



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

**ANA CLÁUDIA DA SILVA MENDES DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO DE EGFR E DA IMUNOEXPRESSION DE ALK E DE  
PD-L1 EM ADENOCARCINOMAS DE PULMÃO**

**FORTALEZA**

**2018**

ANA CLÁUDIA DA SILVA MENDES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO DE EGFR E DA IMUNOEXPRESSÃO DE ALK E DE  
PD-L1 EM ADENOCARCINOMAS DE PULMÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Patologia –  
Departamento de Patologia e Medicina  
Legal – Universidade Federal do Ceará  
para Defesa de Mestrado em Patologia.  
Área de Concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rocha  
Fernandes Távora

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

S578a Silva Mendes de Oliveira, Ana Cláudia da.  
AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO DE EGFR E DA IMUNOEXPRESSÃO DE ALK E DE PD-L1  
EM ADENOCARCINOMAS DE PULMÃO / Ana Cláudia da Silva Mendes de Oliveira. – 2018.  
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Fabio Rocha Fernandes Távora.

1. neoplasias pulmonares. 2. biomarcadores tumorais. 3. EGFR. 4. ALK. 5. PD-L1. I.  
Título.

CDD 571.9

---

ANA CLÁUDIA DA SILVA MENDES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO DE EGFR E DA IMUNOEXPRESSÃO DE ALK E DE  
PD-L1 EM ADENOCARCINOMAS DE PULMÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Patologia –  
Departamento de Patologia e Medicina  
Legal – Faculdade de Medicina –  
Universidade Federal do Ceará – como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Patologia.  
Área de Concentração: Oncologia

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Fabio Rocha Fernandes Távora (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dra. Cristiane Cunha Frota  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dr. Israel Lopes de Medeiros  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Mendes e Maria das Graças, fontes de  
amor incondicional e eterno;

Ao meu esposo, Joãoneci, que sempre  
está ao meu lado;

Aos meus filhos, Joana e Lucas, que me  
inspiram diariamente a ser uma pessoa  
melhor;

Aos meus familiares e aos meus amigos,  
que são meu porto seguro;

Aos meus colegas de trabalho que  
souberam me compreender e apoiar;

Aos mestres, que me guiaram nessa  
jornada;

E aos pacientes, que enfrentam suas  
enfermidades com força e resignação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por permitir que essa experiência traga benefícios para humanidade.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Ao Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora, pelos preciosos conhecimentos transmitidos.

Aos professores, Dra. Cristiane, Dr. Israel e Dra. Ana Paula, pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões.

“Se servimos a ciência, devemos estender seus limites, não apenas no que diz respeito ao nosso próprio conhecimento, mas também à expectativa dos outros.”  
(VIRCHOW, 1860).

## RESUMO

O câncer de pulmão é um dos mais frequentes no Brasil e no mundo sendo a principal causa de mortalidade por neoplasia. Com o surgimento de novos medicamentos direcionados para alterações moleculares específicas, como anti-tirosina quinase para mutação de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) e para o rearranjo do gene ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) e imunoterapia para expressão de PD-L1 (Programmed Cell Death Ligant 1 Receptor), tem-se conseguido um importante ganho de tempo de sobrevida global e de tempo livre de doença em pacientes portadores de carcinoma de pulmão não pequenas células (CPNPC) que contenham tais alterações. A proposta deste estudo é pesquisar os biomarcadores EGFR, ALK e PD-L1 e a relação destes com dados demográficos e com padrões de crescimento histológico em adenocarcinomas pulmonares. Foi realizado um estudo retrospectivo em 173 amostras parafinadas de CPNPC em blocos arquivados sob guarda do laboratório de patologia do Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes (Hospital de Messejana-CE) nos anos de 2015 e 2016. As expressões de ALK e de PD-L1 foram avaliadas por imuno-histoquímica utilizando os anticorpos D5F3 e SP263, respectivamente. O estado mutacional do gene EGFR foi avaliado através de sequenciamento. A expressão proteica do rearranjo do gene ALK foi detectada em 10,4% das amostras, e a população ALK positiva foi 8,8 anos mais jovem que a população com tumores sem essa expressão ( $p=0,0034$ ). 22,1% dos tumores continha alguma mutação do gene EGFR, sendo a mutação mais comum a mutação pontual L858R no éxon 21 (45,5%), seguida pela deleção no éxon 19 (36,3%). O estado selvagem do gene EGFR foi associado com o padrão de crescimento predominantemente sólido ( $p=0,0478$ ). O escore de proporção tumoral (EPT) maior ou igual a 50% para imuno-expressão de PD-L1 foi documentado em 18,2% das amostras. Não foi encontrada associação estatística significativa entre a expressão de PD-L1 e as mutações direcionais EGFR e ALK.

**Palavras chave:** Adenocarcinoma. Neoplasias Pulmonares. Biomarcadores tumorais. EGFR. ALK. PD-L1.



## ABSTRACT

Lung cancer is one the most frequent cause of cancer death in Brazil and worldwide. The advent of new drugs directed towards specific molecular alterations, such as anti-tyrosine kinase for EGFR mutation (Epidermal Growth Factor Receptor) and for the rearrangement of the ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) gene and immunotherapy for PD-L1 (Cell Death Ligant 1 Receptor) expression brought an important gain in overall survival and in progression free survival in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring those alterations. The present study aims to investigate the biomarkers EGFR, ALK and PD-L1 and their relationship with demographic data and histologic growth patterns in pulmonary adenocarcinomas. The study consisted in a retrospective analysis involving 173 paraffin-embedded specimens of NSCLC from the registry of the pathology laboratory during 2015 and 2016. ALK and PD-L1 expression in tumor cells were evaluated by immunohistochemical analysis using antibodies D5F3 and SP263, respectively. EGFR mutation status was assessed through sequencing. ALK expression was detected in 10.4% of samples and the population with ALK positivity was, in average, 8.8 years younger than the population not expressing ALK ( $p=0.0034$ ). 22% of tumors carried mutations in EGFR. The most frequent EGFR mutation was exon 21 L858R point mutation (45.5%) followed by exon 19 deletions (36.3%). Solid predominant subtype was associated with wild-type EGFR status ( $P=0.047$ ). PD-L1 tumor proportion scores (TPS) of  $\geq 50\%$  was documented in 18.2% of samples. No significant relationships were found between positive PD-L1 expression and driver genes (neither ALK nor EGFR).

**Keywords:** Adenocarcinoma. Lung Neoplasms. Biomarkers, Tumor. EGFR. ALK. PD-L1.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Panorama epidemiológico global de câncer de pulmão .....	16
Figura 2	Padrões de crescimento histológico em adenocarcinomas de pulmão, coloração hematoxilina e eosina.....	19
Figura 3	Representação esquemática do gene EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor-Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) mostrando a distribuição dos éxons no domínio extracelular e as mutações descritas na literatura em relação a associação com sensibilidade ou resistência a inibidores tirosina-quinase anti-EGFR.....	23
Figura 4	Esquema tridimensional do complexo da estrutura da proteína ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) com crizotinib, medicamento anti-tirosina quinase específico para expressão anômala do gene ALK.....	26
Figura 5	Métodos diagnósticos para detecção de rearranjo do gene ALK em adenocarcinomas de pulmão .....	27
Figura 6	Inibidor do ponto de verificação imunológico. As proteínas do ponto de verificação, como PD-L1 nas células tumorais e PD-1 nas células T, ajudam a manter as respostas imunes sob controle. A ligação de PD-L1 a PD-1 impede que as células T ataquem células tumorais no corpo (painel esquerdo). O bloqueio da ligação de PD-L1 a PD-1 com um inibidor de ponto de verificação imunológico (anti-PD-L1 ou anti-PD-1) permite que as células T destruam células tumorais (painel direito) .....	30
Figura 7	Padrões de crescimento histológico em adenocarcinomas pulmonares e reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-ALK, clone D5F3 .....	41
Figura 8	Padrões de crescimento em adenocarcinoma de pulmão com imunorreatividade positiva para anticorpo anti-ALK, clone D5F3...	47
Figura 9	Imunomarcagem para o anticorpo anti-PD-L1, clone SP263, de acordo com o escore de proporção tumoral em adenocarcinomas pulmonares .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos dados demográficos dos pacientes selecionados para o estudo e a respectiva classificação histológica dos adenocarcinomas pulmonares .....	40
Tabela 2	Frequência de biomarcadores avaliados em adenocarcinoma pulmonares .....	43
Tabela 3	Correlações clínico-patológicas e estado mutacional do gene EGFR em adenocarcinomas pulmonares .....	44
Tabela 4	Descrição de dados demográficos, histopatológicos e de biomarcadores dos casos positivos para Imunomarcção da proteína do gene ALK.....	43
Tabela 5	Correlações clínico-patológicas e expressão da proteína do gene ALK em adenocarcinomas pulmonares .....	46
Tabela 6	Correlações clínico-patológicas e expressão da proteína PD-L1 em adenocarcinomas pulmonares .....	50
Tabela 7	Correlações entre a expressão de PD-L1 e o estado mutacional do gene EGFR em adenocarcinomas pulmonares	51
Tabela 8	Correlações entre a expressão da proteína PD-L1 e a expressão da proteína ALK em adenocarcinomas pulmonares	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
GLOBOCAN	Global Burden of Cancer Study (Carga Global do Estudo do Câncer)
CPPC	Carcinoma de Pulmão de Pequenas Células
CPNPC	Carcinomas de Pulmão Não Pequenas Células
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer (Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão)
ATS	American Thoracic Society (Sociedade Torácica Americana)
ERS	European Respiratory Society (Sociedade Respiratória Europeia)
TTF1	Thyroid Transcription Factor 1 (Fator de Transcrição Tireoidiana 1)
OMS	Organização Mundial de Saúde
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase (Quinase de Linfoma Anaplásico)
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral (Sarcoma do Vírus de Rato)
PD1	Programmed Cell Death 1 Receptor (Receptor de Morte Celular Programada 1)
PD-L1	Programmed Cell Death Ligant 1 Receptor (Ligante do Receptor de Morte Celular Programada 1)
CEC	Carcinoma espinocelular
ROS1	V-Ros Avian UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog
FDA	Food and Drug Administration (Administradora de medicamentos e alimentos)
TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors (Inibidores de Tirosina Quinase)
BRAF	Homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v- raf
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano)
RET	Rearranged During Transfection (Reorganizado durante a transfecção)
Erb-B	Oncogene Viral de Leucemia Eritroblástica

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases (Proteínas quinase mitoticamente ativas)
AKT1	Oncogene Viral Homologo ao Timona do murinho v-AK
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
FISH	Fluorescence in situ Hybridization (Hibridização in situ por fluorescência)
IDEAL	Iressa Dose Evalution in Advanced Lung Cancer
ISEL	Iressa Survival Evalution in Lung Cancer
IPASS	Iressa Pan-Asia Study (Estudo Iressa pan-asiático)
NPM	Nucleophosphin (Nucleofosfina)
EML4	Echinoderm Microtubule associated Protein Like 4
IHQ	Imuno-histoquímica
ERK	Extracelular signal –regulated kinase (Sinal extra-celular regulado por quinase)
JAK3	Janus kinase 3
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUS	Sistema Único de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Patologia .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Subtipos histológicos .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Biomarcadores .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.1</b>	<b><i>EGFR</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2</b>	<b><i>ALK</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.3</b>	<b><i>PD-1 / PD-L1</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Justificativa .....</b>	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenho do estudo e seleção da amostra .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Comitê de ética .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3</b>	<b>Histopatologia .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Pesquisa de mutação de EGFR .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação de parâmetros imuno-histoquímicos .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Avaliação estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICE A – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO .....</b>	<b>76</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia

O câncer de pulmão é uma das neoplasias mais frequentes no mundo, apresentando aumento de 2% por ano na sua incidência mundial, e é a causa mais frequente de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. A incidência de casos novos de câncer de pulmão, segundo a estimativa mundial de 2012, foi de 1,8 milhão, representando 12,9% de todos os novos casos de câncer, e 1,6 milhão de óbitos (19,4%) em 2012. 58% desses casos ocorrem em regiões menos desenvolvidas. (TRAVIS et al., 2015).

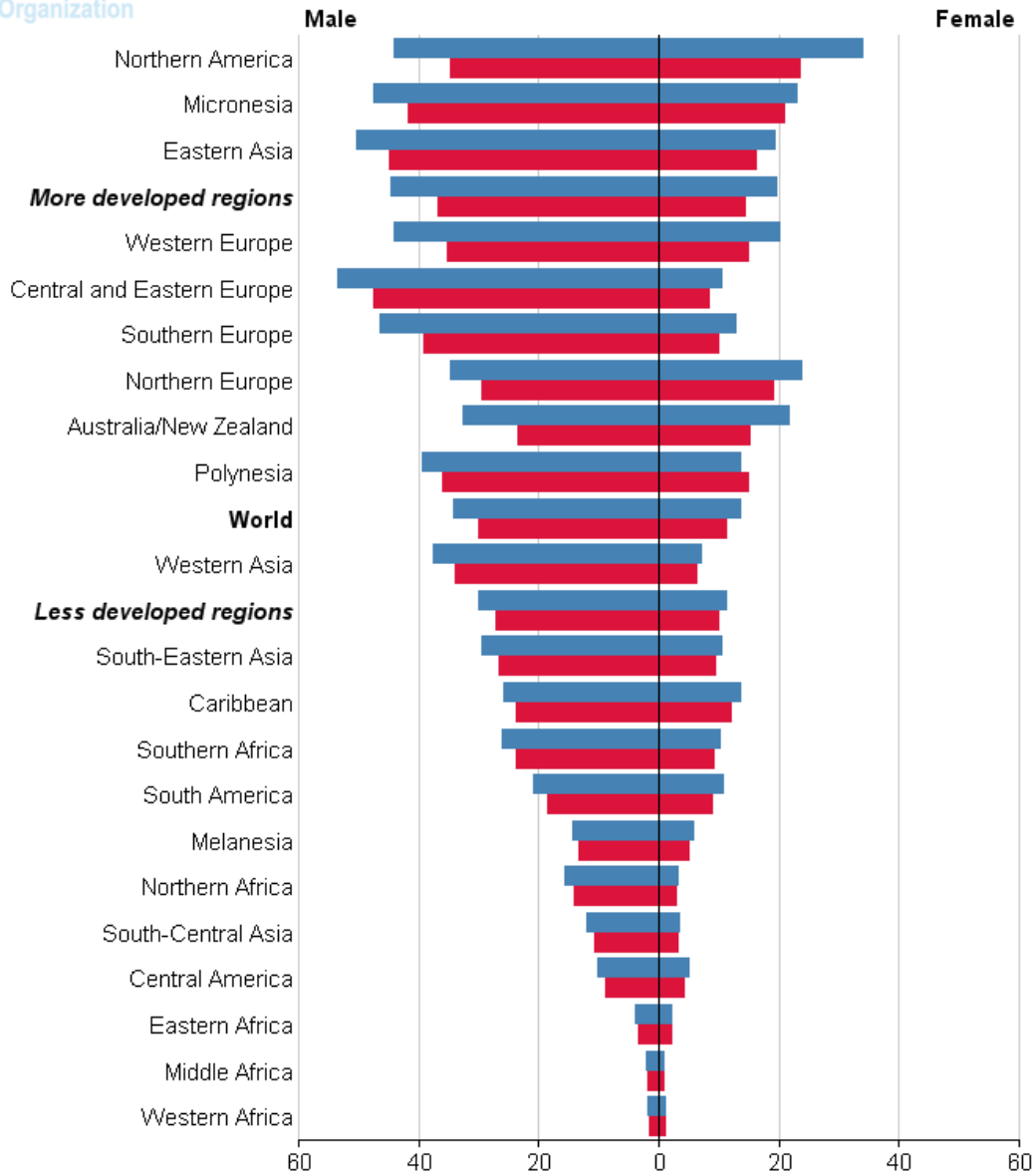
No Brasil, em 2015, ocorreram 15.514 óbitos por câncer de pulmão em homens e 10.978 em mulheres. Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para 2018, válidas também para 2019, é esperada a ocorrência de mais de seiscentos mil casos novos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, e cerca de trinta mil novos casos de câncer de pulmão, sendo o gênero masculino o mais acometido com cerca de dezoito mil casos novos. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, na região do nordeste brasileiro, o câncer de pulmão em homens é o terceiro mais frequente (10,37/100 mil) e para as mulheres ocupa a quarta posição (7,82/100 mil). (INCA, 2018)

Uma vez que não são observados sintomas em seus estágios iniciais, esse tipo de câncer é detectado em estágios avançados, sendo a razão da mortalidade pela incidência de aproximadamente 0,87; refletindo sua alta letalidade e permitindo que sua incidência seja inferida pela mortalidade (figura 1). A sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. Em 90% dos casos diagnosticados, o câncer de pulmão está associado ao consumo de derivados de tabaco, sendo uma das principais causas de morte evitáveis. Nas mulheres, as taxas de incidência são geralmente mais baixas e o padrão geográfico é um pouco diferente, refletindo principalmente a menor exposição histórica ao tabagismo. (WHO, 2012)

As taxas de incidência mais elevadas, estimadas por idade, são vistas na Europa Central e Oriental (53,5 por 100.000) e na Ásia Oriental (50,4 por 100.000), enquanto as mais baixas são observadas na África Central e Ocidental (2,0 e 1,7 por 100.000, respectivamente). (FERLAY et al., 2015).

Figura 1 - Panorama epidemiológico global de câncer de pulmão

International Agency for Research on Cancer



GLOBOCAN 2012 (IARC)

■ Incidence  
■ Mortality

Fonte: WHO (2012).

Estimativa de taxas padronizadas por idade por 100.000



## 1.2 Patologia

Mary Matthews solidificou um alicerce na compreensão da patologia de câncer de pulmão que modificou a perspectiva terapêutica dessa enfermidade quando, em 1973, estabeleceu que o carcinoma de pulmão de pequenas células estava quase sempre disseminado no momento do diagnóstico, e que a ressecção cirúrgica nestes casos não seria curativa (MATTHEWS *et al.*, 1973).

A partir dessa descoberta, foi observado que o carcinoma de pulmão de pequenas células era inicialmente responsivo à terapia disponível na época. Isto levou a divisão do câncer de pulmão em duas categorias: carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC) e carcinoma de pulmão “não pequenas células” (CPNPC), que inclui adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células. Cerca de 85% das neoplasias de pulmão são atualmente carcinomas de pulmão “não pequenas células” (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013).

O surgimento de correlações radiológicas-patológicas entre opacidades tipo vidro fosco versus sólida ou mista vistas por tomografia computadorizada e carcinoma bronquíolo-alveolar versus crescimento invasivo vistos por patologistas abriram novas oportunidades para estudos de imagens serem utilizados por radiologistas, pneumologistas e cirurgiões como forma de prever o subtipo histológico de adenocarcinomas, e assim, o prognóstico do paciente, melhorando o pré-operatório através dessa avaliação para escolha do tipo de intervenção cirúrgica mais adequada. (AOKI *et al.*, 2001)

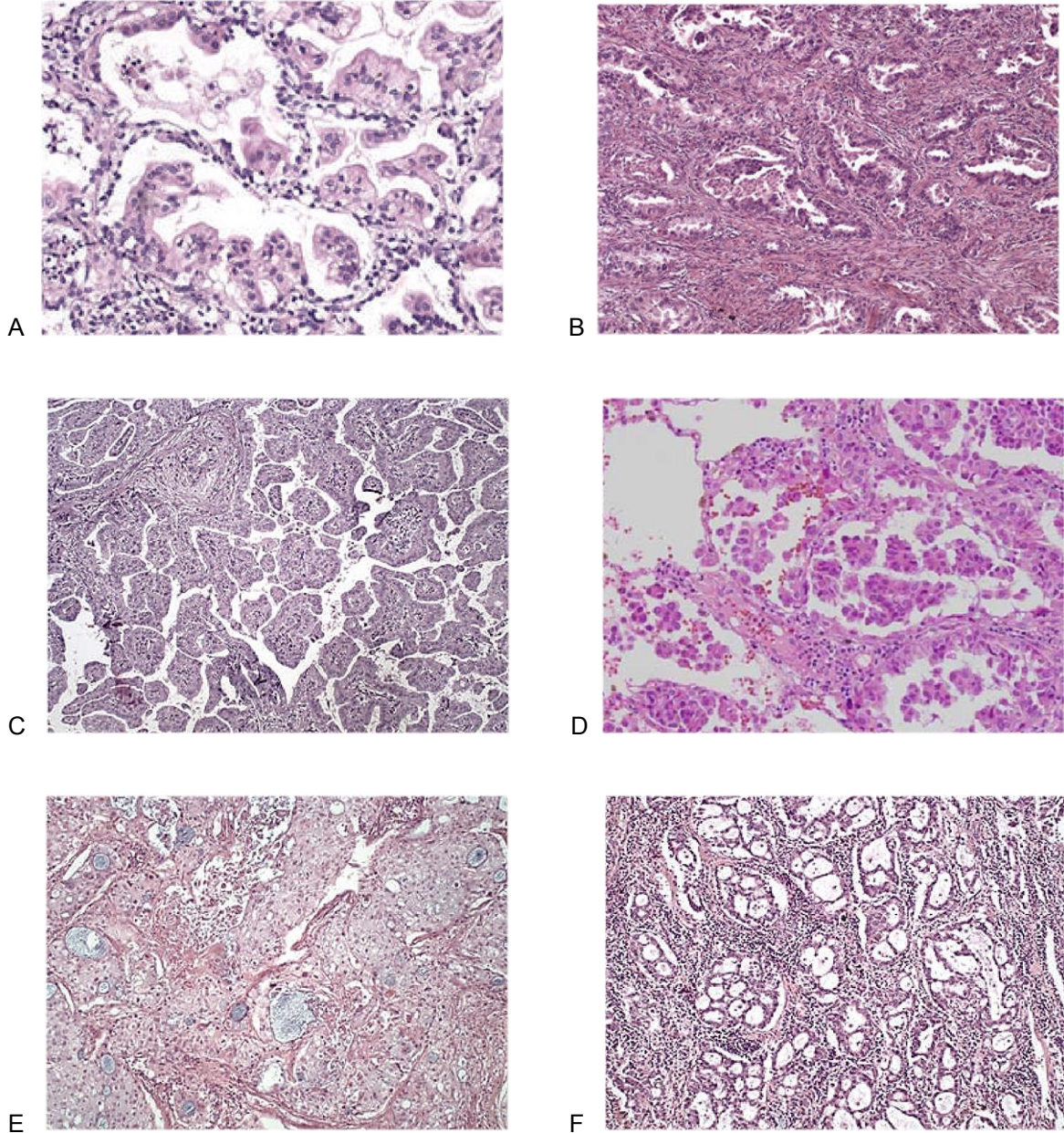
Em 2011, uma equipe multidisciplinar composta pela Associação Internacional para Estudo de Câncer de Pulmão (IASLC – International Association for the Study of Lung Cancer), pela Sociedade Torácica Americana (ATS – American Thoracic Society), e pela Sociedade Respiratória Europeia (ERS - European Respiratory Society) propôs uma nova subclassificação histológica para o CPNPC com o objetivo de padronizar a terminologia e os critérios diagnósticos do grupo de carcinoma anteriormente denominado bronquíolo-alveolar. A necessidade de classificar de forma mais específica os CPNPC teve várias razões, dentre elas, o fato de que os subtipos histológicos têm diferentes valores prognósticos e auxiliam na determinação do tratamento, funcionando como guia para escolha dos casos para investigação molecular de biomarcadores. (TRAVIS *et al.*, 2011)

### 1.2.1 Subtipos histológicos

A maioria dos adenocarcinomas de pulmão são derivados de células da junção bronco-alveolar, células claras ou pneumócitos. As células provenientes das unidades respiratórias terminais originam os subtipos não mucinosos e as provenientes das unidades respiratórias não terminais, os adenocarcinoma mucinosos. A expressão imuno-histoquímica de TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1) é típica de pneumócitos de unidades respiratórias terminais, sendo característica de adenocarcinomas não mucinosos. Estes são subclassificados pela classificação da OMS (Organização Mundial de Saúde) de 2015 de acordo com o padrão de crescimento em: lepidico (in situ), acinar, papilar, micropapilar ou sólido, sendo o padrão cribriforme considerado um subtipo do padrão sólido. Mais de 90% dos adenocarcinomas de pulmão possuem mais de um padrão de crescimento, sendo o tipo predominante utilizado como modificador, sendo necessário estimar a proporção em percentagem dos outros subtipos presentes no tumor. Histologicamente, os subtipos lepidico e acinar preservam algumas características alveolares, enquanto os subtipos papilar e sólido são estruturalmente mais invasivos, com padrão de crescimento “destrutivo” (BURKE *et al.*, 2017).

Como pode ser visto na figura 2, as características histológicas do padrão de crescimento lepidico são semelhantes para o adenocarcinoma “in situ” e lepidico com áreas minimamente invasivas, em geral, acinar. A distinção entre acinar e lepidico é a ausência da arquitetura alveolar prévia e o reconhecimento do septo alveolar anterior. O padrão acinar é composto de glândulas agrupadas separadas por estroma fibroso. O padrão de crescimento papilar clássico é composto de eixos fibrovasculares delineados por células cuboidais ou colunares, por vezes com secreção apical. O adenocarcinoma micropapilar possui ramificações papilares que formam floretes caracterizados por ausência de eixo fibrovascular, resultando numa polaridade invertida, com a face da borda em escova mucinosa ao longo da membrana periférica externa. O adenocarcinoma sólido é um grupo heterogêneo de tumores que variam do extremo da ausência de evidência de diferenciação, sem glândulas ou vacúolos, que não a marcação imuno-histoquímica de TTF-1, ao tipo cribriforme, que pode ser formado por grandes espaços císticos contendo ácinos dilatados até grupos glandulares discretos em meio a áreas sólidas (BURKE *et al.*, 2017).

Figura 2 - Padrões de crescimento histológico em adenocarcinomas de pulmão, coloração hematoxilina e eosina



Fonte: TORRES *et al.* (2014).

A. Proliferação neoplásica delineando alvéolo, conformação lepidica (400x). B. Proliferação de glândulas em meio a estroma fibroso, padrão de crescimento acinar (200x). C. Formações de eixos fibrovasculares delineados por células cuboidais atípicas, padrão papilar (200x). D. Floretes de células tumorais de polaridade invertida destituídos de eixo fibrovascular, padrão micro papilar (400X). E. Escassas estruturas glandulares com vacúolos remanescentes contendo mucina, padrão sólido (400x) F. Glândulas fusionadas com numerosas luzes semelhantes a crivos, padrão cribriforme (200X).

Recentes estudos genômicos em larga escala identificaram várias alterações genéticas nos adenocarcinomas. Certas mudanças genéticas, como mutação do gene EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) ou translocações do gene ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase – Quinase de Linfoma Anaplásico), estão fortemente associadas com uma resposta terapêutica específica e histologia de adenocarcinoma facilmente identificável (OKADA, 2013).

A avaliação histológica adequada de carcinomas pulmonares é crítica, pois as mudanças morfológicas são complementares às alterações moleculares; assim, o fenótipo morfológico pode ser determinado por padrões de expressão gênica. Várias mutações direcionais são alvos terapêuticos e podem se correlacionar com subtipos específicos de adenocarcinoma, pois se tem visto que cada subtipo histológico mostra uma alta prevalência de mutações específicas. Por exemplo, a maioria dos tumores mucinosos possui mutações KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral – Sarcoma do Vírus de Rato) e os subtipos papilar e acinar frequentemente têm mutações no gene EGFR. Essas alterações genéticas associadas a alterações morfológicas têm despertado cada vez mais interesse de patologistas e oncologistas, uma vez que o subtipo histológico pode auxiliar na previsão da eficácia da terapia alvo (KOH *et al.*, 2015; SHOLL *et al.*, 2015).

Existem poucas descrições de associação entre características morfológicas dos adenocarcinomas com rearranjo do gene ALK ou com expressão de PD-L1 (Programmed Cell Death Ligant 1 Receptor - Ligante do Receptor de Morte Celular Programada 1). O rearranjo do gene ALK é descrito em adenocarcinomas que contém células em anel de sinete, pacientes jovens, sem história de tabagismo ou fumantes leves (até 10 maços de cigarro por ano). (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013; INAMURA *et al.*, 2008). Já a expressão de PD-L1 em células tumorais pode variar de 45 a 50% em biópsias de CPNPC, porém sem associação histológica bem definida (GROSSO *et al.*, 2013).

A diferenciação entre carcinoma de células escamosas (CEC) e adenocarcinoma é fundamental devido às mutações de EGFR e os rearranjos de ALK e ROS1 (V-Ros Avian UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog) serem vistos principalmente em adenocarcinomas. Além disso, o quimioterápico perimetrexede tem maior efetividade em adenocarcinomas avançados do que em CEC, e, o bevacizumab, uma droga anti-EGFR, é contraindicada para CEC, enquanto o

nivolumab, imunoterápico, foi liberado pelo FDA (Food and Drug Administration - Administradora de medicamentos e alimentos) para tratamento de CEC avançado. Essa implicação terapêutica em relação aos tipos histológicos e alterações moleculares levam a uma tendência em se classificar os tumores com essas duas informações. (TRAVIS *et al.*, 2015)

### 1.3 Biomarcadores

O tratamento do adenocarcinoma pulmonar é determinado principalmente com base no estágio da doença. Em geral, o tratamento de escolha para o adenocarcinoma em estágio inicial é a excisão cirúrgica, enquanto os pacientes com tumores em estágio avançado, a maioria dos casos, passam por quimioterapia com ou sem associação de radioterapia. O insucesso diante de tais ações terapêuticas padronizadas por anos levou a comunidade científica a investigar biomarcadores, alguns dos quais já estão sendo utilizados para seleção da melhor estratégia de tratamento farmacológico para o CPNPC. (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013)

O câncer de pulmão é uma neoplasia geneticamente heterogênea caracterizada por um amplo espectro de mutações. Várias dessas mutações estão envolvidas na patogênese dos CPNPC e algumas delas são objetos de grande interesse clínico devido ao desenvolvimento de terapias alvo, principalmente para os adenocarcinomas. Por exemplo, para adenocarcinoma pulmonares com gene EGFR mutado, inibidores de tirosina quinase (TKIs), gefitinib e erlotinib, são alternativas terapêuticas superiores quando comparados à quimioterapia padrão com platina (KIM *et al.*, 2016; CARDARELLA *et al.*, 2012).

Mutações do gene EGFR, desde 2004, e rearranjo do gene ALK, desde 2007, estão entre as primeiras mutações direcionais identificadas em adenocarcinoma de pulmão, são mutuamente exclusivos e representam atualmente os mais importantes alvos terapêuticos farmacológicos contra esta neoplasia. A proliferação e a sobrevivência tumoral dependem dessas mutações; portanto, a inativação dos efeitos dessas mutações através de agentes moleculares leva a morte da célula cancerosa. Combinados, esses subgrupos moleculares perfazem pelo menos 20% de todos os adenocarcinomas, a depender da população estudada (GAUTSCHI *et al.*, 2017).

O número de genes alvo terapêuticos está crescendo devido à melhor compreensão das mutações direcionais e seus potenciais oncogênicos. Mutações direcionais a serem consideradas incluem alterações nos genes BRAF, HER2 e RET, pois, apesar de uma menor frequência, os mesmos têm relevância clínica devido a disponibilidade de terapias – alvo aprovadas para outras indicações oncológicas, como HER2 para mama, RET para tireoide e BRAF para melanoma (GAUTSCHI *et al.*, 2017).

### **1.3.1 EGFR**

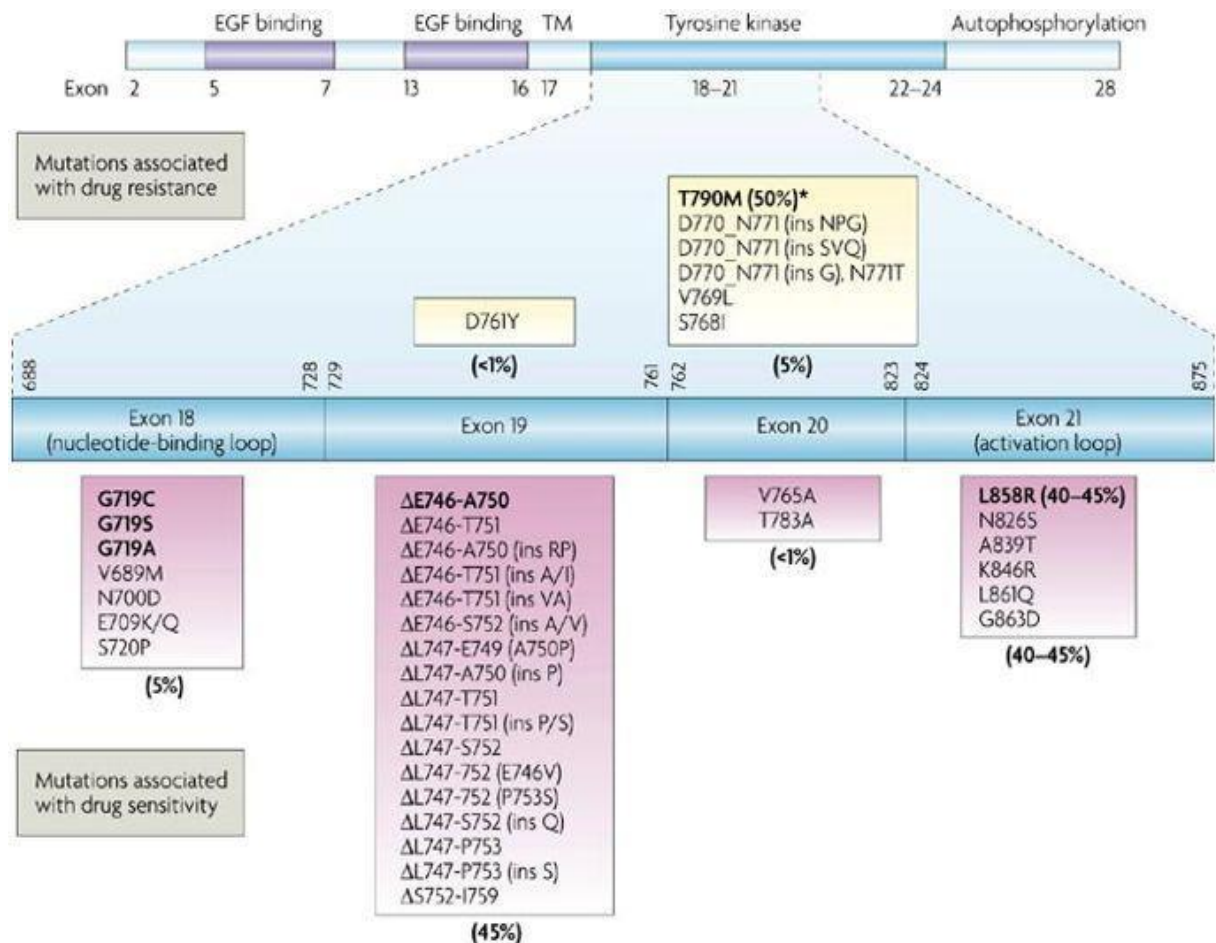
O gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) localiza-se no braço curto do cromossomo 7 e codifica um receptor da família de receptores tirosina quinase transmembranares EGFR/Erb-B (Epidermal Growth Factor Receptor / Erythroblastic leukemia viral oncogene) que é composta por quatro membros: EGFR (HER-1) / Erb-B1; HER2 / c-neu / Erb-B2; HER3 / Erb-B3 e HER4 / Erb-B4. Essas proteínas compartilham entre 40 e 50% de aminoácidos homólogos e possuem um domínio de organização comum. Quando ativados pelo ligante, estes receptores sinalizam através de duas principais vias de ativação, a via RAS-MAPK (RAc Sarcoma virus - Mitogen Activated Protein Kinases) e a via PI3K / AKT (Phosphatidylinositol-3 kinase - V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) que desempenham papéis críticos na regulação, proliferação e sobrevivência celular (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013).

A taxa de expressão global do EGFR é de 51%, sendo um forte indicador prognóstico em carcinomas de cabeça e pescoço, ovário, bexiga e esôfago onde sua amplificação está associada à redução de recidiva e taxa de sobrevivência global. Em CPNPC, sua amplificação está presente em cerca de 6% dos tumores, com relatos de aumento de sobrevivência associados a uma melhor resposta ao gefitinib, um bloqueador de EGFR (LI *et al.*, 2008).

Existem três mecanismos de ativação de EGFR em células tumorais: mutações de EGFR, amplificação, ganho do número de cópias gênicas e superexpressão. Estes eventos frequentemente são simultâneos. A superexpressão de EGFR era considerada de pior prognóstico para CPNPC, porém Nakamura realizou uma meta-análise em 2006 que não confirmou essa associação. O valor preditivo da superexpressão de EGFR para responsividade a inibidores de tirosina

quinase anti-EGFR foi testado em vários estudos. Apesar de inicialmente mostrar uma clara relação, quando avaliado pelo número de cópias por FISH e resposta ao erlotinib, não foi confirmada esta associação. Até o momento, o teste com número de cópias não é recomendado na seleção para tratamento de CPNPC (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013).

Figura 3 - Representação esquemática do gene EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor-Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) mostrando a distribuição dos éxons no domínio extracelular e as mutações descritas na literatura em relação a associação com sensibilidade ou resistência a inibidores tirosina-quinase anti-EGFR.



Fonte: SHARMA *et al* (2007).

Em 2004, dois grupos de pesquisa independentes sequenciaram o gene EGFR em amostras de pacientes portadores de CPNPC em estágio avançado. O objetivo era avaliar o valor preditivo da mutação no gene EGFR para terapia com inibidores tirosina quinase anti-EGFR. Foram identificadas pequenas deleções ou substituições de aminoácidos em 14 de 15 pacientes que eram bons respondedores ao tratamento com gefitinib. Não foram encontradas mutações do gene EGFR nos pacientes sem resposta ao tratamento com gefitinib. Nestes estudos, foram identificadas as mutações ativadoras do gene EGFR, sendo encontradas nos éxons 18 ao 21 no domínio tirosina-quinase, como pode ser visto no esquema da figura 3. Estas mutações têm sido relatadas em 5 a 30% dos casos de CPNPC dependendo da população do estudo (incidência de 15% em caucasianos em comparação com 30% em asiáticos) (LYNCH *et al.*, 2004; PAEZ *et al.*, 2004).

As mutações do gene EGFR levam a uma ativação do receptor independente de ligante e são preferencialmente encontrados em não fumantes, mulheres, asiáticos e pacientes com histologia de adenocarcinoma. Mais de 3.000 mutações somáticas de EGFR já foram descritas sendo que as deleções no éxon 19 (incluindo resíduos 746 a 753) e substituição de arginina por leucina (L858R) no éxon 21 constituem cerca de 90% destas mutações. Substituição de glicina por serina, alanina ou cisteína no códon 719 (G719X) do éxon 18 ocorre em um adicional de 4% de casos e outras mutações sem sentido e pequenas duplicações / inserções no éxon 20 respondem pelo restante (LYNCH *et al.*, 2004; PAEZ *et al.*, 2004).

Os inibidores mais eficazes da tirosina quinase anti-EGFR são os derivados da anilinoquinazolina que atuam como inibidores reversíveis competitivos de ATP, erlotinib e gefitinib. Após estudos pré-clínicos fase I bem-sucedidos, o gefitinib progrediu para estudos de fase II. Taxas de resposta entre 10 e 20% foram relatadas em dois ensaios clínicos randomizados duplo cego de fase II, IDEAL (Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer) 1 e 2, que cadastraram 210 e 221 pacientes com CPNPC previamente tratados com um ou dois regimes. Com base nestes resultados, o gefitinib foi aprovado pelo FDA americano para o tratamento de CPNPC avançado em maio de 2003. Com base no insucesso dos resultados do estudo clínico ISEL (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer), em junho de 2005, onde gefitinib foi comparado com placebo e num seguimento de 7,2 meses e não se encontrou diferença significativa entre os dois grupos, a FDA limitou o uso de



gefitinib. No entanto, o estudo IPASS (Iressa Pan-Asia Study) confirmou o benefício da terapia com gefitinib para pacientes com CPNPC com mutações no gene EGFR, com aumento no tempo de sobrevida livre de doença e no tempo de sobrevida global em comparação com quimioterapia com platina, e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou o gefitinib para o tratamento de doença localmente avançada ou metastática de pacientes com CPNPC com mutação ativadora de EGFR em junho 2009 (FUKUOKA *et al.*, 2003; MOK *et al.*, 2009).

O inibidor de baixo peso molecular, erlotinibe, exibiu atividade antitumoral em estudos clínicos pré-clínicos e de fase I. Erlotinib foi aprovado pela FDA americana em novembro de 2004 com base nos resultados do ensaio randomizado de fase III BR.21 que incluiu 731 pacientes com CPNPC tratados com erlotinibe ou placebo como segunda ou terceira linha terapêutica. A sobrevida global do grupo tratado foi de 2 meses a mais do que o grupo placebo (6,7 meses vs. 4,7 meses). A sobrevida global de 1 ano foi de 31% para o grupo erlotinibe comparado a 22% para o grupo controle (SHEPHERD *et al.*, 2005).

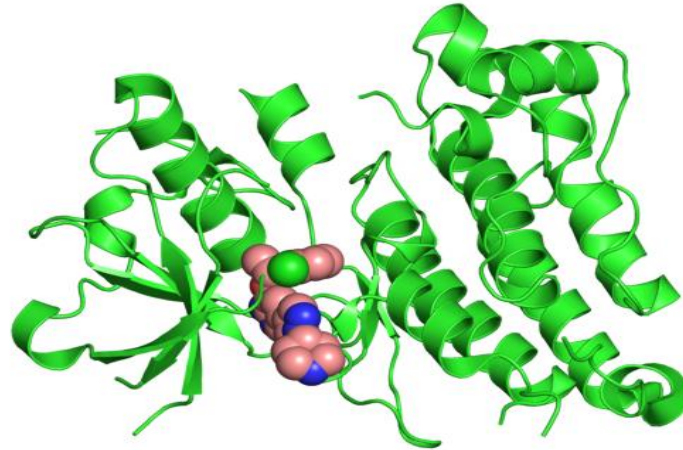
O papel preditivo das mutações do EGFR para a sensibilidade da terapia TKI anti-EGFR foi revelada por diferentes estudos e confirmada por uma grande meta-análise incluindo 59 estudos de 3101 pacientes com CPNPC. Mutações do EGFR foram preditivo de resposta a um agente único TKI anti-EGFR com sensibilidade e especificidade de 0,78, e 0,86 respectivamente. Em geral, o tratamento com TKIs anti-EGFR melhora significativamente a sobrevida de pacientes com CPNPC com mutações do EGFR em comparação com a quimioterapia tradicional. (DAHABREH *et al.*, 2010). Atualmente, TKIs com alvo em mutações EGFR são indicados como primeira linha terapêutica em pacientes selecionados. (NURWIDYA,2016).

### **1.3.2 ALK**

A proteína ALK é um receptor transmembranar com atividade tirosina quinase, normalmente expresso apenas no sistema nervoso central, porém não em tecido pulmonar normal. Ele pertence à superfamília de receptores do fator de crescimento da insulina que é codificado no cromossomo 2 e é constituído por dois grandes íntrons e vinte e seis éxons. O gene ALK foi inicialmente caracterizado na fusão com a proteína NPM (Nucleophosphin-Nucleofosfina) presente em Linfoma

Anaplásico de grandes células, 1994, e atualmente é conhecido como componente de muitas proteínas de fusão em diversos tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 4 - Esquema tridimensional do complexo da estrutura da proteína ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) com crizotinib, medicamento anti-tirosina quinase específico para expressão anômala do gene ALK



Fonte: Disponível em: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Anaplastic\\_lymphoma\\_kinase](https://en.wikipedia.org/wiki/Anaplastic_lymphoma_kinase)>. Acesso em 22 de junho 2018.

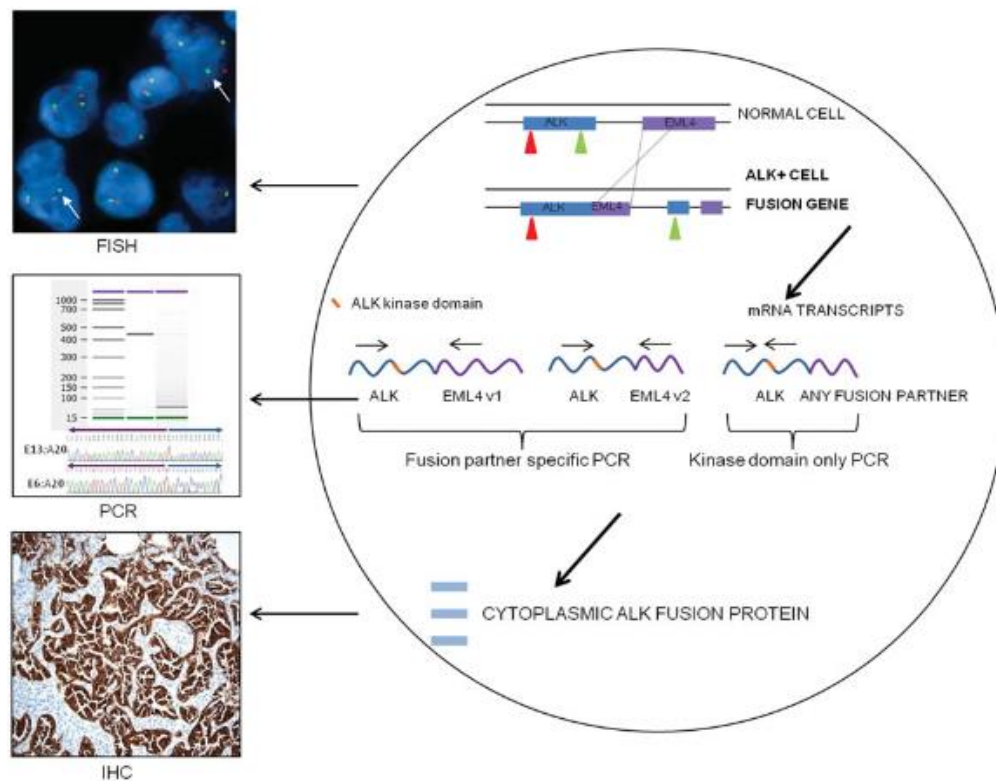
A fusão ALK-EML4 é encontrada em cerca de 2 a 7% dos CPNPC e foi descoberta em 2007 por Soda *et al.*, que identificaram uma pequena inversão no braço curto do cromossomo 2, que leva a fusão da porção N-terminal da EML4 com o ALK (SODA *et al.*, 2007). A patogênese molecular do gene ALK começa com rearranjos cromossômicos que associam as sequências de codificação 3' para o domínio de sinalização intracelular com elementos promotores 5' e sequências de codificação que orientam a superexpressão da quinase e oligomerização independente do ligante, uma característica comum das neoplasias humanas com proteína tirosina quinase do tipo fusão (CHOI *et al.*, 2008).

O rearranjo ALK/EML4 tem um claro potencial oncogênico e sua aberrante atividade de tirosina quinase promove a proliferação celular e sobrevida além de alterações no rearranjo do citoesqueleto e formato da célula (TUONONEN *et al.*, 2013). A transformação oncogênica do ALK é mediada por interação com moléculas de *downstream* que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular. Da mesma forma que a maioria das tirosinas quinases normais e oncogênicas, a fusão do ALK ativa vários mecanismos diferentes que se interconectam e sobrepõem. O mais

relevante e melhor caracterizado é o mecanismo RAS-ERK (Rat Sarcoma virus- Extracelular signal – Regulated Kinase), seguido pelo JAK3-STAT3 (Janus Kinase 3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3) e o PI3K - AKT (Phosphatidylinositol-3 Kinase - V - AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1). Estas três vias moleculares possuem pontos de interação para mediação dos efeitos da atividade do ALK (CHIARLE *et al.*, 2008).

Inicialmente o produto da fusão do gene ALK com o EML4 era detectado apenas pela técnica de hibridização in situ. Porém, foi demonstrada uma boa correlação entre os resultados utilizando IHQ e FISH, para rearranjo ALK, sendo relatadas sensibilidade e especificidade de 100% e 95,8%, respectivamente. Com base nestes resultados, o ensaio IHQ foi confirmado como método diagnóstico para detectar CPNPC com rearranjos do ALK, a exemplo do que pode ser visto no esquema da figura 5 (PAIK *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012).

Figura 5 - Métodos diagnósticos para detecção de rearranjo do gene ALK em adenocarcinomas de pulmão



Fonte: Adaptação de Weickhardt, 2013.

A técnica de FISH para pesquisa do rearranjo EML4/ALK pode apresentar desafios técnicos na avaliação dos resultados da coloração. Conforme afirmado por Galetta *et al.*, os rearranjos intracromossômicos podem produzir uma sutil divisão de sinais, levando a falsos negativos potenciais. Além do fato de as sondas só detectarem fusões previamente conhecidas. Estudos indicam que os eventos de inversão de EML4-ALK incluem pelo menos nove variantes de fusão, contendo a mesma porção do domínio da quinase C-terminal ALK, tornando-os cataliticamente ativos, e, embora a proteína EML4 seja o parceiro de fusão mais predominante, (SHINMURA *ET AL.*, 2008) outros parceiros de fusão foram identificados (TUONONEN *et al.*, 2013; YI *et al.*, 2011; MCLEER-FLORIN *et al.*, 2012).

Em agosto de 2011, a droga Crizotinib recebeu aprovação acelerada da FDA US (Food and Drug Administration) para o tratamento de CPNPC comprovadamente ALK-positivo utilizando um teste de diagnóstico através de imuno-histoquímica aprovado pela FDA. Este teste utiliza o clone D5F3 do anticorpo ALK1, tendo apresentado maior sensibilidade (100% x 67%) e especificidade (99% x 97%) após ter sido comparado com outros clones. Até a data, apenas a técnica de FISH usando o kit de sonda de dispersão Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, Ill) estava aprovado para esta indicação (WEICKHARDT *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2012).

A descoberta do rearranjo do ALK em CPNPC tem aumentado sua importância desde a descoberta da droga crizotinib que tem como alvo terapêutico as linhagens celulares derivadas do rearranjo do ALK. O tratamento com o crizotinib tem mostrado resultados superiores ao tratamento com quimioterapia convencional. (KOIVUNEN *et al.*, 2008). Em ratos transgênicos que expressam especificamente a fusão EML4-ALK em células epiteliais de pulmão, centenas de nódulos de adenocarcinoma se desenvolvem em ambos os pulmões logo após o nascimento e a administração oral de um inibidor específico da atividade de ALK tirosina quinase rapidamente erradica tais nódulos. Estas observações revelam o papel essencial do EML4-ALK na carcinogênese de CPNPC que possuem esta quinase de fusão (CHOI *et al.*, 2010).

Em dois ensaios clínicos, os pacientes com CPNPC ALK positivos localmente avançados ou metastáticos que foram tratados com crizotinib exibiram taxas de resposta globais de 50% (n = 136) e 61% (n= 119), respectivamente. Assim, a determinação do estado de ALK em pacientes com CPNPC é fundamental

para direcionar um tratamento personalizado para o paciente. (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013)

As terapias visando EGFR e, mais recentemente ALK, têm se mostrado efetivas no tratamento de tumores que abrigam essas alterações moleculares. Há heterogeneidade nos resultados devido à complexidade de caminhos de sinalização envolvidos tanto na oncogênese quanto na aquisição de resistência. Portanto, análises de outras moléculas, assinaturas e perfis na expressão de proteínas podem ser críticas na compreensão do desenvolvimento de novos medicamentos e combinações terapêuticas (TORRES *et al.*, 2014).

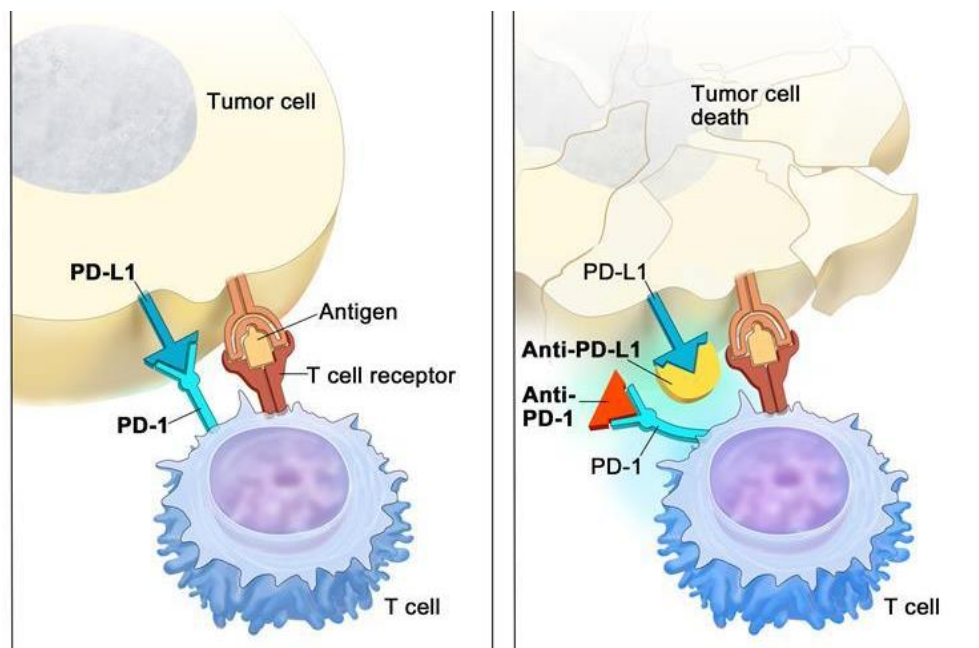
### **1.3.3 PD-1 / PD-L1**

PD-1 é uma proteína de membrana tipo I, de 268 aminoácidos e pertence à família de moléculas reguladoras de células T, chamada CD28/B7 (ISHIDA *et al.*, 1992), sendo codificada pelo gene PDCD1. (SHINOHARA *et al.*, 1994). Possui um domínio extracelular IgV, seguido de uma região transmembranar e uma cauda intracelular, a qual contém dois sítios de fosforilação. Esta proteína é expressa na superfície de células T ativadas, células B e de macrófagos, o que sugere que ela é capaz de inibir a resposta imune celular de maneira mais ampla (BLANK *et al.*, 2004; BLANK e MACKENSEN, 2007).

Dentre as moléculas corregulatórias da família B7-CD28, estudos recentes demonstram que as células tumorais e as células apresentadoras de antígenos modificam o microambiente tumoral através das atividades do receptor PD1 e seus ligantes, por exemplo, PD-L1 (Ligante do receptor de Morte Celular Programada 1) (SHARPE e FREEMAN, 2002; KARACHALIOU *et al.*, 2015).

A interação de PD-L1 (Programmed Cell Death Ligant 1 Receptor) com PD1 (Programmed Cell Death 1 Receptor) que é expressa nas células apresentadoras de antígeno e linfócitos T é um mecanismo fisiológico que ressalta escape da atividade imune. A expressão de PD-L1 também está presente em vários tumores humanos, resultando na inibição do sistema imune pelas células cancerígenas e consequente facilitação da progressão tumoral e metástase (OTA *et al.*, 2015).

Figura 6 - Inibidor do ponto de verificação imunológico. As proteínas do ponto de verificação, como PD-L1 nas células tumorais e PD-1 nas células T, ajudam a manter as respostas imunes sob controle. A ligação de PD-L1 a PD-1 impede que as células T ataquem células tumorais no corpo (painel esquerdo). O bloqueio da ligação de PD-L1 a PD-1 com um inibidor de ponto de verificação imunológico (anti-PD-L1 ou anti-PD-1) permite que as células T destruam células tumorais (painel direito).



Fonte: Disponível em: <<https://www.teresewinslow.com>>. Acesso em: 22 de junho de 2018.

Um alto nível de expressão de PD-L1 em várias neoplasias tem sido associado a prognóstico ruim, embora esses achados ainda sejam controversos na literatura. (SZNOL e CHEN, 2013) Estudos clínicos têm mostrado que a inibição de anticorpos específicos para essas proteínas são uma abordagem promissora no tratamento de câncer e a expressão de PD-L1 na membrana de células tumorais correlaciona-se com maior chance de resposta a inibidores modernos de PD-1 e PD-L1 (BRAHMER *et al.*, 2012). A atividade antitumoral por imunoterapia alvo, em particular nos tumores de pulmão, tem relatos de sucesso surpreendente (HUI, 2017).

Há indícios de que mutações nos genes EGFR e rearranjo do gene ALK possam influenciar a expressão de PD-L1 com poucos dados disponíveis na literatura mundial e nenhum na literatura com casos brasileiros (OTA *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos mostram que a expressão de PD-L1 em carcinomas pulmonares é regulada pelo resultado da mutação de EGFR (AZUMA *et al.*, 2014; AKBAY *et al.*, 2013). Rearranjos cromossômicos envolvendo ALK/EML4 também definem um subtipo molecular específico de carcinoma não-pequenas células, com a fusão resultante manifestando em atividade transformadora tumoral. A expressão de PD-L1 é regulada positivamente pelas vias MEK-ERK e PI3K-AKT, sinalizando nas células positivas para ALK. Estudos recentes mostram que uma alta expressão de PD-L1 é positivamente associada com rearranjo de ALK, consistente com a indução do PD-L1 pelo produto do rearranjo ALK (OTA *et al.*, 2015).

Além do entendimento sobre os marcadores biológicos EGFR e ALK, nos últimos anos também foi melhor compreendido o papel do sistema imunológico na carcinogênese de vários tumores, incluindo o câncer de pulmão. Uma publicação na revista "Cell" incluiu conceitos de evasão tumoral e vigilância imunológica como principais mecanismos de carcinogênese. A suspeita de que um mecanismo da evasão do sistema imune do hospedeiro pelas células tumorais pudesse ser a hiperexpressão ou aumento de função da molécula PD-1, e seu ligante PD-L1, cuja interação com sua proteína ligante, a PD-L1, acarreta uma diminuição da resposta imune; passou a ser aventada em diversos estudos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em 2010, um estudo piloto com o uso de um anticorpo monoclonal anti-PD-1, denominado BMS-936558 (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), também chamado MDX-1106, ONO-4538 ou nivolumabe posteriormente, observou evidência de atividade antitumoral, com perfil de segurança favorável dentre um total de 39 pacientes portadores de diversos tumores sólidos avançados (TOPALIAN *et al.*, 2012).

Dois anos mais tarde, um estudo fase I/II analisou a segurança e a atividade do uso de doses escalonadas do nivolumab no tratamento de 296 pacientes portadores de melanoma metastático, câncer de pulmão não pequenas células, câncer de próstata avançado resistente à castração, câncer de células renais e câncer colorretal. Dos 236 pacientes avaliados, foram observadas respostas objetivas em 14 dos 76 pacientes com CPNPC (18%), 28 dos 94 portadores de melanoma metastático (28%) e 9 dos 33 pacientes com carcinoma colorretal (27%). Um dado interessante deste estudo foi obtido pela avaliação da imunoexpressão de PD-L1 nas amostras de tumores obtidas de 42 pacientes, antes do início do tratamento. Observou-se que dos 25 pacientes em cujas amostras foi constatada

expressão positiva para PD-L1, 9 apresentaram resposta antitumoral, ao passo que nenhum dos 17 pacientes portadores de tumores com expressão negativa para PD-L1 tiveram resposta ( $P=0,006$ ). Estes dados sugeriram inicialmente uma correlação entre a expressão de PD-L1 em células tumorais com resposta objetiva ao tratamento com bloqueio de PD-1 (TOPALIAN *et al.*, 2012).

Em 2015 a medicação nivolumab, um anticorpo humanizado IG4 com ação na proteína PD-1, foi aprovada pelo FDA americano para tumores avançados de pulmão após falha à primeira linha de tratamento com aumento de sobrevida global. A aprovação foi decorrente de estudo que constatou melhores resultados de sobrevida global, sobrevida livre de progressão e taxa de resposta aos doentes que utilizaram nivolumabe em comparação ao docetaxel, o tratamento convencional (BRAHMER *et al.*, 2015).

#### **1.4 Justificativa**

O câncer de pulmão é a causa mais frequente de morte por neoplasia em todo o mundo, apesar de ações terapêuticas como quimioterapia e radioterapia. Com a descoberta de alvos terapêuticos direcionados por mutações tumorais, houve uma mudança neste cenário, com aumento de tempo de sobrevida livre de doença e de sobrevida global, sendo os resultados encontrados superiores aos de tratamento convencional.

Mutações no gene EGFR tornam o tumor sensível à terapia anti-tirosina quinase anti-EGFR, e, o rearranjo no gene ALK, à terapia anti-tirosina quinase anti-ALK, porém, apesar da resposta inicial, invariavelmente estes tumores tornam-se resistentes à terapia alvo, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atrasem a resistência adquirida ou sejam eficazes na configuração da resistência adquirida, como, por exemplo, imunoterapia anti-PD-L1.

Nos países em desenvolvimentos, o acesso a esses novos tratamentos é limitado tanto pelos elevados preços de inibidores de tirosina quinase e imunoterápicos como pela dificuldade de acesso às técnicas de diagnóstico molecular que caracterizam o tumor, porém são de alto custo financeiro. Como resultado, a maior parte da população continua a ser submetida a quimioterapias convencionais associadas muitas vezes à eficácia limitada e efeitos adversos significativos.



No Ceará, o Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes é centro de referência para diagnóstico e tratamento de neoplasias pulmonares, e concentra um grande acervo patológico de carcinomas pulmonares. E mesmo com esses dados, não há estudos patológicos que demonstrem o perfil molecular desses tumores, além da carência de publicações científicas sobre a biologia molecular dos tumores nesta população específica.

Grande parte dos pacientes do SUS, infelizmente, é diagnosticada tardiamente, em estágios avançados da doença. Estudos como o que propomos podem auxiliar na escolha do melhor tratamento farmacológico para tumores que possuem um achado molecular específico, como a presença de mutação no gene EGFR, o rearranjo do gene ALK, ou a expressão de PD-L1, direcionando o tratamento com terapias alvo disponíveis para esse tipo de tumor.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Identificar os biomarcadores EGFR, ALK e PD-L1 e correlacionar com dados demográficos e com padrões de crescimento histológico em adenocarcinomas pulmonares.

### 2.2 Específicos

- ✓ Construir um banco de dados, utilizando casos confirmados de adenocarcinomas pulmonares.
- ✓ Caracterizar as alterações histomorfológicas de adenocarcinomas pulmonares a partir de tecidos emblocados em parafina.
- ✓ Identificar e caracterizar a presença de mutação do gene EGFR em adenocarcinomas pulmonares a partir de tecidos emblocados em parafina, e correlacionar a presença dessa mutação com dados demográficos e padrão de crescimento histológico.
- ✓ Identificar a expressão proteica do gene ALK nas células tumorais de adenocarcinomas pulmonares a partir de tecidos emblocados em parafina, e correlacionar essa expressão com dados demográficos e padrão de crescimento histológico.
- ✓ Identificar e quantificar a expressão proteica de PD-L1 nos tecidos tumorais de adenocarcinomas pulmonares a partir de tecidos emblocados em parafina, e correlacionar essa expressão com dados demográficos e padrão de crescimento histológico.
- ✓ Identificar a coexpressão dos biomarcadores ALK e PD-L1 assim como a presença concomitante da mutação do gene EGFR nos tecidos tumorais de adenocarcinomas pulmonares a partir de tecidos emblocados em parafina, e correlacionar essa expressão com dados demográficos e padrão de crescimento histológico.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Desenho do estudo e seleção da amostra**

Foi realizado um estudo retrospectivo em blocos parafinados de adenocarcinomas de pulmão que se encontravam sob a guarda do laboratório de patologia do Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, Fortaleza-CE nos anos de 2015 e 2016, para pesquisa dos biomarcadores EGFR, ALK e PD-L1.

As análises de todos os cortes histológicos foram avaliadas por dois patologistas com experiência em imuno-histoquímica e patologia pulmonar. Dados demográficos, gênero e idade, foram obtidos do sistema de informações do laboratório de patologia.

Foram excluídos os casos com histologias escamosa, sarcomatoide (carcinosarcomas) ou adenocarcinomas com suspeição de ser do tipo glandular salivar (mucoepidermoide ou adenoide cístico), bem como os carcinomas com diferenciação neuroendócrina.

Também foram excluídos os casos em que o material disponível (lâminas e blocos) não apresentasse qualidade adequada para os testes propostos, ou em que o material não apresentasse quantidade suficiente para garantir reserva para futuros exames.

Foram identificados 678 casos arquivados de CPNPC nos anos de 2015 e 2016, sendo selecionados 400 casos, os quais estavam com material disponível, os demais haviam sido retirados do arquivo por solicitação do paciente. Dos 400 casos selecionados, 68 casos foram excluídos por critérios histológicos, 115 casos foram excluídos por insuficiência de quantidade de material para reserva e 44 casos apresentaram artefatos pré-analíticos, sendo que, ao final, 173 casos foram incluídos neste estudo.

#### **3.2 Comitê de ética**

O plano de pesquisa deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, Fortaleza-CE após o preenchimento dos dados na Plataforma Brasil, sendo aprovado com número CAAE 65315317.0.0000.5039.

### 3.3 Histopatologia

Todos os cortes histológicos foram avaliados por dois patologistas, de forma independente. Os tumores foram classificados de acordo com a classificação corrente da OMS (2015) em: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma mucinoso e adenocarcinoma não mucinoso, e este último subclassificado de acordo com os padrões de crescimento em lepidico, acinar, micropapilar, papilar e sólido.

### 3.4 Pesquisa de mutação de EGFR

Dos 173 blocos disponíveis, 149 tinham pelo menos 10% de tumor viável e foram submetidos à pesquisa da mutação de EGFR. A extração de DNA foi realizada de acordo com protocolo padronizado baseado nos trabalhos de Lynch 2004 e Paez 2004. Em resumo, o material obtido de cortes de 10 µm dos blocos parafinizados foram desparafinizados através de banhos de xilol a 65°C, reidratados com soluções de concentrações decrescentes de ETOH e água deionizada. A extração de DNA foi feita através das etapas de lise celular, com tampão de lise estéril (Na Cl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%), digestão de proteínas por proteinase K, precipitação com proteínas com uma solução de fenol, clorofórmio e álcool iso-amílico (25:24:1) e precipitação do DNA com ETOH 70% gelado e ressuspendido com solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8,0) e mantido a 4°C. A quantidade e pureza do DNA genômico obtido foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro. O DNA genômico foi amplificado para todos os 28 éxons do gene EGFR utilizando PCR multiplex cuja sequência dos iniciadores foi obtida com base no GeneBank. A reação foi realizada em um termociclador adicionando-se os reagentes formamida 1%, tampão (Tris-HCl; KCl), dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, iniciadores; Taq polymerase; DNA das amostras e H<sub>2</sub>O estéril; para ciclagens de desnaturação, anelamento e extensão. O sequenciamento direto do DNA envolveu os éxons 18, 19, 20 e 21 do gene EGFR nas direções 5'-3' e 3'-5' cujos fragmentos de PCR não foram clonais para análise da presença de mutações heterozigóticas. Para o sequenciamento de segunda geração foi utilizada a plataforma fechada Miseq (Illumina, San Diego, CA) que utiliza sistema de química de SBS, um método baseado em terminador- reversível que detecta bases únicas conforme elas são incorporadas a fitas de DNA paralelo em massa. São geradas

imagens dos corantes do terminador fluorescente à medida que cada dNTP é adicionado; depois, os corantes são clivados para permitir a incorporação da próxima base. As identificações de bases são feitas diretamente a partir das medições da intensidade do sinal durante cada ciclo. A análise de dados é integrada a plataforma de análise genômica da Illumina, BaseSpace®. Os resultados finais foram interpretados por patologistas experientes da área. (LYNCH et al., 2004 e PAEZ et al., 2004)

### **3.5 Avaliação de parâmetros imuno-histoquímicos**

O estudo imuno-histoquímico dos tumores foi realizado por meio de cortes de parafina dos blocos seguindo a técnica manual padronizada para este método. As técnicas para cada anticorpo foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, cortes histológicos foram aquecidos por 30 minutos a 60° C, resfriados à temperatura ambiente, desparafinizados e reidratados. A recuperação de antígenos foi feita pelo aquecimento das amostras em tampão de citrato (pH 6,1) até fervura à 100°C, seguido de resfriamento à temperatura ambiente. A coloração imuno-histoquímica foi feita utilizando métodos cromogênicos padrão de polímeros. Após bloquear a atividade endógena de peroxidase, os anticorpos primários foram adicionados. Depois disso, os cortes foram incubados com polímero de marcação. A reação foi completada com sistema de enzima-substrato que se utilizou de diaminobenzina (DAB) como cromógeno. O tecido foi corado com Hematoxilina de Mayer em PBS com pH 7,4. O bloqueio do tecido foi realizado concomitantemente pela incubação de PBS contendo solução de triton X 100 a 1%, soro de caprino normal a 3% e albumina sérica de bovino normal a 1%. Todas as lâminas foram coradas com os seguintes anticorpos e avaliadas conforme explicitado abaixo:

- VENTANA anti-ALK, clone D5F3, Roche Diagnostic cat#790-4796, marcação citoplasmática granular. Em todos os casos foi utilizado o anticorpo monoclonal para controle negativo. Como controle positivo foram utilizados tecidos de apêndice cecal com marcação granular forte em células ganglionares e ausência de marcação em linfócitos, plexo mioentérico e células glandulares. As lâminas foram coradas no equipamento Ventana Benchmark GX (Roche Diagnostics, Suíça, utilizados o Kit de Amplificação

OptiView (Roche Diagnostics, Cat # 760-099) e Kit de Detecção OptiView DAB IHC (Roche Diagnostics, Cat # 760-700). Avaliação por sistema de escore binário: positivo ou negativo.

- VENTANA anti-PD-L1, clone SP263, Roche Diagnostic cat#740-4907, marcação de qualquer intensidade de marcação em padrão membranoso basal, lateral ou circunferencial. As lâminas foram coradas no equipamento Ventana Benchmark GX (Roche Diagnostics, Suíça, utilizados o Kit de Amplificação OptiView (Roche Diagnostics, Cat # 760-099) e Kit de Detecção OptiView DAB IHC (Roche Diagnostics, Cat # 760-700). De acordo com os intervalos utilizados nos estudos clínicos do atezolumab, a expressão de PD-L1 foi agrupada em escores de proporção de tumor (EPT) da seguinte forma: 0%, 1-4%, 5-49%, 50-100%

### **3.6 Avaliação estatística**

Correlações entre todas as variáveis de dados categóricos foram analisadas usando o teste exato de Fisher (quando qualquer célula de uma tabela de contingência teve uma contagem esperada  $<5$ ) ou teste qui quadrado de Person (quando nenhuma célula de uma tabela de contingência teve uma contagem esperada  $<5$ ). As diferenças entre grupos de variáveis paramétricas quantitativas foram analisadas por meio do teste T de Student, pareado ou não pareado conforme a situação. As avaliações de grupos de variáveis não paramétricas foram realizadas através do teste de postos sinalizados de Wilcoxon. Todos os valores p relatados são bicaudais e os testes foram realizados no nível de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS (Cary, NC).

## 4 RESULTADOS

No total foram incluídos 173 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, sendo suas características gerais expostas na tabela 1. A média de idade foi de 67 anos, com variação de 36 a 93 anos. Cento e três deles (59,5%) tinham 70 anos ou mais e setenta pacientes (40,4%) tinham menos de 70 anos. Oitenta e um pacientes (46,8%) eram do gênero masculino e noventa e dois (53,2%) do gênero feminino. (Tabela 1)

A maioria dos tecidos foi obtido por biópsia diagnóstica, (130/173; 75,2%), ou por excisões cirúrgicas, (27/173; 15,6%). A maioria dos casos teve material colhido em sítio pulmonar (125/173; 72,2%), havendo amostras oriundas de sítios metastáticos, com sítio primário pulmonar confirmado por imuno-histoquímica, como pleura (23/173; 13,3%), linfonodos (12/173; 6,9%), dentre outros (Tabela 1).

De acordo com a classificação histopatológica da Organização Mundial de Saúde (TRAVIS *et al*, 2015), ilustrada nas figuras 7 e 8, o principal padrão de crescimento encontrado foi o subtipo sólido (81/173; 46,2%), seguido dos subtipos acinar (64/173; 37,0%), lepidico (17/173; 9,8%) e papilar (8/173; 4,6%) (Tabela 1).

A análise em agrupamentos por grau histológico mostra um predomínio de tumores pouco diferenciados, grau 3, (84/173; 48,6%) de acordo com a classificação da OMS, que divide em grau 1 ou bem diferenciado o predomínio lepidico, em grau 2 ou moderadamente diferenciado os predomínios acinar e/ou papilar e em grau 3 ou pouco diferenciado os sólidos ou micropapilífero. (TRAVIS *et al.*, 2015)

Dos 173 casos do estudo, 149 apresentavam mais de 10% de tumor na amostra e foram submetidos à pesquisa de mutação no gene EGFR. Em 116 (77,9%) o gene foi classificado como tipo selvagem, sem presença de mutação nos éxons analisados. Trinta e três pacientes (22,1%) apresentaram algum tipo de mutação no domínio quinase do gene EGFR. Como mostrado na tabela 2, o principal sítio de mutação nessa população foi no éxon 21, mutação L858R (15/149; 10,0%), seguido pelos éxons 19, deleção, (8/149; 5,0%), éxon 18, mutação G719X, (3/149; 2,0%) e éxon 20, inserção (2/149; 1,0%) (Tabela 2).

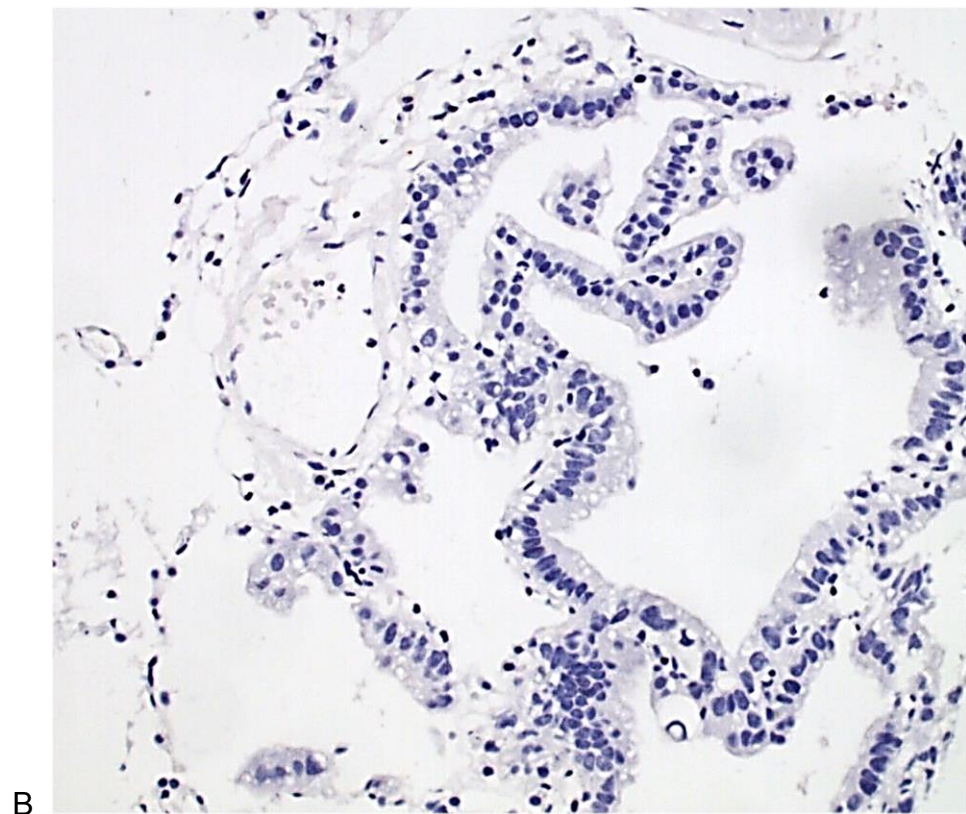
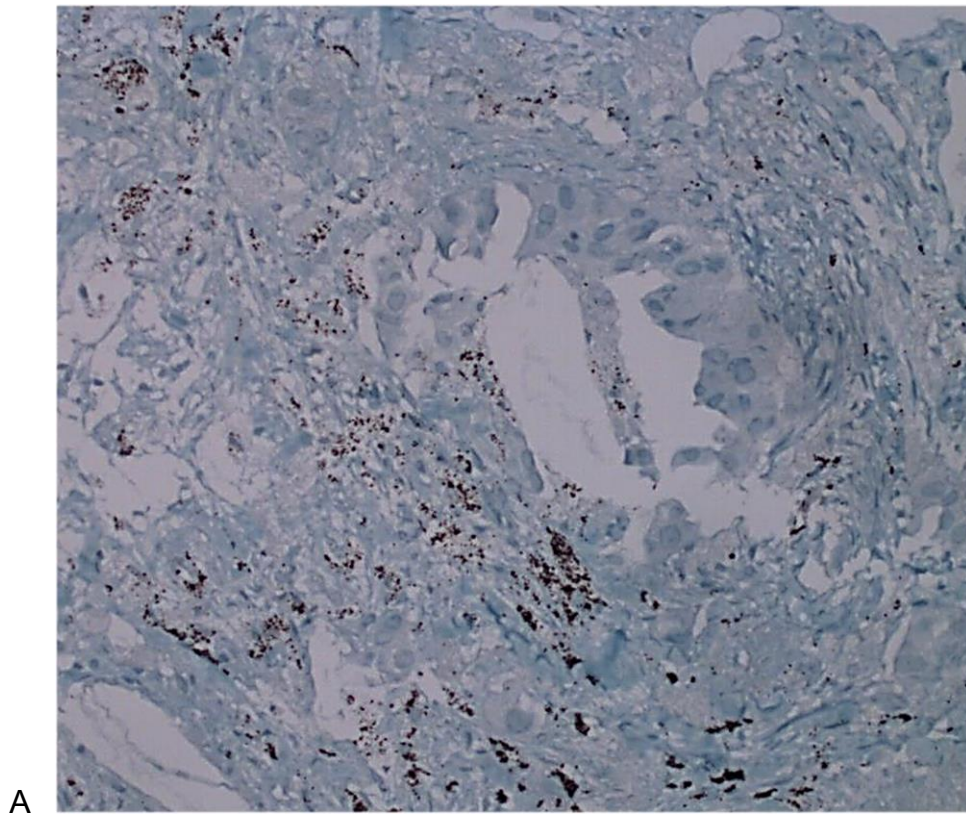
Tabela 1 - Descrição dos dados demográficos dos pacientes selecionados para o estudo e a respectiva classificação histológica dos adenocarcinomas pulmonares

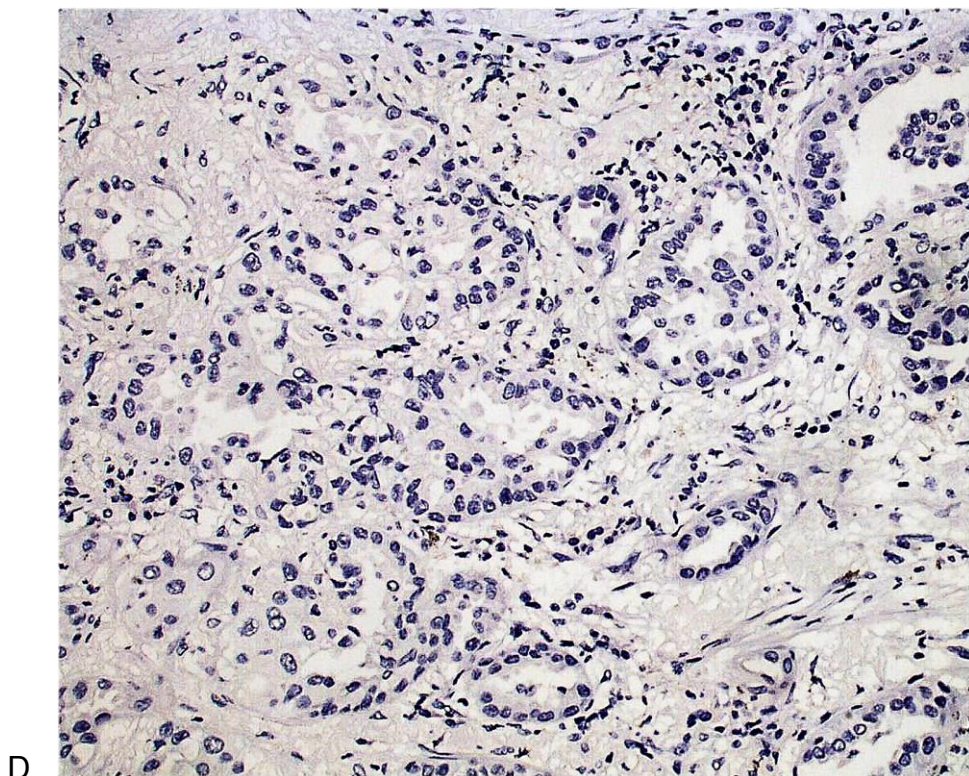
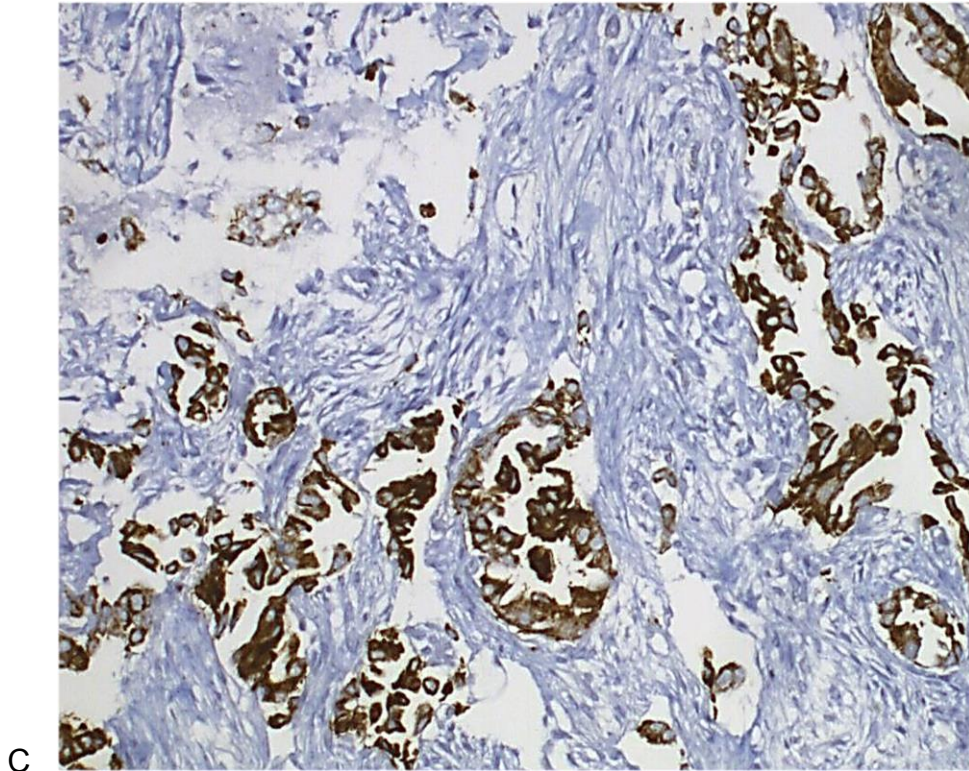
Variável		Número de pacientes (%)
Idade (anos)	Média (variação)	67 (36-93)
	>70	103 (53,5%)
	<70	70 (40,4%)
<b>Gênero</b>		
	Masculino	81 (46,8%)
	Feminino	92 (53,2%)
<b>Procedimento</b>		
	Biópsia incisional	130 (75,2%)
	Cell- block	2 (1,2%)
	Ressecção cirúrgica	27 (15,6%)
	Não informado	14 (8,0%)
<b>Topografia</b>		
	Pulmão	125 (72,3%)
	Pleura	23 (13,3%)
	Linfonodo	12 (6,9%)
	Oso	5 (2,9%)
	Cérebro	4 (2,3%)
	Fígado	2 (1,2%)
	Não informada	2 (1,2%)
<b>Subtipo histológico</b>		
	Sólido	81 (46,8%)
	Acinar	63 (36,4%)
	Lepídico	17 (9,80%)
	Papilar	9 (5,2%)
	Mucinoso	3 (1,8%)
<b>Grau histológico</b>		
	G1 (bem diferenciado)	17 (9,8%)
	G2 (moderadamente diferenciado)	72 (41,6%)
	G3 (pouco diferenciado)	84 (48,6%)

Fonte: pacientes oriundos do Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes



Figura 7 - Padrões de crescimento histológico em adenocarcinomas pulmonares e reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-ALK, clone D5F3





Fonte: Elaborada pela a autora.

A - Padrão de crescimento lepidico, marcação positiva em imuno-histoquímica para o anticorpo anti-ALK, clone D5F3 (400X); B - Padrão de crescimento lepidico, ausência de marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-ALK, clone D5F3 (200X); C - Padrão de crescimento acinar, marcação positiva em imuno-histoquímica para o anticorpo anti-ALK, clone D5F3 (200X); D- Padrão de crescimento acinar, marcação negativa em imuno-histoquímica para o anticorpo anti-ALK, clone D5F3 (400X).

Tabela 2 - Frequência de biomarcadores avaliados em adenocarcinomas pulmonares

Variável	Subtipo	Nº de pacientes (%)
EGFR	Mutação	149
Selvagem	-	116 (77,9%)
Mutado	-	33 (22,1%)
	Éxon 19	12 (36,3%)
	Éxon 21	15 (45,5%)
	Éxon 18	3 (9,1%)
	Éxon 20	3 (9,1%)
ALK		173
Positivo	-	18 (10,4%)
Negativo	-	155 (89,6%)
PD-L1	TPS	55
	0%	27 (49,5%)
	1-4%	2 (3,6%)
	5-49%	16 (29,1%)
	>50%	10 (18,2%)

Fonte: Elaborada pela a autora.

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*);

ALK: Quinase do Linfoma Anaplásico (*Anaplastic Lymphoma Kinase*);

PD-L1: Ligante de Morte Celular Programada (*Programmed cell Death-Ligant*);

EPT: Escore de Proporção Tumoral

Entre os casos com mutação do gene EGFR, dezoito (12,1%) tinham idade igual ou inferior a 70 anos e quinze (10,1%) idade superior a 70 anos, e vinte casos (13,4%) eram do gênero feminino enquanto treze (8,7%) eram masculinos. Entre os casos com EGFR tipo selvagem, quarenta e sete (31,5%) tinham idade igual ou inferior a 70 anos e sessenta e nove (46,3%) idade superior a 70 anos; e sessenta e um casos (40,9%) eram do gênero feminino enquanto cinquenta e cinco (36,9%) eram masculinos. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença da mutação EGFR e gênero ( $p=0,5365$ ) ou idade ( $p=0,3216$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlações clínico-patológicas e estado mutacional do gene EGFR em adenocarcinomas pulmonares

Variável	Estado mutacional do gene EGFR (n=149)		
	Selvagem	Mutado	Valor de p
Idade	n (%)	n (%)	
Média	66,8	69,8	0,3216 <sup>a</sup>
Mediana	67,0	74	0,1629 <sup>b</sup>
Variação	36-93	36-93	
≤70	47 (31,5)	18 (12,1)	0,1098 <sup>c</sup>
>70	69 (46,3)	15 (10,1)	
Gênero			
Feminino	61 (40,9)	20 (13,4)	0,5365 <sup>d</sup>
Masculino	55 (36,9)	13 (8,7)	
Subtipo histológico			
Acinar	39 (26,2)	16 (10,7)	0,1015 <sup>c</sup>
Lepídico	11 (1,4)	3 (2,0)	0,9999 <sup>c</sup>
Mucinoso	2 (1,3)	1 (0,7)	0,5309 <sup>c</sup>
Papilar	4 (2,7)	3 (2,0)	0,1852 <sup>c</sup>
Sólido	60 (40,3)	10 (6,7)	0,0478 <sup>c</sup>

Fonte: Elaborada pela a autora.

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

<sup>a</sup> Teste T de Student com base na informação disponível de 149 pacientes

<sup>b</sup> Teste de postos sinalizados de Wilcoxon com base na informação disponível de 149 pacientes

<sup>c</sup> Teste exato de Fisher (subtipo histológico de interesse vs outros subtipos) com base na informação disponível de 149 pacientes

<sup>d</sup> Teste do Chi-quadrado

Quanto ao tipo histológico, entre os casos com EGFR do tipo selvagem, o principal padrão de crescimento encontrado foi o tipo sólido, 60 casos (40,3%); já entre os casos EGFR mutado, o predomínio foi de casos com padrão de crescimento histológico do tipo acinar, 16 (10,7%), seguido pelo tipo sólido, 10 (6,7%). Estatisticamente, o estado selvagem do gene EGFR foi associado com o padrão de crescimento predominantemente sólido,  $p=0,0478$  (Tabela 3).

A expressão da proteína ALK foi positiva em 10,4% (18 casos) em um total de 173 casos analisados, sendo oito homens e dez mulheres. Os padrões de crescimento histológico vistos nos casos com expressão da proteína ALK foram os tipos acinar, papilar e sólido, de graus histológicos moderadamente e pouco diferenciado respectivamente. Um dos casos positivos para ALK foi classificado histologicamente como linfangite carcinomatosa. Um dos casos apresentou concomitante mutação do gene EGFR (Tabela 4).

Pacientes com a expressão da proteína ALK apresentaram uma média de idade (58,5 anos) significativamente menor do que pacientes com ALK negativo (67,3 anos) ( $p=0,0034$ ). Em pacientes com ALK positivo a mediana de idade foi cerca de 10 anos menor em pacientes que não expressaram ALK (57,5 anos vs 67,0 anos) ( $p=0,0075$ ) (Tabela 5).

Entre os dezoito casos positivos para expressão de ALK, oito (4,6%) eram do gênero masculino e dez (5,9%) do gênero feminino. Nos tumores ALK negativos, setenta e três (42,2%) eram homens e oitenta e dois (47,2%) eram mulheres. Não houve diferença estatística da identificação do rearranjo do gene ALK em relação ao gênero ( $p=0,5160$ ) (Tabelas 5).

O subtipo predominantemente acinar foi o mais frequente dentre os casos positivos para ALK (10/173; 5,8%); o segundo principal subtipo histológico foi o sólido (6/173; 3,5%). Os subtipos lepidico e papilar tiveram um caso ALK positivo cada um (0,6%). Não foi encontrado nenhum caso ALK positivo do subtipo predominantemente mucinoso. Não houve diferença estatística da identificação da expressão do gene ALK em relação ao padrão de crescimento histológico (Tabela 5).

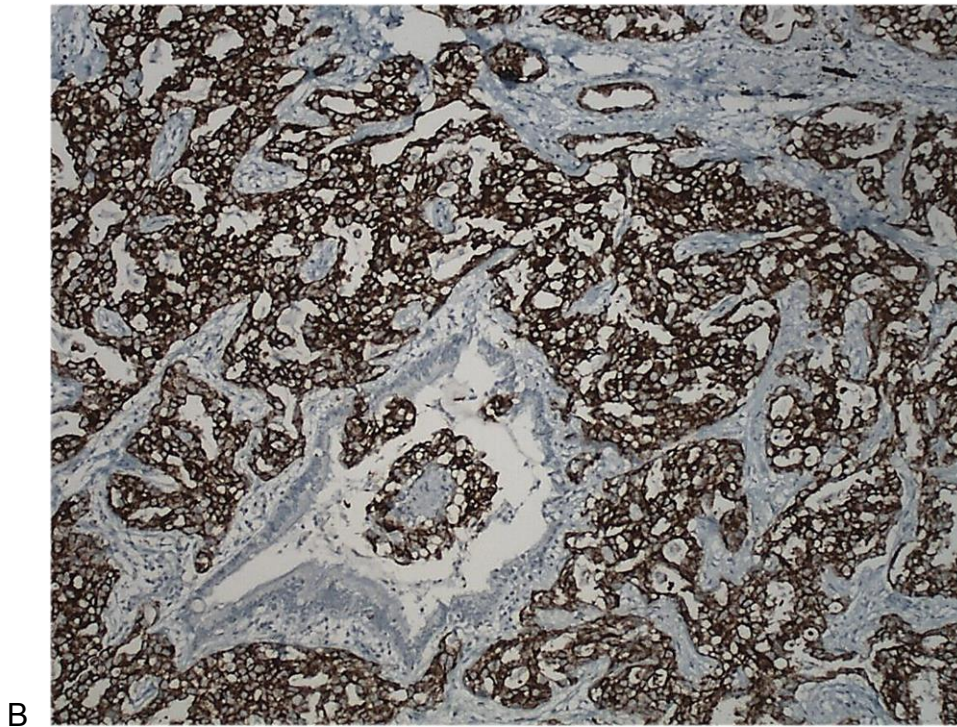
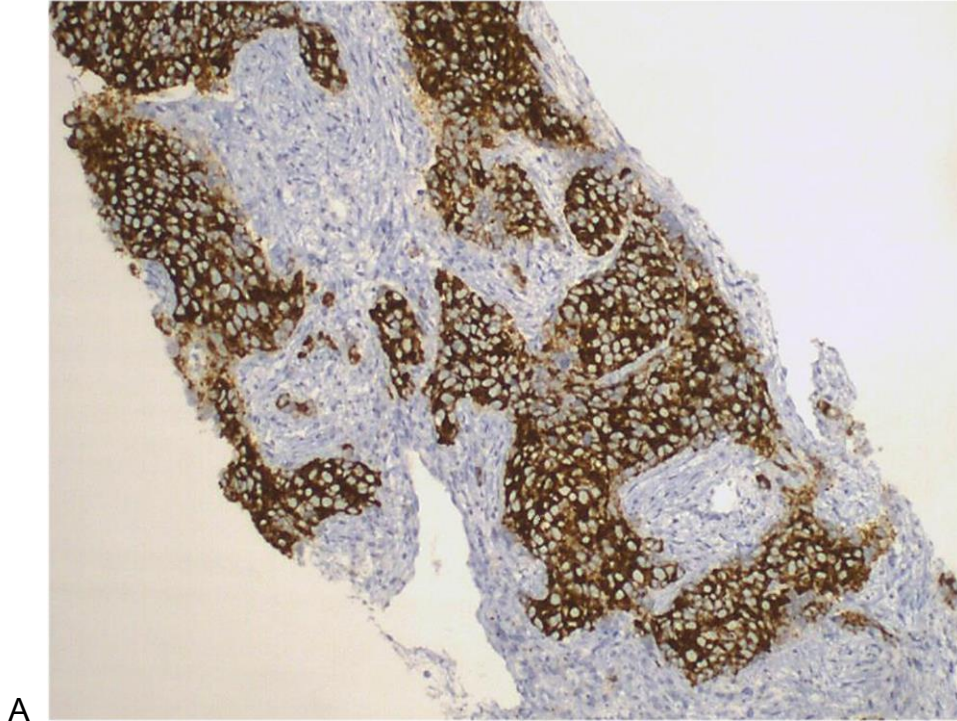
Tabela 4 - Descrição de dados demográficos, histopatológicos e de biomarcadores dos casos positivos para imunomarcação da proteína do gene ALK

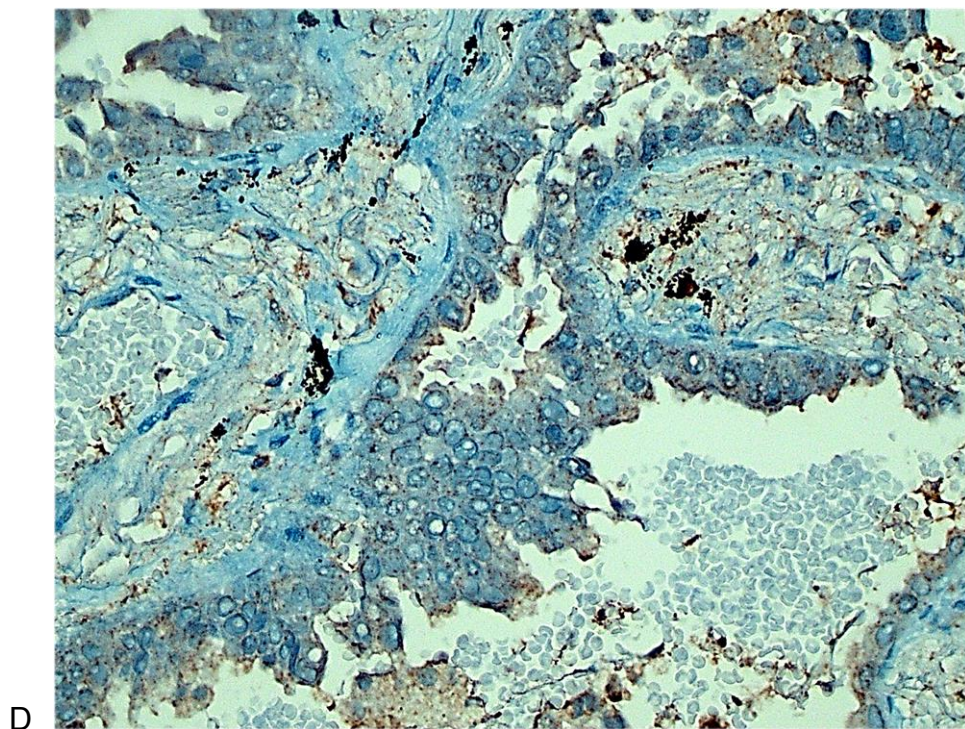
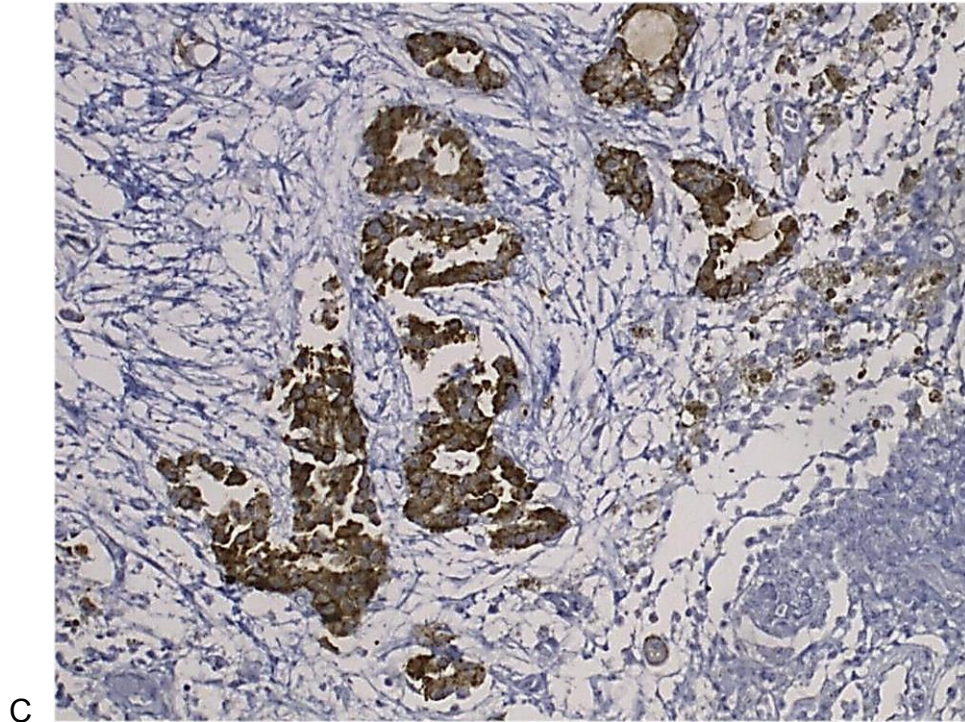
	Idade	Gênero	Histologia	Grau	EGFR	PDL-1
1	62	M	acinar	II	Selvagem	Negativo
2	59	M	papilar	II	Selvagem	10%
3	36	F	linfangite	III	Selvagem	50%
4	71	F	acinar	II	Selvagem	20%
5	76	M	acinar	II	Selvagem	Negativo
6	43	F	acinar	II	Inserção éxon 20	Negativo
7	56	F	acinar	II	NR	100%
8	50	M	acinar	II	NR	Negativo
9	76	M	sólido	III	NR	20%
10	60	F	acinar	II	NR	10%
11	78	F	sólido	III	Selvagem	NR
12	44	F	sólido	III	Selvagem	NR
13	50	M	acinar	II	Selvagem	NR
14	49	F	acinar	II	Selvagem	NR
15	66	M	sólido	III	Selvagem	NR
16	44	M	acinar	II	Selvagem	NR
17	82	F	sólido	III	Selvagem	NR
18	52	M	sólido	III	NR	NR

Fonte: Elaborada pela a autora.

NR: não realizado

Figura 8 - Padrões de crescimento em adenocarcinoma de pulmão com imunorreatividade positiva para anticorpo anti-ALK, clone D5F3





Fonte: Elaborada pela a autora.

A- Padrão sólido (Técnica de estreptovidina-biotina-peroxidase) (200X), B- Padrão sólido, subtipo cribriforme (Técnica de estreptovidina-biotina-peroxidase) (200X), C- Padrão acinar (Técnica de estreptovidina-biotina-peroxidase) (400X), D- Padrão papilar (Técnica de estreptovidina-biotina-peroxidase) (200X)



Tabela 5 - Correlações clínico-patológicas e expressão da proteína do gene ALK em adenocarcinomas pulmonares

Variável	Expressão de ALK (n=173)		Valor de P
	Negativo	Positivo	
Idade			
Média	67,3	58,5	0,0034 <sup>a</sup>
Mediana	67,0	57,5	0,0075 <sup>b</sup>
Variação	36-93	36-82	
≤70	65 (37,6)	5 (2,9)	0,2244 <sup>c</sup>
>70	90 (52,0)	13 (7,5)	
Gênero			
Feminino	82 (47,4)	10 (5,9)	0,5160 <sup>d</sup>
Masculino	73 (42,2)	8 (4,6)	
Subtipo histológico			
Acinar	54 (31,2)	10 (5,8)	0,4916 <sup>c</sup>
Lepídico	16 (9,2)	1 (0,6)	0,5346 <sup>c</sup>
Papilar	8 (4,6)	1 (0,6)	0,4846 <sup>c</sup>
Sólido	74 (42,8)	6 (3,5)	0,4216 <sup>c</sup>

Fonte: Elaborada pela a autora.

Resultados estão apresentados como n (%)

ALK: quinase do linfoma anaplásico (Anaplastic Lymphoma Kinase);

a Teste T de Student com base na informação disponível de 173 pacientes

b Teste de postos sinalizados de Wilcoxon com base na informação disponível de 173 pacientes

c Teste exato de Fisher (subtipo histológico de interesse vs outros subtipos) com base na informação disponível de 173 pacientes

d Teste do Chi-quadrado

Das 173 amostras de adenocarcinoma pulmonar em estudo, havia material suficiente para garantir reserva para estudos futuros em 55 blocos, nos quais foi realizada pesquisa de expressão de PD-L1. Destas amostras, 27 (49,1%) não expressaram PD-L1 e 28 (50,9%) demonstraram algum grau de positividade, e, de acordo com o escore de proporção tumoral (EPT), 10 casos (18,2%) tiveram expressão em mais de 50% das células tumorais, sendo o segundo grupo mais comum o de marcação entre 5 e 49%, com 16 casos (29,1%), e dois casos (3,6%) tiveram marcação entre 1 a 4% das células tumorais. (Tabela 2)

Entre os vinte e oito casos com expressão imuno-histoquímica de PD-L1, oito (14,5%) tinham 70 anos ou menos enquanto vinte deles (36,3%) tinham mais de

70 anos. Já entre os vinte e sete casos sem expressão de PD-L1, dez (18,2%) tinham 70 anos ou menos e dezessete tinham mais de 70 anos. Entre os casos PD-L1 positivos, quinze (27,3%) eram mulheres e treze (23,6%) eram homens. Entre os casos PD-L1 negativos, dezessete (30,9%) eram do gênero feminino e dez (18,2%) do gênero masculino. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre as variáveis idade ( $p=0,9281$ ) e gênero ( $p=0,6653$ ) em relação ao biomarcador PD-L1 (Tabela 6).

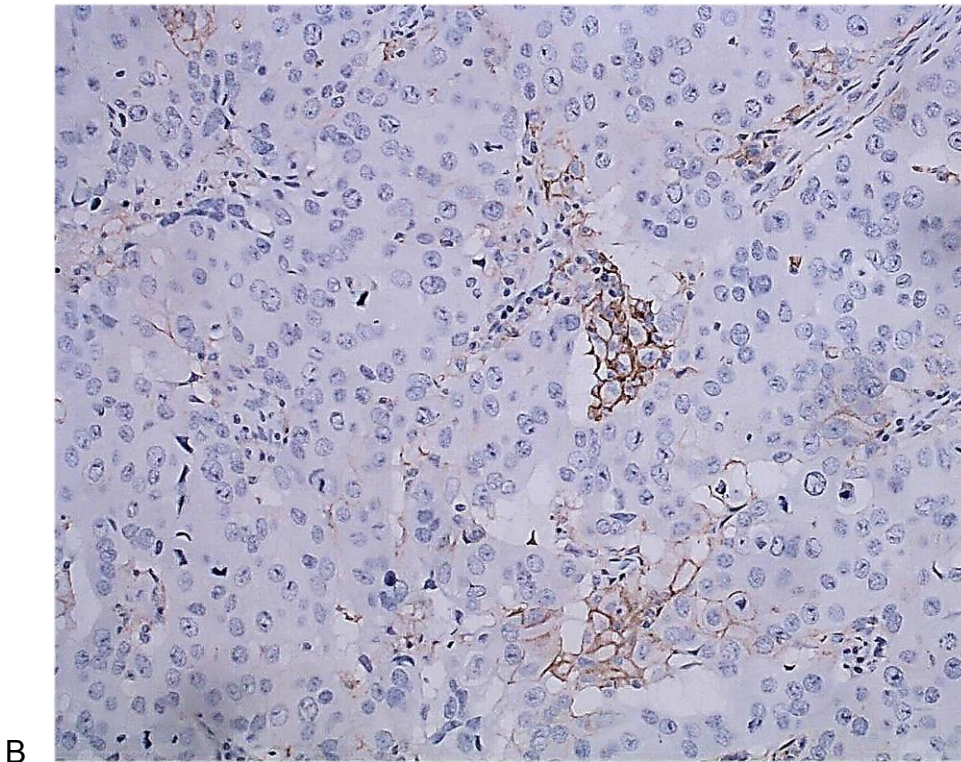
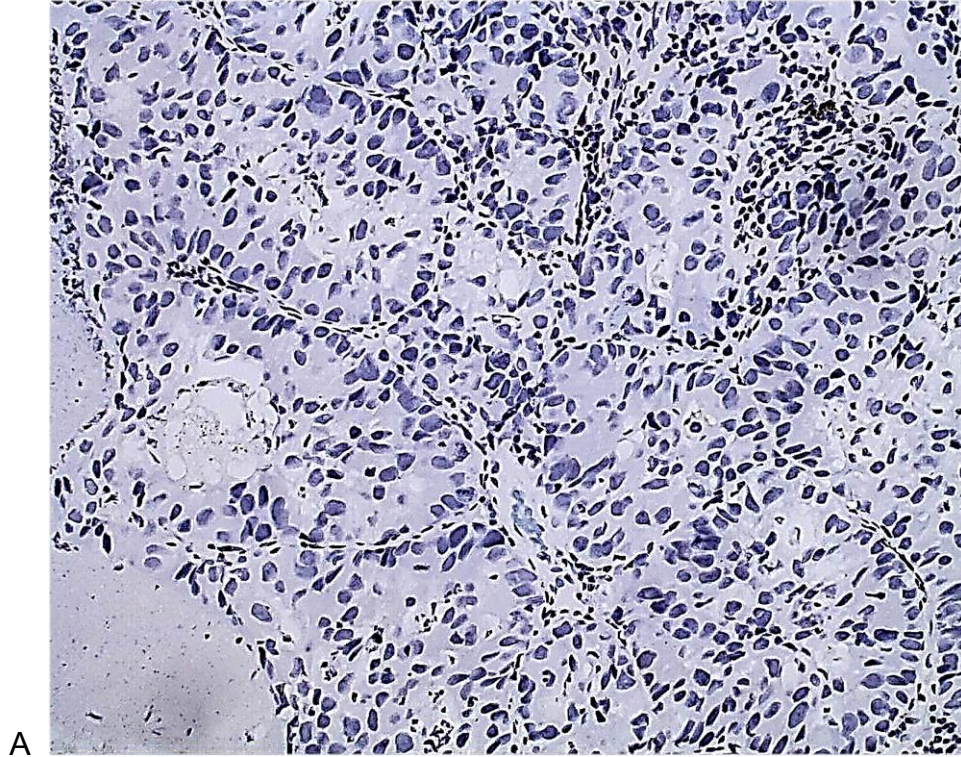
O padrão de crescimento sólido foi o subtipo histológico predominante entre os casos PD-L1 positivos (27,3%), seguido pelo subtipo acinar (14,5%), ao passo que entre os casos PD-L1 negativos, houve um predomínio de padrão acinar (27,3%) seguido de sólido (14,5%). Não houve diferença estatística da expressão de PD-L1 em relação ao tipo histológico (Tabela 6).

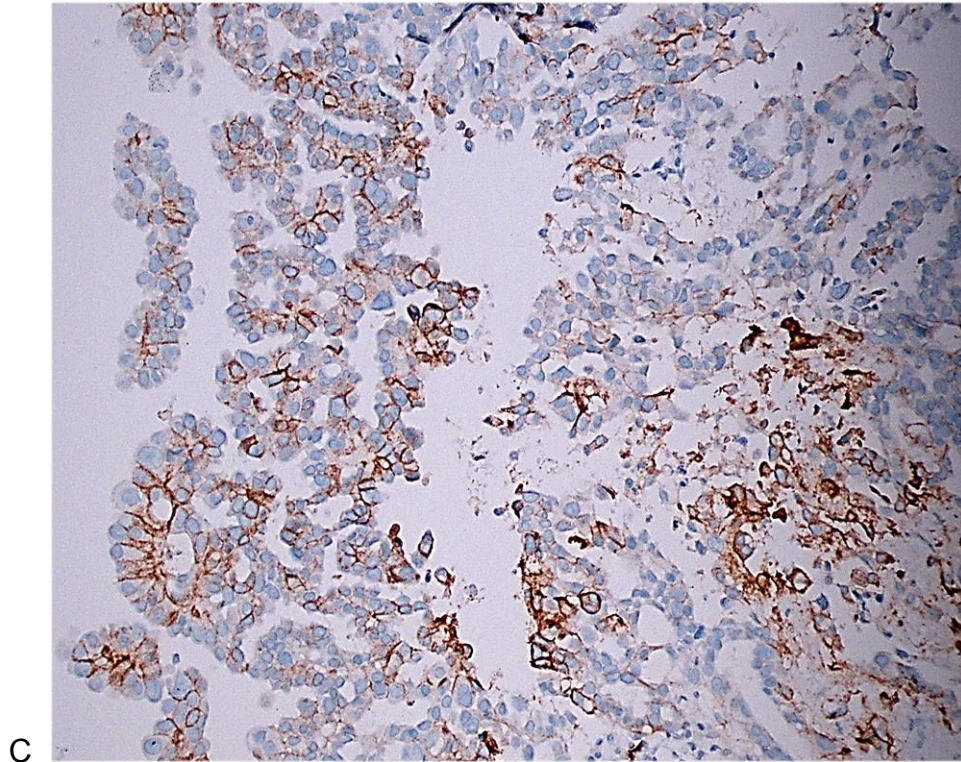
Entre os casos de EGFR mutado, três expressaram a proteína PD-L1 e cinco casos não apresentaram expressão da proteína PD-L1, ao passo que nos casos de EGFR selvagem, catorze expressaram a proteína PD-L1 e dezesseis não expressaram essa proteína. Não foi encontrada associação entre esses biomarcadores com significância estatística ( $p = 0,4079912$ ) (Tabela 7).

Entre os casos com expressão da proteína ALK, em um único caso se detectou simultaneamente a presença de mutação de EGFR, inserção no éxon 20, e este mesmo não expressou a proteína PD-L1. Não foi encontrada significância estatística ( $p = 0,4079912$ ) (Tabela 4).

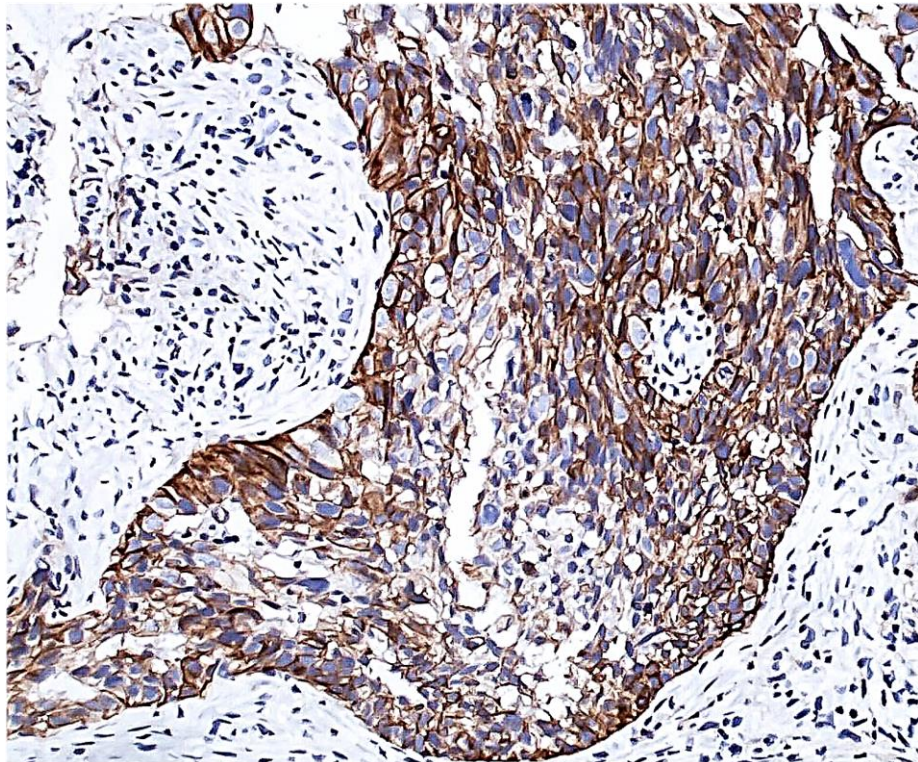
Entre os casos com expressão da proteína ALK, seis tiveram coexpressão da proteína PD-L1 e quatro não expressaram PD-L1, enquanto dentre os casos sem expressão de ALK, vinte e dois (40,8%) expressaram PD-L1 e vinte e dois (40,8%) não expressaram PD-L1. Não foi encontrada associação estatisticamente importante entre esses biomarcadores ( $p = 0,4079$ ) (Tabela 8).

Figura 9 – Imunomarcção para o anticorpo anti-PD-L1, clone SP263, de acordo com o escore de proporção tumoral em adenocarcinomas pulmonares





C



D

Fonte: Elaborada pela a autora.

A-Padrão de crescimento acinar sem imunomarcção para PD-L1, 0%, (400X) B- Padrão de crescimento sólido com imunomarcção para PD-L1, 5%, (400X) C- Padrão de crescimento acinar com imunomarcção para PD-L1, 50%, (400X) D- Padrão de crescimento sólido com imunomarcção para PD-L1, 100%, (400X) (Técnica de estreptovidina-biotina-peroxidase)

Tabela 6 - Correlações clínico-patológicas e expressão da proteína PD-L1 em adenocarcinomas pulmonares

Variável	Expressão de PD-L1		(n=55)
	Negativo	Positivo	Valor de P
Idade			
Média	65,9	64,3	0,6303 <sup>a</sup>
Mediana	67,0	62,0	0,4896 <sup>b</sup>
Variação	37-93	36-93	
≤70	10 (18,2)	8 (14,5)	0,9281 <sup>c</sup>
>70	17 (30,9)	20 (36,4)	
Gênero			
Feminino	17 (30,9)	15 (27,3)	0,6653 <sup>c</sup>
Masculino	10 (18,2)	13 (23,6)	
Subtipo histológico			
Acinar	15 (27,3)	8 (14,5)	0,1165 <sup>d</sup>
Lepídico	2 (3,6)	1 (1,8)	0,1387 <sup>d</sup>
Mucinoso	1 (1,8)	1 (1,8)	0,9967 <sup>d</sup>
Papilar	1 (1,8)	3 (5,5)	0,9954 <sup>d</sup>
Sólido	8 (14,5)	15 (27,3)	0,1022 <sup>d</sup>

Fonte: Elaborada pela a autora.

Resultados estão apresentados como n (%)

PD-L1: ligante de morte celular programada (Programmed cell Death-Ligand)

<sup>a</sup> Teste T de Student com base na informação disponível de 55 pacientes

<sup>b</sup> Teste de postos sinalizados de Wilcoxon com base na informação disponível de 55 pacientes

<sup>c</sup> Teste exato de Fisher (subtipo histológico de interesse vs outros subtipos) com base na informação disponível de 55 pacientes

<sup>d</sup> Teste do Chi-quadrado

Tabela 7 - Correlações entre a expressão de PD-L1 e o estado mutacional do gene EGFR em adenocarcinomas pulmonares

Variável	Mutação de EGFR		Valor de P
	Selvagem	Mutado	
PD-L1	n (%)	n (%)	
Positivo	14 (36,8)	3 (7,9)*	p = 0,4079912
Negativo	16 (42,1)	5 (13,2)	

Fonte: Elaborada pela a autora.

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor);

PD-L1: ligante de morte celular programada (Programmed Cell Death-Ligand)

\*PD-L1 e EGFR (Teste exato de Fisher, p = 0,40799)

Tabela 8 - Correlações entre a expressão da proteína PD-L1 e a expressão da proteína ALK em adenocarcinomas pulmonares

Variável	Expressão de ALK		Valor de P
	Negativo	Positivo	
PD-L1			
Positivo	21 (38,2)	7 (12,7)*	p = 0,4079
Negativo	23 (41,8)	4 (7,3)	

Fonte: Elaborada pela a autora.

ALK: quinase do linfoma anaplásico (Anaplastic Lymphoma Kinase);

PD-L1: ligante de morte celular programada (Programmed Cell Death-Ligand)

\*PD-L1 e ALK (Fisher exact test p = 0,4079)

## 5 DISCUSSÃO

A personalização de tratamento para CPNPC hoje é uma realidade, e, para sua efetivação, é necessária a identificação de biomarcadores através de linhas metodológicas adequadas para garantir que os pacientes recebam os resultados de testes mais precisos e representativos que auxiliem na decisão terapêutica com elevada acurácia e celeridade.

Neste estudo foi investigada a presença de mutação no gene EGFR e a expressão proteica de ALK e de PD-L1 em adenocarcinomas de pulmão provenientes de pacientes oriundos de um hospital regional com referência nacional em cirurgia torácica, Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, além de se correlacionar esses achados com os subtipos histológicos desses tumores e dados demográficos dos pacientes.

Mundialmente, em 2002, 5% dos casos de câncer de pulmão foram diagnosticados entre pessoas de 0 a 44 anos, 14% entre 45 e 54 anos, 25% entre 55 e 64 anos e 55% entre 65 e mais anos. Essas proporções foram bastante uniformes para ambos os sexos. As taxas de câncer de pulmão específicas por idade foram entre 1,5 a 2,3 vezes maiores para os países mais desenvolvidos, em comparação com os países menos desenvolvidos dentro de cada faixa etária (WHO, 2012).

No nosso estudo foram incluídos 173 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, com uma média de idade de 67 anos, e variação de 36 a 93 anos. 103 (59,5%) deles tinham mais de 70 anos, uma frequência similar à vista para países desenvolvidos, segundo as estatísticas do GLOBOCAN, onde 62% de pacientes com câncer de pulmão tinham 65 anos ou mais nos países mais desenvolvidos, em comparação com 49% nos países menos desenvolvidos. 81 pacientes (46,8%) do nosso estudo foi do gênero masculino, refletindo as taxas mundiais que são uniformes para ambos os gêneros (WHO, 2012).

O estudo morfológico do adenocarcinoma de pulmão tem uma grande importância no cenário de análise de material com quantidade limitada, geralmente obtido por métodos pouco invasivos em pacientes com quadros metastáticos, a maioria dos casos; pois, apesar de não definir conduta terapêutica, mostra-se como uma importante ferramenta para priorizar quais testes moleculares devem ser realizados a partir da análise individual dos casos (NISHINO *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde de 2015, os padrões histológicos de crescimento tumoral em adenocarcinomas de pulmão estão relacionados com prognósticos diferentes, com o seguinte sistema de graduação arquitetural: lepidico, grau 1 ou bem diferenciado; acinar ou papilar, grau 2 ou moderadamente diferenciado; sólido, micropapilar ou mucinoso, grau 3 ou pouco diferenciado (OKADA *et al.*, 2013).

O câncer de pulmão é um dos poucos tipos de câncer com elevada carga mutacional. A complexidade do genoma do câncer de pulmão é de longe ilustrada pelo elevado número de alterações no número de cópias parcial ou total de cromossomos somáticos e de rearranjo de genes. A análise genômica do câncer de pulmão vem mostrando que os eventos mutacionais somáticos constitucionais iniciais que conduzem a tumorigênese parecem ocorrer de forma clonal, e que esses tumores são compostos de múltiplos subclones celulares distintos que compartilham um ancestral comum mas que diferem em termos de mutações que ocorrem posteriormente na evolução do tumor; e ainda que esses subclones podem estar mesclados em uma mesma amostra tumoral ou estar regionalmente separados em um mesmo tumor primário, entre sítios primários e metastáticos ou entre sítios metastáticos distintos, provendo um substrato para adaptação, seleção ou capacidade evolutiva do tumor. (SWANTON *et al.*, 2016)

A prevalência de cada tipo histológico varia de acordo com a população estudada. No Japão, o padrão de crescimento mais comum nos adenocarcinomas pulmonares é o tipo papilar, já nos países ocidentais, é o acinar (BURKE *et al.*, 2017). No nosso trabalho, o principal padrão histológico de crescimento foi o sólido (81/173, 46,2%), seguido do acinar, lepidico e papilar. De Melo e colaboradores (2015) encontraram na população do sudeste brasileiro uma predominância do subtipo acinar (67/125, 53,6%), seguido do papilar. Esta diferença mostra a heterogeneidade histológica do adenocarcinoma de pulmão ao redor do mundo.

A heterogeneidade morfológica do adenocarcinoma, mesmo dentro de categorias genomicamente definidas, pode ser explicado em parte por outras alterações genômicas que contribuem para patogênese tumoral. Até mesmo individualmente, adenocarcinomas exibem um grau notável de heterogeneidade morfológica intratumoral, refletindo a evolução genômica dentro de subclones tumorais, como aquisições mutacionais adicionais de sucesso em genes supressores de tumor, ou alterações no número de cópias de genes como um meio



de melhorar a sinalização oncogênica, como na expressão de EGFR. Assim como a evolução ecológica, a evolução tumoral do câncer de pulmão é um processo restrito cujo processo é limitado pelo genoma do hospedeiro, pelos passos pregressos da evolução tumoral e pelo microambiente tumoral. Compreender as vias pelas quais o microambiente tumoral direciona o genoma do câncer durante o curso da doença e as vias pelas quais o sistema imune do paciente atua no contexto de um panorama genômico heterogêneo criam perspectivas de melhorar a sobrevida de pacientes com câncer de pulmão. (SWANTON *et al.*, 2016)

Descrita em 2004, a mutação de EGFR em CPNPC continua sendo objetivo de pesquisas em ensaios clínicos e desenvolvimento de novas drogas. Recentemente o estudo “LUX Lung 7” comparou drogas de primeira e segunda linha, afatinib e gefitinib, quanto ao tempo de tratamento, sobrevida livre de progressão e falha terapêutica em 319 pacientes virgens de tratamento que apresentavam ativação de mutações de EGFR, mostrando que afatinib é um tratamento efetivo e bem tolerado em pacientes com CPNPC com EGFR mutado (WU *et al.*, 2018a).

O ensaio clínico fase III ADAURA é um estudo duplo cego randomizado que compara o uso da droga osimertinib e o uso de placebo em pacientes portadores de CPNPC em estágio inicial submetidos a ressecção e que apresentem mutações EGFR, incluindo no estudo a mutação de resistência T790M, além de comparar o estado mutacional do gene EGFR inicial com a amostra da recorrência da doença. Este estudo foi iniciado em 2015 e seus resultados estão previstos para 2021 (WU *et al.*, 2018).

Estes dois estudos ilustram a importância da identificação da mutação de EGFR em pacientes portadores de CPNPC em amostras tumorais diagnósticas e rebiópsias pós-progressão tumoral. Nos resultados do nosso trabalho, o estado de EGFR mais comumente encontrado foi a forma selvagem (77,9%), enquanto 22,1% dos pacientes apresentavam mutação do gene EGFR.

A mutação de EGFR mais comum encontrada no nosso estudo foi a deleção do éxon 19 e a mutação pontual L858R no éxon 21. Essas também são as mutações mais frequentes observadas em diversos estudos de diferentes populações (INOUE *et al.* 2016; DE MELO *et al.*, 2015; TAKADA *et al.*, 2018).

A taxa de mutação de EGFR encontrada no estudo corrente, de 22,1%, foi similar a descrita por outro trabalho brasileiro que apresentou uma frequência de

21,6% de pacientes com tumores com EGFR mutado, e a mutação mais frequente foi a deleção no éxon 19 seguidas pela substituição de aminoácido L858R no éxon 21, concordante com os achados encontrados no nosso trabalho (DE MELO *et al.*, 2015)

Outro estudo brasileiro, envolvendo pacientes provenientes da região sudeste, exibiu uma frequência de mutação de EGFR de 24% em CPNPC, com predominância da deleção no éxon 19 seguidas pela substituição de aminoácido L858R no éxon 21, achados estes também similares aos encontrados no nosso trabalho (HONMA *et al.*, 2014).

Kim *et al.*, 2016, em um artigo de revisão, relataram uma taxa de frequência de mutação no gene EGFR na população asiática entre 30 e 50% (SHI *et al.*, 2014), na população de brancos americanos entre 11 e 17% e na população europeia entre 8 e 13% (SHIGEMATSU *et al.*, 2005). A taxa de 22,1% encontrada em nosso trabalho seria menor que a da população asiática, porém maior que a população de brancos americanos e de europeus, um achado importante para caracterizar a população nordestina.

Um consórcio latino-americano para investigação de câncer de pulmão envolvendo Argentina (n=1713), México (n=1417), Colômbia (n=1939), Peru (n=393), Panamá (n=174), e Costa Rica (n=102), mostrou uma frequência média de mutação de EGFR em CPNPC de 26%, maior do que o que foi encontrado no nosso trabalho (22,1%), porém com uma variação ampla desse valor por cada país, indo de 14,4% na Argentina até 51,1% no Peru. Esta diferença mostra a heterogeneidade molecular do adenocarcinoma de pulmão em populações e etnias diferentes (ARRIETA *et al.*, 2015).

No nosso trabalho, entre os casos com EGFR do tipo selvagem, o principal padrão de crescimento histológico encontrado foi o tipo sólido, 60 casos (40,3%); e entre os casos EGFR mutado, o predomínio foi de casos com padrão de crescimento histológico do tipo acinar, 16 casos (10,7%). Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre EGFR selvagem e o padrão de crescimento histológico do tipo sólido. (p=0,0105).

Em uma população japonesa, mutações de EGFR foram associadas significativamente com os subtipos histológicos predominantemente papilar e lepidico (YOSHIZAWA *et al.*, 2013). Song *et al.* (2013) relataram que os padrões de crescimento micropapilar e lepidico foram os subtipos associados a mutações EGFR

em pacientes chineses (SONG *et al.*, 2013). Em uma população de pacientes americanos, o componente lepidico foi o único subtipo histológico associado com mutação de EGFR (VILLA *et al.*, 2014) enquanto o padrão acinar foi o único subtipo associado a mutação de EGFR na população brasileira. (DE MELO *et al.*, 2015). Alguns trabalhos apresentam correlação negativa entre a presença de mutação no gene EGFR e a histologia do tipo mucinoso (KIM *et al.*, 2016). A associação encontrada no nosso trabalho entre o adenocarcinoma pulmonar com o padrão histológico predominantemente sólido e o estado selvagem do gene EGFR ( $p = 0,0105$ ) corrobora com o consenso que a relação entre mutação EGFR e subtipo histológico em adenocarcinoma de pulmão ainda não está esclarecida.

Uma medicação anti-tirosina quinase, crizotinib, que tem como alvo específico a expressão de ALK, recebeu aprovação acelerada da FDA US (Food and Drug Administration) em agosto de 2011 para o tratamento de CPNPC comprovadamente positivos para ALK utilizando um teste de diagnóstico através de imuno-histoquímica padronizada. Em um ensaio clínico randomizado fase III multicêntrico, PROFILE 1014, o uso de crizotinib como terapia de primeira linha foi avaliado em CPNPC avançados positivos para ALK através de FISH. Pacientes foram randomizados em um primeiro grupo para receber crizotinib 250mg BID ( $n=172$ ) e em um segundo grupo para receber quimioterapia tradicional, perimetrexede com cisplatina ou carboplatina ( $n=171$ ), com sobrevida livre de progressão de 10,9 meses no grupo 1 e de 7 meses no grupo 2 ( $p < 0,001$ ), e resposta média de 49 meses sob uso de inibidor anti-ALK e de 22,9 meses com quimioterapia convencional. O estudo PROFILE 1014 atingiu seus objetivos ao mostrar que, na população de CPNPC avançado ALK positivo, o uso de crizotinib prolonga a sobrevida livre de doença com taxas de resposta melhores, mais rápidas e mais duradouras do que a terapia tradicional. (KOUDELAKOVA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

A prevalência de fusão de gene ALK com a proteína EML4 em CPNPC, desde sua descoberta por Soda *et al.* em 2007, varia na literatura mundial entre 3 e 8% (CAMIDGE *et al.*, 2010; KWAK *et al.*, 2010). Na população brasileira, a frequência de expressão de ALK encontrada na região sudeste foi de 3,2% (LOPES; BACCHI, 2012) e 4.8% (DE MELO *et al.*, 2015). Considerando isto, a positividade de ALK neste trabalho, 10,4%, é maior que a de outras populações a nível nacional e mundial.

A população deste estudo é proveniente do nordeste brasileiro, onde há raros relatos na literatura científica sobre este e outros biomarcadores de CPNPC. O Brasil é um país de dimensões continentais e há grande diversidade entre suas regiões em nível econômico, social, climático e cultural, e tais diferenças podem ter impacto na elevada frequência encontrada em nosso estudo.

Não se pode excluir viés de seleção para explicar essa diferença, uma vez que se trata de um estudo baseado em uma população oriunda de um único centro, o Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, que, como referência nacional em cirurgia torácica, acaba recebendo pacientes mais graves, com tumores mais avançados, uma vez que se tem visto que adenocarcinoma de pulmão com rearranjo ALK tem uma tendência a exibir padrões arquiteturais mais agressivos. (YOSHIDA *et al.*, 2010; JOKOJI *et al.*, 2010; NISHINO *et al.*, 2012; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Um estudo realizado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) no ano de 2009 sobre uso de drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras mostrou uma maior prevalência de uso de tabaco nas regiões sul (25,8%) e sudeste (23,9%) quando comparadas a região nordeste (13,3%). (INCA 2018). Em relação ao consumo de tabaco do mundo, está sendo observado um aumento em países em desenvolvimento e uma redução desse consumo em países desenvolvidos. Segundo a OMS de 2015, o maior consumo de tabaco foi visto no continente europeu, 29%, e o menor, na África, 12,4%, sendo que a incidência de tabagismo na região do nordeste do Brasil, de onde é oriunda a população deste estudo, é semelhante a menor taxa de consumo por continente, no caso 13,3% no nordeste brasileiro e 12,4% no continente africano. Essa diferença de consumo de tabaco entre as regiões brasileiras e outras regiões no mundo leva a uma outra hipótese: a população do nordeste brasileiro tendo uma menor exposição ao tabagismo, em relação a outras regiões brasileiras e do mundo, teria tumores com uma maior frequência de rearranjo do gene ALK, haja vista que vários estudos mostram uma maior frequência de rearranjo ALK em tumores de pacientes não fumantes (CHAPMAN *et al.*, 2016; NISHINO *et al.*, 2012). Variáveis clínicas e genéticas devem ser consideradas em estudos futuros para tentar confirmar ou refutar esta hipótese.

Em uma meta-análise, Fan *et al.* (2014) revisaram 62 artigos para avaliação das características clínico patológicas e demográficas de pacientes portadores de CPNPC com rearranjo do gene ALK, envolvendo 1178 casos positivos para

expressão da proteína ALK, provenientes do estudo de 20541 pacientes portadores de CPNPC, com taxas de incidência variando entre 0,99% e 15%. Nesta meta-análise, foi visto que pacientes com CPNPC contendo rearranjo ALK tendem a ser mais jovens do que os casos de CPNPC sem essa expressão, com uma diferença média de 7,16 anos a menos ( $P < 0.00001$ ) (FAN *et al.*, 2014).

No nosso trabalho foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na média de idade dos pacientes que expressaram a proteína ALK, 58,5 anos comparada com a média de 67,3 anos vista no grupo de pacientes que não expressaram esta proteína, uma diferença de 8,8 anos ( $p = 0,0034$ ); assim como uma diferença estatisticamente significativa quando observada a mediana de idade que foi de 57,5 anos para os pacientes com tumores positivos para ALK e de 67 anos para pacientes com tumores negativos para ALK ( $p = 0,0075$ ). Estes resultados são condizentes com os achados da literatura corrente, como pode ser visto na meta-análise comentada acima (FAN *et al.*, 2014).

Nishino e colaboradores (2012) descreveram uma extensa coorte de casos de pacientes portadores de adenocarcinoma de pulmão com rearranjo ALK onde foi realizado um estudo morfométrico comparando as características histológicas entre tumores primários e metastáticos e entre biópsias incisionais e excisionais, concluindo que a presença de células em anel de sinete foi a característica histológica independente mais significativa em adenocarcinomas pulmonares com rearranjo ALK primários ou metastáticos e em pequenas biópsias obtidas por procedimentos minimamente invasivos. Este mesmo trabalho mostrou uma associação de rearranjo ALK e o subtipo histológico de padrão sólido, além de uma tendência de associação do subtipo histológicos de padrão micropapilar e invasão pleural e metástases com o rearranjo do gene ALK. Nas recomendações IASLC/ATS/ERS, também se considera a arquitetura micropapilar como de potencial biológico significativamente distinto (NISHINO *et al.*, 2012; YOSHIKAWA *et al.*, 2013).

Outras populações ocidentais também associaram rearranjo ALK em adenocarcinomas de pulmão ao subtipo histológico de padrão sólido. (RODIG *et al.*, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2011). Já na população japonesa, a literatura aponta o subtipo histológico de padrão acinar como significativamente mais associado ao rearranjo ALK. (YOSHIDA *et al.*, 2011; JOKOJI *et al.*, 2010). Não se pode determinar se essas diferenças se devem a diferenças étnicas ou a outras características

populacionais. No nosso trabalho, os subtipos histológicos identificados nos casos com rearranjo do gene ALK foram principalmente acinar (55,55%), seguido do sólido (33,33%), porém sem significância estatística. Apesar destes achados aparentarem divergência, o que se observa é que adenocarcinoma de pulmão com rearranjo ALK tem uma tendência a exibir padrões arquiteturais mais agressivos.

Um dos casos positivos para ALK do nosso trabalho foi classificado histologicamente como linfangite carcinomatosa, não sendo um dos tipos descritos na classificação histológica dos padrões de crescimento tumoral. Na literatura há poucas descrições deste tipo histológico que parece estar associado a um pior prognóstico, porém ainda sem evidências que apoiem essa associação, o que também leva a esta entidade ainda não ter descrição para estadiamento patológico. (TRAVIS et al, 2015)

Um ensaio clínico recente, o “KEYNOTE-024”, mostrou melhora da taxa de progressão livre de doenças e sobrevida global em pacientes com CPNPC avançado em cujos tumores havia expressão de PD-L1 em mais de 50% das células, visto em 30% da população em estudo, o que levou à aprovação do pembrolizumab como terapia de primeira linha para tratamento de pacientes portadores de CPNPC avançado. Neste ensaio clínico, a quantificação da expressão de PD-L1 por metodologia específica de imuno-histoquímica funcionou como biomarcador preditivo (RECK *et al.*, 2016).

Em maio de 2018, um grupo de brasileiros dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia, submeteram um trabalho ao encontro anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (GELATTI *et al.*, 2018) no qual relatam uma baixa prevalência de PD-L1 na população brasileira, com uma frequência de 15,48% com marcação imuno-histoquímica superior a 50% das células tumorais de adenocarcinomas pulmonares, sem associação com gênero ou idade. Em nosso trabalho, encontramos uma taxa de 18,2% de casos de adenocarcinoma com marcação em mais de 50% das células tumorais, resultado abaixo da frequência encontrada no ensaio clínico “KEYNOTE-024”, e semelhante a baixa prevalência que o grupo de brasileiros supracitados encontrou.

O nosso estudo revelou que 50,9% dos casos tinham alguma expressão de PD-L1 em células tumorais; e, quando considerado o ponto de corte de marcação de pelo menos 50% das células tumorais, uma frequência de 18,2% dos casos. Pinto, 2016, em um estudo similar, encontrou positividade geral em 37,9% dos casos, um

pouco abaixo da frequência de casos encontrada em nosso estudo, porém, quando considerado o ponto de corte de marcação em 50% ou mais das células tumorais, Pinto encontrou uma taxa de 16,9% dos casos, valor bem próximo ao encontrado em nosso trabalho. (PINTO *et al.*, 2016).

Nos diversos estudos envolvendo PD-L1, são utilizados diferentes anticorpos: 28-8, 22C3, M1H1, SP142, SP263, e diferentes plataformas: Dako, Roche e Ventana. Alguns estudos utilizaram graduações de 1%, 5%, 50% ou mais para considerar a expressão de PD-L1 positiva. Outros estudos utilizaram isoladamente o cutoff de 1% ou de 5% ou de 10% e ou de 50%. E alguns estudos se basearam ainda na intensidade de marcação por imuno-histoquímica para graduar os tumores. Percebe-se então a extrema dificuldade em se padronizar critérios de positividade para PD- L1, o que envolve desde a maquinaria para as reações químicas, diferentes anticorpos, até a diluição dos reagentes bem como a interpretação das leituras, o que dificulta o estabelecimento de qualquer relação entre os estudos (KERR *et al.*, 2015).

Uma meta-análise recente envolvendo 47 estudos e mais de 11 mil pacientes encontrou uma correlação positiva entre PD-L1 e pior prognóstico em câncer de pulmão. Entretanto tal associação só foi observada para a população asiática, não sendo reproduzida nas populações não asiáticas (ZHANG *et al.*, 2017). Resultados de outras três meta-análises mostraram que pacientes com CPNPC e aumento da expressão de PD-L1 tinham pior prognóstico (PAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; D'INCECCO *et al.*, 2015). Outros estudos mostram que a expressão de PD-L1 tende a estar associada com tabagismo, disseminação linfonodal, tamanho tumoral e alto grau histológico (KIM *et al.*, 2016; RANGACHARI *et al.*, 2017; GAGNÉ *et al.*, 2018).

As populações que vivem nos países em desenvolvimento enfrentam muitos desafios para ter acesso às novas medicações que surgem com a descoberta de alvos terapêuticos. Não apenas em relação aos elevados preços no Brasil, principalmente quanto aos inibidores de pontos de checagem imunológicos, mas também se enfrenta a dificuldade de implementação da seleção de biomarcadores para acesso das melhores imunoterapias (AGUIAR *et al.*, 2017a). Nesse contexto também há uma penalidade para os sistemas de saúde quando o modelo analítico-decisivo mostra que o uso da expressão de PD-L1 como biomarcador aumenta a relação custo-eficácia da imunoterapia. (AGUIAR *et al.*, 2017b)

O nosso trabalho mostrou que os casos PD-L1 positivos têm um predomínio de padrão de crescimento histológico tipo sólido, que é classificado como grau 3 histológico ou como pouco diferenciado, segundo a OMS de 2015, o que seria compatível com o que é encontrado da literatura, descrito como predominância de alto grau histológico em casos com expressão de PD-L1.

A heterogeneidade intratumoral tem sido alvo de discussão acerca da necessidade de rebiópsias em casos especiais, pois em alguns estudos foi comparada de expressão de PD-L1 entre biópsias de agulha e nodulectomias com resultados conflitantes, sendo sugerida nova amostragem em casos que exibem padrão arquitetural de baixo grau como lepidico, acinar e até mesmo o padrão papilar, perante o enorme benefício a ser trazido por uma terapia alvo-específica (GAGNÉ *et al.*, 2018).

De uma perspectiva molecular, a expressão de PD-L1 parece estar fortemente associada a vias de ativação de mutações direcionais (EGFR/ALK). A avaliação de sobreposição desses biomarcadores na rotina clínica provavelmente tem impacto no contexto da medicina personalizada. De fato, vários pesquisadores têm relatado essa associação com CPNPC (CHEN *et al.*, 2015; AZUMA *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2016). Alguns estudos mostraram que CPNPC que contém mutação do gene EGFR ou rearranjo do gene ALK estão associados a uma menor taxa de resposta aos inibidores PD-1/PD-L1 (RITTMAYER *et al.*, 2017; HORN *et al.*, 2017; HERBST *et al.*, 2016).

Uma associação direta entre o nível de expressão de PD-L1 e a presença de mutação no gene EGFR foi descrita em diferentes grupos de pesquisa (D'INCECCO *et al.*, 2015; AKBAY *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2015; BYLICKI *et al.*, 2017). Por outro lado, Takada *et al.* (2018) observaram que a expressão de PD-L1 estava significativamente associada com o gene EGFR tipo selvagem (TAKADA *et al.*, 2018). Hata *et al.* (2017) também relataram uma taxa de expressão menor em EGFR mutados quando comparados aos EGFR tipo selvagem (HATA *et al.*, 2017). Na literatura científica, alguns trabalhos mostram associação entre PD-L1 e ALK (HUYNH *et al.*, 2016; OTA *et al.*, 2015; KOH *et al.*, 2015), porém outros não confirmam tal associação (YANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014).

A população estudada em nosso trabalho foi classificada por porcentagem em quatro principais grupos, de acordo com EPT (0%, 1-4%, 5-49%, 50-100%), porém não foi encontrada associação entre a positividade imuno-histoquímica de



PD-L1 ou porcentagem de expressão de PD-L1 e o estado mutacional do gene EGFR ou a expressão da proteína ALK. Uma vez que não encontramos associação entre o estado mutacional do gene EGFR e a expressão de PD-L1, nosso resultado é mais condizente com os trabalhos descritos em uma recente meta-análise publicada por Yang *et al.* (2017) onde os autores concluíram que a associação entre a expressão de PD-L1 e estado mutacional de EGFR é variável e não apresenta significância estatística (YANG *et al.*, 2017). A obscura relação entre a expressão de PD-L1 e as mutações direcionais em CPNPC, assim como a discrepância entre os diversos estudos citados, pode refletir características individuais dos pacientes, heterogeneidade populacional e a falta de padronização da metodologia e análise da positividade de expressão de PD-L1.

Em um único caso foi encontrada a presença de mutação no gene EGFR e concomitante expressão da proteína ALK, o que é condizente com a literatura onde vários estudos mostram que esses dois biomarcadores são mutuamente excludentes. Este mesmo caso não apresentou expressão de PD-L1 (INAMURA *et al.*, 2008; SHAW *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2016).

Este estudo apresenta diversas limitações. Trata-se de uma análise retrospectiva de uma única instituição e não um estudo correlativo baseado em ensaios, não se podendo excluir viés de seleção. A ausência de informações clínicas, seguimento e uso de terapia alvo-específica, baseando-se apenas em informações histopatológicas, o que dificultou comparações com a literatura corrente. A ausência de padronização para análise de PD-L1, como já explicado. A reduzida quantidade de material disponível por procedimentos pouco invasivos, o que limitou a execução de todos os testes pretendidos. A heterogeneidade intratumoral, que pode levar a casos falsos negativos. Em estudos futuros, uma ampliação na amostragem, a devida correlação clínica e inclusão de novos alvos moleculares, como HER-2, B-RAF, MET e ROS-1, deverão otimizar os resultados aqui apresentados.

O atual desafio para patologia cirúrgica oncológica é disponibilizar, além do diagnóstico histológico preciso e confiável, informações complementares de biomarcadores tumorais que guiem um tratamento personalizado e eficaz para cada tipo de neoplasia, em amostras tumorais cada vez mais exíguas oriundas de técnicas cirúrgicas cada vez menos invasivas.

## 6 CONCLUSÕES

Na população estudada, a frequência da expressão de ALK de 10,4% foi maior do que a média entre 3 e 8% registrada na literatura internacional, sendo caracterizada por pacientes mais jovens em relação aos que não tem essa alteração molecular, porém sem relação com gênero feminino, como é descrito na maioria dos trabalhos.

A frequência de 18,2% dos casos com imunomarcção de PD-L1 em mais de 50% das células tumorais foi menor que a frequência média de 30% relatada em ensaios clínicos onde esse ponto de corte foi utilizado para selecionar pacientes em pesquisas envolvendo o uso de imunomoduladores.

O padrão histológico de crescimento predominantemente sólido é estruturalmente mais destrutivo e relacionado a pior prognóstico e no nosso trabalho está estatisticamente associado ao gene EGFR em seu estado selvagem.

Mais estudos são necessários para compreensão de como esses biomarcadores estão distribuídos numa população tão heterogênea como a população brasileira, e como transformar este conhecimento em uma melhoria para a prática clínica, facilitando o acesso a medicamentos alvo-específicos que são de alto custo, porém de alta efetividade.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. N. *et al.* Economic impact of immune checkpoint inhibitor therapy in Brazil and strategies to improve access. **J Clin Oncol.**, New York, suppl 15, p. 6612, 2017a.
- AGUIAR, P. N. *et al.* The effect of PD-L1 testing on the cost-effectiveness and economic impact of immune checkpoint inhibitors for the second-line treatment of NSCLC. **Ann Oncol.**, Dordrecht, v. 28, n. 9, p. 2256-2263, 2017b.
- AKBAY, E. A. *et al.* Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. **Cancer Discov.**, v. 3, n. 12, p. 1355-1363, 2013.
- AOKI, T. *et al.* Peripheral lung adenocarcinoma: correlation of thin-section ct findings with histologic prognostic factors and survival. **Radiology**, Easton, v. 220, n. 3, p. 803– 809, 2001.
- ARRIETA, O. *et al.* Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in Non Small - Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP). **J Thorac Oncol.**, Hagerstown, v. 10, n. 5, p. 838 – 843, 2015.
- AZUMA, K. *et al.* Association of PD -L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non small cell lung cancer. **Ann Oncol.**, Dordrecht, v. 25, n. 10, p. 1935-1940, 2014.
- BLANK, C. *et al.* PD-L1/B7H-1 Inhibits the effector phase of tumor rejection by t cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T CELLS. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 64, n. 3, p. 1140-5, 2004.
- BLANK, C.; MACKENSEN, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol Immunother**, New York, v. 56, n. 5, p. 739-45, 2007.
- BRAHMER, J. *et al.* Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 373, n. 2, p. 123-35, 2015.
- BRAHMER, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 366, n. 26, p. 2455-65, 2012.
- BRODY, R. *et al.* PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. **Lung Cancer**. v.112, p. 200-215, 2017
- BURKE, A. *et al.* **Practical thoracic pathology**: diseases of the lung, heart, and thymus. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017.

BUTTNER R, *et al.* Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry testing: A review of analytical assays and clinical implementation in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol.**, New York, v. 35, n. 34, p. 3867-3876, **2017**

BYLICKI, O. *et al.* Targeting the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint in EGFR-Mutated or ALK - Translocated Non-Small-Cell Lung Cancer. **Target Oncol.** v. 12, n. 5, p. 563-569, 2017.

CAMIDGE, D. R. *et al.* Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. **Clin Cancer Res.**, Philadelphia, v. 16, n. 22, p. 5581-5590, 2010.

CAMIDGE, D. R. *et al.* Correlations between the percentage of tumor cells showing an anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 118, n. 18, p. 4486-94, 2012.

CARDARELLA, S. *et al.* The introduction of systematic genomic testing for patients with non-small-cell lung cancer. **J Thorac Oncol.**, Hagerstown, v. 7, n. 12, p. 1767-74, 2012.

CHAPMAN, A. M. *et al.* Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. **Lung Cancer**, Limerick, v. 102, p. 122-134, 2016.

CHEN, N. *et al.* Upregulation of PD-L1 by EGFR activation mediates the immune escape in EGFR - Driven NSCLC: implication for optional immune targeted therapy for NSCLC patients with EGFR mutation. **J Thorac Oncol.**, Hagerstown, v. 10, n. 6, p. 910 – 923, 2015.

CHIARLE, R. *et al.* The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. **Cancer**, Philadelphia, v.8, n. 1, p. 11-23, 2008.

CHOI, Y. L. *et al.* Identification of novel isoforms of the EML4–ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 68, n. 13, p. 4971-6, 2008.

CHOI, Y. L. *et al.* EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. **N Engl J Med.**, Boston, v. 363, n. 18, p. 1734-9, 2010.

D'INCECCO, A. *et al.* PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. **Br J Cancer.**, London, v. 112, n. 1, p. 95-102, 2015.

DAHABREH, I. J. *et al.* Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive bio-markers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.**, Philadelphia v. 16, n. 1, p. 291-303, 2010.

De MELO, A. C. *et al.* Mutational Profile and New IASLC/ATS/ERS Classification Provide Additional Prognostic Information about Lung Adenocarcinoma: A Study of

125 Patients from Brazil. **Oncology.**, Basel, v. 89, n. 3, p. 175-86, 2015.

FAN, L. *et al.* Clinicopathological and demographical characteristics of non-small cell lung cancer patients with ALK rearrangements: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One.**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e100866, 2014.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer.**, New York, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

FUKUOKA, M. *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. **J Clin Oncol.**, New York, v. 21, n. 12, p. 2237-46, 2003.

GAGNÉ, A. *et al.* Comprehensive assessment of PD-L1 staining heterogeneity in pulmonary adenocarcinomas using tissue microarrays: impact of the architecture pattern and the number of cores. **Am J Surg Pathol.**, New York, v. 42, n. 5, p. 687-694, 2018.

GALETTA, D. *et al.* The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. **Expert Opin Ther Targets.** v. 16, Suppl 2, p. S45-54, 2012.

GARON, E.B. *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 372, n. 21, p. 2018-2028, 2015

GAUTSCHI, O. *et al.* Bevacizumab plus pemetrexed versus pemetrexed alone as maintenance therapy for patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: update, from the swiss group for clinical cancer research (SAKK) 19/09 Trial. **Clin Lung Cancer.** 2017 v. 18, n. 3, p. 303-309.

GELATTI, A. C. *et al.* Lower prevalence of PD-L1 expression in advanced non-small lung cancer in Brazil. **ASCO Annual Meeting**, e21140, 2018.

GROSSO, J. *et al.* Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients (pts) with advanced solid tumors treated with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538) **J Clin Oncol.**, New York, suppl: 15, abstract: 3016, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HATA, A. *et al.* Programmed death-ligand 1 expression according to epidermal growth factor receptor mutation status in pretreated non-small cell lung cancer. **Oncotarget.** v. 8, n. 69, p. 113807-113816, 2017.

HERBST, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. **Lancet**, London, v. 387, n. 10027, p. 1540 -1550, 2016.

HIRSCH, F.R. *et al.* ALK-immunohistochemistry (IHC) standardization with D5F3 antibody in non-small cell lung carcinoma (NSCLC): An international consensus study. **J Clin Oncol.**, New York, v. 31, n. 15, p. e22042, 2013.

HONG, S. *et al.* Upregulation of PD-L1 by EML4-ALK fusion protein mediates the immune escape in ALK positive NSCLC: Implication for optional anti-PD-1/PD-L1 immune therapy for ALK-TKIs sensitive and resistant NSCLC patients. **Oncoimmunology**. 2016; v. 5, n. 3, p. e1094598, 2016.

HONMA, H. N. *et al.* EGFR activating mutations and their association with response to platinum-doublet chemotherapy in Brazilian non-small cell lung cancer patients. **Target Oncol.** v. 9, n. 4, p. 389-94, 2014.

HORN, L. *et al.* Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). **J Clin Oncol.** New York, v. 35, n. 35, p. 3924-3933, 2017.

HUI, R. *et al.* Pembrolizumab as first-line therapy for patients with PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: a phase 1 trial. **Ann Oncol**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 874-881, 2017.

HUYNH, T. G. *et al.* Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Resected Lung Adenocarcinomas: Association with Immune Microenvironment. **J Thorac Oncol.**, Hagerstown v. 11, n. 11, p. 1869-1878, 2016.

INAMURA, K. *et al.* EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. **J Thoracic Oncol.**, Hagerstown, v. 3, n. 1, p. 13-7, 2008.

INOUE, A. *et al.* Characteristics and overall survival of EGFR mutation - positive non-small cell lung cancer treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors: a retrospective analysis for 1660 Japanese patients. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 46, n. 5, p.462-467, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil.**, Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em 22 jun. 2018.

ISHIDA, Y. *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J.**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 3887-95, 1992.

JOKOJI, R. *et al.* Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. **J Clin Pathol.**, London v. 63, n. 12, p. 1066–1070, 2010.

KARACHALIOU, N. *et al.* Understanding the function and dysfunction of the immune system in lung cancer: the role of immune checkpoints. **Cancer Biol Med**, v. 12, n. 2, p. 79-86, 2015.

- KERR, K. M. *et al.* Programmed Death - Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? **J Thorac Oncol.**, Hagerstown, v. 10, n. 7, p. 985 – 989, 2015.
- KIM, J. *et al.* Correlation of Histologic Subtypes and Molecular Alterations in Pulmonary Adenocarcinoma: Therapeutic and Prognostic Implications. **Adv Anat Pathol**, New York, v. 23, n. 5, p. 30-8, 2016.
- KIM, L. *et al.* Clinicopathologic and molecular characteristics of lung adenocarcinoma arising in young patients. **J Korean MedSci**, Seoul, v. 27, n. 9, p. 1027-36, 2012.
- KOH, J. *et al.* Clinicopathologic Analysis Of Programmed Cell Death-1 And Programmed Cell Death-Ligand 1 And 2 Expressions In Pulmonary Adenocarcinoma: Comparison With Histology And Driver Oncogenic Alteration Status. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 28, n. 9, p. 1154–1166, 2015.
- KOIVUNEN, J. P. *et al.* EML4–ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v. 14, n. 13, p. 4275-83, 2008.
- KOUDELAKOVA, V. *et al.* Non-small cell lung cancer - genetic predictors. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, Prague, v. 157, n. 2, p. 125-36, 2013.
- KWAK, E. L. *et al.* Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 363, n. 18, p. 1693-1703, 2010.
- LI, A. R. *et al.* EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. **J Mol Diagn**, Bethesda, v. 10, n. 3, p. 242-8, 2008.
- LOPES, L.; BACCHI, C. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung cancer in a Brazilian population. **Clinics**, São Paulo, v. 67, n. 7, p. 845-847, 2012.
- LYNCH, T. J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med.**, Boston, v. 350, n. 21, p. 2129-39, 2004.
- MATTHEWS, M. J. *et al.* Frequency of residual and metastatic tumor in patients undergoing curative surgical resection for lung cancer. **Cancer Chemother Rep**, Bethesda, v. 4, n. 2, p. 63-7, 1973.
- MCLEER-FLORIN, A. *et al.* Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. **J Thorac Oncol**, Hagerstown, v. 7, n. 2, p. 348-54, 2012.
- MOK, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. **N Engl J Med.**, Boston, v. 361, n. 10, p. 947-57, 2009.

NISHINO, M. *et al.* Histologic and cytomorphologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. **Mod Pathol.**, Baltimore, v. 25, n. 11, p. 1462-72, 2012.

NURWIDYA F. *et al.* Gefitinib in the treatment of non small cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine.** v. 7, n. 2, p. 119-123, 2016

OKADA, M. Subtyping lung adenocarcinoma according to the novel 2011 IASLC/ATS/ERS Classification: Correlation With Patient Prognosis. **Thorac Surg Clin.**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 179–186, 2013.

OTA, K. *et al.* Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein And Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. **Clin Cancer Res.**, Philadelphia v. 21, n. 17, p. 4014-21, 2015.

PAEZ, J. G. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, Washington, v. 304, n. 5676, p. 1497-500, 2004.

PAIK, J. H. *et al.* Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. **J Thorac Oncol**, Hagerstown, v. 6, n. 3, p. 466-72, 2011.

PAN, Z. K. *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. **J Thorac Dis.** v. 7, n. 3, p. 462-470, 2015.

PINTO, G. D. J. *et al.* Evaluation of PD-L1 expression in tumor tissue of patients with lung carcinoma and correlation with clinical and demographic data. **J Imundo Res.**, Baltimore, v. 2016, ID. 9839685, 2016.

RANGACHARI, D. *et al.* Correlation between Classic Driver Oncogene Mutations in EGFR, ALK, or ROS1 and 22C3–PD-L1  $\geq 50\%$  Expression in Lung Adenocarcinoma. **J. Thorac. Oncol.**, Hagerstown, v. 12, n. 5, p. 878 -883, 2017.

RECK, M. *et al.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non – Small - Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 375, n. 19, p. 1823-1833, 2016.

RITTMAYER, A. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, London, v. 389, n. 10066, p. 255-265, 2017.

RODIG, S. J. *et al.* Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. **Clin Cancer Res.**, Philadelphia, v. 15, n. 16, p. 5216–5223, 2009.

SHARMA, S. V. *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nat Rev Cancer.**, London, v. 7, n. 3, p. 169-81, 2007.



SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, n. 2, p. 116-26, 2002.

SHAW, A. T. *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. **J Clin Oncol**, New York, v. 27, n. 26, p. 4247-53, 2009.

SHEPHERD, F. A. *et al.* Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med**, Boston, v. 353, n. 2, p. 123-32, 2005.

SHI, Y. *et al.* A Prospective, Molecular Epidemiology Study of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non – Small - Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology (PIONEER). **J Thorac Oncol**, Hagerstown, v. 9, n. 2, p. 154162, 2014.

SHIGEMATSU, H. *et al.* Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. **J Natl Cancer Inst**, Cary, v. 97, n. 5, p. 339 – 346, 2005.

SHINMURA, K. *et al.* EML4–ALK fusion transcripts, but no NPM–, TPM3–, CLTC–, ATIC–, or TFG–ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. **Lung Cancer**, Limerick, v. 61, n. 2, p. 163-9, 2008.

SHINOHARA, T. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). **GENOMICS**, San Diego, v. 23, n. 3, p. 704-6, 1994.

SHOLL, L. M. *et al.* Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: the lung cancer mutation consortium experience. **J Thorac Oncol**, Hagerstown, v. 10, n. 5, p. 768–777, 2015.

SODA, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. **Nature**, London, v. 448, n. 7153, p. 561-6, 2007.

SONG, Z. *et al.* Correlation of EGFR mutation and predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in Chinese patients. **Med Oncol**, Houndmills, v. 30, n. 3, p. 645, 2013.

SUN, J. M. *et al.* A dramatic response to crizotinib in a non-small-cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK. **J Thorac Oncol**, Hagerstown, v. 7, n. 12, p. e36-8, 2012.

SWANTON C., *et al.* Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. **N Engl J Med**, London, v. 374, n 19, p. 1864-73, 2016

SZNOL, M.; CHEN, L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in treatment of advanced human cancer response. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v. 19, n. 5, p. 1021-34, 2013.

TAKADA, K. *et al.* PD-L1 expression according to the EGFR status in primary lung adenocarcinoma. **Lung Cancer.**, Limerick, v. 116, p. 1-6, 2018.

TANG, Y. *et al.* The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. **Oncotarget.** v. 6, n. 16, p. 14209-14219, 2015.

TOPALIAN, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 366, n. 26, p. 2443-54, 2012.

TORRES, A. F. *et al.* Expression of EGFR and molecules downstream to PI3K/Akt, Raf-1-MEK-1-MAP (Erk1/2), and JAK (STAT3) pathways in invasive lung adenocarcinomas resected at a single institution. **Anal Cell Pathol (Amst).**, Amsterdam, 2014: 352925, 2014.

TRAVIS, W. D. *et al.* International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. **J Thorac Oncol.**, Hagerstown, v. 6, n. 2, p. 244-85, 2011.

TRAVIS, W. D. *et al.* **WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.** 4. ed. Lyon: IARC Press, 2015.

TUONONEN, K. *et al.* Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: a comparison of four methods. **Biomed Res Int**, v. 2013, ID: 757490, 2013.

VILLA, C. *et al.* Correlation of EGFR Mutation Status With Predominant Histologic Subtype of Adenocarcinoma According to the New Lung Adenocarcinoma Classification of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society. **Arch Pathol Lab Med.**, Chicago, v. 138, n. 10, p. 1353-1357, 2014.

WANG, A. *et al.* The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. **Eur J Surg Oncol.**, London, v. 41, n. 4, p. 450 – 456, 2015.

WEICKHARDT, A. J. *et al.* Diagnostic assays for identification of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 119, n. 8, p. 1467-77, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **GLOBOCAN 2012:** Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acesso em: 22 jun. 2018.

WU, Y. L. *et al.* Afatinib as First-line Treatment of Older Patients With EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Subgroup Analyses of the LUX-Lung 3, LUX-Lung 6, and LUX-Lung 7 Trials. **Clin Lung Cancer.** v. 19, n. 4, p. e465-e479, 2018a.

WU, Y. L. *et al.* ADAURA: Phase III, Double-blind, Randomized Study of Osimertinib Versus Placebo in EGFR Mutation-positive Early-stage NSCLC After Complete Surgical Resection. **Clin Lung Cancer**. v. 19, n. 4, p. e533-e536, 2018b.

YANG, C. Y. *et al.* Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. **Eur J Cancer**., Oxford v. 50, n. 7, p. 1361 – 1369, 2014.

YANG, H. *et al.* The correlation between programmed death-ligand 1 expression and driver gene mutations in NSCLC. **Oncotarget**. v. 8, n. 14, p. 23517-23528, 2017.

YI, E. S. *et al.* Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. **J Thorac Oncol**, Hagerstown, v. 6, n. 3, p. 459-65, 2011.

YOSHIDA, A. *et al.* Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. **Am J Surg Pathol.**, New York, v. 35, n. 8, p. 1226–1234, 2011.

YOSHIDA, A. *et al.* Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. **Lung Cancer**., Limerick, v. 72, n. 3, p. 309-15, 2011.

YOSHIZAWA, A. *et al.* Validation of the IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification for Prognosis and Association with EGFR and KRAS Gene Mutations: Analysis of 440 Japanese Patients. **J Thorac Oncol.**, Hagerstown, v. 8, n. 1, p. 52-61, 2013.

ZHANG, M. *et al.* PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 10255, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. **Onco Targets Ther**. v. 7, p. 567 – 573, 2014.

ZHANG, Y. G. *et al.* Evaluation of ALK Rearrangement in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Using FISH, Immunohistochemistry, and Real-Time Quantitative RT-PCR on Paraffin-Embedded Tissues. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e64821, 2013.

## APÊNDICE A - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

6/12/2018

ScholarOne Manuscripts

 **Jornal Brasileiro de Pneumologia**[Home](#)[Author](#)[Review](#)

### Submission Confirmation

[Print](#)

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Jornal Brasileiro de Pneumologia

**Manuscript ID**

JBPNEU-2018-0181

**Title**

Molecular profile of non-small-cell lung cancer in Northeast Brazil

**Authors**

Oliveira, Ana Claudia  
Alves da Silva, Antonio Vinicios  
Alves, Marcellson  
Cronemberger, Eduardo  
Carneiro, Benedito  
Melo, Juliana  
Martins Neto, Francisco  
Távora, Fábio

**Date Submitted**

12-Jun-2018