



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÂMELA MARIA MARTINS DA SILVA XAVIER

**UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO, NA AVALIAÇÃO DE
FATORES PROGNÓSTICOS E NO DIRECIONAMENTO DO TRATAMENTO DO
CÂNCER DE PULMÃO**

FORTALEZA

2020

PÂMELA MARIA MARTINS DA SILVA XAVIER

UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO, NA AVALIAÇÃO DE FATORES
PROGNÓSTICOS E NO DIRECIONAMENTO DO TRATAMENTO DO CÂNCER DE
PULMÃO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Msc. Gunter Gerson.

FORTALEZA

2020

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)

- X22u Xavier, Pâmela Maria Martins da Silva.
Utilização das técnicas de imuno-histoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico, na avaliação de fatores prognósticos e no direcionamento do tratamento do câncer de pulmão. / Pâmela Maria Martins da Silva Xavier. – 2020.
34 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Me. Gunter Gerson.
1. Câncer de pulmão. 2. Perfil imuno-histoquímico. 3. PCR. 4. EGFR. I. Título.

CDD 570

PÂMELA MARIA MARTINS DA SILVA XAVIER

UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO, NA AVALIAÇÃO DE FATORES
PROGNÓSTICOS E NO DIRECIONAMENTO DO TRATAMENTO DO CÂNCER DE
PULMÃO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Msc. Gunter Gerson.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. MSc. Gunter Gerson (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Maria Jania Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Ana Cláudia da Silva Mendes de Oliveira
Hospital de Messejana

A Deus e à Nossa Senhora de Fátima.
Aos meus pais, que sempre me apoiaram
nos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora de Fátima, por terem me dado saúde e força para superar todos os obstáculos. Sem fé eu não sonharia tão longe.

Aos meus pais, Eliene e Inácio, que são o meu alicerce, por terem me dado a vida, confiado em mim, apoiando-me em todos os momentos, por terem sido o meu ombro amigo nos momentos difíceis, incentivando-me a sempre estudar e a nunca desistir dos meus objetivos futuros. A maior herança deixada por eles é minha educação.

À Universidade Estadual do Ceará, que é minha raiz, local que eu comecei a minha vida acadêmica e saí com um enorme aprendizado.

Aos amigos que fiz durante esses anos, nas duas universidades que estudei, todos têm um espaço especial no meu coração.

Às pessoas que participaram desse trabalho, que colaboraram e me deram todo o suporte, especialmente ao meu orientador Gunter Gerson e ao colega Eduardo Lopes por toda atenção e ensinamentos.

E não menos importante, à minha única professora de reforço, Paula, por ter feito parte da minha formação, o meu muito obrigada.

A todos que fizeram parte, diretamente ou indiretamente, meu coração será sempre grato.

RESUMO

O câncer de pulmão é uma neoplasia de alta mortalidade, sendo o primeiro do mundo tanto em incidência quanto em mortalidade. É o segundo mais comum em homens e o terceiro em mulheres. Geralmente é diagnosticado em estágio localmente avançado, sendo a principal causa de morte por câncer no mundo. A técnica de imuno-histoquímica ganha ampla utilização na identificação do subtipo tumoral, na avaliação dos fatores prognósticos e no direcionamento do tratamento, enquanto a identificação da imunoe expressão de PD-L1 tem possibilitado uma nova premissa de tratamento envolvendo o uso de anticorpos monoclonais. A técnica de PCR para pesquisa de alterações do EGFR permite indicar o tratamento com inibidor de tirosina quinase. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil imuno-histoquímico e as alterações do gene EGFR em uma série de 29 amostras de tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de neoplasia pulmonar, e mostrar a importância dessas técnicas no diagnóstico, na avaliação de fatores prognósticos e no direcionamento do tratamento do câncer de pulmão. Os dados demonstraram uma maior prevalência de casos em mulheres (66%), com a idade média de 66 anos. Os tumores primários do pulmão representaram a maioria dos casos (86%). O tipo histológico predominante foi o adenocarcinoma (38%), seguido do carcinoma de células escamosas (17%), tumores carcinoides (17%), metástase pulmonar (14%), e casos de outros tumores menos frequentes (14%). A maioria dos casos era de grau histológico moderadamente diferenciado (75%). Entre os adenocarcinomas, o subtipo histológico acinar foi o mais frequente (45%). Nos casos de tumores secundários, metade eram metástase de tumor primário do fígado. Do total de tumores carcinoides analisados, 80% foram carcinoides típicos e 20% foi de carcinoide atípico. A expressão de PDL-1 e a alteração de EGFR foram avaliadas em 16 casos, sendo observado expressão de PD-L1 em 12% e alteração de EGFR em 25%. Este estudo não mostrou relação entre os casos que apresentaram imunoe expressão de PDL-1 e alterações de EGFR. O perfil imuno-histoquímico dos casos de adenocarcinoma mostrou que todos apresentaram imunoe expressão de TTF1 e ausência de marcação para p63, enquanto no perfil imuno-histoquímico dos casos de carcinoma de células escamosas identificou-se o oposto. Para tumores carcinoides foi observado o predomínio de marcação em todos os casos de Cromogranina A e Sinaptofisina, sendo o ki67 baixo nos casos de carcinoide típico, e elevado nos casos de carcinoide atípico.

Palavras-chave: Câncer de pulmão. Perfil imuno-histoquímico. PCR. EGFR.

ABSTRACT

Lung cancer is a high-mortality neoplasm, being the first in the world in both incidence and mortality. It is the second most common in men and the third in women. It is usually diagnosed at a locally advanced stage and it is leading cause of cancer death worldwide. Immunohistochemistry exam is widely used in the identification of the tumor subtype, in the evaluation of prognostic factors and in the direction of treatment. The identification of PD-L1 immunoexpression has enabled a new treatment premise involving the use of monoclonal antibodies. The use of the PCR technique to search for EGFR changes allows indicating treatment with tyrosine kinase inhibitor. This study aims to evaluate the immunohistochemical profile and alterations of the EGFR gene in a series of 29 patients diagnosed with lung cancer who underwent surgery, to show the importance of these techniques in the assessment of prognostic factors and treatment of lung cancer. The data show a higher prevalence of cases in women (66%), aged around 61 years. Primary lung tumors accounted for the majority of cases (86%). The predominant histological type was adenocarcinoma (38%), followed by squamous cell carcinoma (17%), carcinoid tumors (17%), lung metastasis (14%), and cases of other less frequent tumors (14%). Most of the cases were of a moderately differentiated histological grade (75%). Among adenocarcinomas, the acinar histological subtype was the most frequent (45%) and in the cases of secondary tumors (14%), half were metastases from primary liver tumors. PDL-1 expression and EGFR alteration were evaluated in 16 cases, with PD-L1 expression observed in 12% and EGFR alteration in 25%. Of the total carcinoid tumors analyzed, 80% were typical carcinoids and 20% were atypical carcinoids. Immunohistochemical profile of the cases of adenocarcinoma showed that all of them presented immunoexpression of TTF1 and the absence of staining for p63, whereas in the immunohistochemical profile of the cases of squamous cell carcinoma it showed the opposite. In cases of carcinoid tumors, a predominance of marking was observed in all cases of Chromogranin A and Synaptophysin, with ki67 being low in cases of typical carcinoid, and elevated in cases of atypical carcinoid.

Keywords: Lung cancer. Immunohistochemical. PCR. EGFR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Análise comparativa entre o sexo e a idade ao diagnóstico	22
Gráfico 2 – Análise comparativa entre perfil histológico do tumor e sexo	23
Gráfico 3 – Análise comparativa entre o subtipo histológico de adenocarcinoma e expressão de PD-L1	25
Gráfico 4 – Análise comparativa entre grau histológico de adenocarcinoma e expressão de PD-L1	25
Gráfico 5 – Imunoexpressão de marcadores de acordo com o subtipo histológico	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações gerais e dados epidemiológicos dos pacientes analisados	20
Tabela 2 - Análise comparativa entre o sexo e a idade ao diagnóstico.....	21
Tabela 3 - Análise comparativa entre subtipo histológico e sexo.....	22
Tabela 4 - Análise comparativa de idade entre os subtipos histológicos.....	23
Tabela 5 - Prevalência dos principais subtipos histológicos e grau de diferenciação entre os adenocarcinomas	24
Tabela 6 - Análise de expressão de PD-L1 e alterações EGFR em CNPCs	24
Tabela 7 - Perfil de pacientes com diagnóstico de tumor carcinoide	26
Tabela 8 – Imunoexpressão de marcadores de acordo com o subtipo histológico	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C-erbB	Oncogene receptor celular endógeno
CD56	Molécula de Adesão de Células Neurais
CEC	Carcinoma de células escamosas
CK 5/6	Citoqueratina 5 e 6
CK 7	Citoqueratina 7
34BE12	Citoqueratina 34 Beta E12
CME	Carcinoma Mucoepidermoide
CNPC	Carcinoma Pulmonar de Células Não-Pequeñas
CPPC	Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
P40	Proteína p40
P63	Proteína p63
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD -1	Morte celular programada 1
PD-L1	Ligante de morte celular programada 1
TTF-1	Fator de transcrição tireoidiano 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Câncer de pulmão	13
2.2	Imuno-histoquímica	14
2.3	Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	14
2.4	PDL-1	16
3	OBJETIVO	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Desenho	18
4.2	Detalhamento do exame de Imuno-histoquímica	18
4.3	Detalhamento do exame de imuno-histoquímica para pesquisa de PD-L1	19
4.4	Detalhamento do exame de PCR para pesquisa de alterações do EGFR	19
4.5	Análise de dados	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1	Resultados	20
5.2	Discussão	27
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma neoplasia com alta mortalidade, ocupando a primeira posição em todo o mundo, desde 1985, sendo um importante desafio para a oncologia (BRASIL, 2020; SANTOS; SHEPHERD; TSAO, 2011). É o segundo mais comum em homens e o terceiro em mulheres. É o primeiro do mundo tanto em incidência quanto em mortalidade (BRASIL, 2020). Segundo dados do Sistema de Informação de Mortalidade, houve 27.931 mortes em 2017. No Brasil, estimam-se 30.200 novos casos em 2020 (BRASIL, 2020).

Os carcinomas pulmonares são classificados morfológicamente em carcinoma pulmonar de células não-pequenas (CNPC) e carcinoma pulmonar de células pequenas (CPPC) (CAPELLOZI, 2009). Aproximadamente 80% dos CNPCs são diagnosticados já na presença de doença localmente avançada ou metastática inoperável. Tumores carcinoides, linfomas e sarcomas são outros tipos histológicos de tumores pulmonares menos frequentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). As estratégias de tratamento atual envolvem a cirurgia, radioterapia, a quimioterapia e os agentes direcionados contra alvos específicos (CONFERENCE..., 2018).

A técnica de imuno-histoquímica ganha ampla utilização e fundamental importância no estudo destes tumores, definindo a histogênese e o subtipo tumoral, pesquisa de fatores prognósticos, direcionando tratamento e sobrevida desses pacientes (SANTOS; SHEPHERD; TSAO, 2011; LOPES; VATTIMO; CASTRO, 2015). A identificação da imunoe expressão de PD-L1 tem possibilitado uma nova premissa de tratamento envolvendo o uso de anticorpos monoclonais, com respostas duráveis em alguns pacientes com doença avançada (ILIE *et al.*, 2016).

A melhor compreensão da biologia molecular nas últimas décadas tem possibilitado a identificação de muitas proteínas associadas à carcinogênese dessa neoplasia, levando ao desenvolvimento de novos tratamentos promissores. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de alterações no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) permite indicar o tratamento com inibidores de tirosina quinase, definindo o grupo de pacientes que pode ser tratado com eficácia por esta terapia direcionada específica (SANTOS; SHEPHERD; TSAO, 2011; SZUTOWICZ; DZIADZIUSZKO, 2010).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é um crescimento celular anormal, incontrolável, que pode invadir os tecidos vizinhos e a distância (UEHARA; JAMNIK; SANTORO, 1998). Geralmente começa nas células que revestem os brônquios e partes do pulmão, como bronquíolos e alvéolos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). É representado em quase 95% dos casos por carcinomas e cerca de 5% são representados por sarcomas e linfomas (CAPELLOZI, 2009).

O CPPC (carcinoma pulmonar de células pequenas) representa 15% dos casos e esse tipo de câncer tende a crescer e se espalhar mais rapidamente que o CNPCs (carcinoma pulmonar de células não pequenas). Tumores carcinoides, linfomas e sarcomas são outros tipos histológicos de tumores pulmonares menos frequentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Cerca de 80% dos cânceres de pulmão são CNPCs e seus principais subtipos são adenocarcinoma, o mais prevalente, seguido de carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). O tabagismo é a principal causa do câncer de pulmão. O fumo representa 85% da origem dos casos e os fumantes possuem cerca de 20 vezes mais risco de desenvolver a doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2019). Outros fatores de risco são a poluição ambiental, as infecções pulmonares, os fatores genéticos e hereditários e a exposição ocupacional a agentes químicos ou físicos (BRASIL, 2020; VIEGAS; CASULARI, 2015).

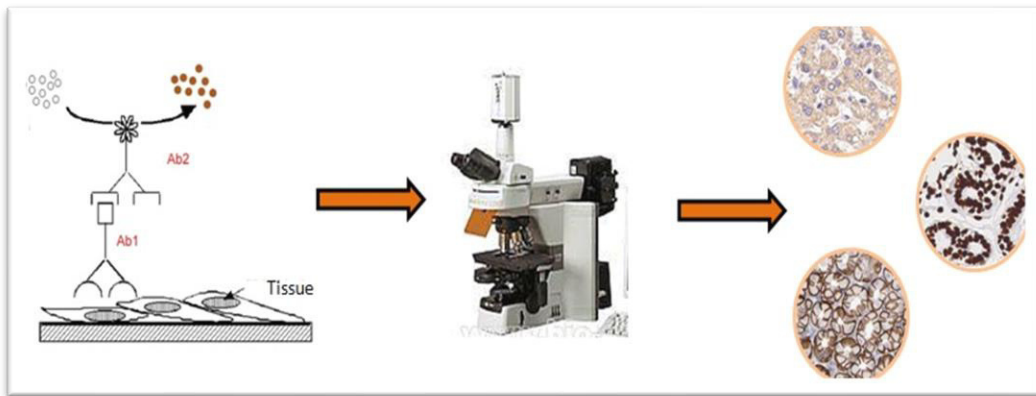
O surgimento dos inibidores de tirosina quinase foi revolucionário no tratamento do câncer de pulmão. Essas drogas apresentam como possível alvo o oncogene receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). O EGFR desempenha um papel importante na regulação das funções celulares e quando esse gene é superexpresso ou mutado nas células cancerígenas, influencia no tratamento, no prognóstico e na sobrevida (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Mais recentemente, o desenvolvimento de fármacos bloqueadores do ligante de morte celular programada 1 (PD-L1) também resultou em grandes avanços no tratamento do câncer de pulmão (CONFERENCE..., 2018; RITTMAYER *et al.*, 2017). O PD-L1 é o principal ligante da molécula de morte celular programada 1 (PD-1) e sua expressão na superfície de células tumorais regula e inibe a resposta imunológica no microambiente da neoplasia, sendo um mecanismo de escape tumoral do sistema imune (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

2.2 Imuno-histoquímica

Nesta técnica, parte da amostra de biópsia é tratada com anticorpos projetados para se unirem a antígenos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). É uma técnica de análise de fragmentos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) via microscópico (SCHACHT; KERN, 2015) A visualização do complexo antígeno-anticorpo é feita microscopicamente e os métodos mais utilizados são: a adição de um fluorocromo conjugado ao anticorpo ou a uma enzima onde o produto da reação enzimática pode ser visualizado (CAPELLOZI, 2009). (Figura 1).

O exame de imuno-histoquímica é fundamental para definir tipo histológico do tumor, avaliar a possibilidade de metástase, pesquisar a imunexpressão de PD-L1 e outros fatores prognósticos (CAPELLOZI, 2009). É imprescindível para prever o grau de resposta ao tratamento adjuvante e neoadjuvante, o grau de risco de metástases e a recidiva (SZUTOWICZ; DZIADZIUSZKO, 2010; LOPES; VATTIMO; CASTRO, 2015).

Figura 1 - Ilustração da técnica de imuno-histoquímica



Fonte: Sino Biological (2020).

O estudo imuno-histoquímico é de fundamental importância em câncer de pulmão, sendo primordial para a identificação dos diferentes tipos histológicos e dos fatores prognósticos e para a identificação de marcadores biológicos, contribuindo para o direcionamento do tratamento do paciente (CAPELOZZI, 2009).

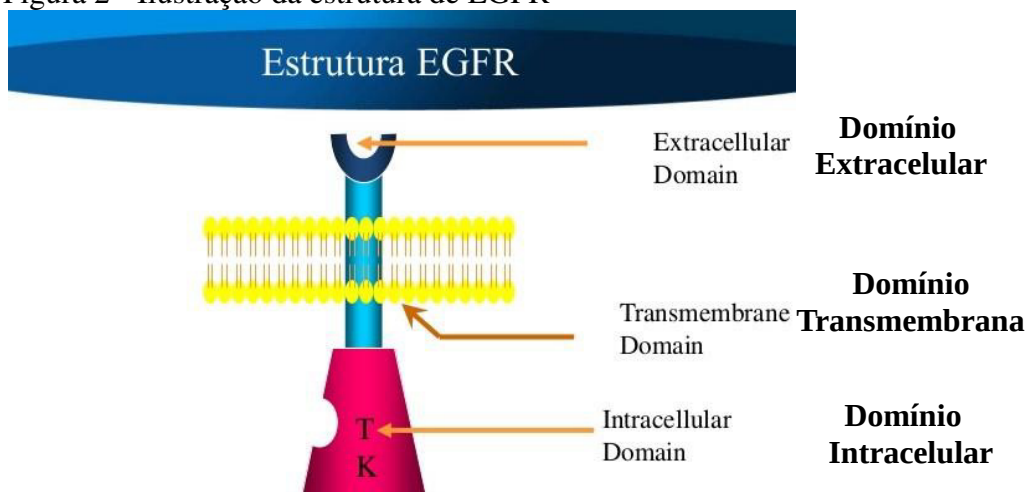
2.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O EGFR é uma proteína transmembranar que pertence à família c-erbB de

receptores de tirosina-quinase (HERBST, 2004). A estrutura do EGFR compreende três domínios: extracelular, transmembrana e o domínio intracelular com atividade de tirosina quina (MENDELSON; BASELGA, 2000). O EGFR desempenha um papel importante na regulação das funções celulares e quando esse gene é superexpresso ou mutado nas células cancerígenas, influencia no comportamento da neoplasia e os tumores crescem mais rapidamente, sendo mais agressivos. Portanto identificar alterações no EGFR pode influenciar o tratamento, o prognóstico e a sobrevivência dos pacientes portadores de câncer de pulmão (SZUTOWICZ; DZIADZIUSZKO, 2010). O EGFR é ainda altamente expresso nos CNPCs e realiza importantes funções na regulação, na proliferação, na sobrevivência e na diferenciação das células tumorais (LOPES; VATTIMO; CASTRO, 2015).

O tratamento adequado e direcionado será escolhido de acordo com as alterações genéticas identificadas nos tumores (SANTOS; SHEPHERD; TSAO, 2011). A técnica de PCR é utilizada pra detectar mutações de interesse, utilizando a atividade da enzima DNA polimerase, e se baseia na amplificação de sequências de DNA específico, utilizando primers (LOPES, 2015). As mutações ocorrem nos éxons 18 a 21 do EGFR. Cerca de 85% dessas mutações consistem em deleções no éxon 19 e em mutação pontual L858R no éxon 21. Os tumores com essas mutações são altamente sensíveis a drogas inibidoras da tirosina quinase. As mutações definem o grupo que pode ser tratado com eficácia por terapia direcionada específica (LOPES; VATTIMO; CASTRO, 2015; ZHU; SHIH; LING, 2006) (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração da estrutura de EGFR



Fonte: Adaptado de centro de pós-graduação JK (2015).

2.4 PDL-1

As células tumorais são reconhecidas pelo sistema imunológico, levando a uma resposta imune que causa a morte celular do câncer. Existe um mecanismo conhecido como evasão da resposta imune, onde o tumor expressa a molécula PD-L1, e assim as células tumorais bloqueiam as respostas imunes antitumorais, não sendo detectadas (LIMA, 2019). A proteína de morte programada (PD1), que é uma proteína de checkpoint em células do sistema imunológico, as células T, quando se liga ao seu ligante, a molécula PD-L1, limita as funções das células do sistema imune. O PD-L1 é expresso em grandes quantidades em alguns tumores (PARDOLL, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Drogas que tem o alvo PD-1 ou PD-L1 tem se mostrado muito promissoras no tratamento, pois bloqueiam essa ligação e aumentam a respostas imune contra as células cancerígenas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o diagnóstico, o perfil imuno-histoquímico e a técnica de PCR para pesquisa de alterações do EGFR em uma série de 29 amostras de tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de neoplasia pulmonar que tiveram suas amostras analisadas no serviço de biópsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar aspectos epidemiológicos: sexo e idade do paciente ao diagnóstico;
- b) Correlacionar os tipos e subtipos de carcinomas pulmonares com a expressão de marcadores imuno-histoquímicos, confirmar os casos de metástase pulmonar e o sítio primário das neoplasias;
- c) Correlacionar os tipos e subtipos de carcinomas pulmonares com alterações do EGFR;
- d) Correlacionar os subtipos de carcinomas pulmonares e grau de diferenciação com expressão PD-L1;
- e) Correlacionar os subtipos de carcinomas pulmonares e grau de diferenciação com mutações EGFR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho

Estudo transversal retrospectivo de uma série de 29 amostras de tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de neoplasia pulmonar que tiveram suas amostras analisadas no serviço de biópsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, entre agosto de 2016 e março de 2020.

As amostras dos casos selecionados foram revisadas, sendo realizadas releitura e análise de lâminas previamente confeccionadas por médico patologista com ampla experiência na área, a fim de avaliar e confirmar parâmetros patológicos: diagnóstico histopatológico e tipos morfológicos; perfil de expressão dos marcadores imuno-histoquímicos; além da revisão dos exames de PCR para pesquisa de alterações do EGFR.

Os aspectos clínicos foram obtidos das informações descritas em formulário padrão de solicitação de estudo anátomo-patológico enviadas ao setor de biópsia. Os parâmetros analisados foram apenas sexo e idade.

4.2 Detalhamento do exame de imuno-histoquímica

O perfil imuno-histoquímico foi avaliado após revisão e releitura de lâminas com marcações específicas que foram realizadas nas amostras tumorais. Os referidos cortes foram submetidos aos métodos de imunocoloração, utilizando anticorpos específicos para diferenciação entre subtipos de neoplasias pulmonares, a depender da hipótese clínico-radiológica. Os principais marcadores imuno-histoquímicos utilizados foram: 1- CK5/6, anticorpo que tem como alvo citoqueratinas 5 e 6, sendo importante marcador de Carcinoma de células escamosas, além de permitir distinguir mesoteliomas de carcinomas pulmonares; 2- CK7, anticorpo que tem como alvo citoqueratina 7, expressada frequentemente em adenocarcinomas de origem pulmonar; 3-34BE12, anticorpo que tem como alvo as citoqueratinas de alto peso molecular, sendo importante marcador de Carcinoma de células escamosas; 3- Cromogranina A, anticorpo que tem como alvo células com diferenciação neuroendócrina; 4- Sinaptofisina, anticorpo que tem como alvo células com diferenciação neuroendócrina; 5- Ki67, anticorpo que expressa o grau de proliferação celular; 6- TTF-1, anticorpo que tem como alvo células neoplásicas de origem pulmonar; 7- p63, anticorpo de marcação nuclear, sendo também importante marcador de Carcinoma de células escamosas.

Foram realizadas análises de forma descritiva, qualitativa, e os resultados apresentados em forma de gráficos e tabelas.

4.3 Detalhamento do exame de Imuno-histoquímica para pesquisa de PD-L1

A imunexpressão de PD-L1, um biomarcador tumoral, foi avaliada após revisão e releitura de lâminas que foram realizadas nas amostras tumorais. A expressão de PD-L1 nas células tumorais pode condicionar a atividade das células T pela ligação ao PD-1 no microambiente tumoral.

A reação imuno-histoquímica da proteína PD-L1 foi realizada utilizando-se clone Dako 22C3 (DAKO Autostainer, AS480), seguindo o protocolo PD-L1 DAKO. O contraste feito com hematoxilina e controles negativos também foram avaliados.

Para interpretação dos resultados, foi avaliada apenas a expressão de PD-L1 em células neoplásicas. A marcação membranar de qualquer intensidade de PD-L1 foi definida como sendo positiva, a ausência de marcação como negativa.

4.4 Detalhamento do exame de PCR para Pesquisa de alterações do EGFR

A pesquisa de alterações do EGFR foi avaliada após revisão de laudos de exame de PCR. O exame foi realizado após seleção de material representativo de amostras dos tumores pulmonares, selecionando-se blocos com células neoplásicas fixados em formalina e incluídos em parafina que foram submetidos à desparafinização, à digestão e ao isolamento de DNA pelo DNA Simple Preparation Kit (Roche: 05985536190, Registro ANVISA: 10287410963), com pelo menos 10% de tumor viável.

Foi feita revisão dos laudos do exame de PCR para pesquisa do EGFR. Foram realizadas análises de forma descritiva, qualitativa, e os resultados apresentados em forma de tabelas e gráficos.

4.5 Análise dos dados

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, no qual as análises foram realizadas com intervalo de confiança de 95%. A frequência absoluta e o percentual de cada variável foram expressos, sendo cruzados por meio dos testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Um valor - P de $\leq 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

Foram analisados um total de 29 casos. Destes, 19 (66%) eram do sexo feminino e 10 (34%) do sexo masculino. Os tumores primários de pulmão representaram 25 casos (86%) e os tumores secundários 4 casos (14%), sendo 2 casos de metástase de tumor primário do fígado, 1 da mama e 1 colorretal. O tipo histológico predominante, entre os tumores primários do pulmão, foi adenocarcinoma, no total de 11 casos (38%), em seguida os casos de carcinoma de células escamosas (CEC) e tumor carcinoide, ambos com 5 casos cada (17%), sendo 4 casos de metástase (14%). Houve ainda 4 casos (14%) de outros tumores menos frequentes, que foram carcinoma mucoepidermoide (CME) de baixo grau endobrônquico, hamartoma pleuropulmonar, hiperplasia adenomatosa atípica e linfoma de zona marginal extranodal. Todos os casos de metástase de tumor primário do fígado foram pós-transplante hepático (Tabela 1).

A maioria dos CNPCs eram de grau histológico moderadamente diferenciados, 12 casos (75%), sendo 4 casos de grau pouco diferenciado (25%). A expressão de PDL-1 foi estudada em 16 casos de CNPCs, sendo destes apenas 02 positivos (12%) e 14 negativos (88%). As alterações de EGFR foram estudadas também nos mesmos 16 casos, sendo 04 mutados (25%) e 12 não-mutados (75%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações gerais e dados epidemiológicos dos pacientes analisados

Sexo	N	%
Masculino	10	34,4
Feminino	19	65,6
Idade		
<65 anos	14	48,3
>65 anos	15	51,7
Sítio tumoral		
Tumor primário	25	86,2
Tumor secundário	4	13,8
<i>Fígado*</i>	2	50,0
<i>Mama</i>	1	25,0
<i>Colorretal</i>	1	25,0
Perfil histológico		
Adenocarcinoma	11	37,9
Escamocelular	5	17,2
Carcinoide	5	17,2
Metástase	4	13,8
Outros tumores	4	13,8
Carcinoma mucoepidermoide	1	

Hamartoma pleuropulmonar	1	
Hiperplasia adenomatosa atípica	1	
Linfoma de zona marginal extranodal	1	
Grau de diferenciação (CNPCs)		
Bem diferenciado	0	0
Moderadamente diferenciado	12	75,0
Pouco diferenciado	4	25,0
Expressão de PD-L1 (CNPCs)		
Positivo	2	12,0
Negativo	14	88,0
Expressão de EGFR (CNPCs)		
Mutado	4	25,0
Não-mutado	12	75,5

*Todos os casos de metástase de hepatocarcinoma foram pós transplante
 Fonte: Elaborada pela autora.

A idade média do total de pacientes analisados foi de $61,5 \pm 15,2$ anos (30-85 anos), com mediana de 66 anos, sendo que 14 (48%) tinham menos de 65 anos e 15 (52%) mais de 65 anos. Na análise comparativa de idade ao diagnóstico e ao sexo, os homens tiveram idade média de $64,7 \pm 13,2$ anos (45-85 anos) com mediana de 67 anos; as mulheres tiveram idade média de $59,8 \pm 16,2$ anos (30-82 anos) com mediana de 64 anos (Tabela 2/Gráfico 1).

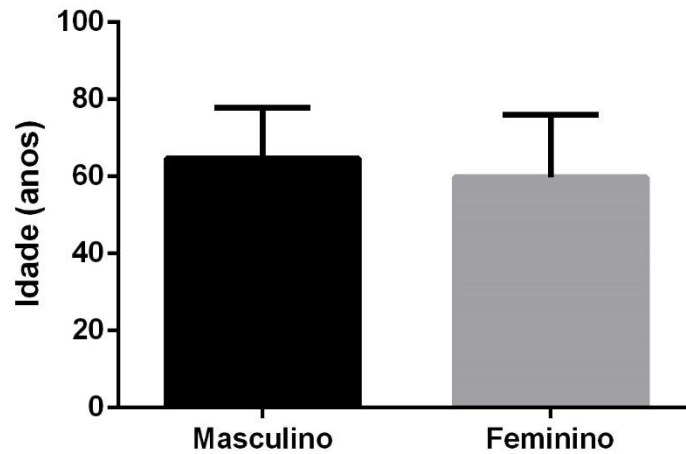
Tabela 2 – Análise comparativa entre a idade ao diagnóstico e sexo

	Total (n=29)	Feminino (n=19)	Masculino (n=10)	p- valor
Média ± Desvio Padrão (anos)	61,5 ± 15,2	59,8 ± 16,2	64,7 ± 13,2	
Mediana (anos)	66	64	67	0,4168
Mínimo (anos)	30	30	45	
Máximo (anos)	85	82	85	

ANOVA Summary

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 1 – Análise comparativa entre a idade ao diagnóstico e sexo



Fonte: Elaborado pela autora.

A análise comparativa entre o subtipo histológico e o sexo mostrou que, no sexo feminino, 07 casos foram de adenocarcinoma (36%), 04 casos foram carcinoma de células escamosas (21%), 04 casos de tumores carcinoide (21%) e 02 casos de metástase de outros sítios (11%), além de outros tumores de menor frequência. Nos pacientes do sexo masculino, 04 casos foram de adenocarcinoma (40%), 01 caso de carcinoma de células escamosas (10%), 01 caso de tumor carcinoide (10%), 02 casos de metástase de outros sítios (20%), além dos demais tumores de menor frequência (Tabela 3/Gráfico 2).

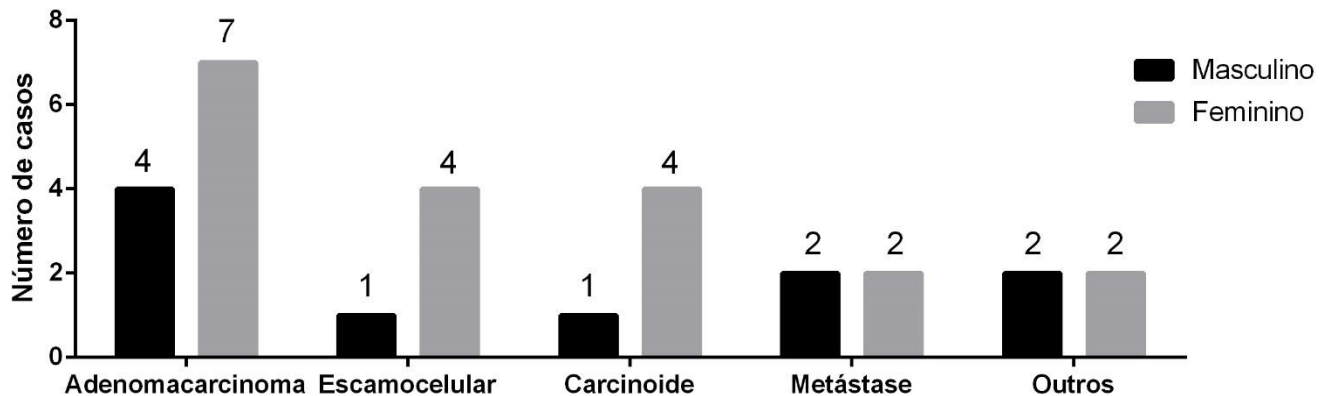
Tabela 3 – Análise comparativa entre subtipo histológico e sexo

	Total		Feminino		Masculino		p-valor
	N	%	N	%	N	%	
Adenocarcinoma	11	38	7	36	4	40	0,7728
Carcinoma de células escamosas	5	17	4	21	1	10	
Carcinoide	5	17	4	21	1	10	
Adenocarcinoma secundário	4	14	2	11	2	20	
Outros tumores	4	14	2	11	2	20	

ANOVA Summary

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 2 – Análise comparativa entre perfil histológico do tumor e sexo



Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise comparativa entre idade e tipos de carcinoma pulmonar, os casos de adenocarcinoma tiveram idade média de $58,9 \pm 17,4$ (30-85 anos) e mediana de 66 anos; os casos de CEC tiveram idade média de $71,2 \pm 6,8$ (62-80 anos) e mediana de 71 anos; os casos de tumor carcinoide tiveram idade média de $65,4 \pm 11,3$ (50-82 anos) e mediana de 65 anos. Nos casos de metástase pulmonar, a idade média foi $69,8 \pm 9,0$ (59-81 anos) com mediana de 69,5 anos. Nos demais tipos de tumores pulmonares menos frequentes a idade média foi $43,3 \pm 8,7$ (33-53 anos) e a mediana de 43,5 anos (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise comparativa de idade entre os subtipos histológicos

	Total (n=29)	Adenocarcinoma (n=11)	CEC (n=5)	Carcinoide (n=5)	Metástase (n=4)	Outros (n=4)	p-valor
Média ±	61,5 ±	58,9 ±	71,2	65,4	± 69,8	± 43,3	0,0316*
DP(anos)	15,2	17,4	± 6,8	11,3	9,0	8,7*	
Mediana (anos)	66	66	71	65	69,5	43,5	
Mínimo (anos)	30	30	62	50	59	33	
Máximo (anos)	85	85	80	82	81	53	

ANOVA Summary

CEC: Carcinoma de células escamosas; DP: desvio padrão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entre os adenocarcinomas, o grau de diferenciação mostrou que 7 eram moderadamente diferenciados, 3 eram bem diferenciados, e apenas 01 pouco diferenciado.

Quanto ao subtipo histológico, 3 eram lepidicos, 5 eram acinares, 1 era papilífero e 2 eram sólidos (Tabelas 05).

Tabela 5 – Prevalência dos principais subtipos histológicos e grau de diferenciação entre os adenocarcinomas

Subtipo histológico	N	%
<i>Acinar</i>	5	45,4
<i>Lepídico</i>	3	27,3
<i>Sólido</i>	2	18,2
<i>Papilífero</i>	1	9,1
Grau de diferenciação	N	%
<i>Bem diferenciado</i>	3	27,3
<i>Moderadamente diferenciado</i>	7	63,6
<i>Pouco diferenciado</i>	1	9,1

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da expressão de PD-L1 e alterações EGFR nos CNPCs mostrou que 02 casos de adenocarcinoma expressaram PD-L1 (18%). Todos os casos de CEC testados foram negativos. As alterações de EGFR foram positivas em 04 casos de adenocarcinoma (36%). Todos os casos que apresentaram expressão de PDL-1 ou alterações EGFR foram de adenocarcinoma de grau histológico moderadamente diferenciado (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise da expressão de PD-L1 e alterações EGFR em CNNPs

	Adenocarcinomas		CEC		p-valor
	N	%	N	%	
Expressão PD-L1					
<i>Positivo</i>	2	18	0	0	1,000
<i>Negativo</i>	9	82	5	100	
Alterações EGFR					
<i>Mutado</i>	4	36	0	0	0,2445
<i>Não mutado</i>	7	64	5	100	

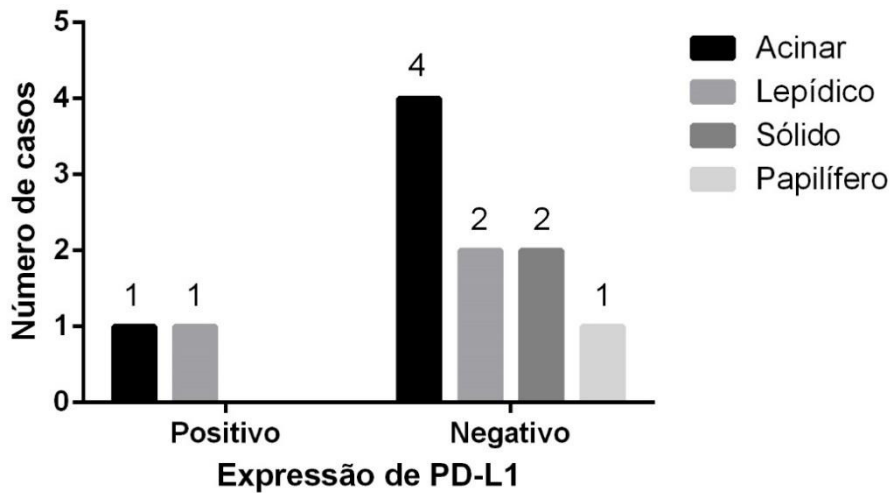
ANOVA Summary

Fonte: Elaborada pela autora.

Na análise comparativa da expressão de PD-L1 e tipos histológicos de adenocarcinomas, foi observado que 01 caso era tipo acinar (50%) e 01 caso tipo lepidico (50%). Todos os adenocarcinomas que apresentaram alterações EGFR eram do tipo acinar. A

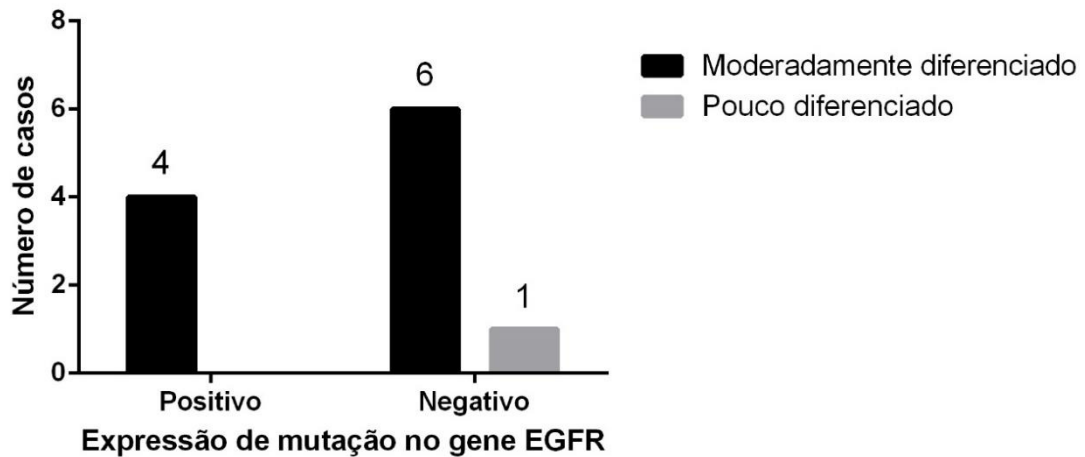
mutação EGFR encontrada em todos os pacientes foi posição C01:C03, mutação L858R no éxon 21 (Gráfico 3/ Gráfico 4).

Gráfico 3 – Análise comparativa entre subtipo histológico de adenocarcinoma e expressão de PD-L1



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 4 – Análise comparativa entre grau histológico de adenocarcinoma e expressão de EGFR



Fonte: Elaborado pela autora.

Do total de tumores carcinoides analisados, 04 casos (80%) foram carcinoides típicos e 01 caso (20%) foi de carcinoide atípico. Todos os casos de carcinoide típicos ocorreram em pacientes do sexo feminino, que apresentaram idade média de $65,5 \pm 13,1$ anos (50-82 anos) e mediana de 65 anos. O único caso analisado de carcinoide atípico foi em um paciente do sexo masculino de 65 anos de idade (Tabela 7).

Tabela 7 – Perfil de pacientes com diagnóstico de tumor carcinoide

Paciente	Sexo	Idade (anos)
Carcinoide típico		
<i>Paciente 01</i>	Feminino	50
<i>Paciente 02</i>	Feminino	66
<i>Paciente 03</i>	Feminino	64
<i>Paciente 04</i>	Feminino	82
Carcinoide atípico		
<i>Paciente 05</i>	Masculino	65

Fonte: Elaborada pela autora.

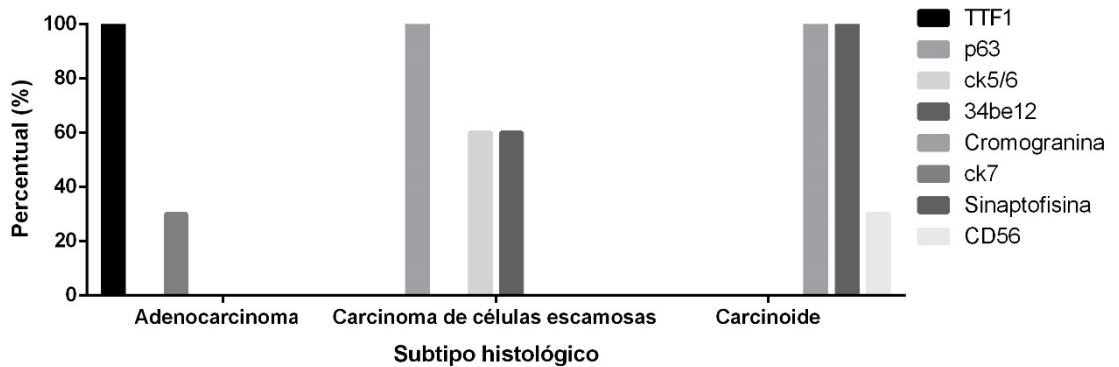
O perfil imuno-histoquímico dos casos de adenocarcinoma mostrou que todos apresentaram imunopositividade de TTF1 e ausência de marcação para p63, dentre outros marcadores realizados. O perfil imuno-histoquímico dos casos de carcinoma de células escamosas mostrou o contrário. Todos os casos apresentaram negatividade para o marcador TTF-1 e imunopositividade para p63. Nestes casos também houve imunopositividade marcante de ck5/6 e 34BE12 em elevado percentual dos casos. No painel de imuno-histoquímica dos casos de tumores carcinoides foi observado predomínio de marcação em todos os casos de Cromogranina A e Sinaptofisina, sendo o ki67 baixo nos casos de carcinoide típico, cerca de 2 a 3%, e elevados nos casos de carcinoide atípico com positividade de até 40% (Tabela 8/ Gráfico 5).

Tabela 8 – Imunopositividade de marcadores de acordo com o subtipo histológico

	TTF-1	P63	CK7	CK 5/6	34BE12	Cromogranina	Sinaptofisina	CD56
ADENOCARCINOMAS	100 %	0 %	30 %	--	--	--	--	-
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS	0 %	100 %	--	60 %	60 %	--	--	-
CARCINOIDES	--	--	--	--	--	100%	100%	30%

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 5 – Imunoexpressão de marcadores de acordo com o subtipo histológico



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Discussão

O câncer de pulmão é mais prevalente no sexo masculino, na idade de 60 anos ou mais, porém vem sendo observada uma tendência crescente na mortalidade entre as mulheres nas últimas décadas, pois observa-se o aumento do tabagismo entre as mulheres (SILVA *et al.*, 2008). Neste atual estudo, evidenciou-se uma maior prevalência no sexo feminino, respondendo por 66% do total de casos analisados. A idade média encontrada foi de 61 anos com mediana de 66 anos. Este estudo revelou ainda que a idade média em homens foi levemente superior que a idade em mulheres, 64 anos em comparação com 59 anos, respectivamente, estando de acordo com a epidemiologia desta doença (UEHARA; JAMNIK; SANTORO, 1998).

A maioria dos casos deste estudo mostrou tratar-se de tumores primários, 25 casos (86%), contra apenas 04 casos (14%) de tumores secundários, sendo 02 casos de metástase de hepatocarcinomas, 01 de carcinoma mamário e 01 de adenocarcinoma colorretal.

A metástase pulmonar pode ocorrer em portadores de neoplasias extratorácicas e a incidência varia de 20% a 54% nos pacientes acometidos por câncer. Os sítios primários que mais dão metástase para o pulmão são mama, cólon, rim, útero e carcinomas da região cabeça e pescoço (HIRAKATA; NAKATA; NAKAGAWA, 1995).

Um dado interessante deste estudo é que todos os casos de metástase de hepatocarcinoma foram pós-transplante hepático; dado que está de acordo com estudos prévios que mostram que até 56% dos pacientes pós-transplante de fígado podem apresentar lesões secundárias pulmonares, onde o retorno venoso que flui pro pulmão através do sistema vascular, geralmente acomete o pulmão com as metástases extratorácicas (SCHLITT *et al.*, 1999).

O tipo histológico predominante, entre os tumores primários do pulmão é adenocarcinoma, seguido pelos CEC (ISMAEL *et al.*, 2010). Este trabalho mostrou um

percentual de 38% de adenocarcinomas e 17% de CEC. O tipo mais comum de adenocarcinoma é o acinar, seguido dos tipos sólido, micropapilar, papilar e lepidico (COLLISSON *et al.*, 2014). Observou-se neste estudo que dos 11 casos de adenocarcinoma, 05 foram tipo acinar, 03 tipo lepidico, 02 tipo sólido e 01 tipo papilífero.

Alguns estudos mostram que o adenocarcinoma seria mais prevalente em mulheres, já em homens, o carcinoma de células escamosas seria o mais comum (EL-TORKY; EL-ZEKY; HALL, 1990; CHEN *et al.*, 2006; TSUKAZAN *et al.*, 2017). Este atual estudo mostrou que no sexo feminino houve 07 casos de adenocarcinomas, contra 04 casos do sexo masculino.

A idade média de apresentação dos tipos de carcinomas pulmonares também é distinta segundo alguns estudos, sendo os adenocarcinomas mais comuns em idade média superior a 55 anos, o carcinoma de células escamosas com idade média superior a 60 anos e os carcinoide com idade média entre 55 e 60 anos (COLAÇO *et al.*, 1992; SOUZA; VASCONCELOS; CRUZ, 2012; SAGERUP *et al.*, 2012; TSUKAZAN *et al.*, 2017; HOBBS *et al.*, 2016). Este trabalho revelou que a idade média encontrada foi de 58 anos para adenocarcinomas, 71 anos para CEC e 65 anos para carcinoide.

A expressão de PDL-1 é mais comumente observada nos adenocarcinomas moderadamente e pouco diferenciados, com estudos revelando ainda maior percentual de expressão em tipo sólido, em sexo masculino e na faixa etária entre 50 e 70 anos (OLIVEIRA, 2018; LIMA, 2019; ALEXANDRE, 2018). Este trabalho mostrou que do total de casos analisados de adenocarcinoma, apenas 02 foram positivos e 09 foram negativos. Já em CECs este estudo não revelou imunexpressão de PD-L1.

As alterações de EGFR são mais comumente observadas nos adenocarcinomas do tipo acinar com maior percentual no sexo feminino e na idade inferior ou igual a 70 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Este estudo mostrou que 04 casos (36%) apresentavam alterações EGFR, sendo todos adenocarcinomas acinares, sendo 3 no sexo feminino e 4 no sexo masculino.

Estudos revelam ainda que a expressão de PDL-1 pode estar relacionada ou não a alterações de EGFR, sendo esta associação mais observada no adenocarcinoma tipo acinar, principalmente em pacientes mais velhos com idade superior a 70 anos e do sexo masculino (TAKADA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2017; D'INCECCO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Este estudo não mostrou relação entre os casos que apresentaram imunexpressão de PD-L1 e alterações EGFR.

O local mais comum de ocorrência de alterações no EGFR é uma deleção no éxon 19 e a mutação L858R no éxon 21 (MELO *et al.*, 2015; INOUE *et al.*, 2016). Neste estudo

todos os pacientes apresentavam mutações na posição C01:C03, mutação L858R no éxon 21.

A literatura mostra que os tumores carcinoides mais prevalentes são típicos no sexo feminino e com idade média entre 55 e 60 anos (MCCAUGHAN; MARTINI; BAINS, 1985). Este atual trabalho revelou que 80% dos casos foram típicos e 20% atípicos, sendo mais comuns em mulheres com idade média de 65 anos.

A recomendação padrão para análises de tumores é que se façam os marcadores essenciais a fim de não haver desgaste do material coletado na biópsia, sendo recomendada pesquisa inicial com TTF1 e p63 ou p40, a fim de elucidação diagnóstica e, somente após isso, poder-se-á realizar extensão do painel, caso seja necessário (CAPELOZZI, 2009). Em adenocarcinomas, a grande maioria é positiva para TTF1 e negativa para p63 (KARGI; GUREL; TUNA, 2006). Os CECs são em grande maioria negativos para TTF1 e positivos para p63 (KARGI; GUREL; TUNA, 2007). Já os tumores carcinoides costumam expressar cromogranina, sinaptofisina, CD56 e demais marcadores neuroendócrinos, além de costumarem apresentar índice de proliferação celular pelo ki67 $\leq 5\%$ (GROSS *et al.*, 2019; CAPELOZZI, 2009).

Neste estudo revelou-se expressão para TTF-1 e ausência de marcação para p63 em todos os casos de adenocarcinomas. Os casos de CECs mostraram o oposto, onde todos os casos apresentaram negatividade para o marcador TTF-1 e para a expressão para p63. Os casos de carcinoides revelaram marcação dos reagentes neuroendócrinos: cromogranina e sinaptofisina, sendo o ki67 baixo em carcinoides típicos, cerca de 2 a 3%, e elevado no caso do paciente com tumor carcinóide atípico, com positividade de até 40%.

Outros tumores encontrados neste estudo foram carcinoma mucoepidermoide (CME) de baixo grau endobrônquico, hamartoma pleuropulmonar, hiperplasia adenomatosa atípica e linfoma de zona marginal extranodal. A literatura médica mundial mostra que os hamartomas são tumores benignos raros e mais comuns em adultos. O CME é um carcinoma tipo glândula salivar símile que corresponde de 0,3% a 1% de todas as neoplasias malignas e tende a apresentar crescimento lento. Linfomas de zona marginal extranodal são os linfomas mais comuns entre os tipos de linfomas primários pulmonares, tendo progressão lenta e sendo curável em estágios iniciais (WANG *et al.*, 2019; SAADI *et al.*, 2015; A. C. CAMARGO CANCER CENTER, 2019; BRASIL, 2020).

Em suma, este projeto abre perspectiva de novos estudos e extensão investigativa.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou a relevância do estudo imuno-histoquímico e da realização de PCR para pesquisa de alterações EGFR na avaliação de fatores prognósticos, identificação dos diferentes tipos histológicos, definição de casos primários e determinação de sítios primários dos tumores secundários, a fim de contribuir no direcionamento do tratamento dessa doença e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

A pesquisa de alterações de EGFR pela técnica de PCR se mostra primordial, pois com o tratamento adequado há um impacto no prognóstico dos pacientes. Os resultados coletados corroboram, em sua maioria, com dados já descritos na literatura.

A maior prevalência de casos em mulheres contrasta com o que a literatura mostra, mas estudos já mostram que há uma tendência crescente de casos de câncer de pulmão entre as mulheres. Os traços são semelhantes a perfil já conhecido de pacientes com câncer de pulmão, como a positividade de TTF-1 e negatividade pra p63, e o adenocarcinoma sendo o tipo histológico predominante. Os casos de metástase de hepatocarcinoma pós-transplante concorda com pesquisas prévias que mostram a prevalência de lesões secundárias pulmonares nesses pacientes transplantados.

Os parâmetros analisados foram apenas idade e sexo, abrindo caminhos futuros para novos estudos com mais variáveis relevantes.

REFERÊNCIAS

- A. C. CAMARGO CANCER CENTER. **Linfoma não Hodgkin**. 2019. Disponível em: <https://www.accamargo.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/linfoma-nao-hodgkin>. Acesso em: 15 set. 2020.
- ALEXANDRE, I. A. **Estudo da expressão imuno-histoquímica do PD-L1 em carcinoma de pulmão não-pequenas células: correlação com dados clínicos patológicos**. 2018. 62 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Medicina) - Universidade Federal da Fronteira do Sul, Passo Fundo, 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Lung Cancer?** 2019. Disponível em <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html#references>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Immune Checkpoint Inhibitors and Their Side Effects**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/immune-checkpoint-inhibitors.html>. Acesso em: 27 out. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Tipos de câncer**. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/linfoma-de-hodgkin>. Acesso em: 15 set. 2020.
- BRODY, R. *et al.* Expressão de PD-L1 em NSCLC avançado: insights sobre estratificação de risco e seleção de tratamento a partir de uma revisão sistemática da literatura. **Lung cancer**, Amsterdam, v. 112, p. 200-215, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29191596/>. Acesso em: 8 ago. 2020.
- CAPELLOZI, V. L. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. **Jorn. Brasil. Pneum**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 375-382, abril. 2009.
- CHEN, L. C. *et al.* Pulmonary Neuroendocrine Tumors: what (little) do we know? **Journ. Nat. Comp. Cancer Network**, New York, v. 4, n. 6, p. 623-28, jul. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16813729/>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- COLAÇO, M. I. *et al.* Carcinoma do pulmão. Revisão da Casuística de 12 Anos num Serviço de Medicina Interna. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 5, n. 7, p. 365-368. jul. 1992. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/3267/2606>. Acesso em: 16 ago. 2020.
- COLLISSON, E. *et al.* Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**, [s.l.], v. 511, p. 543-550, jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature13385>. Acesso em: 12 set. 2020.
- CONFERENCE ON THE LATEST ADVANCES IN LUNG CANCER RESEARCH: FROM BASIC SCIENCE TO THERAPEUTICS. 14-18, 2018, Chicago. Can you Hear Music. **Proceedings of the AACR Annual Meeting 2018**. Philadelphia, AACR: 2018.

D'INCECCO, A. *et al.* PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. **British Journal of Cancer**, Itália, v. 112, p. 95-102, out. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25349974/>. Acesso em: 18 ago. 2020.

EL-TORKY, M.; EL-ZEKY, F.; HALL, J. C. Significant changes in the distribution of histologic types of lung cancer a review of 4928 cases. **Acs Jornaals**, Tennessee, v. 65, n. 10, p. 2361-2367, maio. 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900515\)65:10<2361::AID-CNCR2820651034>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900515)65:10<2361::AID-CNCR2820651034>3.0.CO;2-C). Acesso em: 12 jul. 2020.

GARON, E. B. *et al.* Pembrolizumabe para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas. **The New England Journal of Medicine**, n. 372, p. 2018-2028, maio. 2015. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1501824>. Acesso em: 10 ago. 2020.

GROSS, J. L. *et al.* Bronchial carcinoid tumors: second primary neoplasms and outcomes of surgical treatment. **Jorn. Brasil. de Pneum.**, [s.l.], v. 45, n. 5, p. 1-6. jan. 2019.

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, Houston. v. 59, n. 2, p. 21-26, nov. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15142631/>. Acesso em: 12 out. 2020.

HIRAKATA, K.; NAKATA, H.; NAKAGAWA, T. CT of pulmonary metastases with pathological correlation. **Semin Ultrasound CT MR**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 379-94, out. 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8527171/>. Acesso em: 22 ago. 2020.

HOBBS *et al.* Patient characteristics, treatment and survival in pulmonary carcinoid tumours: an analysis from the UK National Lung Cancer Audit. **BMJ Open**, Reino Unido, v. 7, n. 1, p. 1-4. set. 2016. Disponível em: <https://bmjopen.bmj.com/content/6/9/e012530>. Acesso em: 10 set. 2020.

ILIE, M.; HOFMAN, V.; DIETEL M, *et al.* Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. **Virchows Arch**, v. 468, n. 5, p. 511-525. maio. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26915032/>. Acesso em: 17 ago. 2020.

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. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Japão, v. 46, n. 5, p. 462-467, mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26977054/>. Acesso em: 19 out. 2020.

ISMAEL, G. F. V. *et al.* Aspectos clínicos e histopatológicos em câncer de pulmão: análise dos dados de uma instituição no interior paulista entre 1997 e 2008. **Rev. Brasil. Oncologia Clínica**, [s.l.], v. 7, n. 22, p. 72-78, out./nov./dez. 2010. Disponível em: <https://www.sboc.org.br/sboc-site/revista-sboc/pdfs/22/artigo14.pdf>. Acesso em: 11 set. 2020.

KARGI, A.; GUREL, D.; TUNA, B. The diagnostic value of TTF-1, CK 5/6, and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, Turquia, v.15, n. 4, p. 415-420, dez. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18091384/>. Acesso em: 9 ago. 2020.

LIMA, K. A. **Análise de expressão do PD-L1 em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células na região sul do Brasil**. 2019. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

LOPES, G. L.; VATTIMO, E. F. Q.; CASTRO JUNIOR, G. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. **Jornal Brasileiro de pneumologia**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 365-375, jul./ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132015000004531>. Acesso em: 3 ago. 2020.

MCCAUGHAN, B. C.; MARTINI, N.; BAINS, M. S. Bronchial carcinoids: review of 124 cases. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, New York, v. 89, n. 1, p. 8-17. jan. 1985.

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, Clin. Translational Research**, [s.l.], v. 89, n. 3, p. 175-186, ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25833149/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MENDELSON, J.; BASELGA, J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. **Oncogene**, [s.l.], v. 19, n. 56, p. 6550-65, dez. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204082>. Acesso em: 14 out. 2020.

OLIVEIRA, A. C. S. M. *et al.* Perfil molecular do carcinoma pulmonar de células não pequenas no Nordeste brasileiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 45, n. 3, 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v45n3/pt_1806-3713-jbpneu-45-03-e20180181.pdf. Acesso em: 1 out. 2020.

OLIVEIRA, A. C. S. M. **Avaliação da mutação de EGFR e da imunexpressão de ALK e de PD-L1 em adenocarcinomas de pulmão**. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Patologia. Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 12, p. 252-264, mar. 2012. Disponível em: DOI: 10.1038/nrc3239. Acesso em: 15 out. 2020.

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**, v. 389, n. 10066, p. 255-265, jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979383/>. Acesso em: 15 set. 2020.

SAADI, M. M. *et al.* Large multicystic pulmonary chondroid hamartoma in a child presenting as pneumothorax. **Saudi Medical Journal**. Arábia Saudita, v. 36, n. 4, p. 487-489, jan. 2015. Disponível em: <https://www.smj.org.sa/index.php/smj/article/view/10210/7233>. Acesso em: 8 set. 2020.

SAGERUP, C. M. T. *et al.* Increasing Age and Carcinoma Not Otherwise Specified A 20-Year Population Study of 40,118 Lung Cancer Patients. **Journal of Thoracic Oncology**, Oslo, v. 7, n. 1, p. 57-63, jan. 2012.

SANTOS, G. C.; SHEPHERD, F. A; TSAO, M. S. EGFR Mutations and Lung Cancer. **Annual Reviews of Pathology: mechanisms of disease**, Canada, v. 6, p. 49-69, fev. 2011. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-011110-130206>. Acesso em: 8 set. 2020.

SCHACHT, V.; KERN, J. S. Basics of immunohistochemistry. **Journal of investigative dermatology**, Hannover, v. 135, n. 30, p. 1- 4, mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25666678/>. Acesso em: 11 set. 2020.

SCHLITT, H. J. *et al.* Recurrence patterns of hepatocellular and fibrolamellar carcinoma after liver transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, Alemanha, v. 17, n. 1, p. 324-31, jan. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10458250/>. Acesso em: 19 set. 2020.

SILVA, G. A. *et al.* Diferenças de gênero na tendência de mortalidade por câncer de pulmão nas macrorregiões brasileiras. **Rev. Brasil. Epidem.**, [s.l.], v.11, n. 3, p. 411-419, set. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2008000300008>. Acesso em: 1 out. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. **Dia mundial sem tabaco**: cerca de 85% dos casos de câncer de pulmão são causados pelo tabagismo. 2019. Disponível em: <https://www.sbec.org.br/noticias/item/1568-dia-mundial-sem-tabaco-cerca-de-85-dos-casos-de-cancer-de-pulmao-sao-causados-pelo-tabagismo>. Acesso em: 22 jun. 2020.

SOUZA, M. C.; VASCONCELOS, A. G. G.; CRUZ, O. G. Trends in lung cancer mortality in Brazil from the 1980s into the early 21st century: age-periodcohort analysis. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 21-30, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2012000100003>. Acesso em: 12 ago. 2020.

SZUTOWICZ, E.; DZIADZIUSZKO, R. Quantitative immunohistochemistry in lung cancer: clinical perspective. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Poland, v. 48, n.1, p. 7-11, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2012000100003>. Acesso em: 23 ago. 2020.

TAKADA, K. *et al.* PD-L1 expression according to the EGFR status in primary lung adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 6, p. 1-6, fev. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29413045/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

TSUKAZAN, M. T. R. *et al.* Câncer de pulmão: mudanças na histologia, sexo e idade nos últimos 30 anos no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 43, n. 5, p. 363-367, jun. 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v43n5/pt_1806-3713-jbpneu-43-05-00363.pdf. Acesso em: 12 ago. 2020.

UEHARA, C.; JAMNIK, S.; SANTORO, I. L. Câncer de pulmão. **Medicina (Ribeirão Preto)**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 266-276, jun. 1998. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/7673>. Acesso em: 3 out. 2020.

VIEGAS, C. L.; CASULARI, L. A. Câncer de pulmão em pacientes com menos de 50 anos de idade: estudo de série de casos. **Rev. Brasília Médica**, [s.l.], v. 52, n. 2, p. 47-52, 2015.

WANG, Z. Z. *et al.* Clinical analysis of 5 cases of endobronchial hamartoma. **Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases**, China, v. 42, n. 1, p. 15-19, jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30630243/>. Acesso em: 11 set. 2020.

YANG, H. *et al.* The correlation between programmed death-ligand 1 expression and driver gene mutations in NSCLC. **Oncotarget**, China, v. 8, n. 14, p. 23517-23528, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15627>. Acesso em: 12 ago. 2020.

ZHANG, M. *et al.* PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis. **Scientific reports**, China, v. 7, n. 10255, p. 1-10. ago. 2017.

ZHU, C.; SHIH, W.; LING, C. *et al.* Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, p. 790-800, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16873561/>. Acesso em: 5 ago. 2020.