=0,003$) (Figure 4A, Table 2) ASCL1 expression did not have any differences regarding age, Ki-67 positivity, chromogranin or TTF-1 expression (Table 2). DLL3 expression was strongly associated with TTF-1 positivity (Figure 4B and 4C, Table 2). Tumors that were positive for TTF-1 had a higher percentage of DLL-3 expression both in percentage as well as in H-score ($p<0.001$). The correlation between biomarkers TTF-1 and DLL3 was positive demonstrated in Figure 4D.

Survival and multivariate analyses

Age, sex, and all conventional neuroendocrine markers did not correlate with overall survival. Using Cox regression, epidemiological variables, as well as TTF-1 and DLL3 expression were tested. It was observed that DLL3-positive patients are a marker of worse prognosis in patients with SCLC ($p=0.027$; HR=4.979), meaning that patients with positive DLL3 have 4.9 times the chance of progressing to death, presenting a worse survival rate (Table 4). ASCL1 had an inverse correlation with TTF-1 and positive correlation with DLL3 expression. In addition, ASCL1 H-score had a correlation with overall survival. Patients with negative ASCL1 had worse prognosis than patients with positive or higher scores ($p=0,04$) (Figures 5A. and B).

Discussion

Precision medicine is an innovative approach to disease prevention and treatment that considers differences in people's genes, injuries, environments, and lifestyles to target the right therapies to the right patients at the right time. In oncology, precision medicine uses genetic and molecular information, tailoring treatment on a single patient profile, optimizing efficacy, and minimizing toxicities. [41] This approach is revolutionizing lung cancer diagnosis and treatment. However, despite being widely adopted, its benefit in clinical practice still remains to be fully elucidated. [42]

SCLC continues to carry a poor prognosis, with a five-year survival rate of 3.5% and a 10-year survival rate of 1.8%. [43] The pathogenesis remains unclear, and no known predictive or diagnostic biomarkers exist. Delta-like ligand 3 (DLL3) is an inhibitory Notch ligand that is highly expressed in small cell lung cancer (SCLC) and has been identified as a potential therapeutic target. [14] [45] [46] DLL3 expression is not commonly found in normal adult tissues, which makes it an attractive target for anti-cancer therapies. [45] High DLL3 expression has been associated with poor prognosis in SCLC patients, suggesting its potential role as a prognostic biomarker. [47] [48] However, the prognostic significance of DLL3 expression in SCLC remains controversial, with some conflicting studies indicating a potential association between high DLL3 expression and overall survival. [14]

Therapeutic strategies targeting DLL3, such as antibody-drug conjugates (ADCs), bispecific T-cell engagers, and chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapies, are under development. [49] [5] [50] Rovalpituzumab tesirine (Rova-T), an ADC targeting DLL3, has been evaluated in clinical trials, although it did not meet the expected outcomes in Phase III trials. (23) Other investigational therapies, including bispecific T-cell engagers like tarlatamab (AMG 757) and CAR T-cell therapies targeting DLL3, have shown promise in preclinical models and early clinical trials. [51] [52]

The study conducted by Furuta et al. provides critical insights into the expression of these proteins in surgically resected SCLC samples. [15] The study reveals a high prevalence of DLL3 and ASCL1 expression in SCLC patients, with DLL3 expression detected in 83% of the evaluated samples. These findings agree with our paper, which showed 90% positivity of ASCL1. This high expression rate aligns with DLL3's potential role in the disease's pathology and supports the development of DLL3-targeted therapies. The positive correlation between DLL3 and ASCL1 expressions further underscores their interconnected roles in SCLC's molecular landscape, suggesting that interventions targeting these pathways could offer new avenues for treatment. [15] Their study also explores the prognostic implications of DLL3 and ASCL1 expression, finding no direct association with patient survival. In contrast with their findings, however, our cohort showed better survival, albeit poor in all classes, in patients with positive ASCL1 (by histologic score) and with positive DLL3 (quantified by percentage of positive cells). These findings may be important in establishing practical protocols for scoring these immunohistochemical studies and selecting patients that may benefit from targeted therapies.

Similarly, another recent study demonstrated that high DLL3 and ASCL1 expression was associated with certain morphological features in LCNECs and SCLCs, and in early-stage patients without metastasis who underwent chemotherapy, high expression of both DLL3 and ASCL1 was linked to a better prognosis and a lower risk of death. [53] Furthermore, DLL3 expression in LCNEC was associated with the expression of ASCL1 and neuroendocrine markers, suggesting a relationship between DLL3 expression and the neuroendocrine profile of these tumors. [40] These findings suggest that DLL3 and ASCL1 are not only correlated in their expression but may also be involved in the neuroendocrine phenotype of lung neuroendocrine tumors and could serve as potential therapeutic targets or prognostic indicators in these diseases. Specifically, ASCL1-positive/DLL3-high tumors may represent a subgroup of SCLC with unique vulnerabilities to DLL3-targeted therapies. Further research is warranted to validate these findings and explore the clinical utility of ASCL1/DLL3 co-expression as a predictive biomarker for therapeutic response.

In adenocarcinomas, TTF-1 has been shown to play a significant role in the pathogenesis of lung cancer, being expressed in 69%–80% of lung adenocarcinoma cases. Clinically, TTF-1 expression is a diagnostic tool for identifying the histological type of lung cancer, distinguishing primary lung adenocarcinomas from metastatic forms, and acting as a prognostic indicator. Studies have shown that patients with positive TTF-1 expression exhibit longer overall survival (OS) in stage I lung adenocarcinoma. [54] [55]

Small Cell Lung Cancer (SCLC), typically characterized as an undifferentiated cancer, exhibits TTF-1 positivity in 80–90% of cases, indicating a function beyond epithelial cell differentiation. Evidence of TTF-1 expression in non-pulmonary small cell cancers, such as aggressive small cell prostate cancer, supports its association with neuroendocrine differentiation and aggressive tumor behavior rather than characteristics of terminal respiratory unit cells. [56] [57] [58] In our samples, of interest, was the association of TTF-1 score with DLL3 expression, showing a potential role in TTF-1 as a differentiation and mechanistic marker, much more than only a diagnostic one.

The significant prevalence of DLL3 and ASCL1 expression in early-stage SCLC, as highlighted by Furuta et al. and corroborated by our findings, underscores their potential as therapeutic targets and prognostic biomarkers. [15] Our study further expands upon this, revealing a correlation between ASCL1/DLL3 co-expression and improved survival outcomes, emphasizing the importance of standardized scoring protocols for these immunohistochemical markers. This may enable the identification of patient subgroups that could particularly benefit from DLL3-targeted therapies, potentially personalizing treatment approaches for SCLC.

Additionally, the intriguing association between TTF-1 expression and DLL3, as observed in our study, suggests a multifaceted role for TTF-1 beyond its established diagnostic utility. This finding may have implications for understanding the molecular underpinnings of SCLC and could inform the development of novel therapeutic strategies. Further investigations into the mechanistic link between TTF-1 and DLL3 could uncover new avenues for intervention in this aggressive disease.

Despite the promising insights and potential therapeutic implications highlighted in our study, there are several limitations that should be acknowledged. First, our study's retrospective design may introduce selection bias, as it relies on previously collected data and samples, which may not be representative of the broader SCLC patient population. Additionally, the relatively small sample size limits the generalizability of our findings and may impact the statistical power to detect significant associations or differences in survival outcomes.

Furthermore, our study primarily focuses on the expression of DLL3 and ASCL1 in small SCLC samples, which may not fully capture the heterogeneity of SCLC, especially in that most cases are inoperable or treated with different modalities. The lack of longitudinal data to track changes in marker expression over time and in response to treatment is another limitation. Finally, the interpretation of immunohistochemical scoring can be subjective, and inter-observer variability might affect the consistency of the results, even with the attempted scoring protocols tried here. Future studies should aim to include larger, more diverse cohorts and incorporate prospective designs to validate these findings and enhance their clinical applicability.

In summary, our findings and corroborative studies present a compelling case for the significance of DLL3 and ASCL1 in the clinical landscape of small-cell lung cancer. The evidence of a better survival rate in patients with high expression of these proteins, despite the generally poor prognosis associated with SCLC, indicates their potential utility as biomarkers and as focal points for targeted therapy. Future research should continue to explore the mechanistic pathways influenced by these proteins, emphasizing developing therapeutic strategies that can effectively exploit these targets. By advancing our understanding of DLL3 and ASCL1 within the broader context of lung cancer pathology, we can hope to refine diagnostic criteria and enhance the specificity and efficacy of treatment protocols, ultimately leading to improved survival rates and quality of life for patients afflicted by this formidable disease.

Figure legends

Figure 1. Qupath H-score calculation and analyses. Top (A). Representative image of a case showing DLL3 positivity in tumor cells. Note the strong cytoplasmic and membranous staining. Bottom (B) Representative image from the same field from above show cell staining intensity for the indicated DLL3 protein (DAB staining calculation). Cell staining intensity is represented as follows: negative (blue), low (yellow), medium (orange), and high (red). The H-score is calculated based on the percentage of positive cells by the staining of low, medium and high intensity. Bar = 50uM (micrometers)

Figure 2. Representative slides of 3 different cases of SCLC (A, B and C), showing distinct morphology (top panel, HE sections) and expressions of DLL3 in the second row, TTF1 in the third row, ASCL1 expression in the fourth row and ki67 index in the fifth and final row. The first cases (1st column) shows a moderate expression of DLL3, strong positivity for TTF1, weak and focal positivity for ASCL1; the second case (second column) shows negative DLL3, negative TTF1, strong and diffuse nuclear expression for ASCL1, while the third case (3rd column) shows strong positivity for DLL3, TTF1 and ASCL1. All cases show a high ki-67 proliferative index. Bars = 50uM (micrometers)

Figure 3. Global survival of all patients with DLL3

Figure 4. Immunoexpression of TTF1, ASCL1 and DLL3 in patients with SLCL. A. Association of ASCL1 immunoexpression according to synaptophysin positivity. Patients with a positive synaptophysin stain are more likely to have greater ASCL1 expression, than patients with a negative synaptophysin. B. DLL3 expression (percentage of positive cells) according to TTF1 expression in patients with SLCL. C. DLL3 expression (H-score) according to TTF expression in patients with SLCL. D. Correlation Biomarker, TTF1 and DLL3 correlate in patients with SCLC. * $p < 0,05$.

Figure 5. Survival analysis (Kaplan-Meier) of patients with SCLC. A. TTF1 negative patients have a lower survival rate than TTF1 positive SCLC patients (Log rank $p = 0.014$) and may be associated with an

19

unfavorable prognosis with worse outcome in patients with SCLC. B. DLL3 negative patients have a lower survival rate than DLL3 positive SCLC patients) ($p=0.073$). C. Survival analysis of patients with SCLC according to DLL3 immunoeexpression ($p=0,458$).

References:

1. Wang Q, Gumus ZH, Colarossi C, Memeo L, Wang X, Kong CY, Boffetta P. SCLC: Epidemiology, Risk Factors, Genetic Susceptibility, Molecular Pathology, Screening, and Early Detection. *J Thorac Oncol.* 2023; 18: 31-46. doi: 10.1016/j.jtho.2022.10.002.
2. Rudin CM, Reck M, Johnson ML, Blackhall F, Hann CL, Yang JC-H, Bailis JM, Bebb G, Goldrick A, Umejiego J, Paz-Ares L. Emerging therapies targeting the delta-like ligand 3 (DLL3) in small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology.* 2023; 16: 66-. doi: 10.1186/s13045-023-01464-y.
3. Blackhall F, Jao K, Greillier L, Cho BC, Penkov K, Reguart N, Majem M, Nackaerts K, Syrigos K, Hansen K, Schuette W, Cetnar J, Cappuzzo F, et al. Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine Compared With Topotecan as Second-Line Therapy in DLL3-High SCLC: Results From the Phase 3 TAHOE Study. *J Thorac Oncol.* 2021; 16: 1547-58. doi: 10.1016/j.jtho.2021.02.009.
4. Denninghoff V, Russo A, de Miguel-Pérez D, Malapelle U, Benyounes A, Gittens A, Cardona AF, Rolfo C. Small Cell Lung Cancer: State of the Art of the Molecular and Genetic Landscape and Novel Perspective. *Cancers.* 2021; 13: 1723. doi: 10.3390/cancers13071723.
5. Paz-Ares L, Champiat S, Lai WV, Izumi H, Govindan R, Boyer M, Hummel H-D, Borghaei H, Johnson ML, Steeghs N, Blackhall F, Dowlati A, Reguart N, et al. Tarlatamab, a First-in-Class DLL3-Targeted Bispecific T-Cell Engager, in Recurrent Small-Cell Lung Cancer: An Open-Label, Phase I Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2023; 41: 2893-903. doi: 10.1200/JCO.22.02823.
6. Dhillon S. Tarlatamab: First Approval. *Drugs.* 2024. doi: 10.1007/s40265-024-02070-z.
7. Ahn MJ, Cho BC, Felip E, Korantzis I, Ohashi K, Majem M, Juan-Vidal O, Handzhiev S, Izumi H, Lee JS, Dziadziuszko R, Wolf J, Blackhall F, et al. Tarlatamab for Patients with Previously Treated Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2023; 389: 2063-75. doi: 10.1056/NEJMoa2307980.
8. Giffin MJ, Cooke K, Lobenhofer EK, Estrada J, Zhan J, Deegen P, Thomas M, Murawsky CM, Werner J, Liu S, Lee F, Homann O, Friedrich M, et al. AMG 757, a Half-Life Extended, DLL3-Targeted Bispecific T-Cell Engager, Shows High Potency and Sensitivity in Preclinical Models of Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2021; 27: 1526-37. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-20-2845.
9. Crabtree JS, Singleton CS, Miele L. Notch Signaling in Neuroendocrine Tumors. *Front Oncol.* 2016; 6: 94. doi: 10.3389/fonc.2016.00094.
10. Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *Oncologist.* 2007; 12: 535-42. doi: 10.1634/theoncologist.12-5-535.

11. Wang H, Chen Y, Fernandez-Del Castillo C, Yilmaz O, Deshpande V. Heterogeneity in signaling pathways of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a critical look at notch signaling pathway. *Mod Pathol*. 2013; 26: 139-47. doi: 10.1038/modpathol.2012.143.
12. Shama SK, Pourat J, Abdel-Atti D, Carlin SD, Piersigilli A, Bankovich AJ, Gardner EE, Hamdy O, Isse K, Bheddah S, Sandoval J, Cunanan KM, Johansen EB, et al. Noninvasive Interrogation of DLL3 Expression in Metastatic Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*. 2017; 77: 3931-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0299.
13. Rojo F, Corassa M, Mavroudis D, Öz AB, Biesma B, Brcic L, Pauwels P, Sailer V, Gosney J, Miljkovic D, Hader C, Wu M, Almarez T, et al. International real-world study of DLL3 expression in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2020; 147. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.07.026.
14. Ali G, Di Stefano I, Poma AM, Ricci S, Proietti A, Davini F, Lucchi M, Melfi F, Fontanini G. Prevalence of Delta-Like Protein 3 in a Consecutive Series of Surgically Resected Lung Neuroendocrine Neoplasms. *Frontiers in Oncology*. 2021; 11. doi: 10.3389/fonc.2021.729765.
15. Furuta M, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi H, Yokouchi H, Nishihara H, Minemura H, Harada M, Yamazaki S, Akie K, Fujita Y, Takamura K, Kojima T, Harada T, et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer (HOT1702). *The Oncologist*. 2019; 24: e1172-e9. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0676.
16. Horie M, Miyashita N, Mattsson JSM, Mikami Y, Sandelin M, Brunnstrom H, Micke P, Nagase T, Saito A. An integrative transcriptome analysis reveals a functional role for thyroid transcription factor-1 in small cell lung cancer. *J Pathol*. 2018; 246: 154-65. doi: 10.1002/path.5109.
17. Yan LX, Liu YH, Li Z, Luo DL, Li YF, Yan JH, Zhang JT, Liu C, Liu XH, He J. Prognostic value of delta-like protein 3 combined with thyroid transcription factor-1 in small-cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2019; 18: 2254-61. doi: 10.3892/ol.2019.10538.
18. Gonzalez D, Dietz RL, Pantanowitz L. Feasibility of a deep learning algorithm to distinguish large cell neuroendocrine from small cell lung carcinoma in cytology specimens. *Cytopathology*. 2020; 31: 426-31. doi: 10.1111/cyt.12829.
19. Azim HA, Jr., Peccatori FA, Brohée S, Branstetter D, Loi S, Viale G, Piccart M, Dougall WC, Pruneri G, Sotiriou C. RANK-ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy. *Breast cancer research : BCR*. 2015; 17: 24-. doi: 10.1186/s13058-015-0538-7.
20. de Souza AA, Altemani A, de Araujo NS, Texeira LN, de Araújo VC, Soares AB. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER-2 Expression in Recurrent Pleomorphic Adenoma. *Clinical pathology (Thousand Oaks, Ventura County, Calif)*. 2019; 12: 2632010X19873384-2632010X. doi: 10.1177/2632010X19873384.

21. Derangère V, Lecuelle J, Lepage C, Aoulad-Ben Salem O, Allatessem BM, Ilie A, Bouché O, Phelip J-M, Baconnier M, Pezet D, Sebbagh V, Terrebonne E, Bouard G, et al. Combination of CDX2 H-score quantitative analysis with CD3 AI-guided analysis identifies patients with a good prognosis only in stage III colon cancer. *European Journal of Cancer*. 2022; 172: 221-30. doi: 10.1016/j.ejca.2022.05.040.
22. Parris TZ, Aziz L, Kovács A, Hajizadeh S, Nemes S, Semaan M, Chen CY, Karlsson P, Helou K. Clinical relevance of breast cancer-related genes as potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2014; 14: 324-. doi: 10.1186/1471-2407-14-324.
23. Starzyńska A, Sobocki BK, Sakowicz-Burkiewicz M, Jereczek-Fossa BA, Alterio D, Szot O, Korwat A, Pęksa R. VISTA H-Score Is Significantly Associated with a 5-Year DFS Rate in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical medicine*. 2023; 12: 1619. doi: 10.3390/jcm12041619.
24. Thike AA, Chng MJ, Tan PH, Fook-Chong S. Immunohistochemical expression of hormone receptors in invasive breast carcinoma: correlation of results of H-score with pathological parameters. *Pathology*. 2001; 33: 21-5. doi: 10.1080/00313020123290.
25. Vougiouklakis T, Belovarac BJ, Lytle A, Chiriboga L, Ozerdem U. The diagnostic utility of EZH2 H-score and Ki-67 index in non-invasive breast apocrine lesions. *Pathology - Research and Practice*. 2020; 216: 153041. doi: 10.1016/j.prp.2020.153041.
26. Cass JD, Varma S, Day AG, Sangrar W, Rajput AB, Raptis LH, Squire J, Madarnas Y, Sengupta SK, Elliott BE. Automated Quantitative Analysis of p53, Cyclin D1, Ki67 and pERK Expression in Breast Carcinoma Does Not Differ from Expert Pathologist Scoring and Correlates with Clinico-Pathological Characteristics. *Cancers*. 2012; 4: 725-42. doi: 10.3390/cancers4030725.
27. Baine MK, Hsieh MS, Lai WV, Egger JV, Jungbluth AA, Daneshbod Y, Beras A, Spencer R, Lopardo J, Bodd F, Montecalvo J, Sauter JL, Chang JC, et al. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization
Prognostic value of delta-like protein 3 combined with thyroid transcription factor-1 in small-cell lung cancer
TTF-1 and c-MYC-defined Phenotypes of Large Cell Neuroendocrine Carcinoma and Delta-like Protein 3 Expression for Treatment Selection. doi:
28. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, Metzger GJ, Schmechel SC. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagnostic pathology*. 2012; 7: 42-. doi: 10.1186/1746-1596-7-42.

29. Rizzardì AE, Zhang X, Vogel RI, Kolb S, Geybels MS, Leung Y-K, Henriksen JC, Ho S-M, Kwak J, Stanford JL, Schmechel SC. Quantitative comparison and reproducibility of pathologist scoring and digital image analysis of estrogen receptor β immunohistochemistry in prostate cancer. *Diagnostic pathology*. 2016; 11: 63-. doi: 10.1186/s13000-016-0511-5.
30. Bai Y, Cole K, Martínez-Morilla S, Ahmed FS, Zugazagoitia J, Staaf J, Bosch A, Ehinger A, Nimeus E, Hartman J, Acs B, Rimm DL. An Open-Source, Automated Tumor-Infiltrating Lymphocyte Algorithm for Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2021; 27: 5557-65. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-21-0325.
31. Baker GM, Bret-Mounet VC, Wang T, Veta M, Zheng H, Collins LC, Eliassen AH, Tamimi RM, Heng YJ. Immunohistochemistry scoring of breast tumor tissue microarrays: A comparison study across three software applications. *J Pathol Inform*. 2022; 13: 100118. doi: 10.1016/j.jpi.2022.100118.
32. Boyacı C, Sun W, Robertson S, Acs B, Hartman J. Independent Clinical Validation of the Automated Ki67 Scoring Guideline from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Biomolecules*. 2021; 11. doi: 10.3390/biom11111612.
33. Koch EAT, Erdmann M, Berking C, Kiesewetter F, Kramer R, Schliep S, Heppt MV. Standardized Computer-Assisted Analysis of PRAME Immunoreactivity in Dysplastic Nevi and Superficial Spreading Melanomas. *Int J Mol Sci*. 2023; 24. doi: 10.3390/ijms24076388.
34. Baine MK, Hsieh MS, Lai WV, Egger JV, Jungbluth AA, Daneshbod Y, Beras A, Spencer R, Lopardo J, Bodd F, Montecalvo J, Sauter JL, Chang JC, et al. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. *J Thorac Oncol*. 2020; 15: 1823-35. doi: 10.1016/j.jtho.2020.09.009.
35. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albin A, Bresaola E, Marchiò C, Massa F, Righi L, Gatti G, Papanikolaou N, Vijayvergia N, Calabrese F, Papotti M. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Translational lung cancer research*. 2017; 6: 513-29. doi: 10.21037/tlcr.2017.09.04.
36. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhman N, Bubendorf L, Mino-Kenudson M, Yoshida A, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2019; 14: 377-407. doi: 10.1016/j.jtho.2018.12.005.
37. Rooper LM, Sharma R, Li QK, Illei PB, Westra WH. INSM1 Demonstrates Superior Performance to the Individual and Combined Use of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 for Diagnosing Neuroendocrine Tumors of the Thoracic Cavity. *American Journal of Surgical Pathology*. 2017; 41: 1561-9. doi: 10.1097/pas.0000000000000916.

38. Nicholson AG. The WHO 2015 classification of lung tumours: Evolution of tumour classification in lung cancer. *Pathology*. 2016; 48: S7. doi: 10.1016/j.pathol.2015.12.019.
39. Travis WD, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. (2021). WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours. (Lyon: International Agency for Research on Cancer).
40. Hermans BCM, Derks JL, Thunnissen E, van Suylen RJ, den Bakker MA, Groen HJM, Smit EF, Damhuis RA, van den Broek EC, group P, Ruland A, Speel EJM, Dingemans AMC. DLL3 expression in large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) and association with molecular subtypes and neuroendocrine profile. *Lung Cancer*. 2019; 138: 102-8. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.10.010.
41. Denninghoff V, Jose Serrano M. (2023). Liquid Biopsy. *Molecular Diagnostics of Cancer* [Working Title]: IntechOpen).
42. Rolfo C, Denninghoff V. Globalization of precision medicine programs in lung cancer: a health system challenge. *The Lancet regional health Europe*. 2023; 36: 100819-. doi: 10.1016/j.lanepe.2023.100819.
43. Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH. Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--an analysis of 1,714 consecutive patients. *Journal of Clinical Oncology*. 1995; 13: 1215-20. doi: 10.1200/jco.1995.13.5.1215.
44. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au H-J, et al. *K-ras* Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359: 1757-65. doi: 10.1056/nejmoa0804385.
45. Owen DH, Giffin MJ, Bailis JM, Smit M-AD, Carbone DP, He K. DLL3: an emerging target in small cell lung cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2019; 12: 61-. doi: 10.1186/s13045-019-0745-2.
46. Xie H, Boland JM, Maleszewski JJ, Aubry MC, Yi ES, Jenkins SM, Koepplin JW, Terra SBSP, Mansfield AS, Roden AC. Expression of delta-like protein 3 is reproducibly present in a subset of small cell lung carcinomas and pulmonary carcinoid tumors. *Lung Cancer*. 2019; 135: 73-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.07.016.
47. Chen B, Li H, Liu C, Wang S, Zhang F, Zhang L, Li M, Li G. Potential prognostic value of delta-like protein 3 in small cell lung cancer: a meta-analysis. *World journal of surgical oncology*. 2020; 18: 226-. doi: 10.1186/s12957-020-02004-5.

48. Regzedmaa O, Li Y, Li Y, Zhang H, Wang J, Gong H, Yuan Y, Li W, Liu H, Chen J. Prevalence of DLL3, CTLA-4 and mstn expression in patients with small cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2019; 12. doi: 10.2147/OTT.S216362.
49. Hipp S, Voynov V, Drobits-Handl B, Giragossian C, Trapani F, Nixon AE, Scheer JM, Adam PJ. A Bispecific DLL3/CD3 IgG-Like T-Cell Engaging Antibody Induces Antitumor Responses in Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020; 26: 5258-68. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-20-0926.
50. Yang W, Wang W, Li Z, Wu J, Huang X, Li J, Zhang X, Ye X. Delta-like ligand 3 in small cell lung cancer: Potential mechanism and treatment progress. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2023; 191: 104136. doi: 10.1016/j.critrevonc.2023.104136.
51. Zhang H, Yang Y, Li X, Yuan X, Chu Q. Targeting the Notch signaling pathway and the Notch ligand, DLL3, in small cell lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023; 159: 114248-. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114248.
52. Kuempers C, Jagomast T, Krupar R, Paulsen F-O, Heidel C, Ribbat-Idel J, Idel C, Märkl B, Anlauf M, Berezowska S, Tiemann M, Bösmüller H, Fend F, et al. Delta-Like Protein 3 Expression in Paired Chemonaive and Chemorelapsed Small Cell Lung Cancer Samples. *Frontiers in medicine*. 2021; 8: 734901-. doi: 10.3389/fmed.2021.734901.
53. Prieto TG, Baldavira CM, Machado-Rugolo J, Olivieri EHR, Silva E, Silva VG, Ab'Saber AM, Takagaki TY, Capelozzi VL. Clinical and morphological features of large-cell neuroendocrine carcinomas and small-cell lung carcinomas expressing the DLL3 and ASCL1 oncoproteins. *Braz J Med Biol Res*. 2023; 56: e12921. doi: 10.1590/1414-431X2023e12921.
54. Nakahama K, Kaneda H, Osawa M, Izumi M, Yoshimoto N, Sugimoto A, Nagamine H, Ogawa K, Matsumoto Y, Sawa K, Tani Y, Mitsuoka S, Watanabe T, et al. Association of thyroid transcription factor-1 with the efficacy of immune-checkpoint inhibitors in patients with advanced lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*. 2022; 13: 2309-17. doi: 10.1111/1759-7714.14560.
55. Iso H, Hisakane K, Mikami E, Suzuki T, Matsuki S, Atsumi K, Nagata K, Seike M, Hirose T. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression and the efficacy of combination therapy with immune checkpoint inhibitors and cytotoxic chemotherapy in non-squamous non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2023; 12: 1850-61. doi: 10.21037/tlcr-23-331.
56. Miyauchi E, Motoi N, Ono H, Ninomiya H, Ohyanagi F, Nishio M, Okumura S, Ichinose M, Ishikawa Y. Distinct Characteristics of Small Cell Lung Cancer Correlate With Central or Peripheral Origin: Subtyping Based on Location and Expression of Transcription Factor TTF-1. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94: e2324. doi: 10.1097/MD.0000000000002324.

57. Misch D, Blum T, Boch C, Weiss T, Crolow C, Griff S, Mairinger T, Bauer TT, Kollmeier J. Value of thyroid transcription factor (TTF)-1 for diagnosis and prognosis of patients with locally advanced or metastatic small cell lung cancer. *Diagn Pathol.* 2015; 10: 21. doi: 10.1186/s13000-015-0250-z.
58. Kaufmann O, Dietel M. Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology.* 2000; 36: 415-20. doi: 10.1046/j.1365-2559.2000.00890.x

Table 1. Detailed Patient Demographics and Quantitative Analysis of Neuroendocrine Biomarker Expression (KI-67, Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, TTF1, ASCL1, and DLL3) in Small Cell Lung Cancer (SCLC) Cohort

Characteristics	Results		
<i>Gender, n (%)</i>			
Female	32 (50%)		
Male	32 (50%)		
<i>Age at diagnosis, Average (range)</i>	71 (41- 43)		
<i>Half-life overall survival (days)</i>	136.19		
<i>KI-67</i>			
Global, median (range)	80.0 (40 - 97.20)		
<i>Chromogranin A</i>			
Class N (%)	Negative	Positive	
	11 (29.7%)	26 (70.3%)	
<i>Synatophysin</i>			
Class N (%)	Negative	Positive	
	6 (16.2%)	31 (83.8%)	
<i>CD56</i>			
Class N (%)	Negative	Positive	
	2 (5.6%)	34 (94.4%)	
<i>TTF1</i>			
H-score, median (range)	37.30 (0 – 296.52)		
Quantification, median (range)	17.25 (0 – 99.90)		
Classification 1 Quantification, N (%)	Negative (TTF1=0) 31(48%)	Positive (TTF1≥1) 33 (52%)	
Classification 2 Quantification, N (%)	Negative (TTF1=0) 31 (48%)	Low (1≤TTF1≤49) 4 (6%)	High (50≤TTF1≤100) 29 (45%)
Classification 3 H-score, N (%)	Negative (TTF1=0) 31 (48%)	Low (1≤TTF1≤149) 12 (19%)	High (150≤TTF1≤300) 21 (33%)
<i>ASCL1</i>			
H-score, median (range)	57.08 (0.01-268.66)		
Quantification, median (range)	51.10 (0- 99.90)		

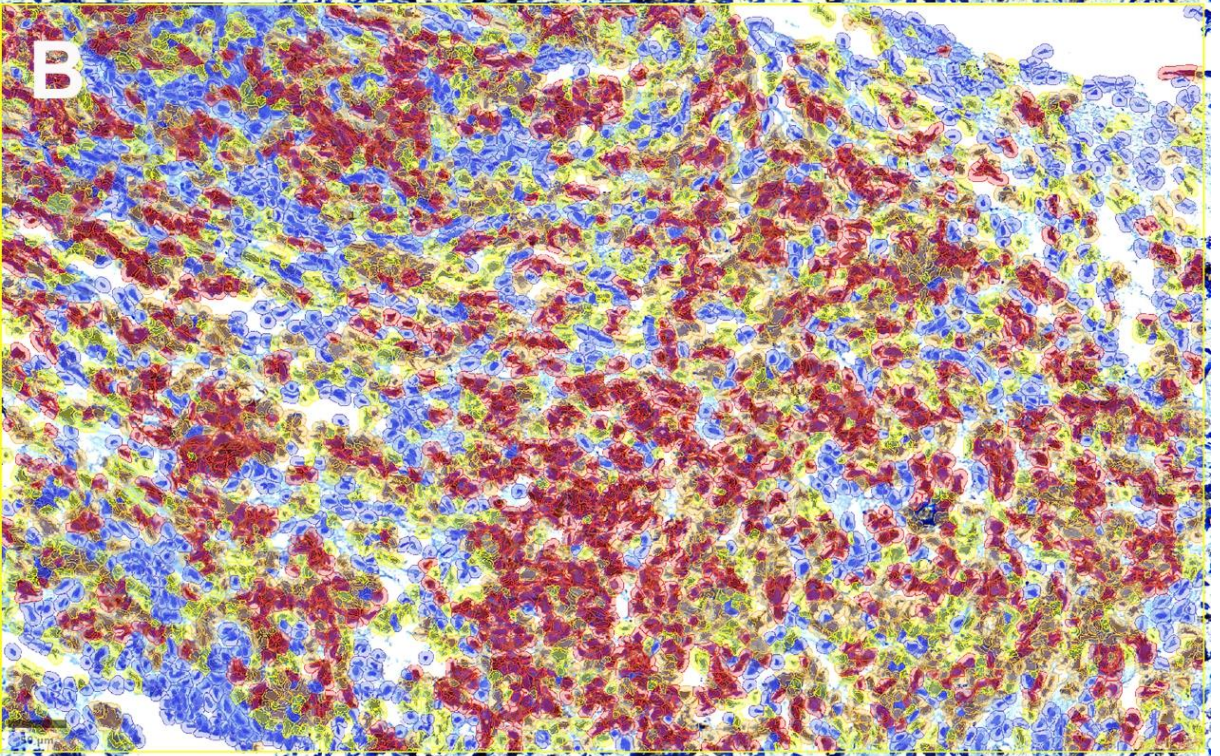
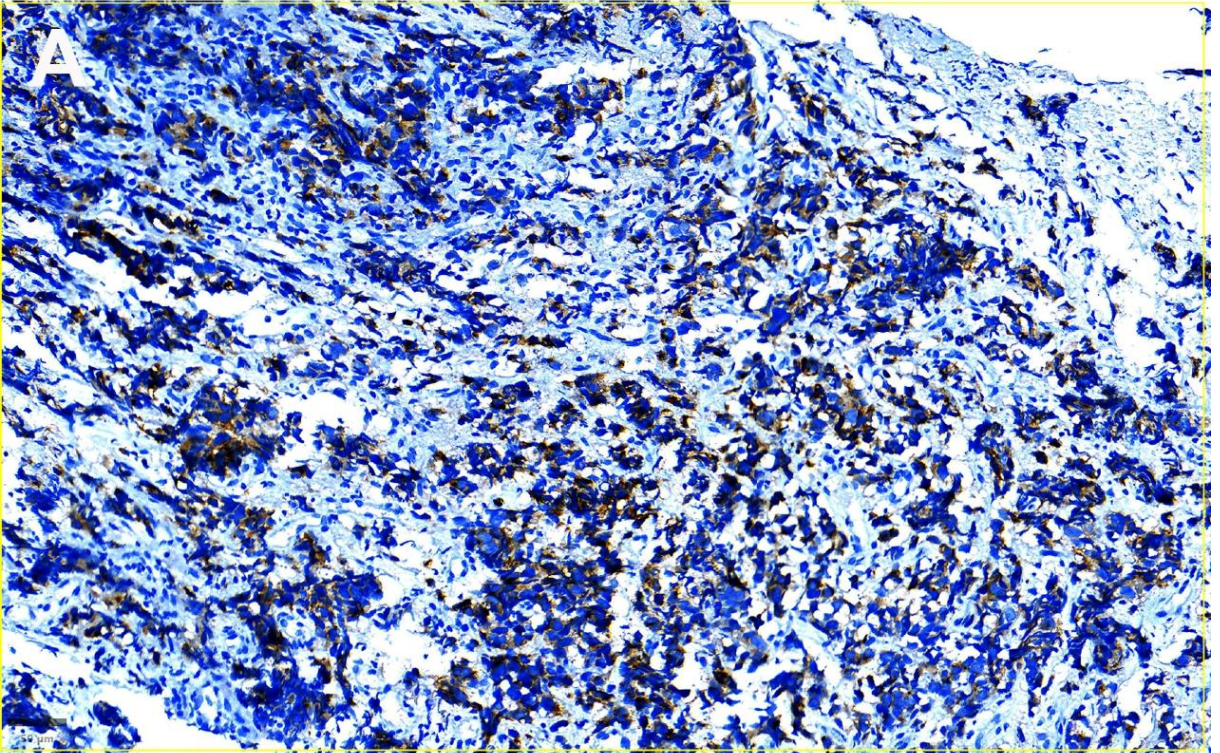
Classification 1 Quantification	Negative (ASCL1=0) 2(3%)	Positive (ASCL1≥1) 62 (97%)	
Classification 2 Quantification	Negative (ASCL1=0) 2(3%)	Low (1≤ASCL1≤49) 28 (44%)	High (50≤ASCL1≤100) 34 (53%)
Classification 3 H-score	Negative (ASCL1=0) 2(3%)	Low (1≤ASCL1≤149) 55 (86%)	High (150≤ASCL1≤300) 7 (11%)
<i>DLL3</i>			
H-score, median (range)	57.08 (0 - 289)		
Quantification, median (range)	51.10 (0 – 99.30)		
Classification 1 Quantification	Negative (DLL3=0) 18 (28%)	Positive (DLL3≥1) 46 (72%)	
Classification 2 Quantification	Negative (DLL3=0) 18 (28%)	Low (1≤DLL3≤49) 27 (42%)	High (50≤DLL3≤100) 19 (30%)
Classification 3 H-score	Negative (DLL3=0) 18 (28%)	Low (1≤DLL3≤149) 42(66%)	High (150≤DLL3≤300) 5 (8%)

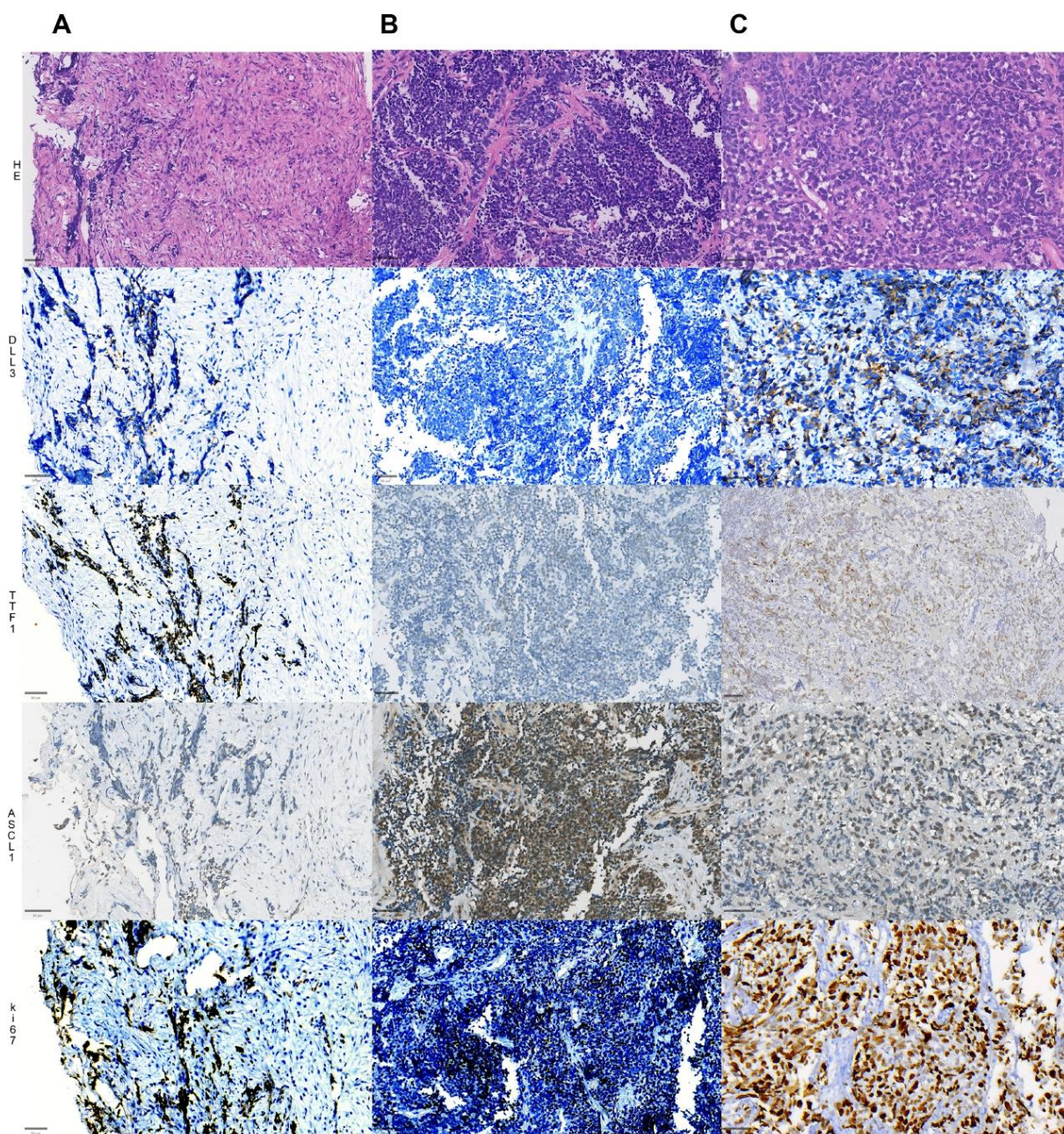
Table 2. Association biomarkers KI67, TTF1, DLL3 and ASCL1 and characteristics in patients SCLC.

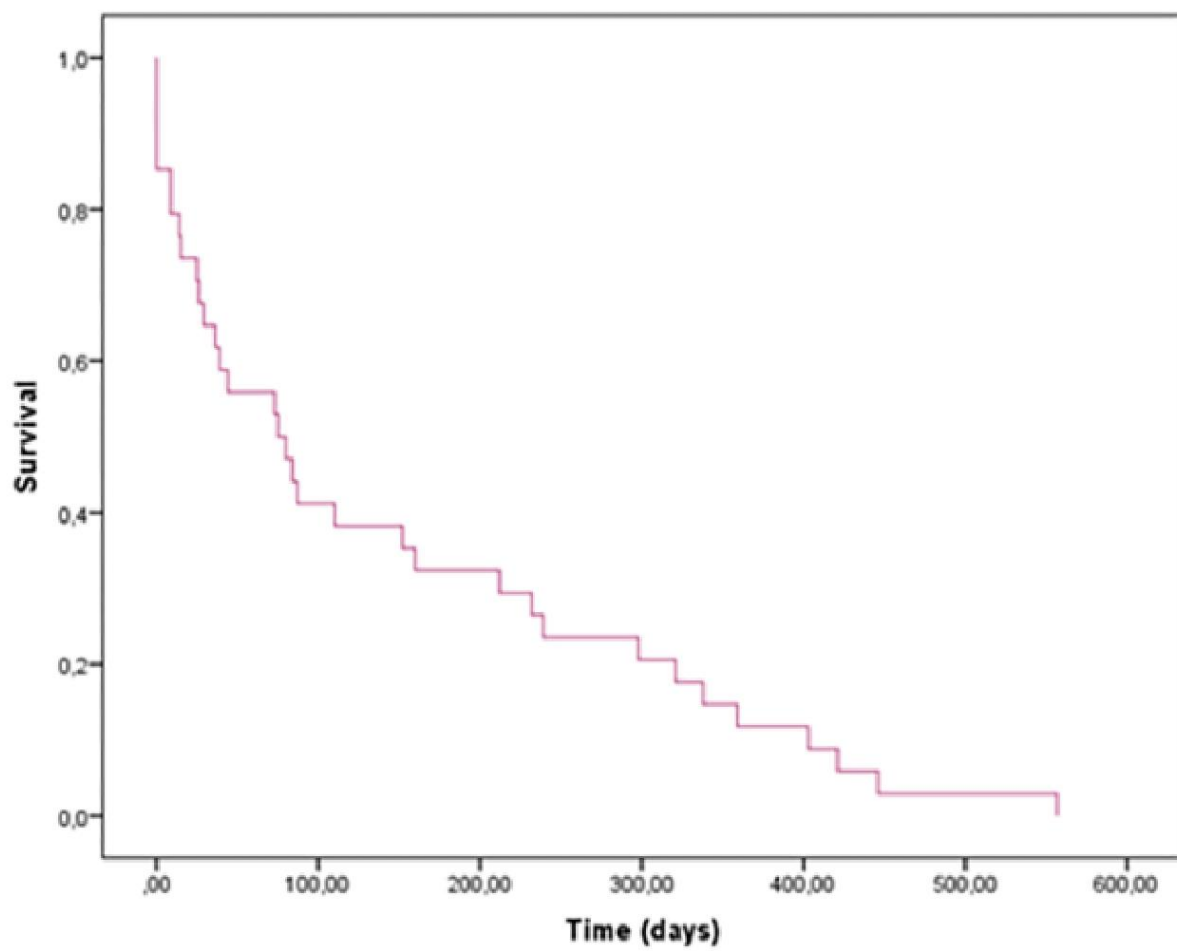
		KI67		TTF1 Quant		TTF1 HS		ASCL1 Quant		ASCL1 HS		DLL3 Quant		DLL3 HS	
		Mediana	p Value	Mediana	p Value	Mediana	p Value	Mediana	p Value	Mediana	p Value	Mediana	p Value	Mediana	p Value
Age class 1	≤ 60	80,00		11,400		29,250		73,950		83,955		33,440		56,655	
	≥ 61	79,70	0,341	29,300	0,579	40,900	0,551	50,700	0,536	56,345	0,582	15,750	0,725	25,865	
Age class 2	≤ 74	80,00		54,700		71,200		62,270		64,680		13,340		14,940	
	≥ 75	70,00	0,299	0,000	0,129	0,000	0,481	49,110	0,302	51,280	0,119	29,400	0,200	40,240	0,425
Sex	Female	79,70		53,000		70,100		51,780		56,825		24,000		32,850	
	Male	80,00	0,393	0,000	0,314	0,000	0,512	51,100	0,201	57,080	0,148	15,750	0,444	25,865	0,684
Chromo A	Negative	80,00		54,700		65,700		44,950		51,280		2,810		3,270	
	Positive	80,00	0,229	51,100	0,707	75,400	0,285	49,010	0,481	55,380	0,402	14,950	0,707	21,675	0,366
Syn	Negative	80,00		50,600		69,350		8,854		9,075		5,145		5,745	
	Positive	80,00	0,888	54,700	0,952	69,000	0,888	53,110	0,004	55,700	0,005	13,500	0,533	13,700	0,615
TTF1 Quant class 1	Negative	80,00		0,000		0,000		67,290		74,540		13,340		14,940	
	Positive	80,00	0,770	90,400	*	182,100	*	44,950	0,097	55,060	0,103	35,000	0,068	46,800	0,071
TTF1 Quant class 2	Negative (0)	80,00		0,000		0,000		67,290		74,540		13,340		14,940	
	Low (1-49)	70,00	0,563	34,850	*	63,750	*	10,965	0,055	11,400	0,062	21,500	0,189	35,550	0,199
	High (50-100)	80,00		92,100		237,600		47,570		55,430		40,600		52,110	
TTF1 HS class 3	Negative	80,00		0,000		0,000		67,290		74,540		13,340		14,940	
	Low (1-149)	75,00	0,634	55,000	*	81,000	*	37,490	0,181	41,030	0,226	5,145	0,008	5,745	0,009
	High (149-300)	80,00		96,100		249,520		44,950		55,430		55,690		79,300	
ASCL1 Quant class 1	Negative	66,90		49,800		137,300		0,045		0,050		0,000		0,000	
	Positive	80,00	0,571	17,250	0,620	37,300	0,693	51,525	*	57,695	*	18,600	0,071	30,025	0,063
	Negative (0)	66,90		49,800		137,300		0,045		0,050		0,000		0,000	
ASCL1 Quant class 2	Low (1-49)	70,00	0,369	51,100	0,537	70,100	0,588	27,740	*	31,050	*	24,250	0,152	35,690	0,158
	High (50-100)	80,00		0,000		0,000		74,410		86,980		14,950		28,540	
	Negative (0-10)	80,00		0,000		0,000		7,050		7,670		10,200		11,200	
ASCL1 HS class 3	Low (11-150)	74,70	0,309	49,500	0,578	70,100	0,645	52,455	*	58,925	*	23,500	0,412	37,770	0,322

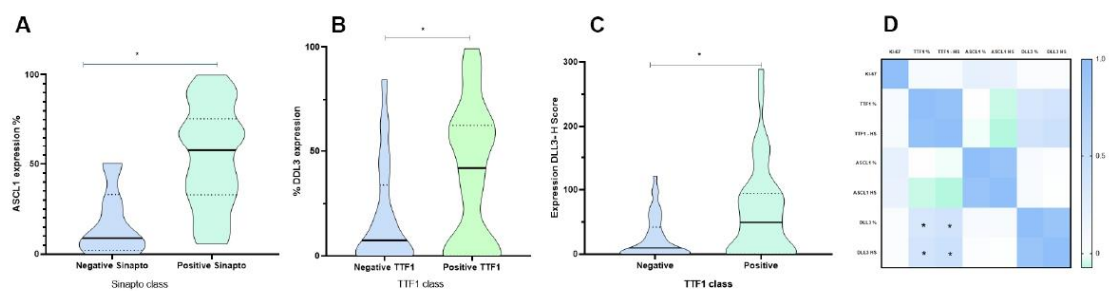
DLL3 Quant - class 1	high (150-300)	80,00		0,000		0,000		95,840		172,960		24,390		27,430	
	Negative	75,00		27,350		32,850		50,030		54,135		0,000		0,000	
	Positive (1-100)	80,00	0,640	17,250	0,912	37,300	0,601	51,525	0,464	57,695	0,446	37,800	*	52,655	*
DLL3 Quant - class 2	Negative	75,00		27,350		32,850		50,030		54,135		0,000		0,000	
	Low (1-49)	80,00	0,837	0,000	0,011	0,000	0,003	53,110	0,762	57,170	0,748	16,400	*	24,300	*
	High (50-100)	80,00		83,800		182,100		50,450		58,220		64,930		95,200	
DLL3 HS - class 2	Negative	80,00		54,700		65,700		49,110		51,280		0,000		0,000	
	Low (1-149)	79,70	0,848	0,000	0,019	0,000	0,006	52,455	0,995	58,925	0,992	33,440	*	43,325	*
	High (150-300)	80,00		99,300		242,900		37,150		39,150		94,310		170,930	

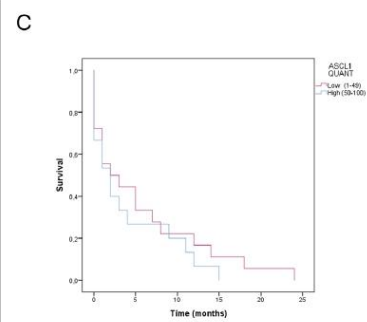
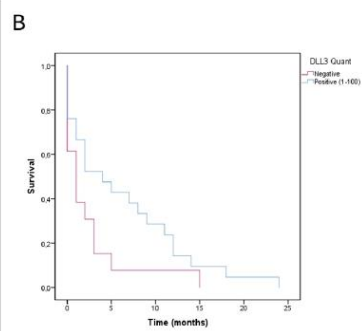
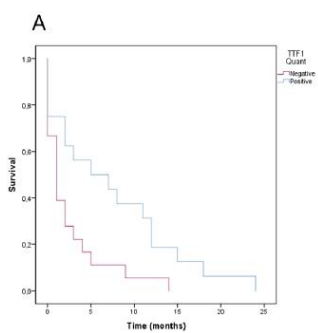
Abbreviations: CgA: Chromogranin A, Syn: Synaptophysin; TTF1: Thyroid transcription factor 1; DLL3: Delta-like ligand 3; ASCL1: Achaete-scute homolog; HS: HScore.











ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNOEXPRESSÃO DE DIFERENTES CLONES DE PD-L1 E UTILIZAÇÃO DA PATOLOGIA DIGITAL PARA ESCORE DE PD-L1 EM CASOS DE CPNPC.

Pesquisador: FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59399322.9.0000.5049

Instituição Proponente: Unichristus

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.517.400

Apresentação do Projeto:

O termo câncer trata de uma série de doenças relacionadas, que podem ocorrer em qualquer tecido do organismo. As células tumorais proliferam-se continuamente, podendo invadir tecidos adjacentes e se espalhar pelo organismo através dos vasos sanguíneos e linfáticos (NCI, 2017). De acordo com o INCA (2019), para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é de 17.760 novos casos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres. O câncer de pulmão deve ser o segundo mais frequente em homens nas regiões Sul (31,07/100 mil) e Nordeste (11,01/100 mil), excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, além de ser o mais letal para ambos os sexos. A imunoterapia é um tipo de terapia biológica que atua auxiliando o sistema imune a combater as células do câncer. Anticorpos monoclonais, inibidores de pontos de verificação e vacinas para tratamento do câncer são alguns dos tipos de imunoterapias. A terapia direcionada utiliza alvos presentes nas células cancerosas, como proteínas que controlam o ciclo celular dessas células (NCI, 2019). De acordo com o NCI (2021), o câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) é qualquer tipo de câncer de pulmão epitelial que não seja câncer de pulmão de pequenas células (SCLC). CPNPC divide-se basicamente

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Cocó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



Continuação do Parecer: 5.517.400

em carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes e adenocarcinoma, com outros diversos subtipos que ocorrem com menos frequência. Apesar de todo câncer de pulmão CPNPC geralmente estar associado ao tabagismo, os adenocarcinomas especialmente podem ser diagnosticados em pacientes que nunca fumaram. Os aspectos microscópicos característicos do adenocarcinoma incluem formação glandular e em alguns casos, produção de mucina. Esses tumores derivam de células dos brônquios, bronquíolos e alvéolos e ocorrem na periferia do pulmão em aproximadamente dois terços dos casos, o restante tem origem em glândulas submucosas ou do próprio epitélio de brônquios maiores. O carcinoma de células escamosas tem tendência a localização central, ou seja, próximo à árvore traqueo-brônquica, e tem origem de células dos brônquios em áreas de metaplasia escamosa e displasia. É representado por neoplasias com formação de queratina bem diferenciadas, assim como tumores anaplásicos com diferenciação queratinizante apenas focal (Gazdar, 2010). A imunoterapia através do bloqueio de pontos de verificação imunológico tem o potencial de estabelecer o controle tumoral, pois pode aumentar e manter a imunidade endógena contra antígenos não mutados, bem como exclusivamente mutantes. Estudos relataram o importante papel do co-receptor de células T da morte programada-1 (PD-1) e seus ligantes B7-H1 / PD-L1 e B7-DC / PD-L2 na manutenção de um microambiente tumoral imunossupressor (Topalian et al., 2012). O PD-1 é uma glicoproteína transmembrana pertencente a superfamília das Imunoglobulinas (Ig). O gene PDCD1 que codifica PD-1 está localizado no cromossomo 2 em humanos (Zhang et al., 2004). Estudos recentes mostraram a importância que os pontos de verificação imunológicos possuem na evasão do tumor. Vários tipos de tumores sólidos, incluindo os CPNPC, superexpressam PD-L1, gerando um microambiente tumoral imunossupressor e a evasão imunológica induzida do tumor, através da downregulation da expressão de moléculas anti apoptóticas e da síntese de citocinas pró-inflamatórias. O bloqueio desta via com anticorpos contra PD-1 ou seus ligantes (como PD-L1) produziu bons resultados clínicos, assim como a melhora da sobrevida global em pacientes com câncer de pulmão (Patel & Kurzrock, 2015; Shukuya & Carbone,

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Cocó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



Continuação do Parecer: 5.517.400

2016). PD-L1 é expresso em uma vários tecidos não neoplásicos , como placenta, endotélio vascular, células das ilhota pancreáticas, músculos, hepatócitos, epitélio e células-tronco mesenquimais, sendo também expresso em células B, células T, células dendríticas, macrófagos e mastócitos (Patel & Kurzrock, 2015). Muitos estudos investigaram o grau de concordância e intercambialidade entre os clones de PD-L1 22C3 e 28.8 (Agilent), SP142 e SP263 (Ventana). A primeira tentativa de harmonizar a imunexpressão de PD-L1 foi o estudo BluePrint, no qual foram selecionados 39 casos de CPNPC, em que três especialistas avaliaram independentemente a porcentagem de expressão de células tumorais (TC) e de células imunes (IC). Nos estudos de fase 1 desse projeto, os pesquisadores concluíram que a expressão de células tumorais (TC) entre SP263, 22C3 e 28-8 era comparável, que SP142 tinha uma expressão mais baixa em TCs, além disso, que a expressão de células imunes (IC) era incomparável entre clones (Hirsch et al., 2017). O pembrolizumab (classe: IgG4 humanizado) e o nivolumab (classe: IgG4 humano) são anticorpos bloqueadores de PD-1, utilizados na clínica para o tratamento do câncer. O pembrolizumab é recomendado como agente único de primeira linha para pacientes com CPNPC metastático e níveis de expressão de PD-L1, clone 22C3 (Agilent), maiores que 50% detectados por imunohistoquímica (IHC). Já o nivolumab, mostrou atividade quando usado como terapia subsequente em toda a população de pacientes com CPNPC não escamoso e escamoso, independentemente do nível de expressão de PD-L1 por IHC. O atezolizumabe, que é um anticorpo humanizado anti-PD-L1, foi aprovado como tratamento de primeira linha para pacientes com CPNPC metastático não escamoso, em combinação com quimioterapia e bevacizumabe (Tsimafeyeu et al., 2020). No estudo de Rittmeyer et al. (2017), os pacientes com alta expressão de PD-L1, isto é, 50% ou mais das células tumorais (TC) e em 10% ou mais das células imunes infiltrantes no tumor (IC), obtiveram o maior benefício do atezolizumabe em comparação com docetaxel, utilizando-se o anticorpo de diagnóstico SP142 (Ventana Medical Systems) por imunohistoquímica. O PD-L1 avaliado por imunohistoquímica (IHQ) é um exemplo dos pontos fortes e limitações de testes de diagnóstico

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Coccó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



Continuação do Parecer: 5.517.400

complementares de IHQ. Uma vantagem do teste PD-L1 é que todos os quatro anticorpos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) testes foram mostrados para prever (variavelmente) respostas clínicas para inibidores do ponto de verificação imunológico. Para alguns pacientes, essas drogas podem induzir um aumento impressionante da imunidade antitumoral que às vezes leva a remissões clínicas dramáticas. Uma importante limitação, por outro lado, é que múltiplos ensaios foram desenvolvidos, cada um com desempenho variado e mal definido, tornando difícil a comparação. No cerne da questão está o escore subjetivo do PD-L1. Sistemas de pontuação-padrão atuais para PD-L1 como um diagnóstico complementar envolve separação de células epiteliais e células inflamatórias e encontrar significado clínico as vezes em percentagens de expressão acima ou abaixo de 1% . Claramente, uma abordagem objetiva, reproduzível e precisa para PD-L1 avaliação traria um grau de consistência necessária neste contexto. A Patologia Digital vem ganhando mais espaço e importância na patologia clínica, pois permite que patologistas possam gerenciar imagens de lâminas em alta resolução, integrá-las a algoritmos com o uso de softwares, assim como compartilhá-las com uma rede de apoio de especialistas para o uso clínico (Niazi; Parwani; Gurcan, 2019). Nesse contexto, o QuPath é um software que foi projetado especificamente para analisar e explorar dados de imagens de lâminas inteiras. Bankhead et al. (2017) relata que o QuPath possui funcionalidades específicas da patologia que tem o intuito de auxiliar em diagnósticos, prognósticos através da avaliação da presença, localização e intensidade da expressão de biomarcadores-chave. Também é capaz de classificar diferentes tipos de células de acordo com algoritmos, gerando uma descrição fenotípica de cada célula na amostra de tecido. Além disso, permite que os desenvolvedores adicionem suas próprias extensões a fim de resolver desafios do cotidiano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Objetivo geral Comparar a imunexpressão de 4 clones de PD-L1 por imunistoquímica em câncer de pulmão e avaliar a morfometria por patologia digital como ferramenta para melhorar predição do escore.

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Coccó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



Continuação do Parecer: 5.517.400

Objetivo Secundário:

Objetivos específicos 1. Avaliar por IHQ, 300 casos de CPNPC em ensaios para PD-L1 com os clones 22C3 e 28.8 (Agilent), SP142 e SP263 (Ventana). 2. Comparar a imunexpressão para PD-L1 nos diferentes clones. 3. Comparar a expressão de PD-L1 entre os subtipos histológicos de CNPC. 4. Correlacionar os resultados de imunohistoquímica para PD-L1 com os resultados de estudos moleculares de EGFR, ALK e ROS1, disponibilizados em banco de dados interno. 5. Avaliar a marcação de PD-L1, diferentes clones, das lâminas escaneadas utilizando o QuPath. 6. Comparar os diagnósticos padrão-ouro de dois patologistas especialistas com os resultados gerados pelo QuPath na expressão do PD-L1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Ausência de riscos

Benefícios:

Com o advento da patologia digital, casos de CPNPC poderão ser revisados a distância aumentando a flexibilidade de diagnóstico;

Com o desenvolvimento desta tecnologia, as análises de imunexpressão de PD-L1 poderá ter o tempo reduzido, implicando um resultado assertivo

e mais rápido para o paciente;

A patologia digital possibilita a maior acessibilidade no estudo do PD-L1, sendo assim, de grande relevância para a comunidade científica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

IMUNOEXPRESSION DE DIFERENTES CLONES DE PD-L1 E VALIDAÇÃO DA

PATOLOGIA DIGITAL PARA DIAGNÓSTICO EM CASOS DE CPNPC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presentes

O estudo se propõe a avaliação da expressão de marcadores utilizados na rotina diagnóstica do paciente.

Não será feita intervenção adicional com

nenhuma tipo de material do paciente. É um estudo comparativo que avalia a interpretação de

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133

Bairro: Cocó

CEP: 60.190-060

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3265-6668

Fax: (85)3265-6668

E-mail: fc@fchristus.com.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS**



Continuação do Parecer: 5.517.400

análises histológicas entre diversos profissionais e com um software. Esse conceito será um importante ferramenta utilizada para auxílio do diagnóstico ou para gerar parâmetros para quantificação de marcadores importantes na decisão terapêutica de pacientes oncológicos, como é o caso do PDL-1

Recomendações:

QUEM VAI PATROCINAR ESTAR CIENTE DOS VALORES?

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM PENDENCIAS

Considerações Finais a critério do CEP:

QUEM VAI PATROCINAR ESTAR CIENTE DOS VALORES?

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1907261.pdf	06/06/2022 18:13:49		Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_LAURA.docx	06/06/2022 18:13:32	FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA	Aceito
Outros	TERMO_FIEL_DEPOSITARIO_LAURA.docx	06/06/2022 18:13:05	FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Patologia_Laura.pdf	03/05/2022 17:52:47	FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA.pdf	03/05/2022 17:47:37	FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Cocó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



Continuação do Parecer: 5.517.400

FORTALEZA, 08 de Julho de 2022

Assinado por:
OLGA VALE OLIVEIRA MACHADO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Cocó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br