

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE (UFCSPA)**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Josenel Maria Barcelos Marçal

**Avaliação da expressão de DLL3 em
carcinoma de pequenas células do
pulmão no sul do Brasil e sua
correlação com EGFR, PDL-1,
CICLIN D 1, marcadores
neuroendócrinos e achados clínicos**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre,
2021**

Josenel Maria Barcelos Marçal

Avaliação da expressão de DLL3 em carcinoma de pequenas células do pulmão no sul do Brasil e sua correlação com EGFR, PDL-1, CICLIN D 1, marcadores neuroendócrinos e achados clínicos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa

Porto Alegre, 2021

Catalogação na Publicação

Marçal, Josenel Maria Barcelos

Avaliação da expressão de DLL3 em carcinoma de pequenas células do pulmão no sul do Brasil e sua correlação com EGFR, PDL-1, CICLIN D 1, marcadores neuroendócrinos e achados clínicos / Josenel Maria Barcelos Marçal. -- 2021.

242 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2021.

Orientador(a): Paulo Ricardo Gazzola Zen ;
coorientador(a): Rafael Fabiano Machado Rosa .

1. Carcinoma pulmonar de pequenas células. 2. Proteína DLL3. 3. pontos de controle imunológicos. 4. biomarcadores. 5. imunohistoquímica. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

Dedico esta tese

Aos meus alunos, razão do meu doutorado.

A minha família linda, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, especialmente, a minha mãe, Maria, ao meu pai, Plínio, a minha tia Ailza e a minha prima Heloísa Helena que me incentivaram nos estudos com seus exemplos e que estiveram sempre presentes na minha formação.

Ao meu marido, Paulo Ricardo, pelo carinho, compreensão, paciência, companheirismo e incentivo. Também, pelas várias ajudas com digitações, pesquisas, traduções e impressões.

Aos meus filhos, Ana Paula, Ricardo e Henrique, incentivadores incondicionais, que souberam me amar e compreender minhas necessidades de tempo para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos Professores Paulo Ricardo Gazzola Zen e Rafael Fabiano Machado Rosa, que me acolheram na orientação do Doutorado, contribuindo com questões fundamentais e oportunizando meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus grandes colaboradores, os meus alunos, Giuseppe Dick Bonatto e Júlia Iaroseski, pelo companheirismo, revisões, pesquisas relacionadas e disponibilidade.

Às técnicas de histologia e macroscopia, Janaína R. Rosa e Caroline Baptistella, que foram importantes na parte experimental da tese.

Aos pacientes envolvidos no estudo que colaboraram com seu material humano, colaborando com o desenvolvimento científico.

Às instituições da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre que me proporcionaram o contato com os alunos e a pesquisa.

A todos os meus alunos, que demonstram muito carinho e confiança em mim como patologista e como docente.

A todos que convivem comigo e que, de alguma forma, contribuíram para realização deste estudo.

“Todas as epidemias têm um meio de contágio, um vetor que dissemina doença e morte. Para a epidemia do tabagismo, o vetor não é um vírus, uma bactéria ou outro microrganismo – ele é uma indústria e sua estratégia de negócio”.

“All epidemics have a means of contagion, a vector that disseminates disease and death. For the tobacco epidemic, the vector is not a virus, a bacterium or another microorganism - it is an industry and its business strategy”.

World Health Organization, 2008

RESUMO

INTRODUÇÃO: carcinoma de pequenas células do pulmão (CPCP) representa uma neoplasia rara, associada ao tabagismo, de curso clínico agressivo, com recidivas após tratamento convencional. Novas terapias-alvo têm sido produzidas e testadas, baseadas na expressão de biomarcadores por células neoplásicas, como a proteína delta Like 3 (DLL3), que é um ligante inibitório da via de sinalização Notch, envolvido na regulação da tumorigênese.

OBJETIVOS: avaliar a expressão de DLL3 em células neoplásicas do CPCP e sua correlação com os biomarcadores EGFR, PDL-1, ciclina D1 e com marcadores do painel de rotina (sinaptofisina, cromogranina, CD56, citoqueratinas, TTF1); e avaliar a associação dos dados clínicos e a sobrevida com a expressão de DLL3.

MÉTODOS: estudo retrospectivo, constituído por 40 amostras de biópsias de CPCP, selecionadas no Laboratório de Anatomia Patológica e Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, selecionadas no período de 2006 a 2016. As amostras foram avaliadas quanto à expressão de biomarcadores por imuno-histoquímica: DLL3 (membranas e citoplasma), EGFR e PDL-1 (membranas), Ciclina D1eKi67 (núcleo). O painel de rotina com TTF1, Cromogranina A, sinaptofisina, CD56, CK70 anteriormente realizado, foi tabulado como positivo ou negativo. Dos prontuários dos pacientes, foram levantados os dados clínicos, data do óbito ou última revisão.

RESULTADOS: foram produzidos três artigos. O artigo I demonstrou expressão de DLL3 de 32,5% na amostra avaliada. Nesses pacientes, a expressão de EGFR foi 46,2%; PDL-1 30,8%; ciclina D1 53,8% ; e cromogranina A 30,8% .

Todos os pacientes positivos para cromogranina A foram negativos para anti-DLL3 ($p > 0,17$). A sobrevida geral para DLL3 positivo foi ligeiramente maior em pacientes com cromogranina A negativa ($p 0.299$). O artigo II apresentou uma revisão bibliográfica: Correlação Entre Embriogênese Pulmonar, Organogênese, Alterações Moleculares e Tumorigênese: artigo de Revisão; e o artigo III propôs uma mini revisão sobre marcas registradas do câncer e sua importância.

CONCLUSÃO: a expressão de DLL3 em células neoplásicas foi de 32,5% na correlação com EGFR, PDL-1 e Cyclin D1. Os valores de HR indicam impacto clínico. Pacientes DLL3 positivos apresentaram baixa expressão de cromogranina A, indicando uma tendência à ação protetiva. O estudo de biomarcadores em CPCP, poderá proporcionar o desenvolvimento de novas terapias-alvo e de marcadores preditivos.

PALAVRAS-CHAVE:

Carcinoma pulmonar de pequenas células; Proteína DLL3; pontos de controle imunológicos; biomarcadores; imunohistoquímica; drogas- alvo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: small cell neuroendocrine carcinoma of the lung (CPLC) represents a rare neoplasm, associated with smoking, with an aggressive clinical course, with recurrences after conventional treatment. New target therapies have been produced and tested, based on the expression of biomarkers by neoplastic cells, such as the delta Like 3 protein (DLL3), which is an inhibitory ligand of the Notch signaling pathway, involved in the regulation of tumorigenesis.

OBJECTIVES: to evaluate the expression of DLL3 in CPLC neoplastic cells and their correlation with the biomarkers EGFR, PDL-1 and cyclin D1 and with routine panel markers (synaptophysin, chromogranin, CD56, cytokeratins, TTF1); to evaluate the association of clinical data and survival with the expression of DLL3.

METHODS: retrospective study of 40 CPLC biopsy samples, selected at the Pathological Anatomy and Mycology Laboratory of the Santa Casa de Misericórdia Hospital Complex in Porto Alegre, from 2006 to 2016. The samples were evaluated for the expression of biomarkers by immunohistochemistry: DLL3 (membranes and cytoplasm), EGFR and PDL-1 (membranes), Cyclin D1 and Ki67 (nucleus). The routine panel with TTF1, Chromogranin A, synaptophysin, CD56, CK70 previously performed, was tabulated as positive or negative. From the patients' medical records, clinical data, date of death or last revision were collected.

RESULTS: three articles were produced. Article I showed an expression of DLL3 of 32.5% in the evaluated sample. In these patients, EGFR expression was 46.2%; PDL-1 30.8%; cyclin D1 53.8%; and chromogranin A 30.8%.

All chromogranin A positive patients were negative for anti-DLL3 ($p > 0.17$). The

overall survival for positive DLL3 was slightly higher in patients with negative chromogranin A (p 0.299). Article II presented a bibliographic review: Correlation Between Pulmonary Embryogenesis, Organogenesis, Molecular Changes and Tumorigenesis: Review Article; and article III proposed a mini review on cancer trademarks and their importance.

CONCLUSION: the expression of DLL3 in neoplastic cells was 32.5% in the correlation with EGFR, PDL-1 and Cyclin D1 the HR values indicate clinical impact. Positive DLL3 patients showed low expression of chromogranin A, indicating a tendency to the protective action of chromogranin. The study of biomarkers in CPCP, may provide the development of new target therapies and predictive markers.

KEYWORDS:

Small-cell lung carcinoma; DLL3 protein; immunological checkpoints; biomarkers; immunohistochemistry; target drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS

218Po e 214	Po-produtos da via curta do radônio
222Rn	Radônio
226	Ra-Radio
238u	Produto do decaimento do urânio
2B4-11	Hibridoma de células T murino
ABL-1	Tirosina-proteína quinase ABL1
aCGH	Hibridização genômica comparativa baseada em array
ADAM10/17	A Desintegrin And Metalloprotease 10/17
ADC	Adenocarcinoma
ADH(SIADH)	Hormônio antidiurético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE1/AE2	Cocktail de citoqueratinas de baixo e alto peso molecular,
AIP4Atrophin-1	Proteína interativa 4-Akt
AKT	Proteína-quinase B
ALMS1	Gene da síndrome de Alstrom
ALT	Alongamento alternativo dos telômeros
Anti-Hu	Antineuronal nuclear antibody type 1
Anti-PDL-1	Proteína 1 de morte celular
APCs	Células apresentadoras de antígeno
APUD	Anina Precursor Uptake and Decarboxylation
ARG1	Gene que codifica a proteína arginase
ARMS	Sistema de mutação refratária de amplificação
ASCL1	Achaete-scute complex-like 1
ASPM	Proteína associada à microcefaliasemelhante ao fuso normal SLIT2-ligante de orientação de fenda 2
AT 1 e 2	Células alveolares tipo 1 e 2
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
AURKA	Aurora quinase A
B7	Proteína de membrana periférica, ligante para CTLA-4
CD28	Proteína coestimuladora expressa por células T

BADJ-	Junção do ducto bronquíoloalveolar
BAX -	<i>Bcl-2 Associated X-protein</i>
Bcl-2 B	<i>Cell lymphoma 2</i>
bHLH-	Hélice-alça-hélice básica
Bim	Proteína próapoptótica
BLIMP B	<i>Lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BmP4	Proteína morfogênica óssea 4
B-MYB	Oncogene viral da protein homóloga aviária
BRAF	Protooncogene que produz serina/treonina
BRCA1	Do inglês, breast cancer 1, early onset; gene supressor
CBP/p300	Fatores de transcrição
CCL 17, 22 e 24	<i>Chemokine ligand 17, 22, 24</i>
CCND1	Protooncogene que codifica ciclina D1
CCNE1	Gene que codifica ciclina E 1
CCNP	Carcinomas de células não-pequenas
CD20	Antígeno de linfócitos B
CD45	Fosfatase de proteína tipo receptor C; em inglês PTPRC
CD56 (NCAM)	Molécula de adesão de células neuronais
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD99	Glicoproteína tipo 1 de cadeia única
CDK	Quinase dependente de ciclina
CEA	Antígenocarcino-embriônico
CgA	Cromogranina A
CHD7	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7</i>
ChrA	Cromogranina A
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
CK20	Queratina de alto peso molecular
CK7	Queratina de baixo peso molecular
CK8/CK18	Citoqueratinas de filamentos intermediários
c- Kit	<i>Cell tyrosine-protein kinase Kit</i>
CL5/6	Citoqueratina de alto peso molecular

C-MET	Protooncogene que codifica o fator do crescimento do hepatócito
cMyc	Protooncogene que codifica fatores de transcrição
Col22A1	A cadeia de colágeno alfa-1 (X)
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPK-BB	Creatinafosfoquinase-BB
CREB	Proteína de ligação (CBP) e p300
CREBBP	Proteína de ligação a CREB
CSL	<i>Complex sclerosing lesion</i>
CTLA-4	Proteína associada ao linfócito citotóxico T-linfócito 4
DBD	Domínio de vinculação do DNA
DC	Células dendríticas
DCs	Células dendríticas
ddPCR	PCR digital de gotículas
Dhh	<i>Desert-Hedgehog</i>
DL	Doença limitada
DLK1/2	Delta-like 1/2 homólogo (Drosophila)
DLL 1 3 4	Delta-like-1, -3, -4
DII1	Delta-like 1
DII3	Delta-like 3
DII4	Delta-like 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dnCdk5	Cdk5 dominante negativo
DNER	Delta e Notch-like fator de crescimento epidérmico repetir
DSBR	<i>Double-strand breaks repair</i>
DSL	Delta, Serrate e LAG2
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
E2Fs	Gene que codifica fatores de transcrição
EBUS	Ultrassom endobrônquico
ECM	Matriz extracelular
ED	Doença extensa

EGF	Fator de Crescimento epidérmico
EGFlíke	Domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico
EGFL7/ EGFlíke	Domain-like-contendo proteína 7
EGFR-TKI	Inibidores de EGFR-tirosina quinase
ELHE	Timidilato-sintetase
EMA	Antígeno epitelial de membrana
EMLA-ALK	Gene de proteína associado ao microtúbulo de echinoderme 4 (EML4) fundido ao gene analplástico de linfoma quinase (ALK)
EP300	Histona acetiltransferase
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos EUA
EPHA7	Receptor de eferina tipo A7HES-hpomólogo de hair/enhancer of split
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ERK	Kinases extracelulares
ERRO	Espécies reativos de oxigênio
ESCs	Células-tronco embrionárias
EUS	Célula tronco adulta
FasI	Proteína transmembrana tipo II
FDA	Food and Drug Administration
FDG PET/CT	Tomografia por emissão de pósitrons
FDG	Radioisótopo emissor de pósitrons
FGF10	Fator de crescimento de fibroblasto
FHIT	do inglês: fragile histidine triad protein
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FMN2	Formin 2
FOX	Forkhead box
Gli1	<i>Fragile histidine triad protein</i>
GLOBOCAN	<i>Global cancer database</i>
GRP	Peptídeoliberadordegastrina
GSK3β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i>
GTP	Guanosinatrifosfato
Gwas	Estudos de Associação Ampla do Genoma

GXYLT	Adição de xilose por glucoside xylosyl-transferase
H1	Histona H1
HDAC1	Histona desacetilase 1
HD	Heterodimerization domínio
HE	Hematoxilina-eosina
HER2	<i>Human Epidérmico Growth Factor Receptor 2</i>
HERP Hes	<i>Related repressor protein</i>
HES1-5	<i>Hairy/Enhancer of Split family 1</i>
Hey-HRT	<i>Hairy related transcription factor</i>
HFG	<i>Hyperplastic foveolar glands</i>
HH-Gli	Via Hedgehog-Gli
HIF-1 α	Fator 1 α induzido por hipóxia
HMB45	Anticorpo monoclonal que reage com antígeno de melanócito
HMF6-2	Glóbulos de gordura do leite humano
HPV	Papiloma vírus humano
HRMA	Análise de fusão de alta resolução
HRP	Proxidase de raiz forte
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
ICP	Irradiação cerebral profilática
ICRP	Comissão Internacional de Proteção Radiológica
ID2	<i>Fragile histidine triad protein</i>
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IHC	Imunohistoquímica
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IKK	Quinase I κ B
iK κ α	I κ appaB kinase alpha
IL12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina-17
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6

IL8	Interleucina 8
INK4	Inhibitors of CDK4
NOS	Óxido nítrico sintetase
INSM1(IA1)	<i>Insulinoma-associated protein 1</i>
IRF6	Interferon fator regulatório 6
IRS2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
JAK	Janus quinase
KDM	<i>Lysine (K)-specific demethylase 1A</i>
KI67	Proteína marcadora de proliferação celular
KMT2	Lisina metiltransferase
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
Lasca	Imunoprecipitação da cromatina
LBD	Ligando do domínio de ligação
LCC	Carcinoma de grandes células
LCNEC	Carcinoma neuroendócrino de grandes células do pulmão
LEMS	Síndrome miastênica de Lambert-Eaton
Lfng	<i>Lunatic fringe</i>
LMW-CK	Citoqueratina de baixo peso molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
LRP6	Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade - 6
LSD1	<i>Lysine-specific demethylase 1</i>
LyD9	Progênitos hematopoiéticos murino
M1	Macrófago Ativado do tipo 1
mAb	Anticorpo monoclonal
MAML1	<i>Mastermind-like 1</i>
MEF	<i>Myocyte Specific Enhancer Factor</i>
MEK	Quinase de proteína ativada por mitogênio
MEK	MAP (<i>mitogen-activated protein</i>) kinase
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
MMP	Metaloproteinases
m-Tor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MUC	Mucina

MYC	<i>Myelocytomatosis</i>
NC	Célula neural
NCAM	Molécula de adesão celular neural
NEBs	Corpos neuroepiteliais
NECD	Domínio extracelular de Notch
NE	Célula neuroendócrina
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFIB	<i>Nuclear factor 1 B-type</i>
NF-κB	Fator nuclear κB
NGS	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NICD	Domínio intracelular de Notch
NK	Célula natural-Killer
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NNK-4	(metilnitrosamino)-1-(3piridil)-1-butona)
NPYR-N	Nitrosopirroldina
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OFUT1-O	Fucosyltransferase 1
OMS	Organização Mundial da Saude
OPA	<i>Ovine pulmonary adenocarcinoma</i>
P107(RBL)	Retinoblastoma like-1
P130(RBL2)	Proteína do retinoblastoma-like 2 (p130)
P16	Protein 16
P40	Protein 40
P59Fyn	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP-1	Poly (ADP-ribose) Polymerase 1
Patch-1	Proteína-12-transmembrana patched
PBD	Pirrolbenzodiazepípede
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCAF	<i>Proteína del retinoblastoma-like 2 (p130)</i>
PCNA	Antígeno de proliferação nuclear

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDCD1	Proteína de morte celular programada (PD-1)
PDE4DIP	<i>Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)</i>
PDGFR-B	Fator de crescimento derivado das plaquetas receptor beta
PDKD2	Proteína quinase D isoforma 2
PD-L1	Ligante de morte programada 1
PDLC	Carcinoma pouco diferenciado de pulmão
PEST	<i>Proline Glutamic ácido, Serina e Threonine</i>
PET/CT	<i>Positron Emission Tomography</i>
PETEN	Fosfatase homólogo da tensina
PGC	Células primordiais da linha germinativa
PGE2	Prostaglandina E2
PH	Perda de heterozigose
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLCy	<i>Fosfolipase Cy</i>
PNECs	Células neuroendócrinas pulmonares
POGLUT1	<i>Protein O-glucosyltransferase 1</i>
pRB	Probe
PSCs	Células-tronco pluripotentes
PTA	Poluição tabagística ambiental
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	PCR de transcrição reversa quantitativa
RAM RBP-Jk	<i>Associated Molecule</i>
RASSF1	<i>Ras association domain-containing protein 9</i>
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
ROBO1	Receptor de orientação rotatória 1
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S100	Proteínas de baixo peso molecular
SEER	Surveillance, epidemiology, and end results sequenciamento de próxima geração
sFRP-1	Proteína 1 relacionada ao frizzled secretada

Sftpc	Proteína surfactante c
Shh	Sonic Hedgehog
SIRT1	Histonas por sirtuin
SKIP	Ski-related protein
SKp2F	boscTCD8+
SKP2-S	Phase kinase-associated protein 2
SMO	Receptor acoplado a protein G
SMRT	Silenciando Mediador para retinóide e receptor de tireoide
SNP	Polimorfismo de nucleotídeos único
SOX	SRY-related HMG-box genes
Sry Sex	Determining region of chromosome Y
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
SSCP	Polimorfismo de conformação de fita simples
STAT3	Sinal transdutor e ativador de transcrição 3
SUFU	Supressor de fusão
SYP	<i>Synaptophysin</i>
TA	<i>Transactivating</i>
TAD	<i>Transcription Transactivation Domain</i>
T-All	Leucemia linfoblástica aguda
TAMS	Macrófagos associados ao tumor
Tc99m-MDP	Difosfonato de metileno de tecnésio-99m
TCMD	Tomografia computadorizada com múltiplos detectores
TCR	Complexo receptor de células T
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF-β	Transforming growth factor
TGF@	Transforming growth factor alpha (TGF-α)
TGFBR2	Transforming growth factor beta receptor 2
TLS	Translesion synthesis
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
Th17	T helper 17
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases

TKI	Protein Tyrosine Kinase
TLR	Receptor Toll-like
TM	Domínio transmembranar
TME	Microambiente tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TNM	EstadiamentoTNM
TPA	Antígeno polipeptídico tecidual
TRAIL TNF	Related apoptosis inducing ligand
TSP	Trombospondina 1
TS	Timidilato sintetase
TTF	Tator de transcrição da tireoide
VALSG	Veteran's Administration Lung Study Group
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	fator de Von Willebrand
WH	World Health Organization
Wnt	wingless-type
ZNF143	Proteína dedo de zinco 143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrando as dez propriedades adquiridas do câncer.	26
Figura 2. Gráfico de barras de taxas padronizadas de idade de incidência específica por região por sexo para câncer de pulmão em 2018 e de mortalidade por sexo e região	32
Figura 3. A figura se refere ao estágio do câncer de pulmão e percentual de sobrevida relativa em 5 anos por estágio	33
Figura 4. Estágios do desenvolvimento normal de espaços aéreos e vasos do pulmão	49
Figura 5. Quinases do ciclo celular principal e seu envolvimento na progressão do ciclo celular	113
Figura 6. Na fase de equilíbrio da imunoedição do câncer, o sistema imunológico mantém o tumor em um estado de dormência funcional.....	124
Figura 7. Resistência adaptativa no microambiente tumoral. As células apresentadoras de antígenos (APCs) capturam antígenos no local do tumor e migram para os órgãos linfóides, onde os antígenos são apresentados às células T virgens.....	131
Figura 8. A ativação canônica da via Shh em vertebrados.	137
Figura 9. A ativação não canônica da via Shh.....	138
Figura 10. Vias de sinalização notch.	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação histológica das neoplasias	56
Tabela 2 - Subgrupo de neoplasias neuroendócrinas	58
Tabela 3 - Diagnóstico diferencial de neoplasias neuroendócrinas.....	60
Tabela 4 - Subclassificação histórica do carcinoma de pequenas células do pulmão.	63
Tabela 5 - Painel para o diagnóstico do câncer de pulmão.....	83
Tabela 6 - Critérios histológicos para diagnóstico diferencial entre carcinoma de pequenas células e carcinoma de grandes células do pulmão .	102

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	25
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS NEOPLASIAS	25
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO	30
1.3 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE PULMÃO.....	34
1.3.1 Fatores de risco modificáveis.....	34
1.3.1.1 Tabaco	34
1.3.1.2 Radônio.....	36
1.3.1.3 Amianto	37
1.3.1.4 Arsênico	38
1.3.2 Fatores de risco que não podem ser modificados.....	39
1.3.2.1 Radioterapia do tórax	39
1.3.2.2 Poluição do ar	39
1.3.2.3 História pessoal ou familiar de câncer	39
1.3.2.4 Doença Broncopulmonar Obstrutiva Crônica (DBPOC)	40
1.3.3 Fatores de risco de potencial incerto	41
1.3.3.1 Fumar maconha	41
1.3.3.2 Cigarros eletrônicos.....	42
1.3.3.3 Talco	43
1.3.3.4 Papiloma Vírus Humano (HPV)	44
1.4 EMBRIOGÊNESE PULMONAR.....	45
1.4.1 Fases do desenvolvimento pulmonar.....	45
1.4.2 Tipos celulares pulmonares	50
1.4.2.1 Células pulmonares embrionárias	50
1.4.2.2 Células pulmonares do adulto	51
1.4.2.3 Regulação molecular na embriogênese.....	53
1.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE PULMÃO	55
1.6 MORFOLOGIA DO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO	60
1.6.1 Histórico.....	60
1.6.2 Aspectos morfológicos do carcinoma de pequenas células do pulmão	63
1.6.3 Carcinoma de pequenas células pulmonar combinado.....	64
1.7 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CARCINOMA NEUROENDÓCRINO DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO	66
1.7.1 Os principais sintomas locais:.....	67
1.7.2 Sintomatologia por metástases	68
1.7.3 Síndromes paraneoplásicas	69
1.8 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	70
1.8.1 Citologia de escarro.....	72
1.8.2 Toracocentese	72
1.8.3 Biópsia por agulha	72
1.8.3.1 Aspiração por agulha fina (PAAF)	73
1.8.3.2 Core biopsy	73
1.8.3.3 Outros métodos de coleta.....	73
1.8.4 Broncoscopia.....	74
1.8.5 Mediastinoscopia e mediastinotomia	74

1.8.6 EBUS-ultrassom endobrônquico	74
1.8.7 Broncoscopia de navegação	75
1.8.8 Toracoscopia	75
1.9 EXAMES DE IMAGEM.....	76
1.9.1 Tomografia computadorizada do tórax com contraste	76
1.9.2 RM Torácica	77
1.9.3 Cintilografia óssea	78
1.9.4 PET / CT.....	79
1.9.5 Aspiração da medula óssea e biópsia.....	80
1.10 DIAGNÓSTICO IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO: INTRODUÇÃO.....	81
1.10.1 Painel de marcadores imunohistoquímicos para o diagnóstico de CPCP	83
1.10.1.1 Citoqueratinas	83
1.10.1.2 Pancitoqueratinas (AE1/AE3)	84
1.10.1.3 KI67.....	85
1.10.1.4 CD56.....	86
1.10.1.5 Cromogranina.....	87
1.10.1.6 Sinaptofisina	88
1.10.1.7 TTF1.....	89
1.10.1.8 INSM1	90
1.10.1.9 CK8/CK18	92
1.10.1.10 CK5/6	94
1.10.1.11 P63.....	95
1.10.1.12 P40.....	96
1.10.1.13 SOX2.....	96
1.11 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS	97
1.12 ESTADIAMENTO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO.....	103
1.12.1 Estadiamento.....	103
1.12.2 Tratamento e prognóstico	105
1.12.2.1 Tratamento quimioterápico	107
1.12.2.2 Tratamento com imunoterapia	108
1.12.2.3 Nivolumab	109
1.12.2.4 Ipilimumab	109
1.12.2.5 Atezolizumabe	110
1.12.2.6 Durvalumab	110
1.12.2.7 Pembrolizumabe.....	111
1.13 MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	111
1.13.1 Ciclina D1	111
1.13.2 EGFR	115
1.13.2.1 EGFR e terapias atuais	119
1.13.2.2 Detecção das mutações de EGFR.....	121
1.13.3 PD-1-PDL-1	123
1.13.3.1 Sinapses imunológicas ou pontos de checagem	123
1.13.3.2 PD-1	124
1.13.3.3 PD-L1	129
1.13.3.4 Via PD-1-PDL-1	130

1.13.3 Vias de sinalização associadas à PD-1-PDL-1	133
1.13.3.1 Via de sinalização PI3K / AKTmTOR	133
1.13.3.2 Via de sinalização MAPK.....	134
1.13.3.3 Via de sinalização JAK-STAT	135
1.13.3.4 Via de sinalização WNT.....	135
1.13.3.5 Via de sinalização NF-κB.....	135
1.13.3.6 Via de sinalização Hedgehog	136
1.14 PERFIL GENÔMICO DO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO	142
1.14.1 Inativação de reguladores epigenéticos	148
1.14.2 Redes defeituosas para dinâmica do citoesqueleto e adesão celular.....	150
1.14.3 Alterações das vias do receptor tirosina quinase	152
1.14.4 Via de sinalização Notch.....	153
1.15 DLL3/DELTA 3/ASCHL	161
1.16 JUSTIFICATIVA.....	166
2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168
3 OBJETIVOS	197
3.1 OBJETIVO GERAL	197
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	197
4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	198
4.1 ARTIGO 1	198
4.2 ARTIGO 2.....	204
4.3 ARTIGO 3.....	214
5 CONCLUSÃO.....	217
6 PERSPECTIVAS	220
APÊNDICES.....	221
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	221
APÊNDICE B – SUPLEMENTO	223
ANEXOS.....	239
ANEXO A – APROVAÇÃO CEP	239
ANEXO B – ACEITE ARTIGO	242

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS NEOPLASIAS

O câncer é uma doença heterogênea, complexa em todos os níveis (genético, patológico, histológico, prognóstico e terapêutico), altamente dinâmica, com múltiplos constituintes moleculares em evolução¹.

O surgimento de uma neoplasia ocorre através da formação de clones transformados que geram subpopulações diversificadas e selecionadas que adquirem uma agressividade crescente. O processo de progressão ocorre devido a fatores morfológicos, metabólicos e alterações na expressão gênica, causados por anormalidades cromossômicas, mutações pontuais e um status aberrante de metilação do DNA¹.

O acúmulo de múltiplas alterações leva as células transformadas a adquirirem características e propriedades típicas que fornecem vantagens em relação a sua contraparte normal².

Em 2000, Hanahan e Weinberg descreveram seis propriedades adquiridas do câncer durante a tumorigênese: manutenção da proliferação celular, inibição de genes supressores tumorais, imortalidade celular, evasão da apoptose, angiogênese sustentada, ativação da invasão e metástase².

Em 2011, os mesmos autores descreveram outras características das neoplasias, incluindo o desenvolvimento e a progressão do câncer em processos inflamatórios; instabilidade genômica; alteração do metabolismo energético (efeito Warburg) e evasão imunológica³. (Figura 1).

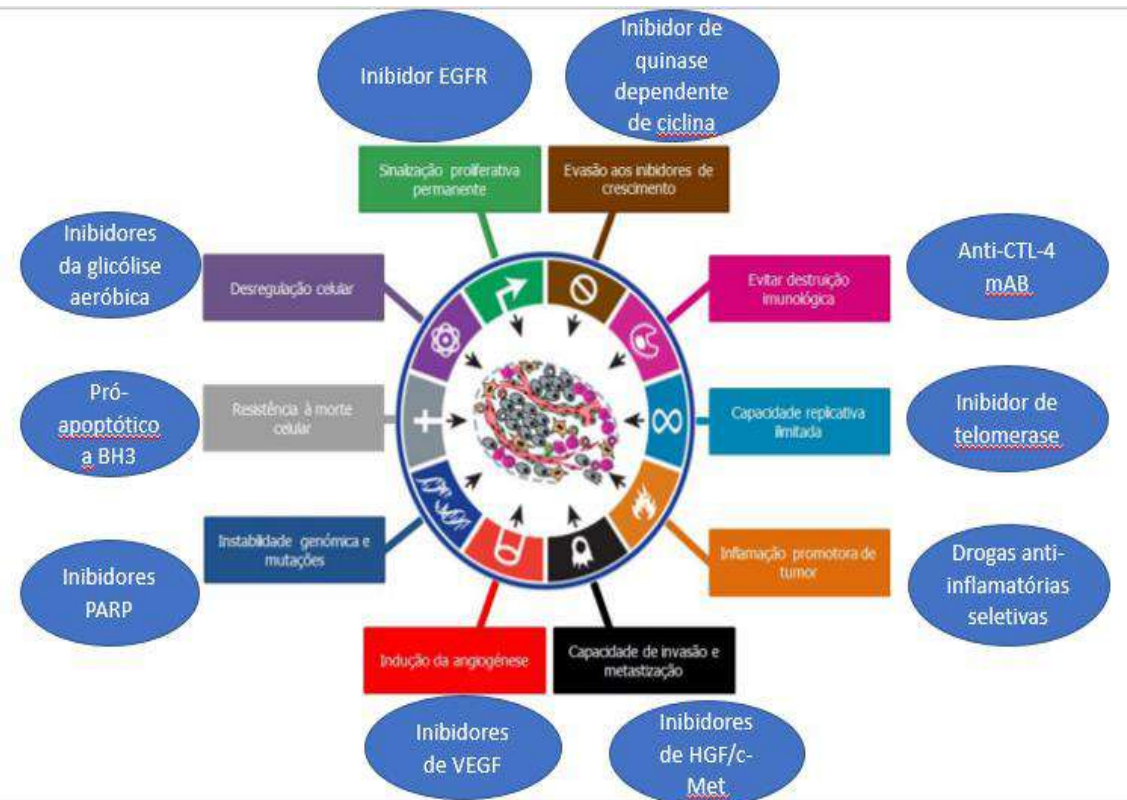


Figura 1. Esquema demonstrando as dez propriedades adquiridas do câncer. Adaptado de Hannah e Weinberg, 2011.

Nos anos que se seguiram a essas descobertas inovadoras, o conhecimento sobre a genética do câncer progrediu notavelmente, com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento para mutações genéticas. O cenário de mutações no câncer foi integrado com mapas de transcriptoma, epigenoma e metaboloma⁴.

Nas células normais, a proliferação celular é um evento controlado por sinais anti-proliferativos ou por indução de morte celular programada, através de um sinal parácrino exógeno^{4,5}.

Nas células tumorais a proliferação é, principalmente, autônoma e desacoplada de sinais mitogênicos externos. As células tumorais sintetizam fatores de crescimento através do estímulo autócrino, provocando a superexpressão de um receptor mais responsivo à concentração normal de

ligante, ou expressando receptores de superfície ativados constitutivamente; ou através de ação das integrinas (receptores que medeiam a matriz celular e o contato célula-célula). Assim, conseguem aumentar a sobrevivência celular, crescimento e manutenção de uma regulação aberrante da cascata SOS-Ras-Raf-MAPK que continua a transmitir uma sinalização mitogênica intracelular, mesmo na ausência de sinais estimuladores normais a montante⁵.

Durante a carcinogênese, se o DNA for danificado, bem como se forem esgotados o conjunto de nucleotídeos e de nutrientes, podem ocorrer alterações nos genes supressores tumorais *RB* (retinoblastoma), que controlam a entrada no ciclo celular; e de *p53*, que mantem a célula na fase G1 / S do ciclo celular. As células cancerosas utilizam outras estratégias para escaparem da morte celular programada, como as mutações que prejudicam a função do *p53*, com o aumento da expressão de inibidores de apoptose (Bcl2, Bcl-xL), a regulação negativa de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim e Puma) e a ativação da via de sobrevivência fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) -Akt⁶.

As células tumorais mostram um potencial replicativo ilimitado através da manutenção da telomerase ou por um mecanismo mediado por recombinação, denominado ALT (alongamento alternativo de telômeros)⁷.

A angiogênese ocorre durante as fases iniciais de progressão neoplásica. As células endoteliais são estimuladas pelo fator de crescimento endotelial-A (VEGF-A) e / ou fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e a regulação negativa se dá pela trombospondina 1 (TSP1) ou β -interferon⁸.

Os novos vasos colaboram com a ocorrência de metástases pela perda de expressão ou mutações do gene da caderina-E, ou por suprarregulação de

genes que codificam proteínas envolvidas na migração celular, como N-caderina⁸.

Cabe ressaltar que alguns elementos dentro do microambiente tumoral são importantes para o desenvolvimento de uma neoplasia. Esses elementos incluem células do parênquima, como fibroblastos, células endoteliais, pericitos, além de fatores imunológicos e inflamatórios recrutados a partir de células T e B, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e outras células derivadas da medula óssea. Esses grupos de células são responsáveis pela síntese dos componentes não celulares do estroma associado ao tumor, como as proteínas da matriz extracelular (ECM), proteases, citocinas e fatores de crescimento⁹.

Os fibroblastos do estroma tumoral secretam fatores de crescimento (HFG, EGF e b-FGF) e citocinas (SDF-1 e IL-6) levando à infiltração de células imunes, que promovem a angiogênese e a propagação metastática; por remodelação ECM e, portanto, influenciando a proliferação, sobrevivência e migração de células cancerosas⁹. O efeito Warburg, é outra propriedade da célula neoplásica que aumenta o potencial energético com a produção e secreção de lactato a partir do glicogênio, sem utilizar oxigênio¹⁰.

Células infiltrantes do sistema imunológico e inflamatório incluem populações com um fenótipo diferente e, portanto, funcionalmente heterogêneo, principalmente macrófagos, células dendríticas (DCs), células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) e neutrófilos. Essas células podem agir de maneiras opostas, tanto antagonizando, quanto promovendo o desenvolvimento do tumor. Portanto, a frequência de infiltração inflamatória, bem como seu estágio de maturação e localização espacial dentro do microambiente tumoral têm efeitos determinantes na clínica e nas respostas imunológicas¹¹.

Outros elementos capazes de afetar o comportamento das células malignas são de origem extracelular, como pH, concentração de oxigênio (O₂), pressão do tecido e fluxo de fluido¹¹.

A identificação da participação dessas células na progressão tumoral está abrindo caminho para a pesquisa e o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas, tendo como alvo as células não-cancerígenas do microambiente tumoral, que frequentemente não apresentam taxas de proliferação desreguladas ou instabilidade genética aumentada¹¹.

Não podemos deixar de mencionar que estudos recentes indicam que uma carcinogênese não pode ser explicada apenas por mudanças genéticas, mas também por alterações epigenéticas, como metilação de DNA, modificações de histonas e microRNAs. Essas alterações moleculares levam a mudanças permanentes nos padrões de expressão gênica que regulam o fenótipo neoplásico¹².

Os macrófagos ativados do tipo 1 (M1) secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que lideram o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T auxiliares 1 (Th1), Th17 e células natural killer (NK). Possuem alta atividade microbicida, função imunoestimuladora e estão presentes em tumores incipientes, onde são capazes de matar células tumorais¹³.

Já os macrófagos tipo 2 (M2) expressam um conjunto de diferentes citocinas e quimiocinas, como CCL17, CCL22 e CCL24, promovendo o recrutamento e o desenvolvimento de células T regulatórias. Esse tipo de macrófagos estimulam a reparação e remodelação do tecido, o processo de neoangiogênese e a invasão e metástase do tumor. As células tumorais podem

regular a função dos macrófagos associados ao tumor (TAMs), "educando-os" para um fenótipo M2^{13,14}.

As células dendríticas, derivadas da medula óssea, são células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfócitos T em órgãos linfoides e em tecidos, e compreende duas subpopulações: células dendríticas mieloides, que inibem a neoangiogênese por produzir interleucina IL-12; e células dendríticas plasmocitóides, que induzem angiogênese pela produção de TNF- α e IL-8, assim como a progressão tumoral e metástases através da secreção de proteases, como MMP-1,-2,-3,-9 e -19 e seus inibidores, chamados de tecido metaloproteinases inibidoras (TIMP)-1 e -2. Estas células agem como células promotoras de tumor, inibindo a imunidade inata e adaptativa e impedindo a ação da imunoterapia³.

Os neutrófilos são capazes de promover o processo de angiogênese, secretando diretamente VEGF, ou induzindo sua liberação pela produção de MMPs, mas, como outras células inflamatórias, também possuem atividade antitumoral. Na verdade, eles podem matar células tumorais ao liberarem proteases, moléculas de perfuração de membrana, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas, em particular TNF- α e IL-1 β . De acordo com os sinais dentro do microambiente tumoral, pode inibir a angiogênese por produção de elastase³.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO

A maioria dos estudos divide o câncer de pulmão em carcinoma de pequenas células (CPCP) e carcinoma de não pequenas células (CNPCP). Em

geral, cerca de 84% de todos os cânceres de pulmão são CNPCP e 13% são de CPCP¹⁵.

Para o Brasil, estimam-se, para cada ano do triênio de 2020-2022, 17.760 casos novos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 16,99 casos novos de câncer de pulmão a cada 100 mil homens e 11,56 para cada 100 mil mulheres¹⁶.

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de pulmão em homens ocupa a segunda posição mais frequente nas Regiões Sul (31,07/100.000) e Nordeste (11,01/100.000). Nas Regiões Sudeste (18,10/100.000), Centro-Oeste 15,11/100.000) e Norte (9,24/100.000), ocupa a terceira posição. Para as mulheres, o câncer de pulmão é o terceiro mais frequente nas Regiões Sul (18,66/100.000) e Sudeste (12,09/100.000). Nas Regiões Centro-Oeste (10,87/100.000), Nordeste (8,86/100.000) e Norte (6,47/100.000), ocupa a quarta posição¹⁶.

As estimativas da *American Cancer Society's* para câncer de pulmão nos Estados Unidos para 2020 são de cerca de 228.820 novos casos de câncer de pulmão (116.300 para homens e 112.520 para mulheres) com cerca de 135.720 mortes por câncer de pulmão (72.500 em homens e 63.220 em mulheres)¹⁵.

A idade média de diagnóstico é de cerca de 65 anos. Um número muito pequeno de pessoas diagnosticadas tem menos de 45 anos.¹⁶ (INCA2020/2022; SEER 2013-2017)¹⁵. (Figura 2)

Quanto à distribuição do câncer de pulmão por sexo, a chance de um homem desenvolver câncer de pulmão durante a vida é de cerca de 1 em 15; e para mulher, o risco é de cerca de 1 em 17. Esses números incluem fumantes e não fumantes. Para fumantes, o risco é muito maior¹⁶.

No mundo, as maiores taxas de incidência de câncer de pulmão em homens foram observadas na Micronésia, Polinésia, e em países do Leste Europeu em homens; e para as mulheres, na América do Norte e nos países do Oeste Europeu^{18,19}. (Figura 2)

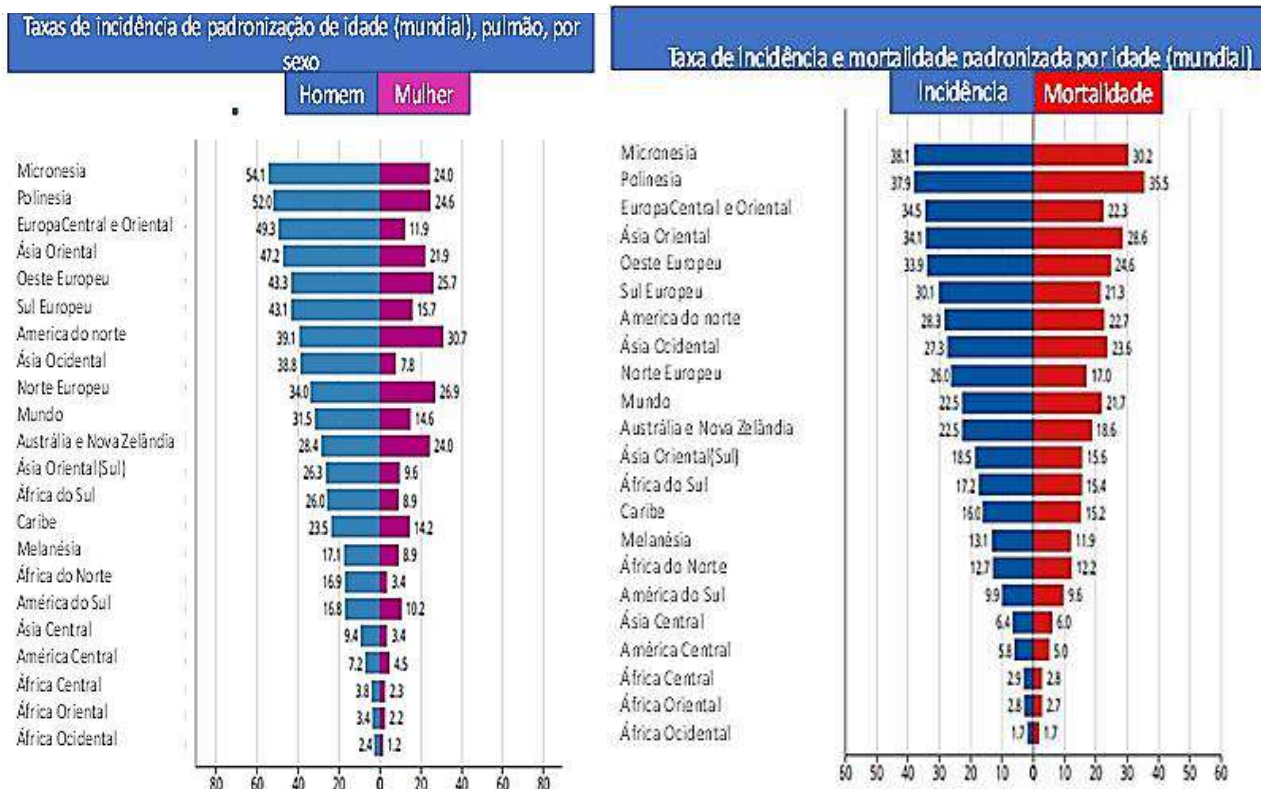


Figura 2. Gráfico de barras de taxas padronizadas de idade de incidência específica por região por sexo para câncer de pulmão em 2018 e de mortalidade por sexo e região. As taxas são mostradas em ordem decrescente da taxa padronizada de idade mundial (W) entre os homens, e as taxas nacionais mais altas entre homens e mulheres são sobrepostas. Adaptado de The Global Cancer Observatory-All rights reserved-march 2019.

Para homens negros a chance de desenvolver câncer de pulmão é de aproximadamente 15% maior em relação a homens brancos. Para mulheres negras, ao contrário, a taxa é cerca de 14% mais baixa do que em mulheres brancas. Apesar do risco geral de câncer de pulmão ser maior nos homens

negros, eles têm menor probabilidade para desenvolver CPCP do que os homens brancos¹⁵.

A principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres é o câncer de pulmão, representando quase 25% de todas as mortes por câncer^{15,20}.

No Brasil, a doença foi responsável por 26.498 mortes em 2015. No fim do século XX, o câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de morte evitáveis¹⁶.

A taxa de sobrevida relativa em cinco anos para câncer de pulmão é de 18% (15% para homens e 21% para mulheres). Apenas 16% dos cânceres são diagnosticados em estágio inicial (câncer localizado), para o qual a taxa de sobrevida de cinco anos é de 56%¹⁶.

Segundo Leora Horn *et al.* (2009), a taxa de sobrevida global é de 15-20 meses para doença confinada ao hemitórax e de 8-13 meses para doença disseminada.^{21,27}

Abaixo, está demonstrada a estatística do SEER, comparando a sobrevida relativa em 5 anos por estágio. Figura 3.

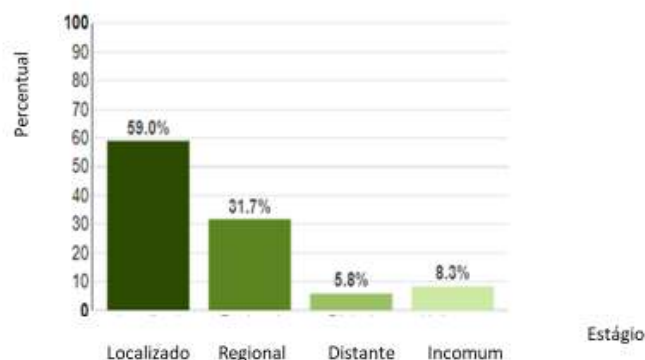


Figura 3. A figura se refere ao estágio do câncer de pulmão e percentual de sobrevida relativa em 5 anos por estágio. Adaptado de SEER 18 2010–2016, All Races, Both Sexes by SEER Summary Stage 2000.

O carcinoma de pequenas células representa, entre todos os tipos histológicos de câncer de pulmão, aproximadamente, 10 a 15% do total e sua taxa de sobrevida relativa em cinco anos é de aproximadamente 15,7%¹⁵.

O CPCP é uma neoplasia agressiva, cuja detecção costuma ocorrer em estágio avançado, que possui associação com síndromes paraneoplásicas, metástases precoces, altas taxas de recorrência. O seu tratamento ainda permanece paliativo, constituído, principalmente, por esquemas de quimioterapia de primeira e segunda linhas e radioterapia¹⁵.

Essa natureza agressiva do CPCP é caracterizada por sua alta frequência mutacional e pelas poucas opções de tratamento disponíveis nas três últimas décadas¹⁵.

1.3 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE PULMÃO

Entre os fatores etiológicos bem estabelecidos, o cigarro é o principal, mas existem outros fatores que predispoem ao câncer de pulmão ou que agem sinergicamente com o tabaco¹⁵.

1.3.1 Fatores de risco modificáveis

1.3.1.1 Tabaco

O Tabaco é o principal fator de risco para câncer de pulmão. Fumantes têm 20 vezes mais chances de desenvolver câncer de pulmão, quando comparados a não fumantes; dez vezes mais chances de ter câncer de laringe e

de duas a cinco vezes mais chances de ter câncer de esôfago²². Cigarros que contém mentol promovem uma inalação mais profunda e representam um fator de risco importante. Charutos e cachimbos tem praticamente a mesma probabilidade para o desenvolvimento do câncer de pulmão²³.

A fumaça tóxica emitida pela ponta do cigarro aceso pelos fumantes é também chamada de poluição tabagística ambiental (PTA). É a maior responsável pela poluição em ambientes fechados, respondendo por cerca de 90% dos níveis de poluição do ar e 95% das substâncias cancerígenas transportadas pelo ar em bares e restaurantes utilizados como pontos de encontros sociais por jovens e adultos ²⁴.

O fumo passivo ou fumaça ambiental do tabaco pode aumentar o risco *de* desenvolver câncer de pulmão. Acredita-se que o fumo passivo cause mais de 7.000 mortes por câncer de pulmão a cada ano¹⁵.

Estudos comprovaram que as concentrações de nicotina, monóxido de carbono e alcatrão, principais elementos da fumaça do tabaco, são tóxicos para o sistema cardiovascular. Esses elementos podem estar mais concentrados nos ambientes fechados poluídos pela fumaça do tabaco do que na fumaça tragada pelos fumantes. O alcatrão, por exemplo, pode estar 5,3 vezes mais concentrado no ambiente, enquanto o monóxido de carbono e a nicotina alcançam níveis de 15 a 21 vezes maiores nos ambientes fechados. A nitrosamina (NPYR – N-nitrosopirrolidina), um importante elemento cancerígeno presente no tabaco, pode alcançar níveis até 10 vezes maiores nos ambientes afetados pela fumaça do tabaco²⁵.

Outra substância cancerígena pulmonar específica do tabaco chama-se NNK (4-(metilnitrosamino-1-)(3-piridil-1-)butanona) e pode ser identificada por

meio de exames de urina em fumantes. Estudos comprovaram que, a cada hora de exposição a essa substância, sua concentração aumenta em 6%. Outros resultados de pesquisas demonstraram que profissionais, como os garçons não fumantes, expostos à fumaça ambiental do tabaco em bares e restaurantes, apresentam duas vezes mais chances de desenvolverem câncer de pulmão do que não fumantes não expostos à poluição tabagística ambiental²⁶.

1.3.1.2 Radônio

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), o radônio é a segunda causa de câncer de pulmão nos Estados Unidos e a principal causa entre os não fumantes. O radônio é um gás radioativo que expõe os pulmões a pequenas quantidades de radiação²⁷.

O radônio (^{222}Rn) é um gás nobre formado a partir do rádio (^{226}Ra), que é um produto de decaimento do urânio (^{238}U). O urânio e rádio ocorrem naturalmente em solos e rochas. Outros produtos de decaimento do urânio e do tório incluem os isótopos torônio (^{220}Rn) e actinônio, (^{219}Rn). O gás radônio, cuja meia-vida tem 3,8 dias, emana de rochas e solos e tende a se concentrar em espaços fechados como minas subterrâneas ou casas²⁷.

Muitas águas minerais e termais contêm radônio, e as águas subterrâneas contêm mais radônio do que as superficiais devido à reposição constante, principalmente pelo decaimento do rádio. O radônio aparece também em alguns subprodutos do petróleo, concentrando-se especialmente nas linhas de produção do propano (pontos de ebulição próximos). Segundo a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP), cerca de 55% da radiação

incidente sobre o ser humano provém do radônio e de seus produtos de decaimento, mas a concentração desse gás no ar varia muito de lugar para lugar devido à variabilidade da composição do solo e das rochas²⁸.

Quando o gás radônio é inalado, partículas alfa densamente ionizantes, emitidas pelo decaimento dos produtos depositados de vida curta do radônio (²¹⁸Po e ²¹⁴Po) podem interagir com o tecido biológico levando a danos no DNA. Uma vez que uma única partícula alfa pode causar grandes danos genéticos a uma célula, é possível que os danos no DNA relacionados com o radônio ocorram em qualquer nível de exposição. Portanto, é improvável que exista um limiar de concentração abaixo do qual o radônio não cause potencialmente câncer de pulmão²⁷.

1.3.1.3 Amianto

Pessoas que trabalham com amianto, na extração em minas, fábricas têxteis, locais onde são manuseados materiais isolantes e em estaleiros, têm maior probabilidade de morrer de câncer de pulmão¹⁶.

O risco de desenvolver câncer aumenta em 90 vezes, caso o trabalhador exposto também seja fumante, pois o fumo potencializa o efeito do asbesto como promotor de câncer de pulmão. Estima-se que 50% dos indivíduos que tenham asbestose venham desenvolver câncer de pulmão^{15,16}.

A inalação destas fibras causa o desenvolvimento de fibrose intersticial pulmonar intensa, envolvendo reação inflamatória, produção de colágeno e formação de granuloma. Além disso, está associada com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no trato respiratório inferior, resultando em

estresse oxidativo. A produção elevada e contínua de ERO ou sua inadequada remoção pode suprimir o sistema de defesa antioxidante e ocasionar danos em moléculas celulares importantes, como proteínas e DNA, que futuramente podem resultar em câncer¹⁵.

Outros tipos de exposição ocupacional também aumentam o risco de câncer de pulmão, dentre eles, minerais radioativos (urânio) e os produtos químicos inalados, como: berílio, cádmio, sílica, cloreto de vinila, compostos de níquel, compostos de cromo, produtos de carvão, gás mostarda, éteres clorometil e escapamento de diesel¹⁵.

1.3.1.4 Arsênico

Estima-se que mais de 100 milhões de pessoas estejam expostas a altas concentrações de arsênio ($> 50 \mu\text{g L}^{-1}$) por meio da água potável, e milhões de indivíduos estão significativamente expostos ao arsênio por meio dos alimentos em todo o mundo. A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) classifica o arsênio como um carcinógeno do Grupo I, que é capaz de induzir tumores pulmonares malignos em humanos. O tipo mais comum de câncer de pulmão causado pela exposição ao arsênio é o carcinoma de células escamosas²⁹.

O arsênio causa alterações de telômeros, danos ao DNA, danos às vias de sinalização celular, disfunção na autofagia e danos epigenéticos.²⁹

1.3.2 Fatores de risco que não podem ser modificados

1.3.2.1 Radioterapia do tórax

Há um maior risco de desenvolver câncer de pulmão para pessoas que fizeram radioterapia no tórax por outros tipos de câncer, principalmente se foram fumantes¹⁵.

1.3.2.2 Poluição do ar

Nas cidades, a poluição do ar (especialmente perto de estradas com muito tráfego) parece proporcionar um ligeiro aumento para risco de câncer de pulmão. Este risco é muito menor do que o risco causado pelo tabagismo, mas alguns pesquisadores estimam que em todo o mundo cerca de 5% de todas as mortes por câncer de pulmão podem ser devido à poluição do ar exterior¹⁵.

Cohen *et al.* (2000),descreveram que pacientes expostos à poluição representam 5% da taxa de mortalidade por câncer de traqueia, brônquios e pulmão³⁰.

1.3.2.3 História pessoal ou familiar de câncer

Pacientes que já tiveram câncer de pulmão, ou que tem familiares de primeiro grau com câncer de pulmão, apresentam maior risco. A genética parece desempenhar um papel importante em algumas famílias³¹.

Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) associaram as regiões cromossômicas 5p15, 15q25-26 e 6q21 com risco aumentado de câncer de pulmão³¹. A região 5p15 codifica a transcriptase reversa da telomerase (TERT), envolvida na replicação celular. No desenvolvimento do câncer de pulmão, está associado a adenocarcinomas em fumantes e não fumantes³². Mutações no locus cromossômico 15q25-26 estão ligadas à dependência de nicotina e suscetibilidade ao câncer de pulmão³³. O locus cromossômico 6p21 regula a sinalização da proteína G, e suas variantes conferem risco aumentado em nunca fumantes³⁴. Estudos de GWAS nas populações chinesa e japonesa Han também encontraram um locus em 3q28, entre outros, relacionado com o aumento do risco de câncer de pulmão³¹.

Os tumores adquirem mutações condutoras genéticas intrínsecas, a maioria das quais envolve vias de sinalização celular, incluindo a família de proteínas ErbB (EGFR / HER1-4) e o gene do vírus do sarcoma de rato Kirsten GTP-ase (*K-ras*)³⁵. Mutações raramente ocorrem na mesma via de sinalização. Outras alterações genéticas e epigenéticas podem causar a inativação de genes supressores de tumor, como *p53*, *p16* e *PTEN*^{31,35}.

Algumas mutações têm associações consistentes com a histologia do tumor pulmonar; por exemplo, mutações de *EGFR* e *EML4-ALK* estão associadas à adenocarcinomas em não fumantes³⁵.

1.3.2.4 Doença Broncopulmonar Obstrutiva Crônica (DBPOC)

A DBPOC e o câncer de pulmão são causados pelo tabagismo. A DPOC é um fator de risco independente para o carcinoma de pulmão, particularmente

para o carcinoma de células escamosas³⁶. O câncer de pulmão é até cinco vezes mais provável de ocorrer em fumantes com obstrução ao fluxo de ar do que aqueles com função pulmonar normal³⁷.

A alta prevalência de câncer de pulmão na DBPOC sugere que pode haver mecanismos comuns, como envelhecimento prematuro dos pulmões (encurtamento de telômeros), predisposições genéticas para doenças ou fatores patogênicos comuns, como fatores de crescimento, ativação de vias intracelulares ou epigenética, produção de radicais livres, liberação de citocinas inflamatórias repressão dos mecanismos de reparo de DNA.³⁸

1.3.3 Fatores de risco de potencial incerto

1.3.3.1 Fumar maconha

Há razões para pensar que fumar maconha pode aumentar o risco de câncer de pulmão. A fumaça da maconha contém alcatrão e muitas das mesmas substâncias cancerígenas que estão na fumaça do tabaco. O alcatrão é o material sólido e pegajoso que permanece após a queima, que se acredita conter a maioria das substâncias nocivas da fumaça¹⁵.

Os cigarros de maconha (baseados) são normalmente fumados até o fim, onde o teor de alcatrão é o mais alto. A maconha é inalada profundamente e a fumaça é retida nos pulmões por muito tempo, o que dá a qualquer substância cancerígena maior oportunidade de se depositar nos pulmões. Como a maconha é ilegal em muitos lugares, pode não ser possível controlar quais outras substâncias ela contém. Além disso, em estudos que analisaram o uso anterior

de maconha em pessoas com câncer de pulmão, a maioria dos fumantes de maconha também fumava cigarros. Isso pode tornar difícil saber quanto pode ser qualquer risco aumentado do tabaco e quanto pode ser da maconha¹⁵.

1.3.3.2 Cigarros eletrônicos

Os cigarros eletrônicos são um tipo de sistema eletrônico de liberação de nicotina. Eles não contêm nenhum tabaco, mas a *Food and Drug Administration* (FDA) os classifica como produtos de “tabaco”. Os cigarros eletrônicos são relativamente novos e mais pesquisas são necessárias para saber quais podem ser os efeitos em longo prazo, incluindo o risco de desenvolver câncer de pulmão³⁹.

A tecnologia eletrônica para entrega de nicotina ao epitélio pulmonar através de um dispositivo eletrônico tornou-se disponível para venda em 2007. O mecanismo básico consiste em uma serpentina de aquecimento operada por bateria que aquece o fluido contido em um cartucho substituível, geralmente uma mistura de aromatizantes, um solvente, e nicotina líquida³⁹. Com o aquecimento, ele produz um vapor de aerossol que é inalado pelo fumante, ou Vaper. Os aerossóis contendo nicotina podem atingir o pico dos níveis séricos de nicotina em menos de 5 minutos³⁹. Os ENDS, também chamados de cigarros eletrônicos ou e-cigarros, evoluíram em um ritmo rápido na última década, com 466 marcas e milhares de aromatizantes disponíveis em 2014.³⁹

A diversidade de produtos disponíveis, bem como as variações individuais nas práticas de vaporização tornaram difícil avaliar com eficácia a segurança

desses dispositivos e seu uso. A disparidade em conteúdo e qualidade dos cartuchos, especialmente, é substancial⁴⁰.

As partículas no vapor do cigarro eletrônico são diferentes daquelas nos cigarros de tabaco tradicionais, mas os dados disponíveis sugerem que o formaldeído, o acetaldeído e as espécies reativas de oxigênio estão presentes em concentrações suficientes para causar danos inflamatórios às vias aéreas e ao epitélio pulmonar. Partículas microscópicas de e-cigarros podem se depositar nos bronquíolos distais ou alvéolos.³⁹

O aerossol do cigarro eletrônico também pode conter hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e traços de metais, embora as concentrações variem. Além disso, a nicotina está presente no vapor do cigarro eletrônico e pode causar novos vícios em usuários que ainda não são fumantes⁴¹.

1.3.3.3 Talco

O talco é um mineral que em sua forma natural pode conter amianto. Alguns estudos sugeriram que os mineiros de talco e pessoas que operam moinhos de talco podem ter um risco maior de câncer de pulmão e outras doenças respiratórias por causa de sua exposição ao talco de grau industrial. Mas outros estudos não encontraram um aumento na taxa de câncer de pulmão. O uso de pó de talco cosmético não mostrou aumentar o risco de câncer de pulmão¹⁵.

1.3.3.4 Papiloma Vírus Humano (HPV)

A possibilidade de que o papilomavírus humano (HPV) contribua para a patogênese do câncer de pulmão como um co-carcinógeno é intrigante. O carcinoma espinocelular brônquico se desenvolve por meio de lesões precursoras bem definidas, geralmente nos locais de metaplasia escamosa. Os papilomas de células escamosas benignos são raros, mas o DNA do HPV foi encontrado em quase metade dos estudados, implicando em uma associação causal⁴⁴.

O papel do HPV tem sido pouco investigado em relação ao câncer de pulmão. Alguns autores sugerem uma correlação em função de algumas evidências. Uma delas consiste no fato de papilomas de células escamosas terem apresentado DNA do HPV em casos estudados, implicando em uma associação causal⁴². Outro fato é que os tumores de pulmão apresentavam semelhanças morfológicas com os cânceres anogenitais causados pelo HPV⁴³. Se for considerado o fato de que vários estudos demonstraram uma associação sinérgica de tabagismo e tipos de HPV de alto risco com câncer de cabeça e pescoço, é possível que o tabaco e a infecção por HPV também possam interagir para o desenvolvimento do câncer brônquico⁴⁴.

Além disso, brônquios com múltiplos focos de epitélio escamoso metaplásico sugerem que há uma zona de transformação, tal como ocorre no colo uterino e, portanto, hipoteticamente, essa zona de transformação poderia abrigar lesões precursoras por HPV⁴⁴.

1.4 EMBRIOGÊNESE PULMONAR

A caracterização das diferentes populações de progenitores no pulmão humano em desenvolvimento é uma parte essencial da medicina regenerativa, particularmente porque seu potencial terapêutico pode ser diferente em relação às células-tronco adultas⁴⁵.

Se, no futuro, devemos ajudar os pacientes no tratamento de doenças do tecido pulmonar, então precisamos entender em detalhes como o pulmão humano se desenvolve e, em particular, como as várias populações de células em desenvolvimento contribuem a nível molecular e celular para a criação de tal órgão complexo⁴⁵. Os tipos celulares, suas alterações e controles moleculares contribuem para o reconhecimento da provável célula de origem das neoplasias⁴⁵.

1.4.1 Fases do desenvolvimento pulmonar

O desenvolvimento pulmonar é subdividido em três períodos principais: o período embrionário, o período fetal e o período de desenvolvimento pulmonar pós-natal^{45,46}.

Para cumprir a tarefa de troca gasosa, o pulmão possui uma enorme superfície interna e um sistema de condução das vias aéreas em forma de árvore, ventilando a área de troca gasosa. Durante o desenvolvimento pulmonar, primeiro são formadas as vias aéreas condutoras, seguidas pela formação e alargamento da área de troca gasosa, sendo que a alveolarização continua após o nascimento⁴⁶.

A organogênese pulmonar faz parte do período embrionário (4-7 semanas gestacionais). Enquanto o desenvolvimento pulmonar fetal consiste nos estágios pseudoglandular, canalicular e sacular. O período pulmonar pós-natal compreende os estágios de alveolarização clássica e contínua, bem como de maturação microvascular. Como a maioria dos processos durante o desenvolvimento pulmonar começa em área proximal e se estende para a periferia, todas as fases do desenvolvimento pulmonar se sobrepõem^{45,46}.

No período de organogênese, o pulmão esquerdo e o direito têm sua própria anlage ou tecido primordial, uma bolsa externa do intestino anterior⁴⁷. Cada broto pulmonar inicia um processo repetitivo de crescimento e ramificação, chamado de morfogênese ramificada, que formará todas as futuras vias aéreas, principalmente durante o estágio pseudoglandular⁴⁸.

O estágio pseudoglandular ocorre entre 5-17 semanas gestacionais com a ramificação e formação da árvore brônquica. O pulmão parece uma glândula tubular, o que dá nome a essa fase^{47,48}.

A ramificação é coordenada através das células epiteliais e mesenquimais e fatores de crescimento e de transcrição que as células estão produzindo. As células epiteliais são sustentadas por uma membrana basal e circundadas por uma matriz extracelular, que é produzida pelas células mesenquimais. Os componentes da matriz extracelular, incluindo a membrana basal, são diferentes no botão terminal, nos pontos de ramificação e nas partes mais proximais da árvore brônquica, onde a diferenciação epitelial já começou⁴⁸.

A expressão de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF-10), proteína morfogênica óssea 4 (BMP-4), Sonic Hedgehog (Shh), ácido retinóico, Notch e TGF- β proporcionam as instruções

para a ramificação no período de morfogênese. Durante esse processo, os tubos epiteliais passam por círculos repetitivos de ramificação e crescimento no mesênquima circundante^{47,49,50}. O desenvolvimento pulmonar depende de estímulos mecânicos. Por volta da 10ª semana, iniciam os movimentos respiratórios que causam o alongamento adicional do tecido pulmonar fetal⁵¹. Estes estímulos regulam positivamente a liberação de serotonina, promovendo a diferenciação epitelial⁵².

Uma camada contínua de células positivas para actina de músculo liso α começa a se formar em torno das futuras vias aéreas mais proximais, tornando-se descontínua nas partes mais distais da árvore brônquica e terminando na frente dos botões terminais. Essas células contráteis começam a realizar contrações espontâneas, empurrando ondas peristálticas de fluido interbrônquico para a periferia, causando uma extensão rítmica das vias aéreas distais, incluindo os botões terminais. Esses movimentos estimulam a morfogênese ramificada e previnem a expansão descontrolada das vias aéreas à medida que o líquido pulmonar é secretado para o pulmão⁵³.

O estágio canalicular ocorre entre 16-26 semanas gestacionais e compreende a diferenciação do epitélio que permite a distinção morfológica entre as vias respiratórias (ácino/unidade ventilatória)^{45,46}.

Na junção do ducto bronquioalveolar (BADJ), ocorre uma mudança abrupta do epitélio de células ciliadas e de células claras para células epiteliais alveolares tipo I e tipo II⁵⁴. Esta junção é formada durante o estágio canalicular, quando ocorre a diferenciação epitelial e é de particular importância, porque representa um nicho de células-tronco⁵⁵. Muito recentemente, foi demonstrado que a junção bronquioalveolar permanece constante ao longo do

desenvolvimento pulmonar no local, ou melhor, na geração das vias aéreas, onde foi originalmente formada⁵⁶.

O estágio sacular, entre 24-38 semanas gestacionais, representa um estágio intermediário, quando a morfogênese da ramificação cessa e a alveolarização ainda não começou, o que é regulado geneticamente⁴⁷. No início do estágio sacular, os alvéolos apresentam revestimento por células tipo 1 e tipo 2^{45,47,57}.

No final do estágio sacular, o mesênquima localizado entre as futuras vias aéreas contém uma rede vascular tridimensional em proliferação, devido à intensa angiogênese, resultando em uma alta densidade capilar. As futuras vias aéreas que se transformarão em ductos alveolares começam a crescer em largura e comprimento, mudam de forma e aparecem como "canalículos", que formam a canalização do mesênquima pelas vias respiratórias e capilares⁴⁵.

O crescimento das vias aéreas causa uma condensação do mesênquima. A morte celular programada (apoptose) contribui para a condensação do mesênquima, onde não apenas o volume, mas também o número total de células mesenquimais é reduzido⁵⁸. (Figura 4)

Estágios do Desenvolvimento Pulmonar

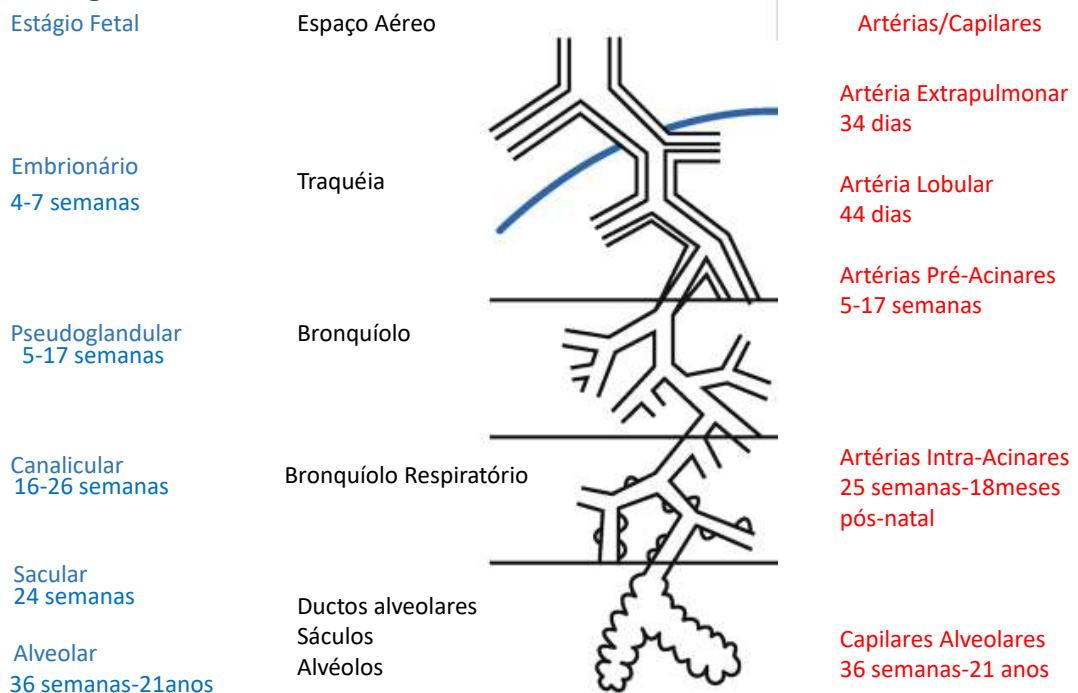


Figura 4. Estágios do desenvolvimento normal de espaços aéreos e vasos do pulmão. Adaptado de Schittny,2017

Em paralelo à alveolarização, a rede capilar de camada dupla dos septos imaturos se funde a uma rede de camada única, resultando em uma configuração otimizada para troca gasosa. A alveolarização ainda continua, porque, em locais onde novos septos estão se desprendendo de septos maduros preexistentes, a segunda camada capilar necessária será formada instantaneamente por angiogênese. Este último confirma uma capacidade vitalícia de alveolarização, o que é importante para qualquer tipo de regeneração pulmonar⁴⁷.

O mesoderma do pulmão representa uma fonte de sinais instrutivos parácrinos essenciais que regulam a proliferação e diferenciação do progenitor da endoderme e também contribui para as várias estruturas do pulmão, incluindo músculo liso das vias aéreas, músculo liso vascular, células endoteliais, células

mesoteliais e muitas linhagens mesodérmicas menos conhecidas, como pericitos, fibroblastos alveolares e lipofibroblastos. Acredita-se que o mesoderma do pulmão se origine do mesoderma inicial que circunda o intestino anterior ventral⁴⁵.

1.4.2 Tipos celulares pulmonares

1.4.2.1 Células pulmonares embrionárias

O epitélio pulmonar embrionário começa a sua diferenciação em células secretoras ciliadas, células caliciformes, células claras, células basais e neuroendócrinas (NE). As proporções dessas células variam ao longo do eixo proximal-distal. Nos bronquíolos, as células claras são mais abundantes que as ciliadas, havendo alguns agrupamentos de células NE, chamados de corpos neuroepiteliais ou NEBs⁵⁹. As células caliciformes são marcadas pela expressão do fator de transcrição SPDEF e mucina-5ac (Muc5ac)⁶⁰.

As células neuroendócrinas (NE) são as primeiras células epiteliais a surgirem no pulmão e são mais abundantes nos pulmões fetais e neonatais, sugerindo seu papel no desenvolvimento pulmonar. As NE são derivadas de uma população de progenitores epiteliais multipotentes, marcados pela expressão do fator de transcrição hélice-alça-hélice básico ID2. Essas células têm a capacidade de dar origem a todos os principais tipos de células epiteliais respiratórias, incluindo PNECs (células neuroendócrinas pulmonares)⁶⁰.

As evidências sugerem que a especificação do destino das PNECs é controlada por interferência entre genes ativadores e repressores de bHLH, um mecanismo conservado entre *Drosophila* e mamíferos⁶¹.

Todos os eventos iniciais no desenvolvimento pulmonar são controlados por uma variedade de vias de sinalização, incluindo Fgf, Tgfb, Wnt, SOX, Hedgehog, Notch e ácido retinóico^{62,63}.

O complexo ASCL1 ativa a diferenciação de NE, enquanto o gene *HES 1* reprime essa via, inibindo a formação do complexo ASCL1/TCF3⁶³.

A sinalização Notch também se mostrou importante na especificação da linhagem PNEC. O ligante Notch delta-like 1 (DLL1) é expresso em células NE nas vias respiratórias proximais. Sua atividade pode estar sob o controle de ASCL1. Notch 2 medeia o destino das células claras ciliadas⁶³.

1.4.2.2 Células pulmonares do adulto

As células epiteliais pulmonares são amplamente subdivididas em vias aéreas (traqueal/bronquiolar) e tipos alveolares. As vias aéreas traqueobrônquicas são revestidas por epitélio pseudoestratificado no qual cada célula entra em contato com a membrana basal. Abaixo da membrana basal estão vasos sanguíneos e linfáticos, músculo liso, cartilagem, fibroblastos e nervos⁶⁴.

As vias aéreas de condução intrapulmonares mais distais são revestidas por epitélio colunar simples. A troca gasosa é realizada dentro do epitélio alveolar⁶⁴.

As PNECs representam apenas 0,4% das células epiteliais no adulto e tem propriedades de células endócrinas e neuronais expressam marcadores neurais, como moléculas de adesão de células neurais NCAM1 e ASCL1⁶⁴. As PNECs estão associadas às fibras nervosas intraepiteliais e podem transmitir sinais ao sistema nervoso central. Geralmente, contém vesículas eletrondensas, que acumulam peptídeos, relacionados ao gene calcitonina (*CGRP*), que atua como vasodilatador, ao gene da bombesina; e às aminas, representadas pela serotonina, que atua como vasoconstritor. As funções da PNECs incluem o controle do tônus das vias aéreas, fluxo sanguíneo pulmonar e imunomodulação⁶⁴.

As células em escova constituem menos de 1% do epitélio das vias aéreas e, recentemente, demonstrou-se que elas podem ter um papel quimiossensorial que pode permitir a detecção de infecções bacterianas^{65,66}.

As células basais são células-tronco que se auto-renovam e se diferenciam em células secretoras e ciliadas durante a homeostase e reparo^{67,68}. As células secretoras são predominantemente do subtipo mucoso. Não está claro se as células secretoras de muco retêm a capacidade de proliferar e funcionar como células-tronco / progenitoras⁶⁷.

O epitélio alveolar consiste em células alveolares tipo I e tipo II (células AT1 e AT2) que são circundadas por capilares e fibroblastos⁶⁹. As células AT1 são planas, altamente estendidas e especializadas para a troca gasosa, pois cobrem mais de 95% da área da superfície de troca gasosa. As células AT2 são cuboidais, mais comuns e especializadas na produção de surfactante, uma mistura complexa de proteínas e fosfolípidios que diminui a tensão superficial na região alveolar^{64,69}. As células AT2 são as principais células-tronco epiteliais

alveolares, pois podem se auto-renovar e se diferenciar em células AT1^{62,64}. Tradicionalmente, os fibroblastos alveolares têm sido caracterizados, principalmente, como miofibroblastos e lipofibroblastos, mas seus papéis exatos ainda não foram definidos e há até mesmo, controvérsia sobre a existência de lipofibroblastos nos pulmões humanos⁷¹. O pulmão também contém uma população residente de células imunes e macrófagos alveolares, que têm funções importantes na homeostase do surfactante e na imunidade inata.⁷¹

1.4.2.3 Regulação molecular na embriogênese

Atualmente, pouca informação está disponível sobre a regulação molecular do desenvolvimento do pulmão humano. Uma linha chave de investigação é a clonagem de genes mutantes de pacientes humanos com doença pulmonar congênita e investigação do mecanismo da função do gene, usando camundongos geneticamente alterados⁷².

As células-tronco pluripotentes (PSCs) podem ser derivadas da massa celular interna do embrião inicial (no caso de células-tronco embrionárias, ESCs) ou podem ser reprogramadas a partir de células totalmente diferenciadas (no caso de iPSCs). Eles retêm o potencial de se diferenciar em cada tipo de célula do corpo⁷².

As células basais podem funcionar como células-tronco específicas do epitélio condutor das vias aéreas. No entanto, ainda não se sabe como funciona a autorrenovação e diferenciação das células basais e se ela envolve a divisão celular assimétrica como outras células-tronco. Os mecanismos moleculares de autorrenovação e diferenciação das células basais são pouco compreendidos,

mas evidências recentes apontam para um papel importante da sinalização Notch na promoção do destino das células secretoras sobre o destino das células epiteliais ciliadas^{72,73}.

Estudos recentes começaram a elucidar a sinalização celular e as vias de expressão gênica, incluindo Pten, proteína quinase C (iota), Wnt, hedgehog, c-kit, Akt e outros que podem desempenhar um papel na transformação de células progenitoras endógenas em células de câncer de pulmão⁷³.

O fator de transcrição Sox2 marca progenitores epiteliais proximais e o Sox9 marca os progenitores epiteliais distais. Os marcadores adicionais das células progenitoras distais Sox9 + incluem proteínas surfactantes, como a proteína surfactante C (Sftpc), o fator de sinalização secretado Bmp4 e o fator de transcrição Id2. Estudos de rastreamento de linhagem sugeriram que células distais Id2 + podem gerar linhagens celulares distais e proximais. Essa capacidade de diferenciação multipotente é perdida, posteriormente, e as células progenitoras Id2 + podem formar apenas epitélios alveolares distais⁷³.

Experimentos de rastreamento de linhagem celular demonstraram que o mesoderma contém um progenitor mesoderma cardiopulmonar (CPP) que pode gerar derivados mesodérmicos cardíacos e pulmonares, incluindo cardiomiócitos, endocárdio, músculo liso vascular pulmonar e das vias aéreas e células semelhantes a pericitos pulmonares que expressam crescimento derivado de plaquetas receptor- β do fator (PDGFR- β) 4. A análise clonal de célula única mostra que os CPPs podem gerar clonalmente as vias aéreas e o músculo liso vascular, bem como o endotélio proximal que expressa o fator de von Willebrand da glicoproteína (vWF), demonstrando que essas linhagens

estão inter-relacionadas e que os CPPs são multipotentes no desenvolvimento inicial do pulmão^{73,74}.

1.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE PULMÃO

A essência da medicina personalizada visa adaptar o tratamento individual do câncer de pulmão com base na classificação histológica precisa e nas informações de biomarcadores. Portanto, a caracterização do tipo histológico do câncer de pulmão desempenha um papel cada vez mais importante no diagnóstico e tratamento. A classificação histopatológica adequada e o teste molecular permitem a seleção do tipo de regime de tratamento. Com a biologia molecular é possível definir, atualmente, aspectos genéticos e identificar qual tumor será submetido à terapia adjuvante, proporcionando melhora na sobrevida de pacientes em estágio avançado⁷⁵.

Reconhecendo a diversidade biológica do câncer de pulmão, uma classificação abrangente e precisa das neoplasias foi desenvolvida. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a nova classificação histológica para as neoplasias pulmonares⁷⁵. (Tabela 1)

WHO 2015

Tabela1 - Classificação histológica OMS dos tumores Pulmonares

Tumores epiteliais Códigos	CID-O
▪ Adenocarcinoma	8140/3
○ Adenocarcinoma lepidico	8250/3
○ Adenocarcinoma Acinar	8551/3
○ Adenocarcinoma papilar	8260/3
○ Adenocarcinoma micropapilar	8265/3
○ Adenocarcinoma sólido	8230/3
○ Adenocarcinoma mucinoso invasivo	8253/3
▪ Adenocarcinoma mucinoso e não-úcinos misto	8254/3
○ Adenocarcinoma colóide	8480/3
○ Adenocarcinoma fetal	8333/3
○ Adenocarcinoma entérico	8144/3
○ Adenocarcinoma minimamente invasivo	8256/3
▪ Não-mucinosos	
▪ Mucinous	8257/3
▪ Lesões pré-invasivas	
▪ Hiperplasia adenomatosa atípica	8250/0
▪ Adenocarcinoma in situ	8140/2
▪ Não-mucinosos	8250/2
▪ Mucinous	8253/2
▪ Carcinoma de células escamosas	8070/3
○ Carcinoma de escamoso queratinizante	8071/3
○ Carcinoma escamoso nãoqueratinizador	8072/3
○ Carcinoma de células escamosas basalóides	8083/3
○ Lesão pré-invasiva	
▪ Carcinoma de células escamosas in situ	8070/2
Tumores neuroendócrinos	
○ Carcinoma de células pequenas	8041/3
▪ Carcinoma de pequenas células combinado	8045/3
○ Carcinoma neuroendócrino de grandes células	8013/3
▪ Carcinoma neuroendócrino de células grandes combinados	8013/3
○ Tumores carcinoide	
▪ Carcinoide	8240/3
▪ Carcinoide atípico	8249/3
○ Lesão pré-invasiva	
▪ Hiperplasia de células neuroendócrinas típico idiopáticas difusas	8040/0
▪ Carcinoma de grandes células	8012/3
▪ Carcinoma adenoescamoso	8560/3
▪ Carcinoma pleomórfico	8022/3
▪ Carcinoma de células de fuso	8032/3
▪ Carcinoma celular gigante	8031/3
▪ Carcinosarcoma	8980/3
▪ Blastoma pulmonar	8972/3
▪ Outros carcinomas não classificados	
○ Carcinoma parecido com lymphoepithelioma	8082/3
○ Carcinoma nut	8023/3
▪ Tumores do tipo glândula salivar	
○ Carcinoma mucoepidermóide	8430/3
○ Carcinoma adenoide cístico	8200/3
○ Carcinoma epitelial mioepitelio	8562/3
○ Adenoma pleomórfico	8940/0

○ Papiloma de células escamosas	8052/0
▪ Exofítico	8052/0
▪ Invertido	8053/0
○ Papiloma glandular	8260/0
○ Papiloma escínico misto e glandular	8560/0
▪ Adenomas	
○ Pneumocitoma esclerótico	8832/0
○ Adenoma alveolar	8251/0
○ Adenoma papilar	8260/0
○ Cistadenoma mucinoso	8470/0
○ Adenoma da glândula mucosa	8480/0
Tumores mesenquimais	
▪ Hamartoma pulmonar	8992/0
▪ Condroma	9220/0
▪ Tumores PECOMAS	9174/1
○ Linfangioleiomiomatose	8714/0
○ PEComa, benigno	8005/0
▪ Tumor celular claro	8714/3
○ PEComa, maligno	8827/1
▪ Tumor miofibroblástico peribronquial congênito	
▪ Linfematoses pulmonares difusas	
▪ Tumor miofibroblástico inflamatório	8825/1
▪ Hemangioendothelioma epitelióide	9133/3
▪ Blastoma pleuropulmonar	8973/3
▪ Sarcoma sinovial	9040/3
▪ Sarcoma intimal da artéria pulmonar	9137/3
▪ Sarcoma myxóide pulmonar com translocação <i>EWSR1-CREB1</i>	8842/3
▪ Tumores mioepiteliais	
○ Mioepitelioma	8982/0
○ Carcinoma mioepitelial	8982/3
Tumores linfoproliferativos	
▪ Linfoma de zona marginal extranodal de tecido linfóide associado a mucosa (linfoma MALT)	9699/3
▪ Linfoma difuso de grandes células B	9680/3
▪ Granulomatose linfomatoide	9766/1
▪ Linfoma intravascular grande célula B	9712/3
▪ Histiocitose celular de Langerhans pulmonar	9751/1
▪ Doença de Erdheim-Chester	9750/1
Tumores de origem ectópica	
▪ Tumores de células germinativas	
○ Teratoma, maduro	9080/0
○ Teratoma, imaturo	9080/1
○ Timoma intrapulmonar	8580/3
○ Melanoma	8720/3
○ Meningioma	9530/0
Tumores metastáticos	

Nota da CID-O: o comportamento é codificado: /0 para tumores benignos; /1 por comportamento não especificado, limitrofe ou incerto; /2 para carcinoma in situ e neoplasia intraepitelial grau III; e /3 para tumores malignos

Fonte: Adaptado de Travis: Who classification of tumors of lung, pleura, thymus and Heart 4th edition, 2015.

Em classificações anteriores da OMS, os tumores carcinoides, o carcinoma pulmonar de pequenas e o de grandes células, eram classificados em grupos separados. No entanto, na classificação atual, eles fazem parte de um mesmo grupo, o de neoplasias neuroendócrinas⁷⁵.

Apesar desses tumores fazerem parte de um mesmo grupo, os tumores carcinoides têm grandes diferenças clínicas, epidemiológicas, histológicas e genéticas, quando comparados com o carcinoma de pequenas e de grandes células. Os pacientes com carcinoides são, significativamente, mais jovens, têm um prognóstico melhor e não apresentam forte associação com o tabagismo. Tumores carcinoides também têm muito poucas anormalidades genéticas em comparação com CPCP e com carcinoma de grandes células⁷⁶.

Por outro lado, carcinomas de pequenas e grandes células têm taxas mitóticas muito mais altas, maior índice de necrose e podem mostrar combinações com outros tipos de neoplasias pulmonares, como o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas⁷⁷.

Todos os tumores neuroendócrinos do pulmão foram reunidos em um único grupo e categorizados em quatro subgrupos (Tabela 2)⁷⁵.

Tabela 2 - Subgrupo de neoplasias neuroendócrinas

Carcinoma Neuroendócrino de pequenas Células	Carcinoma Neuroendócrino de Grandes Células	Tumores carcinoides	Lesões-Pré-Invasivas
Carcinoma de Pequenas células Combinado	Carcinoma neuroendócrino de Grandes Células Combinado	Carcinoide Típico(CT) e Carcinoide Atípico(CA)	DPENECH(Hiperplasia Neuroendócrina,Tumorlets)

Fonte: Adaptado de Travis: Who classification of tumors of lung, pleura, thymus and Heart 4th edition, 2015.

Na classificação da OMS de 2015, tornou-se relevante a contagem do número de mitoses para o diagnóstico diferencial de lesões neuroendócrinas. A contagem de mitoses passou a ser realizada em áreas com maior atividade mitótica, tendo como parâmetro áreas de 2 mm² ⁷⁸, considerando o número médio de mitoses em pelo menos três áreas diferentes com alta magnificação. Mitoses e extensão de necrose devem ser sempre indicadas em casos de tumores neuroendócrinos, incluindo tumores carcinóides.⁷⁵

Embora em muitos casos os tumores CPCP e tumores carcinóides possam ser diagnosticados em material tumoral de boa qualidade com uma secção corada pela hematoxilina e eosina ou em amostras citológicas bem preservadas, a imuno-histoquímica é muito útil no diagnóstico de tumores neuroendócrinos pulmonares. Tanto que o papel do Ki-67 representa o meio diagnóstico na diferenciação do CPCP de alto grau do carcinoma de grandes células e dos tumores carcinóides, especialmente em pequenas biópsias com células tumorais esmagadas e/ou necrosadas^{79,80}.

O diagnóstico diferencial entre os quatro tipos histológicos de neoplasias neuroendócrinas foi resumido por Zheng e cols.⁸¹ (Tabela 3).

Tabela 3 - Diagnóstico diferencial de neoplasias neuroendócrinas.

	Carcinoide Típico	Carcinoide Atípico	CPCP	Carcinoma de grandes células
Morfologia	Células monótonas, arranjo em ninhos organoides, rosetas, paliçadas, trabéculas	Células monótonas, arranjo em ninhos organoides, rosetas, paliçadas, trabéculas	Células pequenas, cromatina finamente granular, núcleos inconspícuos, citoplasma escasso	Células grandes, nucléolo frequentemente, auge, citoplasma amplo
Mitoses/2 mm quadrados	<2	2-10	>10, usualmente >60	>10, usualmente >30
KI67	>ou= 4-5%	<ou=20-25%	>50%	Usualmente >40%
Necrose	Não	Focal ou pontual	Presente, as vezes extensa	Presente, as vezes extensa
De marcador Neuroendócrino	Sim	Sim	Sim, raramente negativa	Sim
Grau	Baixo	Intermediário	Alto	Alto

Fonte: Adaptado de Zheng e cols. (2016).

1.6 MORFOLOGIA DO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO

1.6.1 Histórico

As lesões neuroendócrinas foram definidas em 1938 por Feyter, através da observação de tumores com função secretória e com características anatômicas e morfológicas similares. Pearson criou, 35 anos após, a designação de sistema APUD (*Anina Precursor Uptake and Decarboxylation*) para descrever as características bioquímicas dessas lesões, que teriam origem em remanescentes da crista neural. Azzopardi, num estudo com 100 casos do que ele chamou de "carcinoma de células de aveia", baseado em 16 casos cirúrgicos e 84 casos de material de autópsia, afirmou que o carcinoma de células de aveia

tem características estruturais que identificam esse tumor, incluindo a formação de ninhos celulares, correntes, fitas, rosetas e ductulos⁸². Em 1962, Kreyberg propôs os tipos de células de aveia e células poligonais⁸².

Revisões nosológicas foram feitas ao longo dos anos e alguns termos foram criados para esse tipo de lesão, entre eles, tumor de células de ilhotas, adenoma brônquico, carcinoide, carcinoide atípico, carcinoma de células de Kulchiltsky, argentafinoma, carcinoma endócrino atípico e carcinoma de pequenas células⁸².

A primeira classificação da OMS para CACP foi publicada em 1967 e baseada na descrição morfológica original de Barnard que incorporou quatro subtipos histológicos: células semelhantes a linfócitos, células poligonais, fusiformes e outros. Em 1968, o sistema de estadiamento foi introduzido pelo *Veterans Administration Cancer Study Group* em dois subgrupos clínicos: o de doença limitada, confinada ao hemitórax, e o grupo de doença extensa⁸⁴.

Em 1977, Gould introduziu os termos neuroendocrinomas e carcinomas neuroendócrinos, traçando uma analogia desses tumores com os neoplasmas do sistema celular APUD (captação e descarboxilação do precursor de amina) e suas atividades secretoras aberrantes⁸⁴.

Na segunda classificação da OMS, de 1981, o termo semelhante a linfócitos foi alterado para "oat cell", e os tipos poligonal, fusiforme e mistos foram incluídos no título "intermediário". Outra categoria descrita foi a de carcinomas "combinados", para indicar combinações de elementos escamosos e glandulares malignos. A criação de um subtipo 'intermediário' na classificação da OMS de 1981 não foi reproduzível. Não era possível ter absoluta certeza se as neoplasias eram CACP ou carcinomas pulmonares de não pequenas células. A

reprodutibilidade era pobre entre patologistas e não estava claro se havia qualquer implicação clínica relevante para esta categoria⁷⁵.

Em 1988, o IASLC (Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão) propôs uma modificação adicional, incluindo *oat cell* e subtipos de células intermediárias na categoria de pequenas células. Foi proposto que o CPCP combinado com grandes células fosse definido como uma categoria separada de outros CPCP mistos, como o CPCP combinado com componentes de células escamosas e/ou adenocarcinoma⁸⁵.

Essas classificações anteriores geraram muita polêmica e debate. A falta de reprodutibilidade confundiu os patologistas, pois diversos estudos não conseguiram demonstrar uma relação consistente entre o subtipo histológico e o resultado clínico do paciente⁸⁵.

A classificação de 1999 da OMS / IASLC de tumores de pulmão descreveu os subtipos "mistos" e "combinados" em CPCP, definidos como puro ou combinado com elementos de não pequenas células (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, grandes células, células fusiformes ou células gigantes) ⁸⁵

A classificação atual reconhece apenas dois subtipos: CPCP puro e CPCP combinado. Os patologistas precisam fazer um diagnóstico mais preciso possível entre carcinomas de pequenas e grandes células. Se houver incertezas em um caso difícil, as questões desafiadoras devem ser refletidas, estudadas e um comentário adicionado ao diagnóstico⁷⁵. (Tabela 4).

Tabela 4 - Subclassificação histórica do carcinoma de pequenas células do pulmão.

Kreyberg 1962 ⁷¹	WHO 1967 ⁷²	1973 WP-L WHO 1981 ³⁴	IASLC 1998 ⁷³	WHO / IASLC 1999 ⁷⁴	WHO 2004 ¹⁰
Célula de aveia poligonal	Linfócitos do tipo poligonal fusiforme Outro (contendo focos escamosos e glandular)	Célula de aveia intermediária combinada	Puro SCLC misturado (com células grandes) Combinado	SCLC Combinado SCLC (contendo qualquer outro componente NSCLC)	SCLC Combinado SCLC (contendo qualquer outro componente NSCLC)

Fonte: Adaptado Travis 2012

1.6.2 Aspectos morfológicos do carcinoma de pequenas células do pulmão

A separação do carcinoma pulmonar de pequenas células (CPCP) do carcinoma pulmonar de não pequenas células (CNPCP) é uma distinção crítica no diagnóstico do câncer de pulmão. O diagnóstico de CPCP é mais comumente realizado em pequenas biópsias e espécimes citológicos, e os patologistas precisam estar familiarizados com a morfologia e combinações frequentes com elementos de CNPCP, que podem ser vistos, com maior facilidade em espécimes maiores⁸⁶.

Os CPCPs localizam-se, preferencialmente, em bronquíolos médios, formando um nódulo ou uma massa central brônquica ou hilar, friável, de coloração branco-acinzentada com hemorragia e necrose. A apresentação como nódulos periféricos são menos frequentes e tendem a ser circunscritos, com superfície de corte carnuda⁷⁵.

Pela microscopia óptica, o CPCP é definido como um tumor composto por células ovais, redondas ou fusiformes, com citoplasma escasso, cromatina finamente granular, nucléolos ausentes ou inconspícuos e moldagem nuclear.

Artefatos de esmagamento e necrose são frequentes e extensos. Os índices mitóticos são altos (80 mitoses por 2mm quadrados de área)^{77,86}.

O padrão de crescimento da neoplasia pode ser representado por rosetas, paliçadas periféricas, ninhos organoides, fitas, túbulos ou ductulos. Um padrão pseudoglandular pode estar presente⁷⁵.

Incrustações basofílicas das paredes dos vasos por DNA a partir de células tumorais necróticas, conhecidas como efeito Azzopardi, podem ser vistas. Em alguns casos, a falta de coesividade entre as células pode causar confusão diagnóstica com linfoma⁸².

Até 30% das autópsias em pacientes com CPCP revelam áreas de diferenciação com características de carcinoma não de pequenas células. Esse achado é mais comumente detectado em amostras de pacientes previamente tratados e sugere que a carcinogênese pulmonar ocorre em uma célula-tronco pluripotente capaz de se diferenciar ao longo de vias divergentes⁸⁷.

1.6.3 Carcinoma de pequenas células pulmonar combinado

O carcinoma pulmonar combinado de pequenas células (C-CPCP) é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como carcinoma de pequenas células (CPCP) combinado com componentes adicionais, que consistem em qualquer um dos tipos histológicos de carcinoma pulmonar não-pequenas células (CNPCP); geralmente adenocarcinoma (ADC), carcinoma escamoso-celular (CCS), carcinoma neuroendócrino de grandes células ou, menos comumente, carcinoma de células gigantes ⁷⁵.

Quando o ADC, o CCS ou o carcinoma sarcomatoide são combinados com o CPCP, o C-CPCP é diagnosticado independentemente das quantidades celulares. Para diferenciar CPCP de carcinoma de grandes células, pelo menos 10% do componente de carcinoma neuroendócrino de grandes células é necessário para o diagnóstico C-CPCP⁸⁶.

A incidência de C-CPCP varia de 5% a 28% em diferentes estudos, e está relacionada ao tipo de amostras utilizadas^{88,89}. A frequência do CPCP combinado varia dependendo de quatro fatores: do tamanho da amostra do tumor, número de seções histológicas estudadas, tipo de amostra (autópsia *versus* biópsia cirúrgica *versus* biópsia incisional –punção, broncoscopia, mediastinoscopia) e variação na interpretação, que depende da proficiência e do grau de subjetividade do patologista^{75,90}.

Em comparação com o CPCP puro, o C-CPCP tem características únicas, embora não haja diferenças na idade do paciente, sexo ou histórico de tabagismo. A idade mediana dos pacientes com C-CPCP é de 59 a 64 anos^{75,90}. A maioria dos pacientes C-CPCP são do sexo masculino, em uma proporção que varia de 43% a 82,5%⁹¹. Esse desequilíbrio de sexo pode estar intimamente associado ao tabagismo^{90,91}.

Há grandes diferenças nas localizações C-CPCP. Em estudos publicados anteriormente, a maioria dos autores propôs que o C-CPCP se desenvolve predominantemente em locais centrais (59,1%-86,4%). De fato, Luo et al. (2009) encontraram características de imagem de massa central em 86,4% dos casos, incluindo nódulos linfoides aumentados no mediastino (77,3%)⁹⁰.

Os principais sintomas clínicos do C-CPCP são tosse, dispneia e hemoptise. Homens e cols. (2016) relataram que em 92 de 114 (80,7%)

pacientes com C-CPCP, o tumor ocorreu nas áreas centrais⁹². Atualmente, admite-se que o CPCP ocorre, principalmente, no segmento lobular ou brônquico, com apenas cerca de 25% dos CPCPs localizados em regiões periféricas. No entanto, Mangum *et al.* (1989) relataram 56% de C-CPCPs em regiões periféricas, numa taxa superior à incidência de cerca de 14% para CPCP puro. Coletivamente, em comparação com o CPCP puro, os C-CPCPs são mais propensos a ocorrer em áreas periféricas e a serem acompanhados por derrame pleural maligno, em relação ao CPCP puro⁹³.

O conhecimento das células de origem e dos fatores genéticos e epigenéticos podem influenciar no manejo e, conseqüentemente, na evolução do câncer de pulmão. As neoplasias pulmonares são, histologicamente heterogêneas e estudos por análises de perfil de expressão imuno-histoquímica e molecular são utilizados para identificar semelhanças e diferenças entre os vários tipos histológicos dos tumores⁹³.

1.7 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CARCINOMA NEUROENDÓCRINO DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO

Os pacientes com câncer de pulmão de pequenas células apresentam sintomas resultantes do crescimento local do tumor, da disseminação local e à distância; e da presença de síndromes paraneoplásicas ou uma combinação dos mesmos⁹⁴.

1.7.1 Os principais sintomas locais:

A tosse constitui o sintoma mais comum (45 a 75%), acompanhada por grandes volumes de secreção mucóide. Hemoptise tem uma incidência entre 27 a 57%⁹⁴. A dor torácica que piora com inspiração profunda está presente em 27 a 49%⁹⁴ dos casos de neoplasia de pulmão. O tipo de dor é frequentemente intermitente, do lado do tumor, tornando-se intensa e persistente devido à extensão para mediastino, pleura ou parede torácica⁹⁴.

Sibilos ou estridores localizados sugerem presença de obstrução do brônquio. A obstrução da grande via aérea produz estridor. Na suspeita de obstrução, a análise da curva fluxo-volume pode ser útil para identificação de lesão de traquéia ou laringe⁹⁴.

Dispnéia está presente em aproximadamente 37% da população com câncer de pulmão⁹⁴. As causas de dispnéia incluem obstrução de grande via aérea, intrínseca e/ou extrínseca, pneumonite obstrutiva ou atelectasia, derrame pleural, linfangite, derrame pericárdico, embolia tumoral e comorbidades associadas, como doença bronco-pulmonar obstrutiva crônica⁹⁴.

Rouquidão, como primeiro sintoma, ocorre em cerca de 18% dos pacientes⁹⁴. Paralisia da corda vocal esquerda é a condição mais comum, devido à localização e trajeto do nervo laríngeo-recorrente esquerdo. A paralisia de corda vocal bilateral é mais rara. A paralisia diafragmática ocorre em 1/3 dos casos. Usualmente, é assintomática, e geralmente detectada através de achado radiológico⁹⁴.

Outros sintomas locais podem ocorrer, como disfagia por compressão do esôfago; edema de face e mãos por compressão da veia cava superior⁹⁴.

1.7.2 Sintomatologia por metástases

A sintomatologia por metástases à distância do câncer, depende do local de disseminação, e de suas manifestações órgão-dependentes⁹⁴.

Sabemos que, em torno de 7% dos pacientes com câncer de pulmão apresentam derrame pleural maligno⁹⁴. Estes derrames pleurais são exsudatos sero-sanguinolentos e são, comumente, associados com adenocarcinomas. Portanto, se faz necessário realizar toda uma propedêutica para o diagnóstico de infiltração⁹⁴.

A síndrome de Pancoast se associa com tumor do sulco superior e é caracterizada por dor, síndrome de Horner, destruição óssea e atrofia de músculos da mão. O sulco superior é um sulco criado pela passagem da artéria subclávia até a pleura nos ápices dos lobos superiores⁹⁵.

A Síndrome da veia cava superior ocorre por obstrução ao fluxo sanguíneo na veia cava superior e representa 4% das manifestações clínicas. Os sintomas mais comumente associados são a sensação de aumento de volume da cabeça e dispnéia. A tosse e dor torácica são menos frequentes. Os principais sinais clínicos desta síndrome incluem a dilatação de veias do pescoço, circulação colateral na parede torácica anterior, edema facial e em extremidades superiores, “facies” pletórica^{94,95}.

No coração, em estudos “post-mortem”, foi observada a presença de metástases no pericárdio, com derrame pericárdico em 30% dos casos⁹⁴. Os sintomas e sinais associados são de dispneia, tosse, pulso paradoxal, estase jugular e aumento da área cardíaca⁹⁴.

Metástases hepáticas estão presentes em casos de necropsias em cerca de 30% dos casos de carcinoma espinocelular e de 60% do carcinoma de pequenas células⁹⁴. Inicialmente, os casos são assintomáticos. A sintomatologia inclui o aumento do volume do fígado. Nódulos hepáticos palpáveis podem estar presentes. Icterícia e ascite são infrequentes. Alterações bioquímicas (TGO e TGP) podem identificar casos assintomáticos de metástases hepáticas. Podem ocorrer metástases em supra-renal, geralmente, detectadas em autópsias. A insuficiência de supra-renal raramente é observada clinicamente. Metástases cerebrais podem causar cefaleia, visão turva, náuseas, vômitos, fraqueza de membros, alterações mentais e convulsão. Metástases para ossos/coluna vertebral provocam dores ósseas; para a medula espinhal, provocam paralisia e perda de função intestinal ou da bexiga^{94,95}.

Sintomas inespecíficos podem acompanhar o quadro de metástases e são representados por fadiga, perda de apetite e ganho ou perda de peso, fraqueza muscular severa, alterações na marcha e alterações na cor da pele⁹⁵.

1.7.3 Síndromes paraneoplásicas

As síndromes paraneoplásicas provocam sintomas que dependem da produção de substâncias (aminas, hormônios) pelo tumor⁹⁵.

Síndromes neurológicas, como a síndrome miastênica de Lambert-Eaton, encefalomielite e neuropatia sensorial podem estar presentes nos pacientes com carcinoma de pequenas células. Pacientes com síndrome de Lambert-Eaton apresentam fraqueza na perna proximal, causada por autoanticorpos dirigidos contra os canais de cálcio dependentes de voltagem⁹⁵. A encefalomielite

paraneoplásica e a neuropatia sensorial são causadas pela produção de um autoanticorpo (anti-Hu) que apresenta reação cruzada com ambos os antígenos de carcinoma de pequenas células e proteínas de ligação a RNA neuronal humano, resultando em múltiplos déficits neurológicos⁹⁶.

A produção de hormônios polipeptídicos, incluindo vasopressina (hormônio antidiurético-ADH) e hormônio adrenocorticotrópico, causam, respectivamente, hiponatremia maligna ou síndrome de secreção inadequada de ADH (SIADH) e síndrome de Cushing. Em pacientes com CPCP, SIADH ocorre com maior frequência do que a síndrome de Cushing. O tratamento do câncer e/ou cuidados de suporte como, por exemplo, cisplatina e opiáceos, também podem causar hiponatremia⁹⁷.

O tratamento para SIADH inclui restrição de fluidos, que é difícil para os pacientes devido ao aumento da sede; demeclociclina ou inibidores do receptor de vasopressina (conivaptan, tolvaptan)⁹⁸. Os níveis de ADH e hiponatremia geralmente melhoram após o tratamento bem-sucedido do CPCP^{97,98}.

1.8 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Na avaliação de pacientes com possível câncer de pulmão, os principais dados clínicos incluem a avaliação dos sintomas, exame clínico, avaliação de fator de risco, imagens, como radiografia de tórax e tomografia computadorizada (TC) de tórax e exame citopatológico confirmatório⁹⁹.

Para o CPCP permanece como padrão ouro um diagnóstico anatomopatológico por biópsia. Embora a imagem desempenhe um papel importante na investigação diagnóstica, a biópsia é fundamental na distinção

entre CPCP de CNPCP, assim como de outros tipos histológicos de câncer de pulmão ou outras condições não neoplásicas^{99,100,101}.

O Multidetector TC é amplamente utilizado como o teste de imagem crítico para determinar se, onde e como fazer a biópsia. A biópsia poderá ser realizada por meio de um dos vários métodos como broncoscopia, biópsia percutânea guiada por TC, biópsia endobrônquica ou transtorácica, ultrassom (EBUS), ultrassom endoscópico (EUS), dependendo da localização e tamanho da massa, bem como por fatores relacionados ao estado clínico do paciente^{101,102,103,104}.

Embora a maioria dos casos seja diagnosticado depois que os pacientes se tornam sintomáticos, o CPPC também pode ser detectado acidentalmente. Nesses pacientes assintomáticos, uma radiografia de tórax ou tomografia computadorizada de tórax solicitada por outros motivos pode revelar um nódulo ou massa suspeita que requer investigação adicional. Uma vez que detectados nódulos ou massas suspeitos, esses pacientes deverão ser diagnosticados e estadiados da mesma forma que os pacientes sintomáticos^{103,104}.

O diagnóstico patológico deve ser feito de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), através da morfologia (células pequenas uniformes arredondadas a fusiformes, citoplasma escasso, índice mitótico alto, áreas necróticas)^{106,107}.

O estadiamento preciso dos pacientes também é necessário para selecionar o plano de tratamento que irá maximizar as chances de sobrevivência do paciente. Por um lado, o *overstaging* corre o risco de negar ao paciente o tratamento; em contraste, riscos de subestimação, pode levar a riscos desnecessários de complicações de tratamento agressivo. O diagnóstico e

estadiamento oportunos também são importantes para maximizar a utilização de testes moleculares^{106,107}.

1.8.1 Citologia de escarro

Nesse procedimento, o médico coleta material de expectoração do escarro ou coleta por escovado brônquico. Esse exame tem maior probabilidade de diagnosticar cânceres que se originaram nas vias aéreas principais do pulmão, como a maioria dos cânceres de pulmão de células escamosas. Essa técnica não é útil para diagnosticar outros tipos de câncer de pulmão^{99,107}.

1.8.2 Toracocentese

Método recomendado em casos de derrame pleural. É realizado com agulha estéril para retirada de uma amostra do líquido pleural. Se o derrame pleural for persistente, a toracocentese pode ser repetida para retirar mais líquido e expandir o pulmão afetado, permitindo alívio sintomático⁹⁹.

1.8.3 Biópsia por agulha

A biópsia pode ser realizada com auxílio de agulhas finas (PAAF) ou grossas (core biopsy), e consiste na coleta de uma pequena amostra do tecido pulmonar ou aspirado pulmonar para exame anatomopatológico e citológico. Uma vantagem das biópsias por agulha é não necessitar de uma incisão

cirúrgica, mas, em alguns casos, podem não fornecer material suficiente e adequado para o diagnóstico histopatológico^{99,106,107}.

1.8.3.1 Aspiração por agulha fina (PAAF)

O método utiliza uma agulha muito fina, para aspirar células do tumor para análise citológica. A PAAF pode ser realizada durante uma broncoscopia ou uma ultrassonografia endobrônquica⁹⁹.

1.8.3.2 Core biopsy

Na punção por agulha grossa (core biopsy), o médico utiliza uma agulha de calibre maior para remover um ou mais fragmentos de tecido, para exame anatomopatológico⁹⁹.

1.8.3.3 Outros métodos de coleta

Biópsia de uma lesão metastática pode representar a opção preferida se a localização da metástase for seguramente acessível para biópsia. O diagnóstico da metástase também auxiliará a estadiar patologicamente o paciente⁹⁹.

1.8.4 Broncoscopia

Procedimento para examinar a traqueia e as grandes vias aéreas do pulmão e coletar material para exame anatomopatológico⁹⁹.

1.8.5 Mediastinoscopia e mediastinotomia

Esses procedimentos são realizados no centro cirúrgico, sob anestesia geral, para retirar amostras do mediastino. A diferença principal entre os dois métodos é a localização e o tamanho da incisão. A mediastinoscopia utiliza um instrumento tubular, assim como a broncoscopia, fazendo uma pequena incisão na parte superior do esterno. Na mediastinotomia, é realizada uma incisão ligeiramente maior, entre a segunda e terceira costelas, próximo à região mamária, permitindo que o cirurgião chegue aos linfonodos que não podem ser alcançados por mediastinoscopia⁹⁹.

1.8.6 EBUS-ultrassom endobrônquico

EBUS é uma técnica broncoscópica que utiliza ultrassonografia para visualizar estruturas dentro e adjacentes à parede das vias aéreas, enquanto EUS é uma técnica endoscópica que utiliza ultrassonografia para visualizar estruturas dentro e adjacentes à parede esofágica. Essas técnicas são minimamente invasivas e podem ser realizadas em regime ambulatorial. Pacientes com suspeita de disseminação de câncer de pulmão para linfonodos mediastinais podem ser submetidos à biópsia guiada por EBUS pré-operatória

(ou intraoperatória) e/ou biópsia guiada por EUS com o objetivo de estadiamento N mediastinal patológico. Trata-se de um método minimamente invasivo em tempo real, mesmo para linfonodos com menos de um centímetro ou localizado próximo aos vasos sanguíneos¹⁰⁰.

EBUS também pode ser usado para informar o estadiamento T do câncer de pulmão, e pode melhorar a determinação da distância entre o tumor e a carina, que é um determinante do estágio T. Pode ajudar a distinguir entre a invasão das vias aéreas pelo tumor e a compressão das vias aéreas pelo tumor. O EBUS é usado para avaliação diagnóstica de lesões endobrônquicas, nódulos pulmonares localizados na periferia, lesões mediastinais, bem como para orientar a terapia endobrônquica¹⁰⁰.

1.8.7 Broncoscopia de navegação

Este novo procedimento cria um sistema de orientação do tipo GPS combinado com um broncoscópio para fazer a biópsia de pontos menores e mais profundos no pulmão^{99,100}.

1.8.8 Toracoscopia

A toracoscopia é realizada para verificar se a doença se disseminou para o espaço pleural. Também pode ser feita para a realização de biópsias de lesões pulmonares periféricas, bem como de linfonodos e líquidos próximos, além de avaliar se um tumor está se desenvolvendo nos tecidos ou órgãos adjacentes.

Esse procedimento é realizado quando não se consegue obter uma amostra adequada por outros métodos para diagnosticar o câncer de pulmão⁹⁹.

1.9 EXAMES DE IMAGEM

Os exames de imagem são métodos utilizados para estadiamento da doença, que é fundamental para a formulação de estratégias de tratamento^{100,101}.

1.9.1 Tomografia computadorizada do tórax com contraste

Scanners de tomografia computadorizada adquirem imagens transversais do corpo usando raios-x. A TC com múltiplos detectores (TCMD) permite a visualização em qualquer plano desejado (reconstrução multiplanar)^{101,102}.

A injeção intravenosa de um agente de contraste radiopaco pode ser realizada em alguns casos. A TC com contraste pode fornecer informações adicionais sobre as características de uma massa vista na varredura sem contraste, o que pode facilitar a caracterização da massa como provavelmente maligna ou provavelmente benigna¹⁰¹.

A TCMD de tórax costuma ser um dos primeiros exames realizados para diagnosticar um possível câncer de pulmão. Para o estadiamento do CPCP, imagens adicionais de TCMD são obtidas do abdome, pelve ou cabeça para procurar metástases à distância. É o principal método de avaliação do tumor primário e determinação da extensão da doença. Tumores periféricos normalmente são lobulares com espiculações. Podem estar presentes

opacidades de vidro fosco circundante devido a edema ou hemorragias. Manifestações incomuns de CPCP primário incluem consolidação, opacidades do espaço aéreo e carcinomatose linfangítica, manifestada como espessamento e nodularidade dos septos interlobulares. Achados adicionais incluem atelectasia envolvendo pelo menos um lobo e pneumonia pós-obstrutiva¹⁰¹.

A doença metastática pleural pode se manifestar como um derrame pleural, espessamento pleural e/ou nódulos e massas. O envolvimento pericárdico pode se manifestar como derrame pericárdico e/ou espessamento pericárdico. Nódulos ou massas no pulmão contralateral podem ser vistos no contexto de doença pulmonar metastática¹⁰¹.

Metástases extratorácicas envolvendo o fígado, glândulas supra-renais e ossos podem ser identificados na TC. É rotineiramente usada para avaliar a resposta ao tratamento^{101,102}.

1.9.2 RM Torácica

A imagem por ressonância magnética (MRI) usa campos magnéticos e ondas de rádio para gerar imagens tridimensionais do corpo. Agentes de contraste paramagnético podem ser administrados durante o exame de ressonância magnética para fornecer informações adicionais sobre a natureza de uma massa, da mesma forma que os agentes de contraste podem melhorar uma tomografia computadorizada¹⁰³.

A ressonância magnética é uma técnica de imagem estrutural e funcional com ampla disponibilidade, alta resolução espacial e alta resolução de contraste de tecidos moles. Esta modalidade de imagem é particularmente útil para

detecção e caracterização de lesões dentro dos tecidos, mesmo quando de tamanho inferior a um centímetro, bem como para avaliação da arquitetura interna de órgãos / tecidos. Além disso, os recursos de imagem funcional, como imagem ponderada por difusão e espectroscopia de ressonância magnética, podem ser usados para melhorar a precisão do diagnóstico. Os exames de ressonância magnética demoram mais para serem realizados e geralmente custam mais do que a TCMD, e alguns pacientes com dispositivos eletrônicos ou metálicos implantados ou com claustrofobia não podem se submeter à ressonância magnética¹⁰³.

Durante o processo de estadiamento, todos os pacientes realizam uma ressonância magnética do cérebro, a menos que existam contraindicações. Entretanto, a ressonância magnética de tórax raramente faz parte do processo de estadiamento¹⁰³.

1.9.3 Cintilografia óssea

A cintilografia óssea usa uma câmera gama para criar imagens bidimensionais da distribuição de um radiotraçador, normalmente difosfonato de metileno de tecnécio-99m (Tc99m-MDP). A cintilografia de radiotraçadores que se localizam nos ossos é útil no estadiamento do câncer porque as áreas de alta captação do radiotraçador podem representar metástases. No entanto, a captação também ocorre com outras condições comuns, o que significa que achados falso-positivos não são incomuns. Esta técnica tem apenas capacidade planar (em comparação com a capacidade tomográfica das outras técnicas de imagem descritas acima), limitando ainda mais sua capacidade diagnóstica. Por

último, a cintilografia óssea é menos quantitativa em comparação com PET / CT, e não permite a avaliação de estruturas não ósseas do corpo (ao contrário da TCMD, RM e PET)^{104,105}.

É útil para demonstrar invasão mediastinal ou vascular no cenário de contra-indicações à administração de material contrastado intravenoso, como alergias e insuficiência renal. Se FDG PET / CT não estiver disponível, a cintilografia óssea com difosfonato de metileno de tecnécio-99m e a TC de abdome são recomendadas¹⁰⁵.

A imagem do cérebro, idealmente é avaliada com ressonância magnética (RM), e é recomendada para todos os pacientes, uma vez que o objetivo é detectar doença metastática¹⁰⁵.

Se FDG PET/CT não estiver disponível, a cintilografia óssea com difosfonato de metileno de tecnécio-99m e a TC de abdome são recomendadas¹⁰⁵.

1.9.4 PET / CT

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é uma modalidade de imagem que localiza a captação de um radioisótopo emissor de pósitrons dentro do corpo¹⁸. [F]-fluorodeoxiglicose (FDG) é o radiotraçador PET mais comumente usado. O FDG-PET também pode detectar metástases metabolicamente ativas que podem não ser detectadas por modalidades de imagem estrutural (por exemplo, MDCT, MRI)¹⁰⁵.

Os pacientes com níveis elevados de glicose sérica (acima de 200 mg / dl) geralmente não são submetidos a FDG-PET / CT, devido ao potencial de

resultados falso-negativos. Novamente, uma preocupação potencial sobre a TCMD é a exposição do paciente à radiação ionizante. Dado o prognóstico ruim do CPPC quando é tipicamente diagnosticado, no entanto, essa preocupação é relativamente sem importância^{104,105}.

FDG PET / CT é um exame importante na avaliação do CPCP, combinando informações funcionais (FDG PET) com informações anatômicas (CT). Possibilita o estadiamento e reestadiamento clínico, orientando a terapia e sugerindo prognóstico. Os resultados da FDG PET podem levar a uma mudança no tratamento inicial em até 27% dos pacientes. O plano geral de tratamento pode ser modificado em até 32% dos pacientes. Além disso, o campo de radiação pode ser modificado em até 68% de pacientes devido à melhora na detecção de doença intratorácica^{102,106}.

O CPCP é prontamente identificado no FDG PET devido a sua alta atividade metabólica. Estudos relataram melhor acurácia do estadiamento com FDG PET em comparação com TC sozinha. Embora a FDG PET seja inferior à TC ou RM para a detecção de metástases cerebrais, ele é mais sensível e específico do que a imagem convencional para a detecção de outros sítios de doença metastática^{105,106}.

1.9.5 Aspiração da medula óssea e biópsia

Embora permitam a detecção de doença no momento do diagnóstico, menos de 5% dos pacientes têm envolvimento da medula óssea como um local isolado de doença metastática. Portanto, os estudos de rotina da medula óssea não são recomendados em pacientes com hemogramas normais⁹⁹.

1.10 DIAGNÓSTICO IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO: INTRODUÇÃO

O método auxiliar mais importante no diagnóstico e classificação do câncer de pulmão é a imuno-histoquímica (IMH). A importância de sua aplicabilidade inclui o auxílio eficaz à classificação precisa de tumores, especialmente para tumores pouco diferenciados em pequenas amostras de biópsia, minimizando potenciais erros de diagnóstico e para o melhor delineamento de tipos histológicos de tumor que serão encaminhados para testes moleculares. Também é importante pela possibilidade de utilização de marcadores de linhagem específicos para a exclusão da origem metastática dos tumores⁸⁵.

Os marcadores imuno-histoquímicos (IHC) são mais eficazes se criteriosamente selecionados e utilizados sob a forma de um painel. O progresso recente na catalogação dos biomarcadores e na aplicação de IMH é enfatizado na classificação atual da OMS⁸⁵.

O diagnóstico imuno-histoquímico para o CPCP inclui um painel básico de marcadores utilizado na rotina assistencial. A coloração para pancitoqueratina, AE1 / AE3, ajuda a demonstrar se a neoplasia é um carcinoma, excluindo a possibilidade de uma lesão linfóide ou mesenquimal. Com o TTF 1 e Napsin A, avaliamos adenocarcinoma. Marcadores neuroendócrinos confirmam neoplasia neuroendócrina e Ki 67 nos dá o índice de proliferação celular. Os marcadores P63 e P40 ajudam na distinção de carcinoma de células escamosas⁸⁵.

Os marcadores CK7 e CK20 são citoqueratinas menos utilizadas para o diagnóstico de CPCP, porque apenas cerca de metade dos casos coram com

CK7; e menos de 10%, coram com CK20, apresentando, geralmente, coloração focal⁸⁵

Os marcadores neuroendócrinos que compõem o painel básico incluem CD56, cromogranina A e sinaptofisina , cuja coloração pode ser focal ou difusa, fraca ou forte^{86,107}. Apenas um ou dois marcadores neuroendócrinos do painel podem ser positivos. Até dois terços dos CPCPs serão negativos para cromogranina e sinaptofisina. O marcador CD56 apresenta positividade em cerca de 90 –100% dos casos¹⁰⁸. As células do CPCP podem corar-se, difusa e fortemente, com todos os três marcadores neuroendócrinos, tornando-se importante uma avaliação conjunta com dados morfológicos, com a taxa de mitoses e com o índice de proliferação celular^{86,107}.

O CPCP apresenta uma alta taxa de proliferação celular, apresentando marcação nuclear pelo KI67, com uma média de positividade em 70-90% dos casos⁸⁶.

A expressão do TTF1 ocorre em 70-90% dos carcinomas de pequenas células do pulmão, e também pode ser positiva em 44-80% dos carcinomas extra-pulmonares de pequenas células¹⁰⁹.

Nos casos em que todos os marcadores neuroendócrinos e TTF-1 são negativos, deve ser realizado o diagnóstico diferencial com linfoma, melanoma e carcinoma basaloide. A expressão de queratina afasta linfoma e melanoma. Marcadores escamosos negativos como o P63 e P40, afastam carcinoma de células escamosas⁸⁵. (Tabela 5)

Tabela 5 - Painel para o diagnóstico do câncer de pulmão

Tipo Histológico	Frequentemente positivos	Frequentemente Negativos
Adenocarcinoma	CK7,TTF1,Napsin,34BE12+/-,35BH11	CK20,34BE12+/-
Carcinoma epidermoide	P63,34BE12,CK5/6,CK7+/-,35BH11+/-	CK20,TTF1,Napsin A,CK7+/-,35BH11+/-
Carcinoma de Pequenas Células	TTF1,Cromogranina,Sinaptofisina,CD56,CK7+/-,35BH11+/--(padrão puntiforme perinuclear	CK20,P63,Napsin A,CK5/6

Fonte: Adaptado de Travis: Classificação dos tumores de pulmão, pleura, timo e coração,4ª Ed. (2015)

1.10.1 Painel de marcadores imunohistoquímicos para o diagnóstico de CPCP

1.10.1.1 Citoqueratinas

A citoqueratina CK7 é uma proteína de peso molecular intermediário de 54 kDa, que, dentro de uma célula, forma uma rede densa de filamentos que irradiam do núcleo para a membrana plasmática, atuando como um arcabouço citoplasmático que dá às células epiteliais a capacidade de sustentar o estresse mecânico e não mecânico. Os filamentos intermediários de queratina são estruturas altamente dinâmicas e são reorganizados durante a mitose e apoptose¹¹⁰.

Segundo a classificação de Moll (1982) pertence à sub-família B neutro-básica, que está expressa, principalmente, em epitélios simples, na maioria dos epitélios glandulares e em epitélio transicional, intermediário e no subconjunto de adenocarcinomas em vários órgãos, incluindo pulmão. Geralmente não marcam carcinoma escamoso do pulmão^{110,111}.

Seu padrão de coloração é membranar e citoplasmático, variando de fraco a forte, focal a difuso^{111,112}.

A fenotipagem CK 7/CK 20 de adenocarcinomas é uma ferramenta útil de diagnóstico, baseada em algoritmos probabilísticos e de uma detalhada base de dados. Embora CK 7/CK 20 sejam filamentos intermediários, são localizados em diferentes células epiteliais. CK 7 está tipicamente localizado em epitélio de pulmão e de mama, enquanto a CK 20 é comum em epitélio de trato intestinal^{113,114,115}.

O marcador CK7 é útil para o diagnóstico de tipos específicos de tumores epiteliais com base em padrões de coloração específicos. Coloração em forma de ponto é sugestiva de tumores neuroendócrinos¹¹⁶.

Esse marcador está geralmente expresso, com alguma variação, em adenocarcinomas de pulmão, mama, tireóide, endométrio, colo do útero, ovário, glândula salivar, trato gastrointestinal superior, carcinoma urotelial, carcinoma papilar de células renais e doença de Paget. Geralmente é negativo em carcinoma colorretal, carcinoma de células Merkel, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma da próstata, tumores adrenocorticais e carcinoma de células escamosas¹¹⁷.

1.10.1.2 Pancitoqueratinas (AE1/AE3)

Pancitoqueratinas CK AE1/AE3 ou CK AE1/AE3 (PAN-k) são proteínas solúveis em água, de peso molecular entre 40 a 70 kDa, que formam o citoesqueleto de células epiteliais. É um "pool" (mistura) de dois anticorpos monoclonais obtidos por imunização de camundongos com queratinas humanas.

Seu padrão é citoplasmático ou perinuclear. Esses anticorpos reconhecem um epítopo comum a todos os membros das CKs tipo II ou básicas e as correspondentes CKs tipo I ou ácidas, empregadas na demonstração da natureza epitelial de tumores morfológicamente indiferenciados¹¹⁸.

O anticorpo AE1 reage com o determinante antigênico presente na maioria das citoqueratinas da subfamília A, que incluem as CKs 10,13,14,15,16 e 19 e não reage com as CKs 12,17 e 18. O anticorpo AE3 reage com o determinante antigênico presente na maioria das citoqueratinas da subfamília B, que incluem as CKs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8¹¹⁸.

1.10.1.3 KI67

O Ki67 é um antígeno nuclear não-histona que faz parte da estrutura protéica conhecida como suporte cromossômico. Sua expressão é determinada pelo gene situado no *locus* 10q25 e ocorre no final da fase G1, em S, G2 e M¹¹⁹. Durante a interfase, pode ser detectado, exclusivamente, dentro do núcleo, enquanto que, na mitose, a maior parte é transferida para a superfície dos cromossomos¹²⁰.

O anticorpo KI67 (MIB1) é um marcador clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas. Ele identifica a síntese de DNA das células neoplásicas. Portanto, representa um determinante para índices de fatores prognósticos. É um marcador importante para a definição de margens cirúrgicas, demonstrando a invasão neoplásica, por vezes, não detectada à microscopia óptica. Sua positividade associa-se com o tempo de sobrevivência menor e prognóstico sombrio¹²¹.

1.10.1.4 CD56

A molécula de adesão de células neurais (NCAM), também chamada de CD56, é um antígeno associado ao tumor expresso em câncer de pulmão de pequenas células, neuroblastoma, rabdomyossarcoma, tumores cerebrais, mielomas múltiplos e leucemia mieloide aguda. A expressão constante e forte de NCAM é um pré-requisito para o desenvolvimento de imunoterapias baseadas em anticorpos¹²².

NCAM (CD56) é uma glicoproteína de ligação homofílica expressa na superfície dos neurônios, glia e músculo esquelético. Embora o CD56 seja frequentemente considerado um marcador de comprometimento da linhagem neural, devido ao seu local de descoberta sua expressão também é encontrada no sistema hematopoiético, onde está, mais estritamente associado, às células Natural Killer. O CD56 foi detectado em outras células linfoides, incluindo células gama delta ($\gamma\delta$)T e células TCD8+ ativadas, bem como em células dendríticas¹²².

Acredita-se que o CD56/NCAM induza o crescimento de neuritos, através do FGFR (fator de crescimento fibroblástico), atuando sobre a via de sinalização p59Fyn. Nos nervos, regula interações homofílicas entre neurônios e entre neurônios e músculos. A associação do CD56 com FGFR estimula a atividade do receptor da tirosino quinase para induzir crescimento de neuritos. Quando as células da crista neural param de produzir NCAM e N-Caderinas e começam a exhibir receptores de integrina, as células se separam e sofrem migração^{123,124}.

As neoplasias que são positivas para o anticorpo CD56, incluem: carcinoma de pequenas células de pulmão, mieloma, leucemia mieloide, tumores

neuroectodérmicos, tumor de Willms, neuroblastoma, linfomas de células NK/T, carcinoma de células acinares do pâncreas, e carcinoma de Ewing¹²².

1.10.1.5 Cromogranina

Cromogranina A (Cg A) é uma proteína pró-hormonal com peso molecular de 48 kDa, cujo gene codifica 439 aminoácidos, localizada no cromossomo 14q32.12. Possui peptídeos potencialmente ativos e biologicamente derivam da cromogranina (“vasostatin”, “cromostatin”), detectados em situação de metástase e em neoplasias primárias com características histológicas sugestivas de uma diferenciação neuroendócrina¹²⁴.

Está presente em grânulos secretórios de células endócrinas e neuroendócrinas e seu padrão é citoplasmático granular. A cromogranina foi originalmente isolada de grânulos de cromafim, grânulos da medula adrenal, e tem sido encontrada expressa em uma variedade de tecidos humanos normais e neoplásicos que produzem hormônio polipeptídeo. Está associada à co-secreção de uma ampla variedade de hormônios^{125,126,127}.

O uso da CgA como marcador neuroendócrino, de um modo geral, está limitado a neoplasias contendo grânulos secretórios, no caso dos carcinomas de pequenas células¹²⁶.

Os peptídeos biologicamente ativos derivados da cromogranina A são a vasostatina, cromostatina, cromacina, pancreastina, WE-14, catestatina, parostatina e GE-25, que são expressos por células neuroendócrinas, incluindo células do sistema nervoso central e periférico; e em grânulos de células

endócrinas humanas, como na glândula paratireoide e medular de supra-renal^{126,127}.

As cromograninas, derivam do grupo das graninas, conhecidos como CgA e CgB que são utilizados para a detecção de vários tumores neuroendócrinos e de células ganglionares, como tumor carcinoide, feocromocitoma, neuroblastoma, carcinoma medular de tireoide, tumor de hipófise anterior, de células das ilhotas pancreáticas e de células C da tireoide, carcinoide, carcinoma de células Merkel, neuroblastoma, carcinoma neuroendócrino, paraganglioma, carcinoma de pequenas células pulmonar. As células marcadas pelo anticorpo apresentam um padrão de coloração citoplasmática e granular. Na maior parte dos casos, CgA é produzido em concentrações mais elevadas que CgB¹²⁷.

1.10.1.6 Sinaptofisina

A sinaptofisina é uma glicoproteína de membrana com peso molecular de 38Kda. Conhecida como a principal proteína da vesícula sináptica p38. É uma proteína que, em humanos, é codificada pelo gene *SYP*, que está localizado no braço curto do cromossomo X (Xp11.23-p11.22). Tem 12.406 bases de comprimento e fica na fita negativa. Pertence a uma família de proteínas com quatro domínios transmembrana que inclui sinaptogirina (*syg*) e sinaptoporina¹²⁸.

Estudos moleculares demonstraram diversas funções da sinaptofisina, que incluem formação de membranas altamente curvadas nos vasos sinápticos, exocitose, formação de sinapses, biogênese e endocitose dos vasos sinápticos. Possui também uma função na aprendizagem e memória, através da regulação da transmissão sináptica nos circuitos neuronais¹²⁹.

A sinaptofisina é expressa em estado normal nas membranas pré-sinápticas dos neurônios no cérebro, medula espinhal, retina, células da medula adrenal e junções neuromusculares e ilhotas pancreáticas¹³⁰.

A sinaptofisina representa um marcador para tumor carcinoide, carcinoma neuroendócrino, paraganglioma, carcinoma de pequenas células, adenoma e carcinoma adrenocortical e neuroblastoma; oncocitoma, feocromocitoma, neurocitoma central, paraganglioma gangliocítico, ganglioneuroma, tumor glômico, carcinoma medular da tireoide, carcinoma de células Merkel e condrossarcoma mixóide¹³⁰.

1.10.1.7 TTF1

O Fator de Transcrição da Tireoide (TTF-1) foi identificado em 1989 como uma proteína nuclear tecido específico, membro da família do gene NKx2.1, de 40 kD. É codificado por um gene localizado no cromossomo 14q13 e está expresso, preferencialmente, na tireoide e no pulmão^{131,132}. Regula o desenvolvimento, crescimento celular e diferenciação da tireoide, pulmão e de algumas áreas da mama, contendo homodomínio para fatores de transcrição nuclear. Na tireoide ativa genes da transcrição da tiroglobulina e tiroperoxidase em células foliculares. Presente, também, nos núcleos das células epiteliais das vias respiratórias e em células epiteliais de alvéolos¹³³.

No pulmão, a proteína TTF-1 humana foi detectada durante o desenvolvimento, com idade gestacional de 11 semanas e acredita-se que desempenhe um papel na regulação da produção de surfactante B e de proteína secretora de células claras¹³⁴.

Em tumores pulmonares, o marcador TTF-1 é essencialmente expresso em adenocarcinomas, em tumores neuroendócrinos de grandes células e em carcinomas de pequenas células, sendo pouco frequente em carcinomas escamosos¹³⁵.

1.10.1.8 INSM1

A Proteína 1 é um fator de transcrição, associada ao insulinoma, anteriormente, conhecida como IA1. É um marcador nuclear de diferenciação neuroendócrina com sensibilidade e especificidade equivalente ou melhor em comparação com sinaptofisina, cromogranina e CD56¹³⁶.

A análise funcional de INSM1 revelou que vários genes alvo a jusante e proteínas regulatórias a montante do gene INSM1, estão intimamente associados à diferenciação de células endócrinas pancreáticas^{136,137}. A deleção global do gene INSM1 resultou no desenvolvimento anormal de células β ¹³⁸, bem como no desenvolvimento da linhagem simpático-adrenal. Os padrões de expressão de INSM1 normal em humanos e roedores são restritos ao sistema neuroendócrino fetal e estão silenciados em tecidos adultos¹³⁷.

O gene INSM1 é reativado em tumores de origem neuroendócrina, sugerindo que eventos de desdiferenciação ocorrem em tumores neuroendócrinos que mimetizam o desenvolvimento embrionário normal. O desenvolvimento embrionário requer a geração de células em números adequados e a aquisição oportuna de funções celulares especializadas¹³⁹. A especialização ocorre gradualmente ao longo de várias rodadas de divisão celular, com o ponto final sendo uma célula diferenciada terminalmente não

dividida. Normalmente, a determinação do destino celular é controlada em parte por sinais externos e / ou fatores de diferenciação que governam as células para entrar ou sair do ciclo celular. Há evidências de uma interação direta entre INSM1 e ciclina D1¹⁴⁰.

INSM1 pode interromper o ciclo celular normal. INSM1 liga-se e compete contra CDK4 pela ligação à ciclina D1, levando a um bloqueio na fosforilação da proteína Rb e da sinalização do ciclo celular. Com o bloqueio do ciclo celular, a proliferação é severamente inibida, o que poderia facilitar uma mudança para a via de diferenciação¹⁴¹.

Neurogenina 3 ativa INSM1 e NeuroD/ β 2 durante a via de diferenciação das células β ¹⁴²; enquanto que, INSM1 e NeuroD/ β 2 se contra-regulam durante a maturação das células β ^{137,140}.

A expressão de INSM1 no desenvolvimento do pâncreas fetal é altamente restrita a uma janela de tempo muito estreita¹⁴⁰.

Um relatório recente identificou INSM1 como um gene regulado por Sonic Hedgehog no desenvolvimento do meduloblastoma, sugerindo que INSM1 pode participar do processo tumorigênico induzido por Hedgehog¹⁴¹. Esses resultados apoiam que o INSM1 não funciona apenas como um repressor transcricional, mas também contribui para a proliferação e diferenciação celular¹⁴⁰.

Esta proteína encontra-se expressa em tecidos neuroendócrinos adultos normais (medula adrenal, glândula pineal, glândula pituitária, células enterocromafins gastrointestinais, células das ilhotas pancreáticas, células C da tireóide) e neurônios em desenvolvimento¹³⁷.

Os tumores neuroendócrinos que expressam INSM1, incluem o CPCP, tumor neuroendócrino bem diferenciado, tumor carcinoide de vários locais,

paraganglioma/feocromocitoma, carcinoma de células de Merkel, neuroblastoma olfatório e carcinoma medular da tireoide¹³⁷.

1.10.1.9 CK8/CK18

As citoqueratinas 8/18 (CK8/18) pertencem à família dos filamentos intermediários, um grupo diversificado de proteínas heteropoliméricas compostas por 54 genes diferentes. Os polipéptidos da citoqueratina (CKs) podem ser classificados em duas subfamílias: ácidos (tipo I) e básicos neutros (tipo II). Os polipéptidos dos tipos I e II emparelham-se para formar um heteropolímero tetramérico maduro. A CK18 é uma CK de 45 kDa pertencente à subfamília de CKs ácidas de tipo I, normalmente associadas à citoqueratina CK8 de tipo II de 54 kDa ¹⁴³.

No seu conjunto, a CK8/18 é uma das citoqueratinas de baixo peso molecular (LMW-CK) expressa em epitélios simples não estratificados, células basais e superficiais de epitélios de transição, células luminais/secretórias de epitélios complexos e mesotélios, podendo também estar presente em alguns tipos de células mesenquimais¹⁴³.

Praticamente todos os carcinomas de origem epitelial e mesoteliomas expressam a CK8/18, por isso os anticorpos da CK8/18 constituem uma ferramenta importante na classificação de tumores de origem desconhecida e carcinomas pouco diferenciados¹⁴³.

Os anticorpos da CK8/18 apresentam um padrão de coloração citoplasmático e/ou membranoso. Pode também observar-se uma expressão focal fraca no caso de tumores mesenquimais, incluindo leiomiomas,

rabdomiossarcomas, melanomas malignos, schwannomas, sarcomas de Ewing, tumores desmoplásicos de células redondas pequenas, carcinomas de células escamosas e linfomas^{144,145}. Eles são as primeiras queratinas a aparecer na embriogênese, já nos embriões pré-implantação, e parecem ser as queratinas mais antigas durante a filogênese¹⁴⁶.

Em alguns tipos de células epiteliais, CK 8 e CK 18 são as únicas queratinas presentes. O exemplo clássico é o fígado, com K8 / K18 representando o par característico e único de queratina de hepatócitos normais. O mesmo é verdadeiro para outros epitélios parenquimatosos altamente especializados, como células acinares do pâncreas, células epiteliais tubulares proximais do rim e certas células endócrinas, como células das ilhotas pancreáticas^{143,145}.

CK8 e CK18 não são estritamente específicos do epitélio, podendo apresentar expressão em células mesenquimais raras (mais frequentemente em estágios fetais), como certas células do músculo liso e células do retículo fibroblástico de nódulos linfáticos, bem como vários tumores mesenquimais incluindo rabdo- e leiomiiossarcomas^{143,145}.

Curiosamente, CK8 e CK18 podem desempenhar um papel na regulação do ciclo celular, em que a fosforilação dessas queratinas e a ligação de proteínas adaptadoras 14-3-3 parecem estar envolvidas¹⁴⁷.

Em relação aos tumores malignos, CK8 e CK18 são expressos na maioria dos carcinomas, exceto em alguns carcinomas de células escamosas diferenciados. Coram fortemente a maioria dos adenocarcinomas, carcinomas hepatocelulares, carcinomas de células renais e carcinomas neuroendócrinos. Essas queratinas podem ser úteis na imuno-histoquímica diagnóstica em casos

de carcinomas com baixo teor de queratina, como câncer de pulmão de pequenas células, para provar sua natureza epitelial¹⁴³.

1.10.1.10 CK5/6

A CK 5 é uma citoqueratina do tipo básico com um peso molecular alto e massa molecular de 58 kDa, expressa nas camadas celulares basal, intermediária e superficial dos epitélios estratificados, bem como, nos epitélios de transição, nos epitélios complexos, nas células mesoteliais e mesoteliomas. A CK 5 não tem sido encontrada nos epitélios simples e nas células não epiteliais, com raras exceções. A CK 6 é igualmente uma citoqueratina do tipo básico de alto peso molecular, com uma massa molecular de 56 kDa, expressa pelo epitélio escamoso proliferativo aparecendo muitas vezes junto com a CK 16 (48 kDa)^{111,112}. As células marcadas pelo anticorpo CK5/6 apresentam coloração citoplásmica¹¹².

Em tecidos normais o anticorpo cora o epitélio escamoso estratificado. As células basais expressam a CK 5. As células do epitélio simples e as células não epiteliais, geralmente, não são marcadas pelo anticorpo¹⁴⁵.

Em conjunto com o P63 são usados para detectar a origem das células escamosas em carcinomas pouco diferenciados¹⁴⁸. As citoqueratinas CK5/6 são importantes para o diagnóstico diferencial de mesotelioma epitelioide (CK5 / 6 + em 83%) de adenocarcinoma de pulmão (CK5 / 6- em 85%)¹⁴⁹.

1.10.1.11 P63

P63 é um membro da família genética p53 no 3t27-29, que codifica pelo menos 6 proteínas diferentes com diferentes funções biológicas. O gene *TP63* codifica um fator de transcrição homólogo da proteína supressora de tumor p53 e é traduzido em seis isoformas proteicas: as isoformas TransActivating (TA) são mais parecidas com p53, enquanto as isoformas Delta-N (ΔN) são desprovidos do domínio TransActivation (TA). Embora as isoformas de TA tenham sido inicialmente consideradas as únicas a possuírem funções regulatórias transcricionais, foi bem estabelecido que as isoformas ΔN também são capazes de ativar a transcrição de um conjunto distinto de genes-alvo através de um segundo domínio TA (TA2)¹⁵⁰. A proteína p63 contém um domínio TA, um Domínio de Vinculação de DNA (DBD) e um Domínio de Oligomerização (OD)^{150,151,152}.

P63 desempenha um papel proeminente no controle das funções de células-tronco epiteliais e na diferenciação e estratificação do tecido derivado do ectoderme durante o desenvolvimento embrionário¹⁵⁰.

É conhecido como um regulador-chave do desenvolvimento da epiderme e diferenciação de queratinócitos. Além disso, é necessário para a manutenção do potencial proliferativo em células-tronco epiteliais, diferenciação de queratinócitos, adesão e sobrevivência de células epiteliais¹⁵¹.

O TAp63 é altamente expresso na maioria dos tumores benignos; é negativo ou de fraca expressão na maioria dos carcinomas. Já o $\Delta Np63$ é negativo ou fraco na maioria dos tumores benignos e altamente expresso em

carcinomas adenoidecísticos, carcinomas mucoepidermóides e carcinomas mioepiteliodes¹⁵².

P63 determina a diferenciação escamosa (p63+) para casos de H&E ou citologia como parte do painel. Porém, p63 raramente marca adenocinoma¹⁵³. Resumindo, a classificação do carcinoma não de pequenas células do pulmão se dá da seguinte forma: adenocarcinoma (Δ Np63- ou <2% das células com coloração fraca); carcinoma de células escamosas (Δ Np63 +forte e > 50% das células, TTF1-); carcinoma adenoescamoso (Δ Np63 forte e menos de 50%)¹⁵⁴. Cabe ressaltar que pode ajudar a classificar o carcinoma pulmonar de grandes células como parte do painel¹⁵⁵.

1.10.1.12 P40

O P40 representa uma das 10 isoformas de P53, altamente específico para células escamosas e células basais. É importante para classificação do câncer de pulmão de não pequenas células, definindo o diagnóstico diferencial entre carcinoma de células escamosas (P40+) ou adenocarcinoma (P40-), que será fundamental para indicação do regime de quimioterapia¹⁵⁶.

1.10.1.13 SOX2

SOX2 é um gene de codificação de fatores de transcrição localizado em 3q26.33, conhecido por ser recorrente e especificamente amplificado em carcinomas de células escamosas do pulmão, do esôfago e da cavidade oral.

Nesses órgãos, a proteína SOX2 desempenha um papel importante na tumorigênese e na sobrevivência do tumor¹⁵⁷.

Estudos usando matrizes de alta resolução identificaram a região do gene determinante do sexo Y-box2 (Sox2) em 3q26.33 como um oncogene de sobrevivência de linhagem em carcinoma de células escamosas. SOX2 é um regulador de transcrição, crítico da função normal das células-tronco embrionária e neural, sendo essencial para o desenvolvimento inicial dos mamíferos e para a manutenção de células embrionárias pluripotentes e células-tronco em vários tecidos adultos¹⁵⁸.

Amplificações recorrentes ocorrem em 20% do carcinoma de células escamosas pulmonares¹⁵⁹ e mapeiam para uma região central de 2 Mb (Megabases) que engloba SOX2. A coloração intensa de SOX2 é frequente em núcleos de carcinoma de células escamosas pulmonares (CCS), indicando potencial regulação transcricional ativa pelo SOX2. Análises do transcriptoma do CCS pulmonar, revelam que o SOX2 contribui para ativar fenótipos semelhantes ao de células tronco e fornecem pistas relativas aos genes desregulados envolvidos no fenótipo maligno¹⁵⁹.

1.11 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS

A classificação atual da OMS para o câncer de pulmão afirma que um diagnóstico de CPPC pode ser feito de forma confiável através da histologia e citologia de rotina, mas a imunohistoquímica (IHQ) pode ser necessária,

principalmente, nos casos em que as características histológicas são ambíguas e nos casos em que o patologista deseja aumentar a confiança no diagnóstico¹⁶⁰.

O diagnóstico diferencial de CPCP abrange carcinoma não de pequenas células (CNPCP), incluindo carcinoma de grandes células, carcinoma de células escamosas basaloide, linfoma, melanoma, sarcoma e tumores neuroendócrinos de pulmão (carcinoides) e carcinomas metastáticos de mama, próstata ou carcinomas neuroendócrinos metastáticos de outros órgãos. Assim, o painel imuno-histoquímico inicial tem que ser ampliado¹⁶⁰.

A discordância entre patologistas em câncer de pulmão sobre a distinção entre CPCP e CNPCP na histologia pode ocorrer em até 5-7% dos casos¹⁶¹. Vários fatores podem contribuir para a variabilidade interobservador, incluindo pequenas amostras de biópsias esmagadas, alterações isquêmicas, fixação deficiente e cortes histológicos deficientes. O tamanho da amostra da biópsia também pode afetar o tamanho das células tumorais. Esta observação é baseada em dados que indicam que as células do CPCP parecem maiores em amostras maiores, especialmente biópsias pulmonares abertas⁸⁶.

Há um espectro de morfologia celular no CPCP, que inclui células maiores que se aproximam do tamanho do carcinoma de grandes células. As células tumorais que se situam na fronteira entre o CPCP e o carcinoma de grandes células podem não ser capazes de ser diferenciadas apenas com achados histológicos, como o tamanho das células, e requerem a aplicação de múltiplos critérios morfológicos. Uma regra prática é que as células tumorais do CPCP devem medir aproximadamente o diâmetro de dois a três pequenos linfócitos em repouso⁷⁵.

As variantes basaloides de carcinoma de grandes células ou de células escamosas podem ser problemáticas no diagnóstico diferencial com CPCP. Entre as características histológicas diferenciais, a mais útil é o fato do CPCP crescer em camadas, e o carcinoma basalóide apresentar-se com uma membrana basal e um estroma desmoplásico. As características imunohistoquímicas distintivas incluem a expressão de marcadores escamosos, como p63 positivo para carcinomas basaloides e TTF-1 e marcadores neuroendócrinos para o CPCP⁷⁵.

Os artefatos que as células do CPCP podem apresentar, também podem ocorrer nos tumores carcinoides, linfomas e inflamação crônica, dificultando o diagnóstico diferencial. Infiltrados linfóides, seja devido a pequeno linfoma linfocítico ou inflamação crônica, podem ser diferenciados do CPCP por seu padrão de crescimento discoesivo, contrastando com o agrupamento epitelial e moldagem nuclear do CPPC. Felizmente, as colorações imunohistoquímicas principais para o diagnóstico de CPCP, incluindo queratina, cromogranina, CD56, Ki-67, TTF-1 e CD45 (para linfoma) podem funcionar mesmo em pequenas biópsias. Esses marcadores podem ajudar a resolver a maioria dos problemas com relação ao diagnóstico diferencial¹⁶².

A coloração para pancitoqueratina, AE1 / AE3, ajuda a demonstrar que o tumor é um carcinoma, excluindo uma lesão linfóide ou mesenquimal. Os marcadores CK7 e CK20 são citoqueratinas menos utilizadas para o diagnóstico de CPCP, porque apenas cerca de metade dos casos coram para CK7 e menos que 10%, com CK20. Geralmente, apresentam coloração focal⁷⁵.

Os marcadores neuroendócrinos que compõem o painel básico incluem CD56, cromogranina e sinaptofisina^{86,107}.

O CPCP apresenta uma alta taxa de proliferação celular com marcação nuclear pelo KI67, com uma média de 70-90% ¹⁶³.

Para determinar a diferenciação entre CPCP e adenocarcinoma são utilizados TTF-1 e NapsinA, que são expressos em mais de 85% dos adenocarcinomas¹⁶².

Nos casos em que todos os marcadores neuroendócrinos e TTF-1 são negativos, deve ser realizado o diagnóstico diferencial com linfoma, melanoma e carcinoma basaloide. A expressão de queratina afasta linfoma, melanoma¹⁶².

Os marcadores comumente expressos em carcinoma de células escamosas incluem p40, CK5 / 6, CK5 e p63. Uma exceção é p63, que é menos específico do que os outros marcadores, podendo também ser expresso em até 20% dos adenocarcinomas^{75,156}.

Ocasionalmente, o diagnóstico diferencial com carcinoma de células de Merkel ou PNET é levado em consideração. Particularmente, em paciente não fumante, jovem e na presença de lesões cutâneas ou envolvimento da parede torácica. Morfologicamente, as células tumorais de PNET são tipicamente mais discoesivas e as taxas mitóticas podem ser relativamente baixas em comparação com o CPCP⁷⁵. PNET tende a ser negativo para queratina ou apenas fracamente positivo e tende a corar fortemente com a coloração imunohistoquímica para CD99, enquanto o CPCP é geralmente positivo para pancitoqueratina e TTF-1, mas a coloração de CD99 é negativa ou fraca¹⁶⁴.

O diagnóstico diferencial com o carcinoma de células de Merkel pode ser problemático, mas em contraste com o CPCP, os carcinomas de células de

Merkel são frequentemente positivos para CK20, negativos para TTF-1 e podem expressar proteína de neurofilamento¹⁶⁵.

Um tumor negativo para queratina com achados histológicos semelhantes aos do CPCP deve levantar a possibilidade de linfoma, melanoma, tumor carcinoide com artefatos de esmagamento e PNET. Nestes casos, são úteis os marcadores linfóides (CD45 ou CD20), marcadores de melanoma (S100, HMB-45), Ki-67 e CD99, para diagnóstico diferencial. É extremamente incomum encontrar um CPCP com queratina negativa. Quando isso ocorre, vários anticorpos de queratina além de CK7 / CK20 podem ser úteis. Quando todas as queratinas são negativas, se a morfologia é característica e outros tumores forem excluídos, o achado de TTF-1 e expressão do marcador NE pode ajudar a apoiar um diagnóstico de CPPC⁷⁵.

O carcinoma de grandes células, que representa cerca de 3% dos cânceres de pulmão, é um carcinoma neuroendócrino de alto grau que atende aos seguintes critérios: morfologia neuroendócrina, com padrões de crescimento organoide, em paliçada, trabecular ou sob a forma de roseta; características citológicas de células maiores, de formato poligonal, com baixa relação N / C, cromatina nuclear grosseira ou vesicular e nucléolos frequentes; alta taxa mitótica (≥ 11 por 2 mm^2) com média de 60 mitoses por 2 mm^2 ; necrose frequente; e, pelo menos, um marcador imuno-histoquímico neuroendócrino positivo ou grânulos neuroendócrinos por microscopia eletrônica^{77,75}.

Em pequenos espécimes de biópsia, como agulha ou espécimes de biópsia broncoscópica é difícil fazer o diagnóstico de carcinoma de grandes células, pois geralmente é muito difícil ter certeza da morfologia neuroendócrina sem uma amostra substancial do tumor. No entanto, foram propostos critérios

para seu diagnóstico com base na citologia¹⁶⁷. Os principais critérios para distinguir CPCP de carcinoma de grandes células estão resumidos na tabela 6¹⁶⁷.

Tabela 6 - Critérios histológicos para diagnóstico diferencial entre carcinoma de pequenas células e carcinoma de grandes células do pulmão

Achados Histológicos	Carcinoma de Pequenas Células	Carcinoma de Grandes Células
Tamanho da células	Menor que o tamanho de 3 linfócitos	Grandes
Razão núcleo/citoplasma	Alta	Baixa
Cromatina Nuclear	Finamente granular e uniforme	Grosseiramente granular ou vesicular menos uniforme
Nucléolo	Ausente ou Tênu	Freqüentemente (nem sempre) presente pode ser proeminente ou tênue
Moldagem nuclear	Característica	Atípica
Achados fusiformes	Comum	Incomum
Células poligonais com citoplasma claro	Atípicas	Características
Coloração basofílica de vasos e estroma	Ocasional	Rara
Esfregaço nuclear	Frequente	Incomum

Fonte: Adaptado de “Atualização sobre o carcinoma de células pequenas e sua diferenciação do carcinoma de células escamosas e outros carcinomas de células não pequenas”, Travis, 2015.

Carcinoma pouco diferenciado que é negativo para todos os marcadores (imunofenótipo nulo) pode ser classificado como "CNPCP", ou sem outra especificação (NOS) em uma amostra de biópsia¹⁶⁷.

Os marcadores importantes no diagnóstico diferencial de carcinomas pleomórficos, de células fusiformes e de células gigantes são representados pelos marcadores epiteliais, como pancitoqueratina, citoqueratina AE1 /AE 3, CK7 e marcadores mesenquimais⁷⁵.

1.12 ESTADIAMENTO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

1.12.1 Estadiamento

O primeiro sistema de estadiamento para o CPCP foi introduzido na década de 1950 pelo *Veterans's Administration Lung Study Group* (VALSG) para uso em seus ensaios clínicos randomizados¹⁶⁶. Este sistema simples dividiu o CPCP em dois subgrupos de doenças denominados doença "limitada" e "extensa"^{168,169}.

A doença limitada (DL) foi caracterizada por tumores confinados a um hemitórax. Também entrariam nesse grupo, doença com extensão local e ipsilateral e presença de linfonodos supraclaviculares, desde que pudessem ser englobados no mesmo plano de radiação do tumor primário sem nenhuma metástase extratorácica. Todas as outras formas de doença foram classificadas como doença extensiva (ED)^{168,169}.

Em 1989, a Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão (IASLC) emitiu um relatório de consenso que, pela primeira vez, introduziu mudanças no sistema de estadiamento VALSG^{166,167}. Este relatório sugeriu que a DL deveria ser expandida para incluir tumores limitados a um hemitórax com metástases em linfonodos regionais, incluindo os linfonodos mediastinais, ipsilaterais e contralaterais. Foi recomendado que pacientes com derrame pleural ipsilateral, independentemente da citologia ser positiva ou negativa, passassem a ser considerados como DL desde que, também, não fossem detectadas metástases extratorácicas¹⁶⁷.

O sistema de estadiamento para tumor, linfonodo, metástase (TNM) do Comitê Conjunto Americano de Estadiamento do Câncer (AJCC)¹⁶⁸ e a *Union Internationale Contre de Cancer* (UICC) também são aplicáveis ao CPCP, mas são usados com menor frequência na prática clínica, porque esses dois sistemas de estadiamento baseiam-se na confirmação cirúrgica para sua precisão e, pacientes com CPCP raramente tem indicação cirúrgica. Estadiamento TNM em série não cirúrgica, raramente oferece dados quanto ao prognóstico^{169,160}.

De acordo com o IASLAC, são avaliadas, principalmente, alterações que resultam em mudanças no estadiamento de T. Recomenda-se que tumores de grande porte (>7 cm) se tornem T3; nódulos adicionais dentro do mesmo lóbulo do tumor primário também se tornam T3; nódulos intrapulmonares ipsilaterais em outros lóbulos tornam-se T4; e todos os derrames pleurais, independentemente da citologia, tornam-se M1. Recomenda-se que efusões pleurais na ausência de outros locais metastáticos também sejam designadas M1a, com M1b reservado para todos os outros envoltimentos metastáticos¹⁶⁹⁻¹⁷⁰.

1.12.2 Tratamento e prognóstico

Pacientes com CPCP com doença limitada (DL) são tratados com quimioterapia e radiação torácica, enquanto, em sua maioria, pacientes com doença extensa (DE) recebem apenas quimioterapia. Entretanto, uma definição mais precisa de envolvimento linfonodal pode ser de particular relevância para o tratamento de radiação. Por esse motivo, a simples designação de DL não fornece informações adequadas para um planejamento preciso de radioterapia, tornando-se necessário diferenciar entre a presença ou ausência de linfonodos supraclaviculares ipsilaterais e contralaterais, linfonodos hilares ipsilaterais e contralaterais ou linfonodos mediastinais¹⁷¹.

De fato, o padrão atual de tratamento para a doença limitada é a quimiorradiação concomitante, com quatro ciclos de cisplatina e etoposídeo com radioterapia torácica durante o primeiro ou segundo ciclo de quimioterapia. A ressecção é indicada para uma proporção limitada de pacientes que apresentam pequenos tumores primários periféricos e nenhuma infiltração documentada dos linfonodos mediastinais. O tratamento também inclui quatro a seis ciclos de quimioterapia com um agente de platina e etoposídeo ou irinotecano. Após uma boa resposta à terapia inicial, a irradiação craniana profilática é indicada para pacientes com doença extensa^{171,172}

Apesar do tratamento de primeira linha fornecer taxas de resposta de até 80%, o prognóstico do CPPC permanece sombrio. A maioria dos pacientes recaem dentro de 6 meses após a conclusão do tratamento inicial, levando a um intervalo médio de sobrevida de 15 a 20 meses, e de oito a 13 meses para pacientes com DL e DE, respectivamente^{172,173}.

Nas últimas décadas, embora devamos reconhecer que esforços para melhorar a evolução clínica dos pacientes com CPPC têm sido feitos, a taxa de sobrevida em 5 anos permanece em torno de 6%. Numerosas estratégias de tratamento foram avaliadas, mas nenhuma delas produziu resultados superiores sobre a terapia padrão baseada em platina¹⁷⁴.

Dados recentes sugerem que o CPCP pode ser uma neoplasia imunologicamente manipulável. Os sobreviventes de longo prazo do CPCP são caracterizados pela atividade predominante do efeito imunológico sobre os mecanismos imunossupressores¹⁷⁵. Na verdade, pode-se postular que a alta taxa de mutações somáticas relatadas no CPPC pode contribuir para o aumento da imunogenicidade. Essa hipótese, reforçada por relatos de melhora na sobrevida em pacientes com síndromes paraneoplásicas neurológicas, exibindo respostas imunes anti-Hu fornece o fundamento teórico para avaliação de estratégias de imunoterapia no manejo de pacientes com CPPC¹⁷⁵.

O significado prognóstico e o manejo clínico do CPCP combinado são controversos. Embora o tratamento inicial, como em outros órgãos, seja conduzido pelo componente do carcinoma de pequenas células, existem algumas sugestões de que esses tumores sejam menos quimiossensíveis do que o CPCP puro¹⁷⁶. Outros estudos não encontraram nenhuma diferença no prognóstico do CPCP combinado e puro. É sugerido que, em contraste com o CPCP puro, a ressecção cirúrgica deve ser considerada após a terapia neoadjuvante para CPCP combinado¹⁷⁷. A importância dos diferentes tipos de CPCP combinado (por exemplo, contendo adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas) não é conhecido^{176,177}.

Uma observação notável em estudos de autópsia é que quase 50% dos pacientes que são inicialmente diagnosticados com CPCP puro apresentam CNPCP ou em combinação com CPCP após o tratamento¹⁷⁸. Uma possível explicação é que um componente menor do CNPCP pode não ser representado em pequenas biópsias ou amostras de citologia, conferindo maior quimiorresistência do que o CPCP. Os patologistas devem estar cientes desse fenômeno ao lidar com uma amostra pós-tratamento em um paciente com diagnóstico inicial de CPPC¹⁷⁹.

1.12.2.1 Tratamento quimioterápico

A quimioterapia padrão de primeira linha é uma combinação de etoposídeo ou irinotecano com platina. No estágio limitado, a radioterapia concomitante ou sequencial para o tórax e mediastino também é necessária. Se uma resposta completa for alcançada, a irradiação cerebral profilática (ICP) é indicada para prevenir o desenvolvimento subsequente de metástases para o cérebro. No estágio extenso, a quimioterapia é o tratamento básico no cenário de primeira linha. O valor da radiação torácica e da ICP é controverso, entretanto, não é uma recomendação padrão para todos os pacientes. A sobrevida global mediana (OS) para pacientes com CPPC em estágio extenso tratados com quimioterapia de primeira linha padrão é de aproximadamente 10 meses¹⁸⁰.

O CPCP geralmente é sensível ao tratamento inicial. Entretanto, a maioria dos pacientes desenvolve doença recorrente, frequentemente com locais adicionais de metástase após o tratamento inicial¹⁸¹.

Infelizmente, muito poucos medicamentos que foram aprovados são eficazes para o tratamento de segunda linha do CPPC. O topotecano é uma escolha padrão de segunda linha, mas não é usado uniformemente para pacientes, em parte devido à sua eficácia modesta e toxicidade hematológica significativa. Representa a única terapia de segunda linha para CPCP, que foi inicialmente aprovada como uma formulação intravenosa em 1998 e como uma formulação oral em 2007. A duração mediana da resposta (DOR) com topotecano intravenoso é em torno de 3,3 meses¹⁸¹.

Devido à eficácia modesta dos tratamentos convencionais de resgate disponíveis, a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes tem aumentado. Os regimes de agente único citotóxicos padrão, incluindo paclitaxel, docetaxel, gencitabina e vinorelbina, foram estudados em ensaios clínicos de fase II como terapias de segunda linha com resultados modestos. Mais recentemente, a terapia direcionada e a imunoterapia também foram testadas ativamente com muitos desapontamentos, mas também com alguns resultados encorajadores¹⁸².

1.12.2.2 Tratamento com imunoterapia

Existem inibidores de ponto de verificação imunológico para uso em estágio extensivo de câncer de pulmão de pequenas células, tanto no cenário recorrente quanto na linha de frente^{183,184}.

1.12.2.3 Nivolumab

O nivolumabe é um anticorpo inibidor do ponto de verificação imune PD-1 totalmente humano, com segurança e eficácia comprovadas em pacientes com CPPC¹⁸³. Os dados pré-clínicos também sugeriram uma atividade anticâncer melhorada para os anticorpos alvejados PD-1 e CTLA-4 combinados, e a combinação de nivolumabe e ipilimumabe demonstrou respostas duráveis em vários tipos de tumor^{183,184,185}.

Os pesquisadores relataram os resultados da monoterapia com nivolumab como um tratamento de terceira linha ou posterior à utilização de um ou mais regimes de quimioterapia à base de platina; ou para pacientes que receberam dois ou mais regimes de quimioterapia anteriores e que apresentaram progressão da doença^{185,186}.

O Nivolumab foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em pacientes com estágio extenso de CACP e com progressão após quimioterapia à base de platina ou uma outra linha de tratamento quimioterápico^{183,184}.

1.12.2.4 Ipilimumab

O ipilimumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1 anti-CTLA-4 que bloqueia o CTLA-4 e seus ligantes (CD80 / CD86), promovendo a ativação e proliferação de células T^{186,187,189}. Nos primeiros ensaios clínicos mostrou inibição durável em vários tipos de tumor¹⁹⁰. Um estudo inicial de fase II avaliou a segurança e eficácia de ipilimumabe em combinação com carboplatina e

etoposídeo como quimioterapia de primeira linha para pacientes com CPPC em estágio extenso ¹⁹¹.

1.12.2.5 Atezolizumabe

O atezolizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo o ligante de morte programada 1 (PD-L1), um ligante inibitório que regula negativamente a ativação e proliferação de células T pela ligação ao receptor PD-1¹⁹². Um estudo de fase I inicial estabeleceu que a monoterapia com atezolizumabe teve efeitos colaterais aceitáveis com durabilidade promissora de resposta em pacientes com recidiva de CPPC¹⁹³. O estudo Impower 133 é um estudo de fase III que avaliou a combinação de atezolizumabe com etoposídeo e carboplatina versus placebo combinado com platina em pacientes com CPPC em estágio extenso não tratados. Este estudo verificou uma melhora significativa na eficácia para pacientes em estágio extenso tratados com atezolizumabe mais carboplatina padrão e regime de etoposídeo no tratamento de primeira linha¹⁹⁴.

1.12.2.6 Durvalumab

Durvalumab é um anticorpo monoclonal IgG1 humano que tem como alvo o ligante de proteína da morte programado (PD-L1)¹⁸⁸. Após demonstração de segurança, em estudos prévios, durvalumab demonstrou eficácia no cenário da primeira linha. CASPIAN é um ensaio clínico de fase 3, randomizado e de rótulo aberto que demonstrou uma vantagem de sobrevivência para a combinação de durvalumab (D) com dose padrão de carboplatina (ou cisplatina) e etoposide em

comparação apenas com quimioterapia padrão à base de platina¹⁹⁵. Com base neste estudo, a FDA aprovou o uso de durvalumab (mas não tremelimumab) em combinação com etoposide e carboplatina ou cisplatina para o tratamento de CPCP¹⁹⁵.

1.12.2.7 Pembrolizumabe

Na Keynote-028, os pesquisadores avaliaram a segurança e a eficácia preliminar do pembrolizumabe em paciente com extenso estágio de câncer de pulmão de pequenas células progredindo no padrão disponível de terapias assistenciais¹⁹⁶. Os pacientes apresentavam tumores com expressão PD-L1 \geq 1% medidos pelo anticorpo 22C3. Os pontos finais primários incluíam segurança e tolerabilidade. Com base nesses dados, a FDA aprovou o pembrolizumabe para uso em pacientes com estágio extenso-CPCP que progrediu na quimioterapia à base de platina e pelo menos uma outra linha de terapia¹⁹⁶.

1.13 MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS UTILIZADOS NO ESTUDO

1.13.1 Ciclina D1

O gene *CCND1* é um protooncogene que codifica a proteína ciclina D1, também conhecida como BCL-1. Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 11, banda 11q13. Possui 13.388 bases e se traduz em 295 aminoácidos¹⁹⁷.

A ciclina D é um importante regulador do ciclo celular que impulsiona a progressão através de G_1 em resposta aos sinais mitogênicos. As ciclinas do tipo D formam holoenzimas juntamente com quinases dependentes de ciclina (CDKs) 4 e 6. A fosforilação de pRb pela ciclina D facilita a expressão da ciclina E, um regulador positivo do ponto de verificação em G_1 ¹⁹⁸.

Existem três ciclinas homólogas do tipo D: D1, D2 e D3. Entre estas, a ciclina D1 é mais comumente expressa em vários cânceres humanos¹⁹⁹. A ciclina D1 tem as isoformas a e b. Um polimorfismo, A870G, localizado na região doadora de splice na fronteira exon-ítron 4, produz dois transcritos de mRNA distintos, chamados isoformas a e b²⁰⁰. Ambas as isoformas podem estimular a atividade cdk4 / 6, mas a ciclina D1b tem capacidade reduzida de fosforilar pRb²⁰². Além de sua função de ligação à cdk, as ciclinas do tipo D têm propriedades adicionais independentes de cdk no crescimento celular, incluindo metabolismo e diferenciação celular²⁰².

As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são as subunidades catalíticas de uma família de cinases serina/treonina heterodiméricas dos mamíferos. Os ativadores dessas CKs são moléculas sintetizadas e degradadas durante cada ciclo celular e, por isso, foram designadas como ciclinas. Os complexos CDK4-ciclina D, CDK6-ciclina D e CDK3-ciclina C regulam a transição da fase G_0 - G_1 e as primeiras fases de G_1 através da fosforilação da proteína do retinoblastoma^{203,204}. (Figura 5).

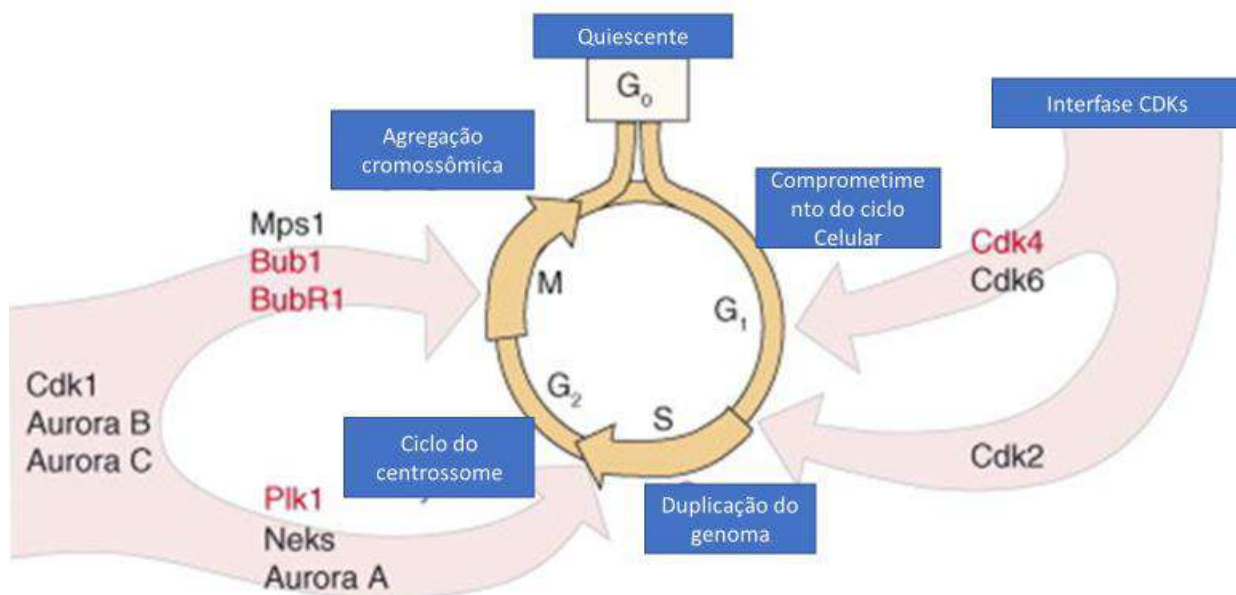


Figura 5. Quinases do ciclo celular principal e seu envolvimento na progressão do ciclo celular. Quinases mutadas em câncer humano são mostrados em vermelho. Adaptado de Malumbre, 2007.

A atividade de CDK4 / 6 é controlada positivamente pela associação com ciclinas do tipo D (ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3); e negativamente, por ligação a inibidores de CDK da família INK4 (p16INK4A, p15INKB, p18INK4C e p19INK4D)²⁰⁵.

Então, os complexos de ciclina D/CDK4/6 ativados iniciam a fosforilação da proteína supressora de tumor RB (codificado por RB1), bem como as proteínas intimamente relacionadas p107 (RBL1) e p130 (RBL2). A proteína RB originalmente recruta co-repressores e reprime a transcrição de genes alvo regulados por fatores de transcrição E2F (E2Fs) para inibir a transição G1/S²⁰⁶.

As proteínas de reparo de DNA foram identificadas como parceiros de interação da ciclina D1. Foi demonstrado que o recrutamento da ciclina D1a para a cromatina é suficiente para que a resposta a danos no DNA (DDR) seja iniciada²⁰⁷.

Conseqüentemente, a desregulação da ciclina D1 ocasiona proliferação celular, podendo alterar, também, a angiogênese, apoptose, metabolismo, duplicação de centrôssomo e interação da ciclina D1 com proteínas envolvidas no reparo de danos ao DNA, incluindo BRCA1 e Rad51^{207,208}.

Nas células cancerosas a desregulação da ciclina D1 é comum e está frequentemente associada ao desenvolvimento e progressão de malignidades em humanos. Há evidências de vários mecanismos pelos quais a expressão da ciclina D1 encontra-se desregulada, a maioria envolvendo alterações do próprio locus *CCND1*²⁰⁹. A alteração de função da Ciclina D1 pode ocorrer por amplificação do gene *CCND1*, observada frequentemente em cânceres de mama, pâncreas, pele, pulmão, cabeça e pescoço; ou por translocação do locus *CCND1* para elementos potenciadores IGH, visto em quase todos os casos de linfoma de células do manto; ou por mutações nas sequências que codificam o domínio PEST da ciclina D1, que ocorrem em cânceres de esôfago²⁰⁹.

A serina / treonina quinase Akt desempenha um papel fundamental no controle do metabolismo celular, sobrevivência e sinalização mitogênica. A ciclina D1 está associada à Akt1 e aumenta a taxa de início e a atividade celular máxima da Akt1 induzida por mitógenos. Foi identificada uma nova função extranuclear da ciclina D1 para aumentar as funções proliferativas através do aumento da fosforilação de Akt1 em Ser473²¹⁰.

A ciclina D1 é instável, apresentando uma meia-vida curta de, aproximadamente, vinte e quatro minutos, sendo degradada, principalmente, através do proteossoma 26S de maneira dependente da ubiquitina²¹¹. Estudos iniciais sugerem que a proteína SKp2F-box pode estar envolvida na degradação de ciclina D1²⁰⁸.

Outros mecanismos de controle negativos do ciclo celular são as CKIs (*cyclin kinase inhibitors*), compostas pela Família CIP/KIP (proteína inibidora de quinase), constituídas pelas proteínas p21, p27 e p57; e pela família INK4 (inibidor de CDK), que tem ação seletiva sobre o complexo ciclina D/CDK 4, 6, abrangendo as proteínas p15, p16, p18 e p19^{208,211}.

1.13.2 EGFR

A proteína EGFR é uma tirosino-quinase (TKI- *protein tyrosine kinases*), que age como receptor de membrana e traduz sinais críticos para a proliferação, diferenciação e motilidade celular. É responsável pela fosforilação de enzimas e atua na regulação gênica. A sobre-expressão, amplificação ou mutação do *EGFR* estão relacionados ao desenvolvimento de neoplasias e a sua progressão²¹².

A família de receptores EGFR, também conhecida como família c-erb-B (receptores do fator de crescimento epidérmico humano) é constituída por quatro membros: EGFR ou c-erb-B1 (HER-1), c-erb-B2 (ou HER-2 / neu), c-erb-B3 (ou HER-3) e c-erb-B4 (ou HER-4). A estrutura do EGFR foi descrita pela primeira vez na década de 1960 por Cohen (Cohen, 1965) e compreende três domínios: o domínio extracelular (a porção N-terminal); o domínio transmembrana e o domínio C-terminal intracelular (uma porção hidrofóbica com atividade de tirosina-quinase). O domínio extracelular confere especificidade de ligação e os ligantes incluem o próprio EGF, TGF- α , anfirregulina e betacelulina. O domínio intracelular é capaz de fosforilar resíduos de tirosina dentro do próprio receptor

(autofosforilação) e de proteínas envolvidas na transdução de sinais, anfirregulina e betacelulina²¹².

A interação entre ligantes do EGFR e o domínio extracelular do receptor levam a sua dimerização, que promove a ativação do domínio tirosino quinase localizado no domínio intracelular do receptor. Uma vez ativado, este último domínio promove a autofosforilação de locais específicos dentro do domínio C-terminal do EGFR²¹².

A dimerização de EGFR leva à autofosforilação em resíduos de tirosina dentro do sistema intracelular que estimula as vias de sinalização Ras / Raf / MAPK e PI3K / Akt / mTOR, promovendo processos celulares, como migração, proliferação e sobrevivência celular. Algumas mutações em *EGFR* foram relatadas em 2004 e, atualmente, são mais prevalentes no subgrupo do CNPCP²¹³. As mutações de *EGFR*, pertinentes ao CNPCP, estão localizadas especialmente no local de ligação de ATP da quinase. As mutações *EGFR* mais frequentes são as ativadoras clássicas ou de sensibilização, correspondendo a deleções *in-frame* (em torno dos resíduos de aminoácidos 747 a 750, levando a uma mudança na leitura do DNA) do exon 19 (45% das mutações *EGFR*) e da mutação L858R do exon 21 (40 % de mutações *EGFR*)²¹⁴.

A terceira classe mais frequente de mutações de *EGFR* é composta de inserções *in-frame* no exon 20 (5-10% das mutações de *EGFR*) da quinase²¹⁵.

Outras mutações recorrentes incluem mutações pontuais do exon 18 na posição G719 (3% das mutações *EGFR*); mutações L861Q no exon 21 (2% das mutações *EGFR*) e inserções no exon 19 *in-frame* (<1% das mutações *EGFR*)²¹⁶.

As mutações em *EGFR* são mais frequentes em tumores com histologia de adenocarcinoma, em mulheres com CNPCP, em pacientes de etnias do Leste Asiático e em fumantes leves ou não fumantes²¹⁴.

As mutações de *EGFR*, ao favorecerem o estado de quinase ativa, são oncogênicas em linhas de células CNPCP, induzindo proteínas antiapoptóticas e pró-sobrevivência mediadas por EGFR através de alvos a jusante da proteína quinase ativada por mitogênio, quinase regulada por sinal extracelular, janus quinase / transdutor de sinal e ativador de transcrição e fosfatidilinositol-3-quinase / proteína quinase B cascatas²¹⁷. Estas redes de sinalização tornam as células com mutações *EGFR* dependentes deste membro ErbB para a sua sobrevivência. EGFR mutante de inibição conduz à regulação positiva e ativação de moléculas pró-apoptóticas que iniciam a via de apoptose mitocondrial intrínseca, afetando o equilíbrio de genes pró-apoptóticos *versus* membros da família BCL-2 antiapoptóticos²¹⁸.

O sinal apoptótico induzido pela inibição de EGFR mais bem descrito é o da molécula BH3 de domínio exclusivo BIM, que na mitocôndria se liga a membros BCL-2 antiapoptóticos e antagonizam sua atividade antiapoptótica²¹⁸.

Dentre os mecanismos que levam a um aumento da atividade proliferativa, da capacidade de invasão, da angiogênese e da resistência à quimioterapia e à radioterapia estão a estimulação parácrina e autócrina no microambiente tumoral por meio do aumento da produção de ligantes (principalmente de EGF e TGF- α), da superexpressão de moléculas de EGFR na membrana de células tumorais e de mutações ativadoras do gene EGFR, todos afetando suas vias de transdução de sinais²¹⁹.

Alguns exemplos de proteínas que se ancoram ao EGFR são: proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (Grb2), domínio 2 de homologia a src (Shc), sarcoma (Src), proto-oncogene de ABL 1 (Abl) e fosfolipase C gama (PLC γ)²²⁰. A associação física destas proteínas adaptadoras com o EGFR aumenta a eficiência da fosforilação do substrato, e, também, serve de auxílio na formação dos complexos de sinalização²²¹.

A alta expressão de EGFR nuclear está relacionada com alta expressão de ciclina D1, óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e B-MYB (oncogene viral da proteína homóloga aviária b-myb) e genes superexpressos em cânceres humanos e associados com aumento da proliferação celular. Essa regulação ocorre por meio da interação do EGFR com a transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3 (STAT3), que por sua vez, co-regula a expressão de iNOS²²², e por interação de EGFR com E2F1, que ativa a expressão de B-MYB²²³.

Ciclina D1 e BMYB são reguladores positivos da progressão das fases G1/S do ciclo celular²²⁴ e iNOS é uma enzima importante na produção de prostaglandinas, que atuam na quimioprevenção e quimioterapia, demonstrando uma natureza antitumoral ²²⁴.

Adicionalmente, os promotores que regulam a expressão dos genes Aurora-A cinase (AURKA)²²⁵, Ciclooxigenase-2 (COX-2) c-MYC ²²⁶(timidilato sintase (TS) e o promotor do gene que codifica uma proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) foram identificados como alvos do EGFR nuclear^{225,226}. Alvos esses, codificando proteínas envolvidas em tumorigênese, instabilidade cromossômica e quimiorresistência²²⁶.

O crescimento e a metástase de tumores pulmonares envolvem ativações dependentes de EGFR da cascata de proteína quinase ativada por Ras /

mitogênio (MAPK) e vias de fosfatidilinositol-3 quinase / Akt (PI3K / AKT) e PI3K / AKT que é uma via de sinalização pró-proliferativa que promove a multiplicação celular e, em seguida, atenua a apoptose no CPCP e CNPCP²²⁷.

Para as células malignas serem liberadas de tumores e translocadas, a angiogênese provou desempenhar um papel extremamente importante. Durante este processo, o EGFR ativado promove a quebra da matriz extracelular (ECM) dos tecidos pulmonares, causando aumento do suprimento de sangue aos vasos sanguíneos do tumor por meio da angiogênese. O EGFR ativado também desencadeia a expressão aumentada dos fatores de crescimento angiogênicos, particularmente, fator de crescimento epidérmico vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas e interleucina-8²²⁷.

1.13.2.1 EGFR e terapias atuais

Atualmente, os pacientes com qualquer tipo de mutação de ativação do EGFR são tratados com inibidores da tirosina quinase (TKIs) do EGFR. As primeiras terapias EGFR-TKIs foram sintetizados na década de 1990. O gefitinibe (ZD1839; AstraZeneca, Londres, Inglaterra), um derivado da 4-anilinoquinazolina, foi o primeiro EGFR-TKI a obter a aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA. Em 2003, o FDA aprovou o uso do gefitinibe para o tratamento de CNPCP avançado após o insucesso da terapia convencional²²⁷.

Em 2004, outro EGFR-TKI, o erlotinibe (OSI-774; Genentech, Roche Group, South San Francisco, CA, EUA) foi aprovado pelo FDA para o tratamento de CNPCP após o insucesso da quimioterapia citotóxica²²⁷.

Mais recentemente o afatinibe (BIBW-2992; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Ingelheim am Rhein, Alemanha), um bloqueador irreversível da família ErbB, também foi aprovado pelo FDA para uso clínico em pacientes que nunca foram submetidos à quimioterapia e cujos tumores abrigam mutações ativadoras do gene EGFR ^{219,228}.

Entretanto, o sucesso terapêutico desses agentes direcionados é limitado pela resistência primária ou adquirida aos medicamentos. A resistência adquirida a EGFR-TKIs é causada por alterações no gene *EGFR* que são mediados por uma série de mecanismos moleculares ou por um mecanismo independente de *EGFR* que é facilitado pela ativação de vias de sinalização alternativas para apoiar o crescimento do tumor. A mutação T790M é o mecanismo mais frequente de resistência adquirida a EGFR-TKIs em CNPCP²³⁰. Até o momento, estudos demonstraram que 50-60% dos tumores adquiriram resistência aos EGFR-TKIs²³¹.

O composto mono-anilino-pirimidina AZD9291, como representante dos inibidores de terceira geração, é um novo EGFR-TKI que demonstrou ser eficaz contra a resistência a T790M e mutações de sensibilização de EGFR-TKI em modelos pré-clínicos²³². Entretanto, a resistência aos inibidores de terceira geração se desenvolve rapidamente e a mutação EGFR C797S é o principal mecanismo²³².

Portanto, a fim de superar a resistência adquirida aos inibidores de terceira geração, os EGFR-TKIs de próxima geração podem ser uma solução terapêutica ideal²³².

1.13.2.2 Detecção das mutações de EGFR

O gene *EGFR* também pode sofrer amplificação, podendo ser detectado por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou hibridização *in situ* cromogênica (CISH). Além do *EGFR* mutado, agora há evidências de que o aumento do número de cópias do gene *EGFR*, definido como alta polissomia ou amplificação, está associado a uma melhor resposta aos TKIs²³³.

Embora alguns casos de adenocarcinoma mostrem mutações de *EGFR* e aumento do número de cópias do gene, outros podem mostrar apenas uma ou outra forma de alteração. Recentemente, foi relatado que aproximadamente 50% dos casos com mutação de *EGFR* mostram um aumento no número de cópias do *EGFR*, enquanto aproximadamente 75% dos casos com aumento no número de cópias do gene têm mutações²³⁴.

As alterações genéticas no *EGFR* podem ser avaliadas com uma variedade de tecnologias. Em geral, o sequenciamento, embora com a limitação de baixa sensibilidade, é o método mais comum capaz de rastrear todas as mutações e inclui piro-sequenciamento, análise de fusão de alta resolução (HRMA) e análise de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP)²³⁵.

Todavia, o sequenciamento direto e o piro-sequenciamento podem identificar diretamente a mutação, enquanto HRMA e SSCP podem apenas identificar a ausência ou presença de uma mutação²³⁵.

Assim, um método eficaz para identificar as mutações é fundamental devido ao efeito na escolha terapêutica. A reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR) é a base da maioria dos métodos que detectam mutações específicas, incluindo a tecnologia do sistema de mutação refratária de amplificação (ARMS)²³⁵.

A origem do material biológico é uma das questões mais importantes para esses testes moleculares. Em geral, a amostragem do tecido tumoral é considerada o padrão ouro para a genotipagem. No entanto, o tecido tumoral não está disponível na maioria dos casos, pois a maioria dos pacientes apresenta metástase tumoral ou é submetida a ressecção após o diagnóstico. Portanto, o DNA do tumor circulante (ct) está emergindo como uma nova estratégia para genotipagem. O ctDNA pode fornecer as mesmas informações que o tecido tumoral e evita a heterogeneidade do tumor, podendo ser usado nos casos em que o tecido tumoral não está disponível ²³⁶.

Vários métodos podem ser usados para detectar mutações de *EGFR* no plasma ou soro de pacientes com CNPCP. Entre deles, o PCR digital de gotículas (ddPCR), um novo método que pode quantificar ácidos nucleicos absolutos²³⁷.

A mistura de PCR é distribuída em várias reações e o número de cópias dos ácidos nucleicos em cada reação são testados. As estatísticas de Poisson podem ser usadas para calcular o número de cópia absoluto dos ácidos nucleicos-alvo na amostra original²³⁸.

As principais vantagens do ddPCR são de fornecer uma alta sensibilidade e uma quantificação absoluta para detecção ²³⁸.

1.13.3 PD-1-PDL-1

1.13.3.1 Sinapses imunológicas ou pontos de checagem

Denomina-se sinapse imunológica ou agregado de ativação supramolecular (SMAC), a região de contato entre a célula T e a célula apresentadora de antígeno (APC). Na região central, encontra-se o complexo TCR (receptor de células T), correceptores CD4 ou CD8, receptores para coestimuladores, enzimas e outras proteínas. Na periferia, (p-SMAC), encontram-se moléculas de sinalização de membranas plasmáticas com conteúdo lipídico, chamados de *Rafts* lipídicos ou macrodomínios ricos em glicolipídeos²³⁹.

A sinalização entre o TCR e o correceptor estimulador é iniciada nesses locais. Quando os *rafts* induzem mudanças no citoesqueleto, coalescem e formam a sinapse. Externamente à p-SMAC encontra-se uma região distal ou d-SMAC, rica em actina e proteínas CD45, responsáveis por finalizar alterações no citoesqueleto da célula T²³⁹.

A formação da sinapse imunológica é o gatilho para a sinalização mediada pelo receptor da célula T (TCR), acarretando estabilização de adesão, controle da endocitose e liberação de grânulos ou citocinas. Após a formação da sinapse imunológica, originam-se sinais estimulatórios ou inibitórios do sistema imune, decorrentes de moléculas coestimuladoras, chamadas de pontos de checagem imunológicos²³⁹.

O efeito do sistema imune no câncer é o resultado de uma interação complexa de células e mediadores químicos com atividade anti-tumoral (linfócitos CD8, Th1 e NK, macrófagos M1 e células dendríticas do tipo 1, IFN-gama, TNFA, IL-1 e IL-12, TRAIL, perforina e FasL) e pró-tumoral (linfócitos Treg e Th2, células supressoras derivadas da medula óssea, macrófago do tipo M2, células dendríticas do tipo 2, PD-1, CTLA4, IL-23, IL-10, IDO, TDO, ARG1, COX-2, PGE2) ²⁴⁰.(Figura 6).

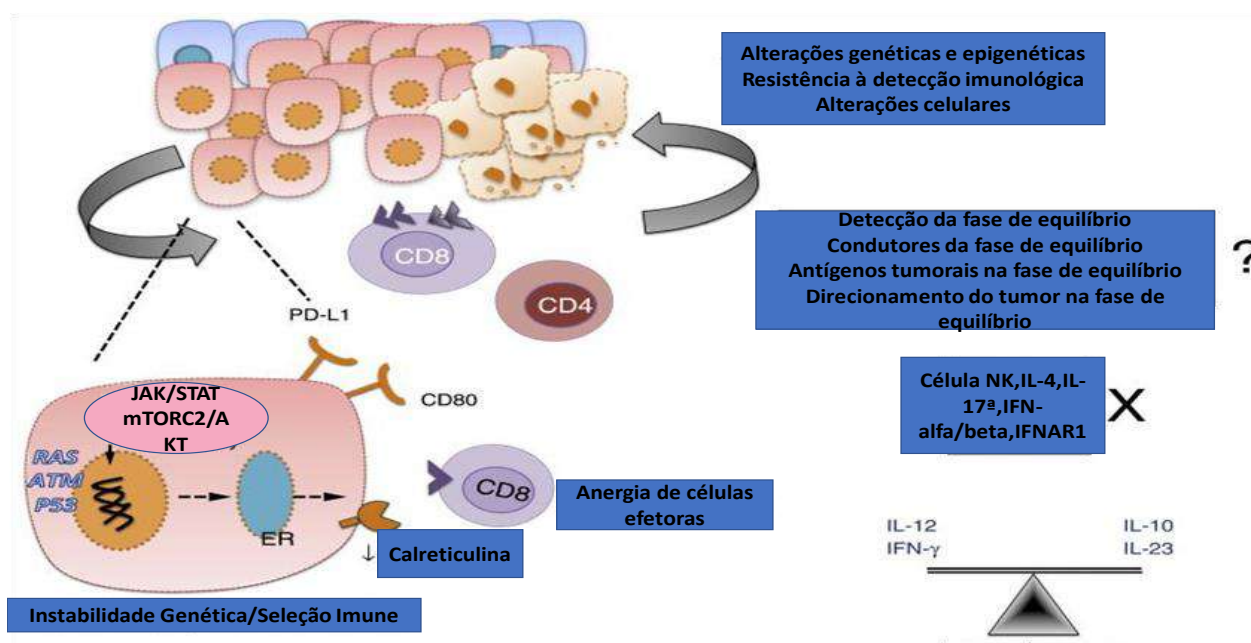


Figura 6. Na fase de equilíbrio da imunoeedição do câncer, o sistema imunológico mantém o tumor em um estado de dormência funcional. O sistema imune adaptativo é necessário para manter o tumor em um estado funcionalmente dormente, enquanto as células NK e citocinas como IL-4, IL-17A e IFN- α / β são dispensáveis. Adaptado de Mittal D, 2014.

1.13.2.2 PD-1

A proteína de morte celular programada 1 ou PD-1 (também referida como CD279) é uma proteína transmembrana de 55 kDa contendo 288 aminoácidos com um domínio N-terminal extracelular (semelhante a IgV), um domínio que

permeia a membrana e uma cauda citoplasmática, codificada pelo gene *PDCD1*. Foi descoberto pela primeira vez em linhas celulares LyD9 (progenitor hematopoiético murino) e 2B4-11 (hibridoma de células T murino) privadas de interleucina-3 (IL-3) em 1992²⁴¹.

O gene *PDCD1* codifica um receptor de superfície celular que é membro da superfamília B7 / CD28 envolvida na imunomodulação. *PDCD1* atua como uma molécula inibidora nas células T após interagir com seus ligantes PDL1 e PDL2²⁴².

A função de PD-1 é de inibir respostas imunes, adaptativas e inatas, regulando as respostas de fase tardia (fase efetora, resposta de memória, infecção crônica). Encontra-se expressa em linfócitos T CD8⁺ ativados, células Natural Killer (NK), linfócitos B, macrófagos, células dendríticas (DCs) e monócitos. A maior expressão ocorre em células T tumor específicas²⁴³.

A proteína PD-1 possui duas famílias B7 ligantes, o PD-L1 e o PD-L2. O PD-L1 é induzido nas células hematopoiéticas ativadas e nas células epiteliais, através da citocina inflamatória IFN-*gama*. O PD-L2 possui expressão muito mais seletiva nas células dendríticas ativadas e em alguns macrófagos²⁴⁴.

A interação entre PD-1 e PD-L1 ou PD-L2 em tecidos do hospedeiro leva à inibição da sinalização do receptor de células T (TCR) e coestimulação de CD28²⁴⁵; limita as interações das células T com as células alvo e, finalmente, leva à sua inativação e perda da capacidade proliferativa. A expressão de PD-L1 é induzida por estímulos inflamatórios localizados, como interferons (IFNs) liberados pelas células T infiltrantes²⁴⁶.

O processo de indução de PD-L1 no câncer foi denominado "resistência imunológica adaptativa" e representa um mecanismo pelo qual as células cancerosas se protegem da destruição mediada por células T²⁴⁶.

A expressão de PD-1 na superfície das células T ativadas ocorre por ativação transcricional e demora entre 6 a 12 horas. A ativação do PD-1 aumenta a migração de células T nos tecidos, limitando o tempo que uma célula T precisa para reconhecer os complexos de MHC. O bloqueio de PD-1 funciona, predominantemente, no microambiente tumoral, onde seus ligantes são super-expressos pelas células tumorais. Os ligantes para PD-1 sofrem *upregulation* em diversos tumores. O PD-L1 é o que apresenta maior expressão em tumores sólidos²⁴⁷.

A ativação transcricional de PD-1 é desencadeada por fatores de transcrição, como fator nuclear de células T ativadas (NFAT), via NOTCH, proteína Forkhead box (FOX) e fator regulador 9 de interferon (IFN) (IRF9). Durante infecções crônicas, PD-1 é expresso em células TCD8 exauridas, devido à desmetilação do seu promotor. O fator de transcrição FOXO1 se liga ao promotor PD-1 para aumentar sua expressão. O vazamento de células cancerosas aumenta a expressão da subunidade c-FOS de AP1, e assim, a expressão de PD-1²⁴⁸.

O mecanismo de resistência adaptativa por indução de PD-L1 tumoral, juntamente com a ampla atividade do PD-1, indica a possibilidade de se estudar um mecanismo de terapia contra o câncer, utilizando essas vias. Muitos pacientes possuiriam células T próprias capazes de atacar as células tumorais se não existisse a adaptação imune no microambiente tumoral. A expressão de

PD-L1 no tumor mostra o potencial do próprio sistema imune do paciente em reconhecer as suas células tumorais²⁴⁹.

A análise de atividade antitumoral é observada com destaque para a via PD-1, como uma via de imunossupressão intratumoral dominante e um alvo na terapia contra o câncer²⁴⁹.

A primeira geração de anticorpos que bloqueiam os pontos de controle imunes do PD-1, aprovados pela FDA, está representada pelo pembrolizumab e o nivolumab, que inibem a interação PD-1/ ligantes, aumentam a atividade e reação das células T e a produção de citocinas inflamatórias. Avanços no sequenciamento genético, tecnologia e informática tornam mais factível o estudo genético de cada tumor e, conseqüentemente, uma melhor análise e identificação do anticorpo correto para cada caso²⁵⁰.

Atualmente, anticorpos para PD1 e PDL1 causam entusiasmo em relação ao uso de imunoterapia no tratamento do adenocarcinoma de pulmão. Seu uso foi impulsionado, principalmente, pelos resultados de estudos avaliando anticorpos antagonistas dos receptores de morte programada PD1 /PDL1, os quais demonstraram respostas antitumorais em pacientes com quimioterapia refratária²⁵¹.

Ensaio clínico randomizado para adenocarcinoma de pulmão metastático avaliando anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1 estão em andamento, e outros estudos, estão investigando estratégias de combinação. Todos os esforços adicionais estão sendo realizados para avaliar biomarcadores potenciais da resposta dessa terapia, em particular, a expressão de PDL1 dentro do tumor²⁵¹.

Deleções mono e bialélicas de PDCD1 também são recorrentemente observadas em linfomas de células T humanas com frequências que podem exceder 30%, indicando alta relevância clínica. Mecanicamente, a atividade de PD1 aumenta os níveis do supressor de tumor PTEN e atenua a sinalização pelas cinases AKT (164730) e PKC em células pré-malignas²⁵. Em contraste, uma deleção homozigótica ou heterozigótica de PD1 permite o crescimento irrestrito de células T após um insulto oncogênico e leva ao rápido desenvolvimento de linfomas altamente agressivos *in vivo* que são prontamente transplantáveis para os receptores. Assim, o receptor PD1 inibitório é um supressor de tumor haploinsuficiente potente em linfomas de células T que é frequentemente alterado em doenças humanas²⁵².

Meng e cols. (2018) relataram um mecanismo de degradação de PD1 e a importância desse mecanismo na imunidade antitumoral em modelos pré-clínicos. Eles mostraram que a superfície PD1 sofre internalização, ubiquitinação subsequente e degradação do proteassoma em células T ativadas. FBXO38 é uma ligase E3 de PD1 que medeia a poliubiquitinação ligada a lys48 e subsequente degradação do proteassoma. Concluíram que FBXO38 regula a expressão de PD1²⁵³.

Sugiura e cols. (2019) demonstraram que CD80 interage com PDL1 em cis em células apresentadoras de antígeno para interromper a ligação de PDL1 / PD1. Subsequentemente, PDL1 não pode envolver PD1 para inibir a ativação de células T quando as células apresentadoras de antígeno expressam quantidades substanciais de CD80. Em camundongos knockin nos quais não ocorrem interações cis-PDL1 / CD80, a imunidade tumoral e as respostas autoimunes foram grandemente atenuadas por PD1. Assim, os autores

concluíram que CD80 em células apresentadoras de antígeno limita o sinal co-inibitório de PD1, enquanto promove a co-estimulação mediada por CD28, destacando componentes críticos para indução de respostas imunes ideais²⁵⁴.

1.13.2.3 PD-L1

O ligante PDL-1, também referido como CD279 e B7-H1, pertence à série B7 e é uma glicoproteína transmembranar tipo 1 de 33 kDa que contém 290 aminoácidos com domínios Ig- e IgC em sua região extracelular ²⁵⁵.

O PD-L1 é geralmente expresso por macrófagos, algumas células T ativadas e células B, células dendríticas e algumas células epiteliais, particularmente em condições inflamatórias. Também é expresso pelas células tumorais como um "mecanismo imune adaptativo" para escapar das respostas antitumorais. PD-L1 está associado a um ambiente imunológico rico em células T CD8, produção de citocinas Th1 e fatores químicos, bem como interferons e características específicas de expressão gênica²⁵⁶.

O IFN- γ ativa a proteína quinase D isoforma 2 (PKD2), que é importante para a regulação de PD-L1. A inibição da atividade de PKD2 inibe a expressão de PD-L1 e promove uma forte resposta imune antitumoral. As células NK secretam IFN- γ através das vias Janus quinase (JAK1, JAK2) e transdutor de sinal e ativador da transcrição1 (STAT1), aumentando a expressão de PD-L1 na superfície das células tumorais. As células T e NK parecem secretar IFN- γ , que induz a expressão de PD-L1 na superfície das células alvo, incluindo células tumorais ²⁵⁷.

PD-L1 atua como um fator pró-tumorigênico em células cancerosas através da ligação a seus receptores, ativando vias de sinalização proliferativas e de sobrevivência. Este achado indicou ainda que PD-L1 está implicado na progressão tumoral subsequente. Além disso, PD-L1 demonstrou exercer efeitos proliferativos não imunes em uma variedade de tipos de células tumorais²⁵⁸.

1.13.2.4 Via PD-1-PDL-1

Evidências pré-clínicas e clínicas sugerem que o sistema imunológico é capaz de detectar e erradicar células tumorais, fornecendo uma justificativa para a imunoterapia em oncologia. A resposta imune antitumoral é iniciada pela captação e processamento de antígenos de proteínas tumorais por células apresentadoras de antígenos (APCs), que posteriormente ativam as células T. A ativação de células T requer duas etapas: (a) Apresentação de peptídeos antigênicos na superfície de APCs em conjunto com moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) para células T virgens que expressam o receptor de células T apropriado (TCR) e, (b) coestimulação da interação entre os ligantes CD80 / CD86 em APCs e o receptor CD28 em células T^{255,256}.

Resistência adaptativa no microambiente tumoral. As células apresentadoras de antígenos (APCs) capturam antígenos no local do tumor e migram para os órgãos linfóides, onde os antígenos são apresentados às células T virgens. Seletivamente, as células T específicas do antígeno são ativadas, diferenciadas em células T efetoras (Teff) e expandidas. As células Teff migram para o microambiente tumoral, onde as células tumorais apresentarão seus antígenos tumorais em MHC-I, estimulando a produção de IFN- γ pelas células Teff no microambiente tumoral. A presença de IFN- γ irá induzir nas células

tumorais e nas células do estroma associado ao tumor a expressão de B7-H1 (PD-L1) como um mecanismo de "resistência adaptativa" de evasão imune, o que levará em último termo à supressão imunológica de Células T. TE, células efetoras T²⁵⁶. Figura 7

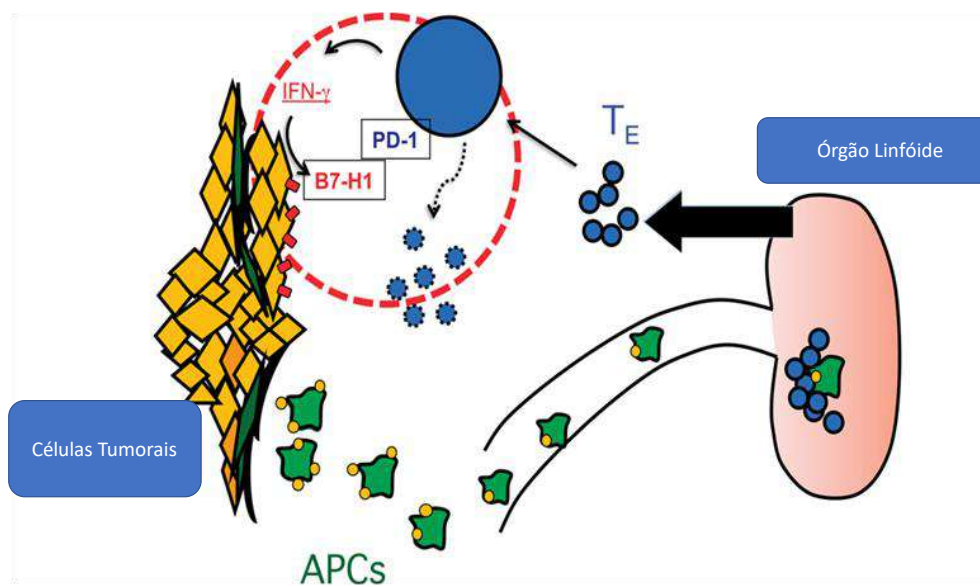


Figura 7. Resistência adaptativa no microambiente tumoral. As células apresentadoras de antígenos (APCs) capturam antígenos no local do tumor e migram para os órgãos linfóides, onde os antígenos são apresentados às células T virgens. Seletivamente, as células T específicas do antígeno são ativadas, diferenciadas em células T efetoras (Teff) e expandidas. As células Teff migram para o microambiente tumoral, onde as células tumorais apresentarão seus antígenos tumorais em MHC-I, estimulando a produção de IFN- γ pelas células Teff no microambiente tumoral. A presença de IFN- γ irá induzir nas células tumorais e nas células do estroma associado ao tumor a expressão de B7-H1 (PD-L1) como um mecanismo de "resistência adaptativa" de evasão imune, o que levará em último termo à supressão imunológica de Células T. TE, células efetoras T. Adaptado de Sanmamed, 2014.

A resposta imune antitumoral é composta por CD4⁺ ativado; células T auxiliares, que recrutam outras populações de células imunes para o tumor, secretando citocinas; e de células T citotóxicas CD8⁺ ativadas que reconhecem e matam diretamente as células tumorais por meio de interações entre seu TCR e o complexo MHC-antígeno da célula tumoral. O sistema imunológico também pode promover o crescimento e a progressão do tumor por meio de tipos de

células imunossupressoras dentro do microambiente tumoral (por exemplo, células T reguladoras, células supressoras derivadas de mieloides e macrófagos associados a tumor). As células tumorais podem escapar do sistema imunológico explorando as vias do ponto de verificação imunológico²⁵⁷.

Evidências crescentes mostram que o sistema imunológico está envolvido na fisiopatologia do CPPC. Na verdade, o CPCP há muito é considerado imunogênico devido à ocorrência de distúrbios paraneoplásicos, como a síndrome miastênica de Lambert-Eaton (LEMS), que resulta de uma resposta imune dirigida contra antígenos específicos expressos nas células tumorais do CPCP e nas células nervosas normais (HuD, HuC e Hel-N1). Curiosamente, os pacientes com CPPC com LEMS tendem a ter um melhor prognóstico, talvez porque a resposta imune gerada contra o sistema nervoso também esteja direcionando as células tumorais ²⁵⁸.

Adicionalmente, há evidências de que o CPCP é imunogênico em função da relação entre a atividade imunológica e do prognóstico. Por exemplo, mais células T CD45⁺ infiltrando tumores CPCP foram consideradas preditivas de melhor sobrevida global, independente do estágio e status de desempenho. Além disso, mais células T efetoras foram encontradas em estágio limitado-CPCP em comparação com estágio extenso. Maiores proporções de células T efetoras-regulatórias foram associadas a uma sobrevida mais longa. Além de apoiar a justificativa para a imunoterapia, dados recentes sugerem que os cânceres de pulmão com uma alta taxa de mutação podem ser, particularmente, sensíveis aos agentes imunoterapêuticos que inibem a via PD-1 ²⁵⁹.

PD-L1 representa outro alvo terapêutico potencial no CPCP. Além de ser um ligante para PD-1, PD-L1 também pode servir como um receptor para CD80

expresso em células T, entregando um sinal inibitório adicional. O bloqueio de PD-L1 pode remover os sinais inibitórios e estimular a imunidade antitumoral²⁶⁰.

1.13.3 Vias de sinalização associadas à PD-1-PDL-1

1.13.3.1 Via de sinalização PI3K / AKT/mTOR

A via da fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT) está associada à proliferação celular e apoptose. A ativação de PI3K / AKT aumenta a produção de energia das células T CD8. O mTOR é responsável por regular os efeitos biológicos da estimulação de células imunes. A ativação de PI3K / AKT pode promover a expressão de PD-L1 por meio do aumento da sinalização extrínseca ou diminuição da expressão de reguladores negativos, como fosfatase e homólogo de tensina (PTEN). A regulação negativa de PTEN pode levar à ativação de PI3K / AKT e facilitar a expressão de PD-L1²⁶¹.

A via mTOR pode formar dois novos complexos com funções diferentes: O mTORC1 é um complexo bem caracterizado como um regulador da tradução. O mTORC2 é responsável pela fosforilação de alguns membros do grupo de quinases AGC, como AKT (S473), e tem sido relacionado ao controle do citoesqueleto²⁶².

Os fatores que aumentam a via PI3K / AKT são o EGFshh, IGF-1, insulina, e CaM. Tanto a leptina quanto a insulina recrutam a sinalização da PI3K para a regulação metabólica. A via é antagonizada por vários fatores, incluindo PTEN, GSK3B e HB9. O PTEN atua desfosforilando PIP3 em PIP2, o que limita a

capacidade dos AKTs de se ligarem à membrana, diminuindo sua atividade. As deficiências de PTEN podem ser compensadas a jusante para resgatar a diferenciação ou quiescência^{232,268}.

1.13.3.2 Via de sinalização MAPK

A via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) é um importante sistema de transdução de sinal que está associado à conversão de sinais extracelulares em respostas intracelulares, que pode regular a proliferação celular, diferenciação, invasão, metástase e morte por meio da ativação de fosforilação. A quinase amino-terminal c-Jun (c-Jun), p38MAPK e ERK são três vias paralelas envolvidas na via MAPK²⁶⁸. A pesquisa recente tornou-se gradualmente focada na associação entre o eixo PD-1 / PD-L1 e a via MAPK. A inibição da via MAPK impediu o fator de crescimento epidérmico e o mRNA de CD274 induzido por IFN- γ e a proteína PD-L1 e a regulação positiva da membrana em células de adenocarcinoma de pulmão ²⁶³.

Após a ativação do receptor do fator de crescimento (proteína transmembrana), este ativa a proteína RAS através da molécula adaptadora GRB2 e um fator de troca do nucleotídeo guanina (SOS), induz RAS a trocar seu GDP por um GTP. Este evento é seguido por uma estimulação sequencial de diversas proteínas quinases citoplasmáticas, como a Raf (quinase específica para Ser/Thr), a MEK e as MAPK. As MAPK, por sua vez, migram para o núcleo celular, onde fosforilam um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, iniciando, assim, a proliferação celular²⁶⁴.

1.13.3.3 Via de sinalização JAK-STAT

A ativação da sinalização de JAK da via STAT é uma via de sinalização conservada evolutivamente, usada por uma variedade de citocinas, IFNs, fatores de crescimento e moléculas relacionadas. Recentemente, foi relatado que a via JAK / STAT induz a expressão de PD-L1 em cânceres²⁶⁵.

1.13.3.4 Via de sinalização WNT

Foi demonstrado que a sinalização WNT desregulada facilita a transformação maligna, a progressão do tumor e a resistência à terapia convencional do câncer. Um grande conjunto de evidências indica que sinais WNT anormais também podem interromper o imunomonitoramento do câncer, promovendo assim o escape imunológico e a resistência a uma variedade de imunoterapias, incluindo bloqueadores de pontos de verificação imunológicos^{266,267}.

A via de sinalização WNT é conhecida por desempenhar um papel crucial na regulação de células-tronco²⁶⁷.

1.13.3.5 Via de sinalização NF-κB

Recentemente, foi demonstrado que a expressão do gene *PD-L1* pode ser induzida pelo receptor Toll-like (TLR) ou pelo fator nuclear dirigido por IFN-γ (NF-κB). Lim e cols. (2016) observaram que o inibidor de NF-κB curcumina, em combinação com a terapia de inibição de checkpoint anti-CTLA-4, reduziu o

crescimento de câncer de mama, carcinoma de cólon e linhas celulares de melanoma, sugerindo que a inibição de NF- κ B pode desempenhar um papel duplo, a proliferação e sobrevivência de células tumorais²⁶⁸. Os pontos de verificação imunológicos tumorais NF- κ B estão provavelmente envolvidos na expressão de PD-L1 induzida por LMP1, uma vez que o éster fenetílico do ácido cafeico inibidor de NF- κ B diminuiu a indução de PD-L1. NF- κ B também é um mediador principal da expressão de PD-L1 induzida por INF- γ . O inibidor de NF- κ B, mas não os inibidores de MAPK, PI3K ou STAT3, aboliu a expressão de PD-L1 induzida por IFN²⁶⁹.

Além disso, há indícios de que a quimioterapia induz supressão imunológica local por meio da suprarregulação de PD-L1 mediada por NF- κ B no câncer de ovário²⁷⁰.

1.13.3.6 Via de sinalização Hedgehog

A via Hedgehog-GLI (HH-GLI) é uma via de sinalização altamente conservada que desempenha um papel fundamental no controle da especificação celular, interação célula-célula e padronização tecidual. Além da sua importância na organogênese, essa via de sinalização encontra-se interrompida em vários tipos de câncer ²⁷¹.

Nos mamíferos, a via Hh é composta por três proteínas: Shh, Indian-Hedgehog (Ihh) e Desert-Hedgehog (Dhh). Shh tem papel marcante na especificação do tipo de célula do sistema nervoso e na padronização dos membros, enquanto Ihh tem papel importante no desenvolvimento do esqueleto, principalmente na ossificação endocondral. Dhh está restrito às gônadas,

incluindo células da granulosa dos ovários e células de Sertoli dos testículos^{272,273}. Também é constituída por dois receptores, a proteína 12-transmembrana Patched (Ptch1) e SMO (receptor acoplado à proteína G), e três glicoproteínas GLI (GLI1, GLI2 e GLI3)²⁷³.

A ativação da via Shh pode acontecer de duas maneiras principais: 1. sinalização canônica: por interação dependente de ligantes ou através de sinalização induzida por receptor²⁷². (Figura 8).

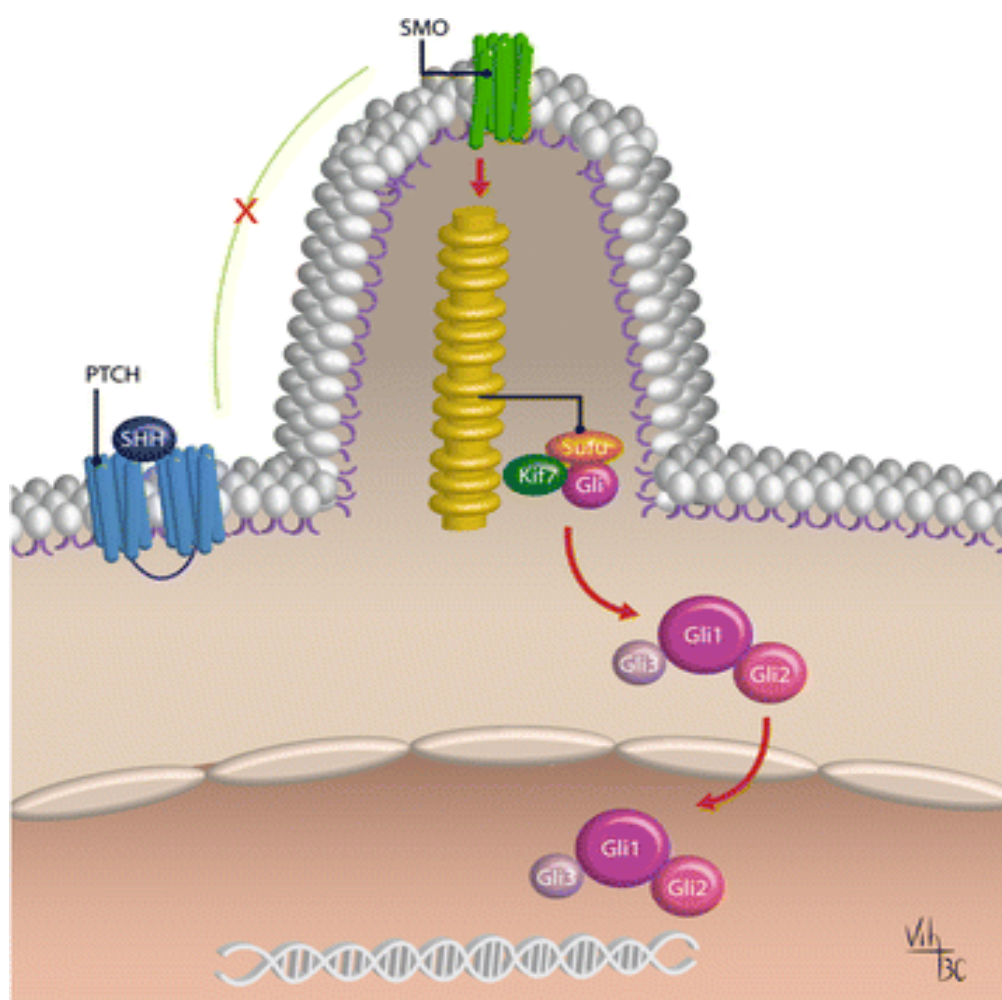


Figura 8. A ativação canônica da via Shh em vertebrados. A ativação ocorre por interação dependente de ligantes quando Shh se liga a Ptch na membrana celular. Em resposta a esta ligação, ptch não inibe mais o Smo, que se acumula no PC e inicia a cascata da via de sinalização a jusante. Assim, smo regula o processamento e ativação gli no PC. Quando Gli é ativado, ele se transloca para o núcleo, onde ativa genes alvo. (Diagrama de Carballo, VC). Adaptado de Robbins et al., 2012

2. sinalização não canônica: quando há um mecanismo de ativação a jusante (SMO).^{272,273}. (Figura 9)

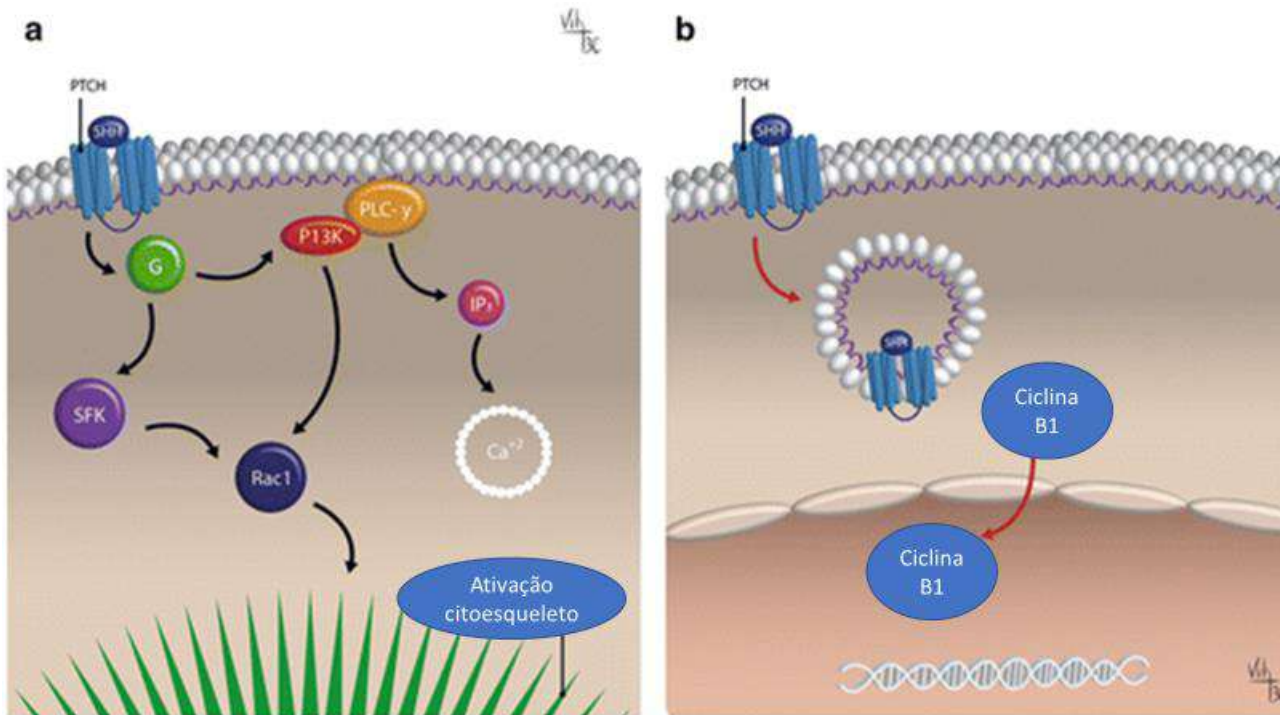


Figura 9. A ativação não canônica da via Shh. A ativação não canônica ocorre através de mecanismos independentes do Gli e pode ser de dois tipos. A) Tipo I que modula Ca²⁺ e actin citoesqueleto (esquerda). Quando Shh liga o receptor Ptch, Smo não é mais inibido e as proteínas G_i (G) e pequenas GTPases RhoA e Rac1 ativadas. Além disso, smo estimula cálcio (Ca²⁺) liberação do ânticulo endoplasmático (ER) e plc-γ catalisado a abertura de canais dependentes de IP₃ pela geração de IP₃. B) Tipo II que é independente no Smo. Quando Shh liga Ptch, a interação de Ptch com ciclin B1 é interrompida, levando a um aumento na proliferação celular e sobrevivência (à direita). (Diagramas de Carballo, VC). Adaptado de Robbins et al., 2012.

A sinalização canônica ocorre quando a transdução é iniciada pela interação do ligante HH ao PTCH1. Na ausência de ligante, ocorre acúmulo de SMO no cílio primário (CP), uma organela que se alastra da superfície das células vertebradas, atuando como um centro de sinalização especializado para transdução de sinal HH. Assim, o acúmulo de SMO no cílio promove a repressão da via²⁷⁴.

Em resposta à sinalização de Shh, a inibição de Ptch1 de Smo no CP é abolida, Ptch1 é internalizado e degradado. Assim, após a degradação de Ptch1, Smo se acumula no CP, onde é ativado e estabilizado, iniciando a cascata de sinalização a jusante Shh. Esta cascata de sinalização a jusante resulta na translocação de proteínas da família Gli para o núcleo que inicia a transcrição de genes alvo, incluindo Ptch1 e Gli1, em um loop de feedback negativo e positivo, respectivamente²⁷⁵. Além disso, a translocação de Gli para o núcleo também induz à modulação de proteínas de Wnt e Noggin²⁷⁶. Patched 2 (Ptch2) é outro receptor para Shh que compartilha aproximadamente 54% de homologia com Ptch1. No entanto, a expressão e sinalização de Ptch2 é diferente de Ptch1, tendo capacidade diminuída de inibir Smo na ausência do ligante Shh^{273,277}.

Essas três proteínas são dependentes de Shh, onde apenas Gli1 ocorre atua como um ativador transcricional de comprimento total, enquanto Gli2 e Gli3 atuam como reguladores negativos ou positivos da via que é determinada pelo processamento pós-transcricional e pós-tradução²⁷⁸.

O Gli3 também tem uma função muito importante na regulação da sinalização Shh. Sem Shh, Gli3 tem uma forma repressora (Gli3R). Quando Shh se liga a Ptch e ativa Smo, Smo converte Gli3R em uma forma ativada (Gli3A). Portanto, Gli3 funciona como um fator de transcrição com dupla função²⁷⁸.

A via de sinalização Shh também pode ser controlada pelo Supressor de Fusão (SUFU), que é um regulador negativo da via de sinalização Shh, atuando nos fatores de transcrição Gli. Quando o ligante Shh não está presente, SUFU se liga diretamente às proteínas Gli e inibe sua translocação para o núcleo, impedindo a ativação da via. No entanto, os mecanismos específicos relativos à inativação de Gli por SUFU não são completamente compreendidos. As

proteínas Gli retidas no citoplasma por SUFU são degradadas ou processadas e, assim, inibem a sinalização de Shh²⁷⁹. Quando o Gli-R se move para o núcleo, ele reprime os genes alvos SHH, incluindo o próprio *Ptch1* e o *Gli1*. Quando a via Shh é ativada, é necessário que a inibição de SUFU de Glis ocorra por hiperfosforilação de SUFU²⁷³.

A ubiquitinação, principalmente de Gli3, controla a via de Shh, demonstrando que Gli1 e Gli2 podem ser acetilados na lisina 518 e 757, respectivamente. O mecanismo de desacetilação dessas proteínas é mediado pela enzima histona desacetilase 1 (HDAC1), que promove a ativação transcricional da via²⁸⁰.

Foi demonstrado que a ativação aberrante da sinalização de Hh está associada à formação de tumores cerebrais, bem como seu cruzamento com outras vias, como o fator transformador de crescimento beta (TGFβs), Wnt, Notch e Shh²⁸⁰.

A “sinalização não canônica de Shh” geralmente ocorre por meio de mecanismos independentes de Gli. Os mecanismos independentes de Gli incluem dois tipos: Tipo I a jusante de Smo, que modula Ca²⁺ e o citoesqueleto de actina; e o tipo II que é independente de Smo e aumenta a proliferação e sobrevivência celular. A sinalização não canônica de Shh pode regular a quimiotaxia e a migração celular por meio do rearranjo de actina e pode estimular a proliferação celular por meio da ativação de quinases reguladas por sinal extracelular induzida por cálcio (ERK), ativando a família de quinase Src, que é necessária na orientação do axônio²⁸¹.

Novas evidências sugerem que a via de sinalização Shh pode interagir com outros componentes de sinalização, como TGF-β, receptor do fator de

crescimento epidérmico (EGFR), K-Ras, PKA, Notch e Wnt / β -catenina. Tem sido sugerido que mais de uma dessas vias estejam ativas, em diferentes tipos de tumores, ao mesmo tempo²⁷³.

As vias Shh e Wnt podem interagir de duas maneiras: por meio de Gli1 e Gli2, que mostraram regular positivamente a expressão da proteína-1 relacionada ao frizzled secretada (sFRP-1) e, assim, inibir ligantes Wnt e / ou seus receptores; e através de GSK3 β a jusante (um componente essencial dos complexos que regulador positivo da sinalização de Shh por fosforilar SUFU e promover a liberação de SUFU de Gli, pelo menos quando a via está ativa^{273,280}.

Já foi demonstrado que em camundongos sem função APC normal (degradação citoplasmática e exportação nuclear de β -catenina) que SUFU regula negativamente a transcrição dependente de Tcf, reduzindo os níveis nucleares de β -catenina. Portanto, Shh pode regular a sinalização Wnt^{282,273}.

Está bem estabelecido que a ativação aberrante do RAS tem um papel protagonista na tumorigênese, e a ativação da mutação do RAS ocorre em 30% de todos os cânceres humanos. Outra via que demonstrou interagir com Shh é a via de sinalização ERK, que controla a função do fator de transcrição Gli na sinalização Shh, quando estimulada por ligantes exógenos (como fator de crescimento de fibroblastos básico -bFGF)²⁸².

Além de Wnt / β catenina e KRAS, TGF- β / TGF- β R, EGFR e receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α) também podem cooperar com a via Shh canônica²⁸³.

Outra via de sinalização que se cruza com Shh e contribui para a tumorigênese é a sinalização de EGFR. A estimulação de EGFR / RAS / RAF / MEK / ERK em diferentes linhagens de células cancerosas, foi capaz de ativar o

fator de transcrição Gli e a modulação transcricional seletiva da expressão do gene alvo de Gli ²⁸⁴.

Assim, fica cada vez mais evidente que a integração dessas vias de sinalização, importantes para a morfogênese embrionária, pode suportar um comportamento mais maligno das células tumorais e, conseqüentemente, manter a tumorigênese de diversos tumores agressivos ²⁷³.

1.14 PERFIL GENÔMICO DO CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO

Os genomas do CPCP apresentaram taxas de mutação extremamente altas de 8,62 mutações não-sinônimas por milhão de pares de base (Mb). As transversões C:G>A:T foram encontradas em 28% de todas as mutações, conferindo um padrão indicativo de tabagismo pesado²⁸⁵.

O histórico de tabagismo ou o estágio clínico dos tumores não se correlaciona com o tipo e o número de mutações. O teor médio do tumor foi de 84%. Em contrapartida, os CPCP em murinos apresentaram um baixo número de alterações somáticas (em média 28,5 mutações que alteram proteínas por amostra em média)²⁸⁶.

A classificação da maioria dos genes mutados no CPCP compreende os genes reguladores do ciclo celular e morte celular; reguladores epigenéticos, tirosino-quinases receptores; e reguladores da dinâmica do citoesqueleto e da adesão celular²⁶⁸.

A utilização da hibridização genômica comparativa baseada em array (aCGH) e a análise de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) com base em

array aumentam a resolução das alterações do número de cópias somáticas do nível do cromossomo para o nível de um único gene. Essas análises confirmaram perdas recorrentes nas regiões 3p e 17p, abrigando *FHIT*, *RASSF1* e *TP53*, e perdas nas regiões 13q e 10q, abrigando *RB1* e *PTEN*²⁸⁷. A amplificação das regiões 1p, 2p e 8q, que compreendem *MYCL* (L-MYC), *MYCN* (N-MYC) e *MYC* (c-MYC) também foi observada²⁶⁸.

São importantes as alterações de perda de função bialélica em *RB1* e *TP53* que ocorrem em quase todos os CPCP, apoiando o conceito de longa data de perda de atividade supressora de tumor como o evento limitante para a iniciação do CPCP, que foi validado nos modelos de camundongos geneticamente modificados²⁸⁸.

Além da perda quase universal de RB e p53, porções significativas de mutações CPCP afetam os homólogos funcionais RBL1 (3-4%), RBL2 (5-7%) e TP73 (13%). RBL1 e RBL2 compartilham funções-chave com RB, incluindo a regulação dos fatores de transcrição E2F na expressão de genes do ciclo celular²⁸⁵.

A proteína do retinoblastoma é um membro de uma família de proteínas que inclui *P107* (*RBL1*) e *P130* (*RBL2*). Embora a perda de *RB1* seja uma mutação associada ao CPCP, as mutações nos outros membros da família raramente são observadas no CPCP. A proteína RB1 tem um papel central na regulação do ciclo celular, onde suprime a transição das células da fase G1 para a fase S. As formas mutantes de RB1, mesmo perdendo sua capacidade de inibição da progressão do ciclo celular, mantem sua capacidade de promover a diferenciação celular²⁸⁹.

Recentemente, foi demonstrado que RB1 pode reprimir globalmente redes de pluripotência em células somáticas através da ligação direta a genes de pluripotência conhecidos, como *Oct4* e *Sox2*. A amplificação de SOX 2 ocorre em 27% dos CSCP. Conseqüentemente, a perda de *Rb1* leva à indução desses fatores e um ganho na pluripotência, tornando as células mais suscetíveis à²⁹⁰. A perda de *RB1* no CSCP também está fortemente associada à expressão aumentada do potenciador de zeste 2 (EZH2)²⁹⁰.

O EZH2 demonstrou ser expresso em níveis elevados em células-tronco neurais em proliferação, promovendo a manutenção do progenitor neuronal e a especificação da linhagem, além de regular a troca fenotípica entre as células basais e secretoras no pulmão²⁹¹.

A proteína tumoral p73 que é codificada pela *TP73*, juntamente com a proteína relacionada, p63, constituem a família p53 de fatores de transcrição. Devido a sua semelhança estrutural as proteínas p53, p73 e p63 são consideradas supressores de tumor. A função de P53 é de controlar a parada do ciclo celular e a apoptose por meio de sua capacidade de induzir a expressão de genes relacionados²⁹². A expressão de p73 está disseminada ao longo do epitélio das vias aéreas, enquanto a expressão de p63 é limitada às células basais. *TP73* frequentemente encontra-se alterada no genoma do CSCP (13%), enquanto a alteração *TP63* está ausente²⁸⁵. As alterações de *TP73* incluem rearranjos de genes que resultam na geração da variante p73 com truncamento NH-terminal ou deleção COOH-terminal. Variantes com truncamento N-terminal não possuem o domínio de transativação inteiro ou parte dele e podem exercer um efeito negativo dominante em p73 e p53 de tipo selvagem²⁸⁵.

A Amplificação da transcrição ou a regulação positiva de um dos protooncogenes *MYC* (*MYC*, *MYCN* ou *MYCL*) tem sido identificada em 20% a 30% dos casos de CPCP²⁹³. As proteínas da família *MYC* são ativadores transcricionais capazes de conduzir a expressão de uma ampla variedade de genes que contribuem para a progressão do ciclo celular e regulação do desenvolvimento. As amplificações dos três genes *MYC* são mutuamente exclusivas, sugerindo que a capacidade de conduzir ao desenvolvimento do CPCP é compartilhada entre os membros da família²⁶⁸.

O mecanismo exato de transformação mediada por *MYC* em células CPCP não é completamente compreendido. *MYC* tem sido implicado no controle da pluripotência, autorrenovação e transição epitelial-para-mesenquimal, processos que estão fortemente implicados na transformação celular. A amplificação dos genes da família *MYC* é responsável por até 50% de todos os casos de SCLC²⁹⁴.

Além da ativação da sinalização de *MYC*, a ativação da via oncogênica da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) também foi observada em altas frequências no CPPC. Foi descoberto que o homólogo de fosfatase e tensina (*PTEN*), um inibidor desta via, é perdido em uma fração substancial dos casos de CPCP. Estudos iniciais de alelotipagem mostraram que deleções homozigóticas de *PTEN* estavam presentes em aproximadamente 10% das linhas de células CPCP^{293,294}.

Usando o sequenciamento de próxima geração, mutações e amplificações em outros membros desta via foram identificadas em 20% a 40% de todos os CPCP estudados. É importante ressaltar que todas essas alterações ocorreram de forma mutuamente exclusiva²⁹⁰. A ativação desta via demonstrou

facilitar a regulação aberrante da proliferação, sobrevivência e migração, dando à célula tumoral uma vantagem seletiva²⁹⁰.

A presença de alterações em membros da família *NOTCH* em um quarto das amostras analisadas de CPCP foi demonstrada. As mutações de inativação observadas na sinalização Notch podem contribuir para a tumorigênese, permitindo a expansão da massa de células tumorais NE²⁸⁵.

As altas frequências de alterações encontradas em *TP53*, *RB1* e na via PI3K, bem como em membros da família *MYC* e *NOTCH*, sugeriram que sua respectiva ativação ou inativação é um fator importante para o CPCP^{293,294}.

Outro evento comum no CPCP é a regulação positiva da sinalização anti-apoptótica, em particular, a expressão da proteína anti-apoptótica BCL2 que foi detectada em 75%-90% dos casos de CPCP primário, e apenas em 10% a 30% de todos os outros cânceres de pulmão²⁹⁵. A expressão de BCL2 é transcricionalmente regulada por p53, e a perda quase uniforme desse supressor de tumor, poderia, portanto, ser a razão principal para a regulação positiva de BCL2. Assim, a regulação positiva de BCL2 pode ser uma consequência e não uma causa para a tumorigênese no CPPC²⁹⁵.

Estudos recentes de sequenciamento de todo o exoma identificaram alterações no número de cópias anteriormente desconhecidas, incluindo perda focal de *SLIT2* (que codifica um ligante para ROBO1) e amplificação focal de *CCNE1*, *SOX2*, *FGFR1*, *IRS2* e *NFIB*^{290,296}.

Algumas análises, sugerem que o carcinoma de pequenas células do pulmão apresenta níveis baixos de expressão de *EGFR*, *HER2* e outros RTKs de superfície celular, PI3K, RAS, MAP, cMET. Por outro lado, Inibidores do mTOR não tem demonstrado uma importância clínica significativa para CPCP.

Foram identificados níveis elevados de E2F1-co-ativador e ELHE (timidilato-sintetase), que são mediadores da apoptose e proteínas reguladoras do DNA. A expressão de *PARP1*, proteína de reparo de DNA, e do co-ativador do E2F1 está altamente manifesta no RNAm de CPCP²⁹⁷.

As ampliações de *FGFR1* e *IRS2* indicam desregulação da sinalização do receptor quinase em um subconjunto de tumores, aumentando a perspectiva de direcionar este subgrupo molecular com inibidores específicos da tirosina quinase^{296,297}.

Os genes que codificam as proteínas SOX, principalmente SOX2, estão amplificados em uma parcela significativa dos CPCP²⁹⁶. Dados os papéis dessas proteínas SOX na reprogramação de células somáticas em um fenótipo de células-tronco / progenitoras e na regulação de células progenitoras pulmonares, as células tumorais podem cooptar essas proteínas para promover a autorrenovação e desdiferenciação²⁹⁸.

Foi identificado o produto do gene *CDKN2A*, a ciclina p16, que é um inibidor da quinase e está retido nas células tumorais do CPCP. A proteína p16 regula, negativamente, a evolução do ciclo celular por bloqueio da fosforilação de pRB, o que explica a mutação e o padrão epigenético apresentado por p16 nas células²⁹³.

NFIB codifica um membro da família do fator nuclear I (NFI) de fatores de transcrição que desempenham papéis importantes no desenvolvimento do pulmão e do cérebro, regulando a expressão de um amplo espectro de genes. Embora a amplificação do *NFIB* seja raramente detectada em tumores primários, esse gene é frequentemente superexpresso e amplificado em linhas de células CPCP (34% dos casos) que foram principalmente derivadas de tumores

metastáticos²⁹⁹. Estas observações sugerem que o aumento da atividade deste fator de transcrição pode promover o desenvolvimento do tumor e a metástase²⁹⁹.

Há, ainda, um grande número de mutações não sinônimas (alteração da sequência de aminoácidos) a uma taxa de 8 por milhão de nucleotídeos em média^{285,290}. Essa taxa mutacional, extremamente alta, é atribuída à associação de pacientes com CPPC com tabagismo pesado. A exposição ao tabaco foi encontrada em uma porção significativa (28%) de todas as mutações²⁹⁶.

1.14.1 Inativação de reguladores epigenéticos

Outra observação marcante nos estudos sobre alterações recorrentes no CPPC é o alto número de alterações encontradas nos reguladores epigenéticos³⁰⁰.

Mutações nas histonas acetiltransferases *CREBBP* e *EP300* e nas histonas metiltransferases *MLL*, *MLL2* e *EZH2* foram encontradas em estudos independentes em frequências de 4% a 6% para cada gene^{300,290,296}. Mutações nesses genes podem ser uma fonte importante de alterações em todo o genoma na regulação epigenética. Entretanto, como eles afetam a tumorigênese do CPCP permanece uma questão não totalmente elucidada³⁰⁰.

Um grupo de alterações no CPCP parece convergir em genes que codificam reguladores epigenéticos, incluindo *CREBBP* / *EP300* (proteína de ligação a elemento de resposta de cAMP (CREB) / p300 associado a E1A), *KMT2A* e *KMT2D* (lisina metiltransferase 2A e 2D, respectivamente), *KDM6A* (lisina desmetilase 6A) e vários componentes do complexo BRG / fator associado

a BRM associado a polibromo (PBAF), incluindo PBRM1 (polibromo 1), ARID1A e ARID2 (proteína 1A e 1D contendo domínio interativo rico em AT, respectivamente), e CHD7 (cromodomínio-helicase-proteína de ligação ao DNA 7)^{301,302}.

CREBBP e EP300 são histonas acetiltransferases (HATs) que acetilam vários resíduos de lisina em proteínas histonas. A acetilação da histona H3 lisina 27 (H3K27) mediada por CREBBP / EP300 resulta em estruturas de cromatina que são favoráveis para a transcrição ativa dos genes a jusante. Embora o CREBBP / EP300 de muitos processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, controle de crescimento e homeostase, por meio do acoplamento da remodelação da cromatina ao reconhecimento do fator de transcrição, a perda das funções do CREBBP / EP300 são implicadas em vários tipos de câncer, como o linfoma e o câncer de pulmão^{301,302,303}.

No CPCP, as mutações agrupadas no domínio HAT, bem como o truncamento do gene nas acetiltransferases CREBBP e EP300, sugerem um papel potencial da acetilação de H3K27 e a ativação do gene resultante na supressão tumoral. As mutações observadas em *CREBBP* e *EP300* foram mutuamente exclusivas, sugerindo uma função supressora de tumor compartilhada entre esses parálogos funcionais³⁰³.

KMT2A e KMT2D (também conhecido como leucemia de linhagem mista 1 e 2, respectivamente) são metiltransferases de histona específicas para histona H3 lisina 4 (H3K4)³⁰³.

A monometilação mediada por KMT2A / 2D de histona H3 lisina 4 (H3K4me1) aumenta H3K27ac por CREBBP / EP300 no intensificador / promotor. Os rearranjos gênicos e mutações que afetam os domínios SET

dessas proteínas são frequentemente encontrados na leucemia (Kandath, 2013). As mutações missense e truncadas em *KMT2A* e *KMT2D* sugerem um papel para mutações de perda de função nesses genes, levando à repressão transcricional devido a uma redução global em H3K4me1 e H3K27ac (Smith). KDM6A desmetila H3K27me3, preparando o resíduo de lisina de histona para acetilação por CREBBP / EP300. Portanto, as proteínas da família KMT2 e KDM6A atuam em conjunto com as proteínas HAT para induzir e manter a expressão de genes alvo³⁰⁴.

No câncer, a perda de proteínas da família KMT2 ou KDM6A leva à trimetilação de H3K27 (H3K27me3) e ao silenciamento de genes supressores de tumor. Esta metilação de H3K27 é impulsionada por PRC2 (complexo repressivo polycomb 2), um complexo enzimático multiproteico composto de EZH2, SUZ12, EED e YY1, e a atividade aumentada de EZH2 promove o desenvolvimento de muitos tipos de câncer^{303,304}.

1.14.2 Redes defeituosas para dinâmica do citoesqueleto e adesão celular

Estudos recentes identificaram um grupo de mutações recorrentes que afetam genes que não estão ligados a vias oncogênicas específicas, incluindo mutações em *ALMS1*, *ASPM*, *COBL*, *COL4A2*, *COL22A1*, *FMN2*, *KIAA1211*, *PDE4DIP*, *ROBO1* e *SLIT2*. Notavelmente, as funções conhecidas dessas proteínas, originárias daqueles genes, estão relacionadas à formação do citoesqueleto ou rearranjos associados às interações célula-célula e célula-matriz. *ALMS1* (gene da síndrome de Alstrom), *ASPM* (proteína associada à microcefalia semelhante ao fuso anormal) e *PDE4DIP* (proteína de interação da

fosfodiesterase 4D) se ligam aos microtúbulos e desempenham um papel na formação de estruturas baseadas em microtúbulos, incluindo o centrossoma e o fuso mitótico³⁰⁵. Um processo de sobreposição para o qual convergem os defeitos nesses genes pode ser a divisão celular. A mutação *ASPM* afeta a polaridade durante a divisão celular das células progenitoras neurais e resulta em microencefalia, e *PDE4DIP* é um parálogo da proteína microencefalia *CDK5RAP2*³⁰⁶. *COBL* (cordon bleu), *FMN2* (formin 2) e *KIAA1211* (também conhecido como *CRAD*: regulador da dinâmica da actina relacionado ao câncer) se ligam à actina e influenciam a dinâmica do citoesqueleto de actina e a polaridade celular³⁰⁷.

Enquanto *COBL* não tem sido associado ao câncer, somente atuando na regulação da morfogênese neuronal, *KIAA1211* é significativamente mutado em cânceres colorretais e a perda de sua função promove o desenvolvimento de câncer colorretal mucinoso em camundongos deficientes em *APC*. *FMN2* é um componente da via supressora de tumor *p14ARF*. *SLIT2* (ligante de orientação de fenda 2) e *ROBO1* (receptor de orientação rotatória 1) são um ligante e um receptor cognato, respectivamente, que acionam a sinalização que controla a orientação do axônio, neurogênese e progressão do câncer³⁰⁸.

Embora não se saiba como essa sinalização contribui para a tumorigênese, as principais respostas mediadas pelo citoesqueleto de actina / microtúbulo são afetadas após a perda de *SLIT2* ou *ROBO1*, resultando em polaridade de célula defeituosa. Duas proteínas de colágeno, *COL4A2* e *COL22A1*, são frequentemente mutadas no CPPC, mas é difícil ligar essas mutações a qualquer aspecto da tumorigênese³⁰⁸. O papel potencial, se houver, dessas proteínas na matriz extracelular estaria relacionado à estabilização da

interação célula-matriz, servindo como um ligante para proteínas de adesão celular, que podem ser interrompidas na transformação das células³⁰⁸.

1.14.3 Alterações das vias do receptor tirosina quinase

Subconjuntos de tumores de adenocarcinoma de pulmão são direcionados por vias de sinalização de quinase hiperativas devido a alterações oncogênicas em EGFR, ALK, ERBB2, ROS1 e MET. Esses subconjuntos mostram respostas clínicas a vários inibidores da tirosina quinase, incluindo erlotinibe e crizotinibe. No genoma do CPCP, essas tirosina quinases receptoras e outros mediadores de sinalização de quinase, como KRAS, BRAF e MEK / ERK, raramente estão alterados. Enquanto a maioria dos estudos genômicos encontraram poucos alvos acionáveis em subconjuntos de tumores CPCP, um estudo de sequenciamento em 98 amostras 'indiferenciadas' de CPCP descobriu que 53% dos tumores tinham pelo menos uma alteração acionável³⁰⁹.

A amplificação de *FGFR1* foi descoberta recentemente em um pequeno subconjunto de tumores^{287,290}. Estudos funcionais, usando linhas de células do CPCP, mostraram um efeito supressor de tumor com inibição genética ou química de *FGFR1*³¹⁰. Como a frequência da amplificação do *FGFR1* varia e não necessariamente se correlaciona bem com a expressão da proteína, um biomarcador robusto é necessário para prever a resposta a um inibidor de *FGFR1*. MET (também conhecido como c-MET) é outro receptor de tirosina quinase, ocasionalmente amplificado ou mutado no CPCP²⁸⁷. As alterações dos mediadores de sinalização intracelular, incluindo IRS2, PIK3CA, AKT e proteínas do complexo mTORC1, também foram detectadas no CPCP³⁰⁰.

A desregulação do eixo de sinalização PI3K-mTOR pode ser alcançada pela perda permanente de PTEN (fosfatase e homólogo de tensina), um supressor de tumor e regulador da proliferação e migração celular³⁰⁵.

Enquanto todas essas alterações resultam em um aumento na atividade da via, alterações na EPHA7 (receptor de efrina tipo A 7), um membro da subfamília de receptores de efrina das tirosina quinases, causam perda de função. EPHA7 foi implicada na orientação do axônio e demonstrou desempenhar um papel supressor de tumor na regulação do crescimento de linfoma e tumores de próstata, mas o impacto da inativação de EPHA7 no CPCP ainda precisa ser determinado³⁰⁵.

1.14.4 Via de sinalização Notch

A sinalização Notch é um processo de comunicação célula-célula, que permite o estabelecimento de padrões de expressão e diferenciação gênica, regula a escolha do destino binário da célula e a manutenção das células-tronco³¹¹. Pode atuar como fator de transcrição, para regular a expressão gênica e como estimulador proteico, através de um mecanismo que envolve a destruição, mediada pelo proteossoma³¹².

Nos mamíferos, existem quatro receptores Notch (Notch1-4) que abrigam uma alta homologia de sequência. Eles se ligam aos ligantes Notch Jagged 1 (JAG1), JAG2, Delta-like 1 (DLL1), DLL3 e DLL4 por interação trans (ligante e receptor localizados em células diferentes) ou por interação cis (ligante e receptor localizados na mesma célula) seguidos de várias repetições de domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF-LIKE). Nos ligandos Jag1

e Jag2 há um domínio rico em cisteína, seguido de um domínio transmembranar e uma pequena porção citoplasmática³¹². Classicamente, a interação trans resulta na ativação de Notch e a interação cis na inibição de Notch³¹³.

O DLL3 possui uma função inibitória única que bloqueia o tráfego do receptor Notch no citoplasma. Portanto, DLL3 se liga aos receptores Notch apenas de uma maneira autônoma celular cis-interativa, levando à inibição de Notch³¹⁴.

Os quatro receptores Notch são compostos por três domínios: extracelular (NECD), intracelular (NICDI) e transmembranar (TM). O domínio NECD é composto por grande número de repetições EGF-like (29 repetições em Notch4 e 36 repetições em Notch1), que são essenciais para a interação entre receptores Notch e os ligandos. Após as repetições EGF-like existem três repetições LN (Lin-12/Notch) ricas em cisteína que se pensa que atuem no sentido de inibir a ativação de Notch antes da sua ligação ao ligando^{313,314}.

O domínio NICD é composto por um domínio RAM (RBP-Jk-Associated Molecule), seguido de seis repetições Ankyrin, que permitem a interação com o fator de transcrição CSL. Este domínio é constituído também por dois sinais de localização nuclear (NLS), uma sequência OPA (rica em glutamina) e uma sequência PEST (Prolina, Glutamate, Serina, Treonina). Nos receptores Notch1 e Notch2 existe, ainda, um domínio TAD (Transcription Transactivation Domain), que compreende o domínio desde o segundo sinal de localização até ao domínio OPA^{312,315}. (Figura 11)

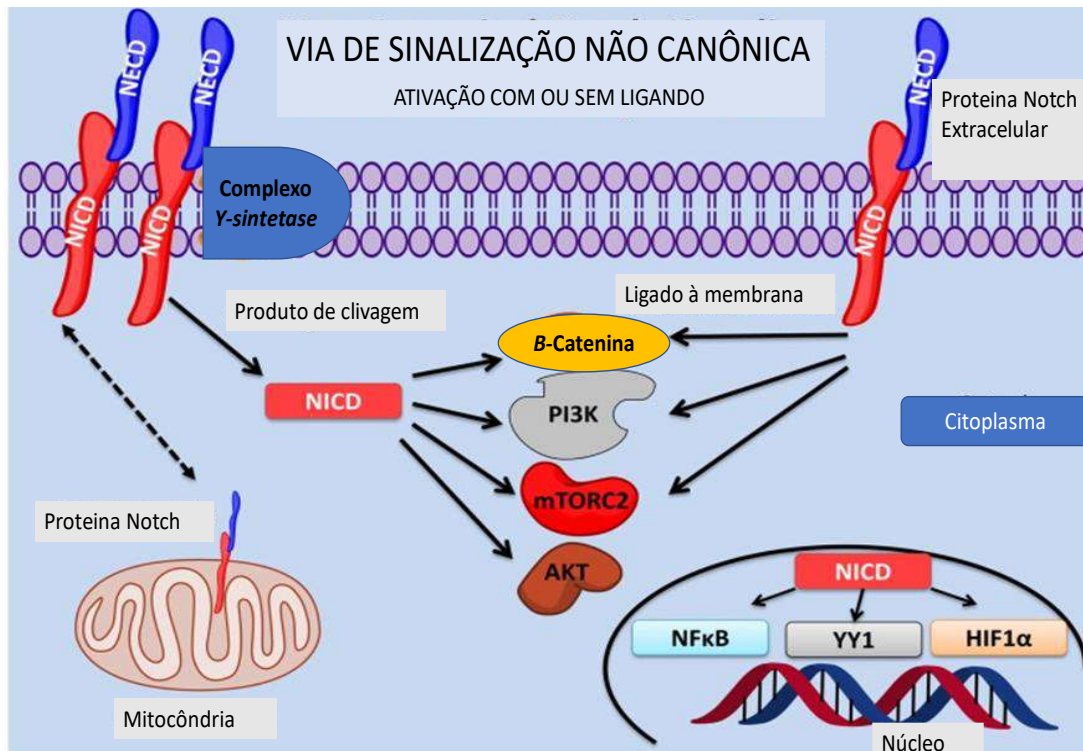


Figura 10. Vias de sinalização notch. A sinalização de Notch não canônica pode ocorrer dependente ou independente da interação entre ligas. Além disso, a sinalização de Notch não canônica pode ser γ -secretase dependente ou independente com este último exercendo sua função como Notch ligado à membrana. A sinalização de Notch não canônica é independente das vias CSL/RBPJk e, em vez disso, interage com as vias PI3K, mTORC2, AKT, Wnt, NFκB, YY1 ou HIF-1 α nos níveis citoplasmáticos e/ou nucleares. A sinalização não canônica do Notch regula a sobrevivência celular, o metabolismo e a diferenciação através da interação com essas vias em muitos processos biológicos importantes, incluindo imunidade e câncer. Adaptado de Ayaz, 2014.

A sinalização canônica é iniciada pela interação da proteína Notch com um ligante às células (Delta-like 1, 3, 4 ou Jagged 1, 2) e resulta em liberação de Notch, inicialmente por proteases de clivagem de membrana através de ADAM10 e ADAM17, seguida por ação do complexo gama-secretase. A porção intracelular do Notch é fundamental para a transmissão de sinais celulares. Ao concluir esse processo, o Domínio intracelular Notch (NICD) transloca-se para o núcleo. Como o NIDC não consegue se ligar ao DNA diretamente, forma um heterodímero com o RBPJk/CSL, um repressor transcricional. Após a interação com o NICD, o RBPJk/CSL é convertido em um potente ativador transcricional de genes alvo a jusante³¹⁴.

Quando há uma interação receptor-ligante, RbpjK recruta repressores, suprimindo a expressão de gene alvo da sinalização Notch, atuando como elemento crítico para a ativação transcricional³¹⁶. A interação eficiente dos receptores-ligantes é dependente de eventos pós-transcricionais. O evento-chave para que se tornem funcionais é a adição de fucose aos domínios EGF, nos resíduos de cisteína e treonina. Esses resíduos servirão de substrato para a glicosilação, mediada por glicosiltransferases da família fringe (Radical, Lunatic e Manic)³¹⁷.

Após a formação do complexo transcricional, ocorre a expressão de genes da família HES (Homólogo de Hairy/Enhancer of split) e Hey (HRT-Hairy related transcription factor) ou HERP (Hes-related repressor protein). Todos esses genes codificam fatores de transcrição com domínios básicos hélice-base-hélice (bHLH) que se ligam ao DNA com alta afinidade³¹⁸.

Uma vez no núcleo, o NICD converte a CSL de repressor a ativador da transcrição. Esta conversão ocorre pela interação direta entre os fatores de transcrição NICD (NOTCH intracellular domain), SKIP (Ski-Related Protein) e CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1). O metabolismo do NICD no núcleo é controlado pela sua fosforilação e ubiquitinação, sendo esta feita pela ligase de ubiquitina E3. A degradação da NCID reinicia a célula, preparando-a para, uma possível repetição de todos os passos desta via³¹⁹.

NICD endógeno é relativamente curta. Está transitoriamente presente nos promotores-alvo do Notch em resposta ao ligante e degrada-se rapidamente em parte devido à fosforilação do domínio PEST terminal C por quinase ciclina C/ciclina-dependente (CDK)³²⁰. A fosforilação do domínio PEST é seguida por ubiquitinação e degradação proteossômica subsequente. A fosforilação perto

das repetições anquilírinas da NICD também foi relatada para regular negativamente a ativação transcricional da via Notch, interferindo na formação do complexo de ativação. A fosforilação de NICD por glicogênio synthase quinase 3 β (GSK3 β) ocorre em uma região terminal C para a ANK, que se repete e aumenta a estabilidade da NICD³²¹.

Enzimas fringe (*N*-acetylglucosaminyltransferases) influenciam a afinidade entre receptores Notch e repetições específicas semelhantes a EGF por glicosilação. A glicosilação tipo frange resulta no alongamento de resíduos de fucose ligados ao O em repetições específicas semelhantes ao EGF no Notch e impede a ativação do Notch por ligantes irregulares, mas não por ligantes semelhantes ao Delta³²². Outra forma de modificação de carboidratos ligada a O nos receptores da via é a glicose O, que é anexada a resíduos de serina pelo O-glucosyltransferase Rumi/POGLUT1³²³. As repetições do notch EGF o-glicosylated podem ser ainda modificadas pela adição de xilose por glucoside xylosyltransferase (GXYLT)1 e GXYLT2 e xilosyltransferase xyloside, resultando em regulação negativa da sinalização Notch³²⁴.

A acetilação por CBP/p300 e PCAF/GCN5 aumenta a estabilidade do NICD, assim como a isomerização de prolyl por Pin1 enquanto a desacetilação de NICD e histonas por Sirtuin 1 (SIRT1) inibe a sinalização de Notch³²⁵. Essas modificações pós-transicionais também podem ser específicas do parálogo de Notch. Por exemplo, o domínio intracelular Notch4 (Notch4-ICD) é o único parálogo Notch com sítios para fosforilação AKT. Notch4-ICD que é fosfoilado pela AKTe, então se liga a 14-3-30 e se acumula no citoplasma, bloqueando assim a regulação genética Notch4 ³²⁶.

A sinalização de Notch também pode ocorrer de forma não canônica independente da CSL. Embora a sinalização canônica seja bem estudada e crucial em vários processos celulares, os mecanismos conhecidos de sinalização não canônica são limitados, mas conhecidos por ocorrerem no câncer e em algumas células do sistema imunológico³²⁷.

As vias não canônicas do Notch apresentam uma nova e interessante via de estudo e podem revelar novos alvos de intervenção terapêutica no cenário translacional³²⁷.

A sinalização Notch atua sobre várias vias celulares que estão envolvidas nas respostas ao câncer e ao sistema imunológico. Um desses caminhos é o caminho Wnt/ β -catenina. A via Wnt/ β -catenina é um caminho conservado que regula as decisões de pluripotência celular e destino celular no desenvolvimento e na vida pós-natal. Funções aberrantes ou mutações em β -cateninas têm sido associadas a uma série de cânceres e outras doenças humanas. A sinalização não canônica converge para a via de sinalização Wnt/ β -catenina e resulta em uma interação antagônica entre a sinalização Notch e a wnt/ β -catenina³²⁷. Essa interação interrompe a regulação dos processos de desenvolvimento de doenças de forma dependente do tecido e leva à regulação negativa da sinalização Wnt, alterando o nível de atividade β -catenina. Altos níveis de Notch ligados à membrana estão associados a níveis mais baixos de β -catenina ativa, sugerindo uma relação inversa entre os dois, bem como uma potencial regulação negativa de β -catenina por Notch³²⁷.

A primeira indicação de que a via de Notch desempenha um papel na oncogênese veio de Aster e cols (1994) em células T da leucemia linfoblástica aguda (T-ALL), na qual a translocação cromossômica do gene *Notch1* foi

identificada como uma causa de oncogênese T-célula. Em relatórios posteriores, a via Notch foi associada à tumorigênese e à progressão do câncer no pulmão e em outros órgãos^{328,329}.

Além de seu papel na tumorigênese, Notch também é relatado como um supressor de tumor. Esta observação deixa bem claro que a compreensão das vias individuais de sinalização de Notch é importante para a manipulação terapêutica racional de Notch³²⁸.

A Sinalização Notch é uma das mais importantes do sistema de sinalização celular, através da interação com ligandos do delta e / ou das famílias Jagged / Serrate, que regulam vários genes, tais como *HES1*, *cyclinD1*, *c-Myc* e *Akt*. A importância da sinalização Notch na carcinogênese tem sido relatada no controle da diferenciação, metabolismo, progressão do ciclo celular, angiogênese, regulação de células-tronco e das células cancerosas³³⁰.

No câncer de pulmão, *Notch* exibe funções de promoção e supressão de tumor. Um estudo de sequenciamento do genoma completo de casos de CACP revelou mutações dos genes da família Notch em cerca de 25% dos casos examinados, sugerindo uma natureza supressora de tumor de *Notch* em células CACP²⁸⁵. Em linhagens de células CACP, experimentos de transfecção de genes em knockdown esclareceram que *Notch1* desempenha um papel significativo na supressão da proliferação celular, aumento da apoptose, indução da morfologia epitelial (transição mesenquimal-epitelial), supressão da motilidade, aquisição de resistência a drogas e supressão da diferenciação neuroendócrina³³¹. Em relação à determinação do destino celular, a via Notch1-Hes1 é um repressor da diferenciação neuroendócrina por meio da expressão diminuída de *ASCL1* e *INSM1*³³².

No sistema imunológico, a sinalização não canônica da via Notch está envolvida na ativação e proliferação de células CD4 T, bem como nos efeitos promotores do tumor da interleucina-6 (IL-6) ³¹⁵.

Estão em desenvolvimento terapias-alvo para modular a via de sinalização notch, incluindo anticorpos neutralizantes, peptídeos de bloqueio, compostos naturais e inibidores de γ -secretase³³³. O Notch 2/3 neutralizante de tarextumabe neutraliza o tumor em camundongos não apenas em uma variedade de tumores epiteliais, mas também em tumores de xenoenxerto CPCP. Isso sugere que a inibição de Notch2 ou Notch3 pode ter atividade terapêutica em células CPCP ou que efeitos autônomos não-celulares no estroma tumoral mediado pela inibição de Notch2/3 são responsáveis por esse efeito. Uma maneira terapêutica e interessante de explorar a diminuição da sinalização de Notch consiste em direcionar ligantes notch que são frequentemente superexpressos mesmo em tumores com baixa sinalização canônica Notch. Uma estratégia pioneira especialmente eficaz no CPCP, que frequentemente expressa altos níveis de DLL3, pode funcionar como um inibidor de Notch, retendo receptores Notch no citoplasma, ou por inibição *cis*.³³⁴.

Um DLL3 mAb conjugado com um agente quimioterápico foi altamente eficaz em modelos pré-clínicos de CPCP. No entanto, o mAB não teve atividade terapêutica superior, sugerindo que a inibição DLL3 por si só não é uma estratégia terapêutica viável no CPCP³³⁴.

Com base em nossa compreensão atual da estrutura, função e regulação dos receptores e ligantes Notch, podemos identificar várias etapas que podem potencialmente ser direcionadas para inibir a sinalização notch³³⁴:

- 1) Expressão de ligantes

- 2) Ligantes e ubiquitina e trans-endocitose
- 3) Expressão de receptores Notch
- 4) Ligante-vinculação receptora
- 5) Dissociação heterodímera durante a ativação da via
- 6) Clivagem mediada por ADAM de Notch
- 7) Ubiquitinação subsequente e endocitose do substrato γ -secretase
- 8) Clivagem mediado γ -secretase de Notch
- 9) Montagem do complexo de coativadores com Notch e CSL
- 10) Heterodimerização de complexos transcricionais Notch
- 11) Modificações pós-translacionais de Notch
- 12) Expressão de alvos Notch.

1.15 DLL3/DELTA 3/ASCHL

A proteína DLL3, também conhecida como delta like 3, proteína 3, homólogo da drosófila Delta 3, SCDO1, tem 618 aminoácidos e uma massa de 64,6 KDa. Localizada, predominantemente, no aparelho de Golgi, não tem a capacidade de ativar a sinalização Notch como acontece com os outros ligantes³³⁵.

O DLL3 compartilha apenas 36% de homologia com o DLL1 e difere de outras proteínas delta tipo DSL (Delta / Serrate / LAG-2), DLL1 e DLL4), tanto em seu número reduzido de repetições semelhantes a fator de crescimento epidérmico (EGF) e espaçamento dos resíduos de cisteína dentro de seu domínio DSL, que é necessário para a ligação Notch³³⁵.

A expressão normal de DLL3 no tecido é mais elevada no cérebro fetal e desempenha um papel fundamental na somitogênese, no mesoderma paraxial³¹⁸.

Embora a ativação da via de Notch atue como um estímulo oncogênico em alguns tipos de tumor³³³, a ativação de Notch em tumores neuroendócrinos suprime o crescimento tumoral. No curso do desenvolvimento normal, o DLL3 inibe a ativação da via Notch cis- e transacional, interagindo com Notch e DLL1 e redirecionando-os ou retendo-os, respectivamente, para compartimentos endossômicos / lisossomais ou Golgi, evitando assim, sua localização na superfície celular³³⁵. Além disso, o DLL3 é um dos vários ligantes Notch que parecem ser alvos diretos a jusante de ASCL1. Portanto, o ligante tipo delta 3 (DLL3) é um ligante da via Notch inibitório altamente regulado e expresso de forma aberrante na superfície da célula em CPCP e em outros tumores neuroendócrinos de alto grau³³⁴.

A sinalização Notch é regulada para baixo durante o crescimento do tumor neuroendócrino e é inibida pela expressão de DLL3³³⁴. A expressão de DLL3 é regulada por achaete-scute homólogo 1 (ASCL1), um fator de transcrição que é necessário para o desenvolvimento adequado de células neuroendócrinas pulmonares e é um driver oncogênico no CPCP³³⁶.

ASCL1 (1 Achaete-scute homólogo-1, denominado Mash1 em roedores) é um fator de transcrição hélice-hélice pró-neural e funciona no câncer de pulmão de pequenas células (CPCP), não apenas na indução de diferenciação neuroendócrina, mas também, como um regulador de várias atividades biológicas, como proliferação celular, sobrevivência e quimiorresistência.³³⁶

De acordo com Osada e cols. (2005), a inibição de *ASCL1* suprime a proliferação celular e induz a apoptose em linhas de células do CPCP, o que poderia significar que *ASCL1* desempenha um papel fundamental na carcinogênese do CPCP. A expressão de *ASCL1* é suprimida pela sinalização Notch em células epiteliais normais e em células cancerosas³³⁷ e pelo gene *Hes1*, que é um dos genes alvo representativos da via de sinalização Notch e um fator de transcrição hélice-alça-hélice básico repressivo, supressor de *ASCL1* no desenvolvimento do pulmão de camundongo e em células CPCP³³⁸.

Um dos candidatos a reguladores *ASCL1* em células CPCP é o fator de transcrição silenciador do elemento 1 repressor (REST), pois suprime a expressão de *ASCL1* através de mecanismos epigenéticos na neurogênese. REST é deficiente em linhagens celulares do CPCP^{338,339}. Ele também medeia a regulação negativa de moléculas de adesão celular, como a E-caderina, e ativa a via de sinalização Wnt / β -catenina³³⁹.

Além de *ASCL1*, o Brain 2 (BRN2) ou fator de transcrição do domínio POU, é um fator específico de células neurais do desenvolvimento e pode participar na diferenciação neural de células CPCP³⁴⁰. Recentemente, um fator de transcrição de dedo de zinco conhecido como proteína 1 associada ao insulinoma (INSM1), foi relatado como um regulador crucial para a diferenciação neuroendócrina das células epiteliais pulmonares normais e células CPCP³⁴¹.

INSM1 pode regular a expressão de *ASCL1* e BRN2 em linhas de células do câncer de pulmão e, sozinho, pode induzir a diferenciação neuroendócrina em linhas de células CNPCP³⁴⁰.

Linoilae cols. (2000), descobriram que a superexpressão de *ASCL1* leva à expressão de CD56 *in vitro*. A expressão de *ASCL1 in vivo* induziu a

diferenciação NE de tumores de pulmão murino e aumentou a tumorigênese. No entanto, a expressão de ASCL1 por si só não foi suficiente para induzir um fenótipo CPCP completo, mas foi relatado que ASCL1 pode cooperar com a perda de RB e p53 ao formar CPCP ³⁴².

A expressão seletiva do DLL3 superficial em células cancerosas apresenta um alvo atraente para uma variedade de estratégias terapêuticas. Rovalpituzumab Teserine (Rova-T; SC16LD6.5) é um conjugado de anticorpos que consiste em um anticorpo monoclonal direcionado à dLL3, um *linker catepsin-cleavable*, e uma ogiva pirrolobenzodiazepíde (PBD) ³³⁴. O primeiro ensaio clínico em humano de Rova-T no CPCP avançado demonstrou atividade encorajadora, apesar dos efeitos colaterais, muitas vezes graves, atribuíveis à ogiva PBD9. Porém, o estudo Trinity, fase 2, mostrou uma taxa de resposta objetiva apenas de 16%, ao mesmo tempo em que reportou um perfil de toxicidade semelhante. Posteriormente, um estudo de fase 3, foi interrompido devido à menor sobrevida global. Um teste ativo de fase 3 de Rova-T na configuração de manutenção (MERU) está em andamento (NCT03033511)^{334,343}.

Outras terapias alvo de DLL3 encontram-se sob investigação ativa, como o engajador de células T bispecífico (BiTE) AMG 757 (NCT03319940), e um receptor de antígeno quimérico CAR-T AMG119 (NCT03392064). Esses agentes têm mostrado atividade anticífrica significativa em modelos pré-clínicos de CPCP. A AMG 757 foi a mais potente em modelos pré-clínicos e, portanto, pode ser mais adequado que a AMG119 para superar barreiras conhecidas à atividade CAR-T em tumores sólidos^{343,344}.

Estratégias alternativas permanecem sob exploração, incluindo o uso de ^{89}Zr -SC16, radiotracer PET como diagnóstico complementar para otimizar a seleção de pacientes para tratamento com agentes terapêuticos direcionados à DLL3^{344,345}. O anticorpo Zr-rotulado-SC16 delineou com sucesso o tecido normal dos xenoinxertos de tumores CPCP subcutâneos e ortotópicos. O acúmulo de radiotracer em tumores foi diretamente correlacionado com o grau de expressão de DLL3 e, também, correlacionado com a resposta à terapia SC16LD6.5 em modelos de xenoinxerto derivados do paciente CPCP^{344,345}.

Outra terapia em estudo, o DLL3/CD3 ITE, um novo anticorpo de célula S T biespecífico semelhante ao IgG está em fase pré-clínica. O ITE DLL3/CD3 induz lise altamente seletiva das células tumorais e posterior ativação e proliferação de células T. Em um modelo *in vivo* pré-clínico, o ITE DLL3/CD3 induz a infiltração de células T CD4 e CD8 em tumores não inflamados, levando a um ambiente tumoral mais inflamado e resultando em regressão completa do tumor³⁴⁶.

Os engajadores de células T biespecíficos representam uma classe promissora de imunoterapia baseada em anticorpos. Essas moléculas são projetadas para induzir a formação de uma sinapse citolítica de forma independente, ligando-se concomitantemente a um respectivo antígeno na superfície celular das células tumorais e ao CD3 em células T; e para direcionar sua atividade triática citolítica para as células tumorais. Após a formação da sinapse citolítica, as células T produzem perforina e granzyme B, levando à apoptose das células tumorais. A ativação de células T leva à liberação transitória de citocinas, que envolve outras células imunes e amplia a resposta imune contra o tecido tumoral, levando à conversão de um ambiente tumoral não

inflamado (frio) para um ambiente tumoral inflamado (quente), infiltração e proliferação de células T, e mortes em série de células tumorais³⁴⁷.

Após os recentes sucessos clínicos de engajadores de células T biespecíficos com uma meia-vida curta (BiTE) para o tratamento de malignidades hematológicas, a próxima geração de engajadores de células T, para o tratamento de tumores sólidos está surgindo³⁴⁷.

A ativação de células T e secreção de citocinas é uma característica do modo de ação dos engajadores de células T, que em alguns casos também pode causar efeitos colaterais clínicos como febre e hipotensão. Por isso, pode ser desejável reduzir a secreção de citocinas tanto quanto possível sem influenciar negativamente o potencial citotóxico das células T. Glicocorticoides foram utilizados para inibir respostas inflamatórias como citocinas³⁴⁶ e um estudo pré-clínico que utilizou a dexametasona glicocorticoide em combinação com blinatumomab. A dexametasona pode se qualificar como uma potencial indicação para terapias TcE. Os dados obtidos neste estudo revelam que a dexametasona pode reduzir a secreção induzida pelo ITE DLL3/CD3 do IFN γ e mcp-1, e, portanto, tratar reações potenciais de infusão ou síndromes de liberação de citocinas associadas ao tratamento DE 12/CD3. Porém, o tratamento pode resultar em redução do potencial citotóxico do DLL3/CD3 ITE³⁴⁶.

1.16 JUSTIFICATIVA

Nesse contexto, em que evidências epidemiológicas apontam a necessidade de desenvolvimento de terapias mais eficazes para o CPCP, novas drogas estão sendo produzidas e testadas a partir do conceito de pontos de

checagem (check-points) imunológicos, baseados na expressão de proteínas/receptores pela neoplasia e na produção de anticorpos que têm como alvo as vias de controle imunológico. Terapias anti-PDL-1 (proteína-1 de morte celular) e linfócito T citotóxico- antígeno 4, foram testadas e já aprovadas para uso em casos avançados de CPCP, extensos ou recidivantes pela *Food and Drug Administration* (FDA)³³⁴.

Sounders e cols. (2015), estudando o ciclo celular e a expressão de receptores, evidenciaram que os CPCP têm alta expressão da proteína Delta Like3 (DDL3), que é um ligando inibitório da via de sinalização Notch, envolvido na regulação de check-points imunológicos que regulam a tumorigênese. A partir dessas evidências, foi produzida uma droga conjugada anticorpo-fármaco, que vinha sendo testada em estudo randomizado, tendo sido interrompido devido aos fortes efeitos adversos. Entretanto, estudos a partir dessa proteína continuam sendo uma tendência na tentativa de descobrir um tratamento que diminua a morbimortalidade no CPCP³³⁴.

A proteína Delta Like3 (DDL3) teve seu auge em 2015, com a produção de um conjugado anticorpo-agente quimioterápico, que, em fase III de estudo randomizado, teve seu uso encerrado, em função de intensas reações adversas. Entretanto, em outubro de 2020, foi publicada pesquisa sobre terapia biespecífica, utilizando o anticorpo DLL3. Até o momento, nenhum estudo no Rio Grande do Sul foi realizado sobre a expressão de DLL3 no CPC³³⁴.

2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol.* Aug 2002;12(4):261-6
- 2- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* Jan 2000 7;100(1):57-70.
- 3- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* Mar 0211 4;144(5):646-74.
- 4- Moses C, Garcia-Bloj B, Harvey AR, Blancafort P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *Eur J Cancer.* 2018 Apr; 93:10-18.
- 5- Youssef A, Aboalola D, Han VK. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int.* Fev 2017; 2017:9453108
- 6- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1317-22.
- 7- Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current opinion in cell biology.* Jun1999 1;11(3):318-24.
- 8- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* Sep 1994 9;265(5178):1582-4.
- 9- Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology.* Nov 1998 1;8(11):437-41.
- 10- Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):27-47.
- 11- De Palma M, Hanahan D. The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Mol Oncol.* 2012 Apr;6(2):111-27.
- 12- Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep.* 2014 Feb;31(2):523-32.
- 13- Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science.* May 2010 7;328(5979):749-52.
- 14- Hirata E, Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Jul 2017 5;7(7):a026781.

- 15- American Cancer Society. Cancer statistics, 2020. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21590>. Acesso em 7 maio 2020
- 16- INCA. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em 5 maio 2020.
- 17- National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Cancer Statistics Review 1975-2010. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/. Accessed January 15, 2016.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/
- 18- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.
- 19- Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 1. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf>. Acesso em 5 maio 2020.
- 20- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34
- 21- Horn L, Dahlberg SE, Sandler AB, Dowlati A, Moore DF, Murren JR, Schiller JH. Phase II study of cisplatin plus etoposide and bevacizumab for previously untreated, extensive-stage small-cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E3501. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):6006-11.
- 22- Prado GF, Lombardi EM, Morais AM, Martins SR, Santos Ude P. Tabagismo: o que tem sido abordado nos periódicos brasileiros. *Arq Bras Cardiol*. 2012 Dez;99(6):e184-90.
- 23- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016 Sep;48(3):889-902
- 24- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2004. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 83.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316407/>

- 25- Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2006.
- 26- Stark MJ, Rohde K, Maher JE, Pizacani BA, Dent CW, Bard R et al. The impact of clean indoor air exemptions and preemption policies on the prevalence of a tobacco-specific lung carcinogen among nonsmoking bar and restaurant workers. *Am J Public Health*. 2007 Aug;97(8):1457-63.
- 27- Santos TO, Rocha Z, Cruz P, Gouvea VA, Siqueira JB, Oliveira AH. Radon dose assessment in underground mines in Brazil. *Radiat Prot Dosimetry*. 2014 Jul;160(1-3):120-3
- 28- R.A.Pett;T.F. C.Campos.O gás radônio e suas implicações para a saúde pública. *Revista de Geologia*, 2013,Dez 26(2):35-44
- 29- Wei F, Zhang T, Deng SC, Wei JC, Yang P, Wang Q, Chen ZP, Li WL, Chen HC, Hu H, Cao J. PD-L1 promotes colorectal cancer stem cell expansion by activating HMGA1-dependent signaling pathways. *Cancer Lett*. 2019,May 28;450:1-13.
- 30- Cohen AJ. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect*. 2000 Aug;108 Suppl 4(Suppl 4):743-50
- 31- Schwartz AG, Cote ML. Epidemiology of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 893:21-41
- 32- Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M.A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet*. 2009 Nov;85(5):679-91. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.09.012. Epub 2009 Oct 15. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2011 Jun 10;88(6):861. Metspalu, Andres [corrected to Metspalu, Andres]
- 33- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):638-642
- 34- Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Adv Cancer Res*. 2010;109:51-72.
- 35- Tsuchida N, Murugan AK, Grieco M. Kirsten Ras* oncogene: significance of its discovery in human cancer research. *Oncotarget*. 2016 Jul 19;7(29):46717-46733.
- 36- Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F et al. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax*. 2004 Aug;59(8):679-

81. doi: 10.1136/thx.2003.018291. PMID: 15282388; PMCID: PMC1747095.
- 37- Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer*. 2015 Nov;90(2):121-7.
- 38- Barnes PJ, Adcock IM. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: a lethal association. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 15;184(8):866-7.
- 39- Dinakar C, O'Connor GT. The Health Effects of Electronic Cigarettes. *N Engl J Med*. 2016 Oct 6;375(14):1372-1381.
- 40- Orr MS. Electronic cigarettes in the USA: a summary of available toxicological data and suggestions for the future. *Tob Control* 2014; 23 Supplement 2.
- 41- Tegin G, Mekala HM, Sarai SK, Lippmann S. E-Cigarette Toxicity? *Southern Medical Journal*. Jan 2018;111(1):35-38
- 42- Syrjänen KJ. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Dec;55(12):885-91.
- 43- Rabkin CS, Biggar RJ, Melbye M, Curtis RE. Second primary cancers following anal and cervical carcinoma: evidence of shared etiologic factors. *Am J Epidemiol*. 1992 Jul 1;136(1):54-8
- 44- Syrjänen KJ. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Dec;55(12):885-91.
- 45- Schittny JC, Burri PH (2008) Development and growth of the lung. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM (eds) *Fishman's pulmonary diseases and disorders*, vol 1. McGraw-Hill, New-York, pp 91–114
- 46- Schittny JC. How high resolution 3-dimensional imaging changes our understanding of postnatal lung development. *Histochem Cell Biol*. 2018 Dec;150(6):677-691.
- 47- Cardoso WV, Lü J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*. 2006 May;133(9):1611-24.
- 48- Schittny JC, Burri PH (2004) Morphogenesis of the mammalian lung: aspects of structure and extracellular matrix components. In: Massaro D, Massaro GD, Chambon P (eds) *Lung development and regeneration*. Marcel Dekker, New York, pp 275–317
- 49- Hines EA, Sun X. Tissue crosstalk in lung development. *J Cell Biochem*. 2014 Sep;115(9):1469-77

- 50- Swarr DT, Morrisey EE. Lung endoderm morphogenesis: gasping for form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015; 31:553-73
- 51- Koos BJ, Rajaei A. Fetal breathing movements and changes at birth. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 814:89-101.
- 52- Pan J, Copland I, Post M, Yeger H, Cutz E. Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jan;290(1): L185-93.
- 53- Schittny JC, Miserocchi G, Sparrow MP. Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Jul;23(1):11-8
- 54- Winkelmann A, Noack T. The Clara cell: a "Third Reich eponym"? *Eur Respir J.* 2010 Oct;36(4):722-7.
- 55- McQualter JL, Yuen K, Williams B, Bertonecello I. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 26;107(4):1414-9.
- 56- Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* Mar 2017;367(3):427-444.
- 57- Rock JR, Hogan BL. Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27:493-512.
- 58- Rogelj S, Klagsbrun M, Atzmon R, Kurokawa M, Haimovitz A, Fuks Z et al. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *J Cell Biol.* 1989 Aug;109(2):823-31.
- 59- Morrisey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell.* 2010 Jan 19;18(1):8-23
- 60- Rawlins EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development.* 2009 Nov;136(22):3741-5.
- 61- Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med.* 2006 Jan 23;203(1):7-13.
- 62- Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.* 2010 Sep-Oct;3(9-10):545-56.

- 63- Kotton DN, Morrisey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med.* 2014 Aug;20(8):822-32
- 64- Chanda D, Kurundkar A, Rangarajan S, Locy M, Bernard K, Sharma NS, Developmental Reprogramming in Mesenchymal Stromal Cells of Human Subjects with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sci Rep.* 2016 Nov 21;6: 37445.
- 65- Krasteva G, Canning BJ, Papadakis T, Kummer W. Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life Sci.* 2012 Nov 27;91(21-22):992-6
- 66- Tizzano M, Cristofolletti M, Sbarbati A, Finger TE. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med.* 2011 Jan 13; 11:3.
- 67- Teixeira VH, Nadarajan P, Graham TA, Pipinikas CP, Brown JM, Falzon M. Stochastic homeostasis in human airway epithelium is achieved by neutral competition of basal cell progenitors. *Elife.* 2013 Oct 22;2: e00966.
- 68- Watson JK, Rulands S, Wilkinson AC, Wuidart A, Ousset M, Van Keymeulen A et al. Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. *Cell Rep.* 2015 Jul 7;12(1):90-101.
- 69- Weibel ER. On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Mar 1;191(5):504-13.
- 70- Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development renewal and cancer *Nature* 2014, Mar 13;507(7491):190-4.
- 71- Bhattacharya J, Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin Immunopathol.* 2016 Jul;38(4):461-9.
- 72- Nikolić MZ, Caritg O, Jeng Q, Johnson JA, Sun D, Howell KJ; Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids. *Elife.* 2017 Jun 30;6:e26575.
- 73- Rawlins EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development.* 2009 Nov;136(22):3741-5.
- 74- Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019 Mar 7;176(6):1248-1264
- 75- Travis WD; Atualização sobre o carcinoma de células pequenas e sua diferenciação do carcinoma de células escamosas e outros carcinomas de células não pequenas; *Surg Oncol Clin N Am* 25 (2016) 447–46 8zheng

- 76- Fernandez-Cuesta L; Peifer ML; U Xet al. Mutações frequentes em genes remodelando cromatina em carcinoides pulmonares. *Nat Commun.* 2014; 5: 3518
- 77- Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol.* 2005 Apr;40(2):90-7
- 78- Fritz, April, Percy, Constance, Jack, Andrew, Shanmugaratnam, Kanagaratnam, Sobin, Leslie H. et al. (2000). International classification of diseases for oncology / editors, April Fritz ... [et al.], 3rd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42344>
- 79- Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol.* 2005 Feb;29(2):179-87
- 80- Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res.* 2017 Oct;6(5):513-529.
- 81- Zheng 43. Litzky LA. Pulmonary neuroendocrine tumors. *Surg Pathol* 2016; 3:27–59. 44.
- 82- Azzopardi JG. Bronchial oat cell carcinoma. *J Pathol Bacteriol* oct 1959; 78:513-519.
- 83- Litzky LA. Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *Surg Pathol Clin.* 2010 Mar;3(1):27-59.
- 84- Gould VE. Histogenesis and differentiation: A re-evaluation of these concepts as criteria for the classification of tumors. *Hum Pathol.* March 1986;17(3):212-215.
- 85- Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2012 Jan;25 Suppl 1: S18-30.
- 86- Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MNet al. Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol.* 2002 Sep;26(9):1184-97.
- 87- Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow LQ, Downey RJ, Gandhi L et al. National Comprehensive Cancer Network. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013 Jan 1;11(1):78-98.
- 88- Babakoohi S, Fu P, Yang M, Linden PA, Dowlati A. Combined SCLC clinical and pathologic characteristics. *Clin Lung Cancer.* 2013 Mar;14(2):113-9

- 89- Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016 Jul;25(3):447-68
- 90- Luo Y, Hui Z, Yang L, Li J. [Clinical analysis of 80 patients with combined small-cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2015 Mar;18(3): 161-6
- 91- Zhang C, Yang H, Zhao H, Lang B, Yu X, Xiao P, Zhang X. Clinical outcomes of surgically resected combined small cell lung cancer: a two-institutional experience. *J Thorac Dis.* 2017 Jan;9(1):151-158.
- 92- Men Y, Hui Z, Liang J, Feng Q, Chen D, Zhang H et al. Further understanding of an uncommon disease of combined small cell lung cancer: clinical features and prognostic factors of 114 cases. *Chin J Cancer Res.* 2016 Oct;28(5):486-494.
- 93- Mangum MD, Greco FA, Hainsworth JD, Hande KR, Johnson DH. Combined small-cell and non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1989 May;7(5):607-12.
- 94- Uehara C, Jamnik S, Santoro IL. Lung cancer. *Medicine (Ribeirão Preto)* 1998; 31: 266-276.
- 95- Marchioli CC, Graziano SL. Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *Chest Surg Clin N Am.* 1997 Feb;7(1):65-80.
- 96- Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, et al. Encefalomielite anti-Hu-paraneoplásica: análise de 200 pacientes. *Cérebro.* 2001; 124 :1138–114
- 97- Castillo JJ;Vincent M;Justice E.Diagnosis and management of hyponatremia in cancer patients.*Oncologist.* 2012;17(6):756-65.
- 98- Zhang X, Zhao M, Du W, Zu D, Sun Y, Xiang R, Yang J. Efficacy and Safety of Vasopressin Receptor Antagonists for Euvolemic or Hypervolemic Hyponatremia: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016 Apr;95(15):e3310.
- 99- Fernandez A; Jatene FB, Zamboni M. Diagnosis and staging of lung cancer.*J Pneumol* 2002; 28(4):219-228
- 100- Suzuki I, Fernandes-Bussy S, Herth FJF. Endoscopia respiratória no estadiamento do câncer de pulmão. *Pulmão RJ* 2011;20(2):25-35
- 101- Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Neuroendocrine tumors of the lung: clinical, pathologic, and imaging findings. *Radiographics.* 2006 Jan-Feb;26(1):41-57
- 102- Kalemkerian GP. Staging and imaging of small cell lung cancer. *Cancer Imaging.* 2012 Jan 12;11(1):253-8.
- 103- Barcellos MG. Lung. Cancer radiology. *J Pneumol* apr 2002; 28(2):94-99

- 104- Krause BJ, Schwarzenböck S, Souvatzoglou M. FDG PET and PET/CT. *Recent Results Cancer Res.* 2013; 187:351-69.
- 105- Carter BW, Glisson BS, Truong MT, Erasmus JJ. Small cell lung carcinoma: staging, imaging, and treatment considerations. *Radiographics.* 2014 Oct;34(6):1707-21.
- 106-Bradley JD, Dehdashti F, Mintun MA, Govindan R, Trinkaus K, Siegel BA. Positron emission tomography in limited-stage small-cell lung cancer: a prospective study. *J Clin Oncol* 2004;22(16): 3248–3254. 41.
- 107-Maleki Z. Diagnostic issues with cytopathologic interpretation of lung neoplasms displaying high-grade basaloid or neuroendocrine morphology. *Diagn Cytopathol* 2011; 39:159–167
- 108- Bobos M, Hytioglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS. Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol.* 2006 Apr;28(2):99-104.
- 109- Agoff SN, Lamps LW, Philip AT, Amin MB, Schmidt RA, True LD, Folpe AL. Thyroid transcription factor-1 is expressed in extrapulmonary small cell carcinomas but not in other extrapulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol.* 2000 Mar;13(3):238-42.
- 110- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat.* 2009 Apr;214(4):516-59.
- 111- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24.
- 112- Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1992 Feb;140(2):427-47.
- 113- Sun TT, Eichner R, Nelson WG, Tseng SC, Weiss RA, Jarvinen M, Woodcock-Mitchell J. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol.* 1983 Jul;81(1 Suppl):109s-15s.
- 114- Sun TT, Lavker RM. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004 Sep;9(3):202-7.
- 115- Su YC, Hsu YC, Chai CY. Role of TTF-1, CK20, and CK7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci.* 2006 Jan;22(1):14-9.
- 116-Tamas EF, Epstein JI. Detection of residual tumor cells in bladder biopsy specimens: pitfalls in the interpretation of cytokeratin stains. *Am J Surg Pathol.* 2007 Mar;31(3):390-7.

- 117- Ikeda S, Fujimori M, Shibata S, Okajima M, Ishizaki Y, Kurihara T, et al. Combined immunohistochemistry of beta-catenin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2006 Feb 2; 6:31.
- 118- Broers JL, Ramaekers FC, Rot MK, OSTENDORP T, HUYSMANS A, VAN-MUIJEN GN et al. Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies. *Cancer Research*. 1988 Jun;48(11):3221-3229.
- 119- Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, van Dalen CH, Geurts van Kessel AH et al. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet*. 1989 Oct;83(3):297-9
- 120- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22
- 121- Richardsen E, Andersen S, Al-Saad S, Rakae M, Nordby Y, Pedersen MI, et al. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in a large prostatectomy cohort. *PLoS One*. 2017 Nov 15;12(11): e0186852.
- 122- Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017 Jul 24; 8:892.
- 123- Jensen M, Berthold F. Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. *Cancer Lett*. 2007 Dec 8;258(1):9-21.
- 124- *Díaz Pérez JÁ, Currás Freixes M. Cromogranina A y tumores neuroendocrinos [Chromogranin A and neuroendocrine tumors]. Endocrinol Nutr*. 2013 Aug-Sep;60(7):386-95.
- 125- D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocr Connect*. 2014 Apr 29;3(2): R45-54.
- 126- Al-Risi ES, Al-Essry FS, Mula-Abed WS. Chromogranin A as a Biochemical Marker for Neuroendocrine Tumors: A Single Center Experience at Royal Hospital, Oman. *Oman Med J*. 2017 Sep;32(5):365-370.
- 127-Capelozzi VL. Understanding the role of biological markers in lung cancer. *J Pneumol*. 2001;27(6):321-28.
- 128- Südhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn R. The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic Acids Res*. 1987 Nov 25;15(22):9607.
- 129- McMahan HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not

- essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):4760-4.
- 130- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*. 2009 Aug 18;162(2):234-43.
- 131- Lau SK, Luthringer DJ, Eisen RN. Thyroid transcription factor-1:review. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*. 2002 Jun;10(2):97-102
- 132-Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J*. 1990 Nov;9(11):3631-9.
- 133- Park SY, Kim BH, Kim JH, Lee S, Kang GH. Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Oct;131(10):1561-7.
- 134-Jerome Marson V, Mazieres J, Groussard O, Garcia O, Berjaud J, Dahan M et al. Expression of TTF-1 and cytokeratins in primary and secondary epithelial lung tumours: correlation with histological type and grade. *Histopathology*. 2004 Aug;45(2):125-34.
- 135- Matoso A, Singh K, Jacob R, Greaves WO, Tavares R, Noble L et al. Comparison of thyroid transcription factor-1 expression by 2 monoclonal antibodies in pulmonary and nonpulmonary primary tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 Mar;18(2):142-9.
- 136- Mellitzer G, Bonn e S, Luco RF, Van De Castele M, Lenne-Samuel N, Collombat P, Mansouri A, Lee J, Lan M, Pipeleers D, Nielsen FC, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg H. IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrinet al pancreas. *EMBO J*. 2006 Mar 22;25(6):1344-52.
- 137- Breslin MB, Zhu M, Notkins AL, Lan MS. Neuroendocrine differentiation factor, IA-1, is a transcriptional repressor and contains a specific DNA-binding domain: identification of consensus IA-1 binding sequence. *Nucleic Acids Res*. 2002 Feb 15;30(4):1038-45.
- 138- Gierl, M. S., Karoulias, N., Wende, H., Strehle, M. and Birchmeier, C. (2006). The zinc-finger factor *Insm1* (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells. *Genes Dev*. **20**,2465 -2478
- 139- Wildwater M, The I, van den Heuvel S. Coordination of cell proliferation and differentiation: finding a GEM in the root? *Dev Cell*. 2007 Jun;12(6):841-2
- 140- Liu WD, Wang HW, Muguira M, Breslin MB, Lan MS. INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/beta2 gene through the recruitment

- of cyclin D1 and histone deacetylases. *Biochem J.* 2006 Jul 1;397(1):169-77.
- 141- Zhang T, Liu WD, Saunee NA, Breslin MB, Lan MS. Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 2009 Feb 27;284(9):5574-81.
- 142- Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ. Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3292-307.
- 143- Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jun;129(6):705-33.
- 144-. Adams H, Schmid P, Dirnhofer S, Tzankov A. Cytokeratin expression in hematological neoplasms: a tissue microarray study on 866 lymphoma and leukemia cases. *Pathol Res Pract.* 2008;204(8):569-73.
- 145- Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol.* 1990 Jun;1(3):165-79.
- 146- Blumenberg, M. Concerted gene duplications in the two keratin gene families. *J Mol Evol* 1988 27, 203–211.
- 147- Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res.* 2007 Jun 10;313(10):2021-32.
- 148- Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2001 Dec;116(6):823-30.
- 149- King JE, Thatcher N, Pickering CA, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology.* 2006 Feb;48(3):223-32
- 150- Guerrini L, Costanzo A, Merlo GR. A symphony of regulations centered on p63 to control development of ectoderm-derived structures. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:864904.
- 151-Wu N, Rollin J, Masse I, Lamartine J, Gidrol X. p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network. *J Biol Chem.* 2012 Feb 17;287(8):5627-38
- 152- Maruya S, Kies MS, Williams M, Myers JN, Weber RS, Batsakis JG et al. Differential expression of p63 isoforms (DeltaN and TA) in salivary gland neoplasms: biological and diagnostic implications. *Hum Pathol.* 2005 Jul;36(7):821-7

- 153- Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jan;35(1):15-25.
- 154- Nonaka D. A study of Δ Np63 expression in lung non-small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2012 Jun;36(6):895-9.
- 155- Barbareschi M, Cantaloni C, Del Vescovo C, Cavazza A, Monica V, Carella R, et al. Heterogeneity of large cell carcinoma of the lung: an immunophenotypic and miRNA-based analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011 Nov;136(5):773-782.
- 156- Sato H, Masuda M, Kanai M, Tsukiyama-Kohara K, Yoneda M, Kai C. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J Virol*. 2007 Nov;81(21):11569-76.
- 157- Maier S, Wilbertz T, Braun M, Scheble V, Reischl M, Mikut R, Menon R, Nikolov P, Petersen K, Beschorner C, Moch H, Kakies C, Protzel C, Bauer J, Soltermann A, Fend F, Staebler A, Lengerke C, Perner S. SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. *Hum Pathol*. 2011 Aug;42(8):1078-88
- 158- Brcic L, Sherer CK, Shuai Y, Hornick JL, Chirieac LR, Dacic S. Morphologic and clinicopathologic features of lung squamous cell carcinomas expressing Sox2. *Am J Clin Pathol*. 2012 Nov;138(5):712-8.
- 159- Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembelé D, Martinet N, Thibault C, Huelsken J, Brambilla E, du Manoir S. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One*. 2010 Jan 29;5(1): e8960.
- 160- Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016 Jul;25(3):447-68.
- 161- Feld R, Sagman U, Leblanc M. Staging and prognostic factors for small cell carcinoma. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD. (eds). *Lung Cancer, Principles and Practice*, 2nd edn. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2000, pp. 612–627
- 162- Kontogianni K, Nicholson AG, Butcher D, Sheppard MN. CD56: a useful tool for the diagnosis of small cell lung carcinomas on biopsies with extensive crush artefact. *J Clin Pathol*. 2005 Sep;58(9):978-80.
- 163- Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):179-87.
- 164- Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an

immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch.* 2009 Nov;455(5):397-411.

- 165- Wiatrowska BA, Krol J, Zakowski MF. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung: proposed criteria for cytologic diagnosis. *Diagn Cytopathol.* 2001 Jan;24(1):58-64.
- 166- Zelen M. Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 3. 1973 Mar;4(2):31-42
- 167- Greene FL, Sobin LH. The TNM system: our language for cancer care. *J Surg Oncol.* 2002 Jul;80(3):119-20.
- 168-Greene FL, Sobin LH. The TNM system: our language for cancer care. *J Surg Oncol.* 2002 Jul;80(3):119-20
- 169- Eberhardt WE, Mitchell A, Crowley J, Kondo H, Kim YT, Turrisi A 3rd et al. International Association for Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Board Members, and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2015 Nov;10(11):1515-22.
- 170- Rami-Porta R, Call S, Doms C, Obiols C, Sánchez M, Travis WD, Vollmer I. Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J.* 2018 May 17;51(5):1800190.
- 171- Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2007 Aug;2(8):706-14.
- 172- Rudin CM, Ismaila N, Hann CL, Malhotra N, Movsas B, Norris K et al. Treatment of Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the American College of Chest Physicians Guideline. *J Clin Oncol.* 2015 Dec 1;33(34):4106-11.
- 173- Koinis F, Kotsakis A, Georgoulas V. Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Feb;5(1):39-50.
- 174- Mamdani H, Induru R, Jalal SI. New therapies in small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2015 oct; 4: 533-44
- 175- Koyama K, Kagamu H, Miura S, Hiura T, Miyabayashi T, Itoh R et al. Reciprocal CD4+ T-cell balance of effector CD62Llow CD4+ and CD62Lhigh CD25+ CD4+ regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6770-9.

- 176- Maxwell Sehested, Fred R. Hirsch, Kell Osterlind, T and Jens E. Olsen, Md. Morphological variations of small cell Cancer V.57, 1415 February 1986 Pages 804-807 lung cancer: A histopathologic study of pretreatment and posttreatment specimens in 104 patients.
- 177- Waddell TK, Shepherd FA. Should aggressive surgery ever be part of the management of small cell lung cancer? *Thorac Surg Clin*. 2004 May;14(2):271-81
- 178- Fisseler-Eckhoff A, Demes M. Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel)*. 2012 Jul 31;4(3):777-98.
- 179- Rekhtman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Nov;134(11):1628-38.
- 180- Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, Rudd RM, Okamoto H, Skarlos DV et al. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *J Clin Oncol*. 2012 May 10;30(14):1692-8
- 181- von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA, Fields SZ, Kleisbauer JP, Chrysson NG et al. Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Feb;17(2):658-67.
- 182- Liu B, Song Y, Liu D. Recent development in clinical applications of PD-1 and PD-L1 antibodies for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2017 Dec 1;10(1):174.
- 183- Hammers HJ, Plimack ER, Infante JR, Rini BI, McDermott DF, Lewis LD et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study. *J Clin Oncol*. 2017 Dec 1;35(34):3851-3858.
- 184- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):23-34.
- 185- Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, Ott PA, Taylor M, Eder JP et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):883-895.
- 186- Ready N, Farago AF, de Braud F, Atmaca A, Hellmann MD, Schneider JG, Spigel DR, Moreno V, Chau I, Hann CL, Eder JP, Steele NL, Pieters A, Fairchild J, Antonia SJ. Third-Line Nivolumab Monotherapy in Recurrent SCLC: CheckMate 032. *J Thorac Oncol*. 2019 Feb;14(2):237-244.
- 187- Hoos A, Britten C. The immuno-oncology framework: Enabling a new era of cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2012 May 1;1(3):334-339.

- 188- Centanni M, Moes DJAR, Trocóniz IF, Ciccolini J, van Hasselt JGC. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 2019 Jul;58(7):835-857.
- 189- Liechtenstein T, Dufait I, Lanna A, Breckpot K, Escors D. MODULATING CO-STIMULATION DURING ANTIGEN PRESENTATION TO ENHANCE CANCER IMMUNOTHERAPY. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*. 2012 Sep;12(3):224-235.
- 190- Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, LaPlant BR, Kabat BF, Fernando D et al. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6446-53.
- 191-Reck M, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Ann Oncol*. 2013 Jan;24(1):75-83.
- 192- Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3327-34.
- 193- Horn L, Mansfield AS, Szczyńska A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ et al. Mpower133 Study Group. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Dec 6;379(23):2220-2229
- 194- Novidades da Conferência Mundial de Câncer de Pulmão, Entre os dias 23 e 26 de setembro de 2018 ocorreu em Toronto, Canadá, a 19ª Conferência Mundial de Câncer de Pulmão (WCLC), promovida pela Associação Internacional para Estudo do Câncer de Pulmão (IASLC).
- 195- Administração U.S.F.D. *FDA aprova Durvalumab para câncer de pulmão de células pequenas de estado extenso*. White Oak, MD (2020).
- 196-. Ott PA, Elez E, Hirt S, Kim DW, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, Mehnert JM. Pembrolizumab in Patients With Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Study. *J Clin Oncol*. 2017 Dec 1;35(34):3823-3829
- 197- Myklebust, M., Li, Z., Tran, T. *et al*. Expression of cyclin D1a and D1b as predictive factors for treatment response in colorectal cancer. *Br J Cancer* oct 2012 107, 1684–1691 (2012).
- 198- Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*. 1991 Sep 20;66(6):1217-28.

- 199- Gladden AB, Diehl JA. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem.* 2005 Dec 1;96(5):906-13.
- 200- Holley SL, Parkes G, Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Leder K, Strange RC, Fryer AA, Hoban PR. Cyclin D1 polymorphism and expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1917-24.
- 201- Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther.* 2002 May-Jun;1(3):226-31.
- 202- Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ, Knudsen ES. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):30339-47
- 203- Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005 Nov;30(11):630-41.
- 204- Canavese M, Santo L, Raje N. Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther.* 2012 May;13(7):451-7.
- 205- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Dec;1(3):222-31
206. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 13;21(6):1960.
- 207- Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, Elias JE, Becks L, Bienvenu F et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature.* 2011 Jun 8;474(7350):230-4.
- 208- Li Z, Jiao X, Wang C, Shirley LA, Elsaleh H, Dahl O et al. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. *Cancer Res.* 2010 Nov 1;70(21):8802-11.
- 209- Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jul 7;11(8):558-72.
- 210- Chen K, Jiao X, Ashton A, Di Rocco A, Pestell TG, Sun Y et al. The membrane-associated form of cyclin D1 enhances cellular invasion. *Oncogenesis.* 2020 Sep 18;9(9):83
- 211- Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer.* 6: 24

- 212- Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000 Dec 27;19(56):6550-65.
- 213- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129-39.
- 214- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Mar 2;97(5):339-46
- 215- Yasuda H, Park E, Yun CH, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo WL et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med*. 2013 Dec 18;5(216):216ra177.
- 216- He M, Capelletti M, Nafa K, Yun CH, Arcila ME, Miller VA, Ginsberg MS, Zhao B, Kris MG, Eck MJ, Jänne PA, Ladanyi M, Oxnard GR. EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 15;18(6):1790-7.
- 217- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Mar;7(3):169-81.
- 218- Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* 2007; 4: 1669-167
- 219- Lopes GL, Vattimo EF, Castro Junior Gd. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J Bras Pneumol*. 2015 Jul-Aug;41(4):365-75.
- 220- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):31-53.
- 221- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*. 2001 Mar;8(1):11-31.
- 222- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, et al. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*. 2005 Jun;7(6):575-89
- 223- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog*. 2006 Jan;45(1):10

- 224- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):802-8.
- 225- Hung LY, Tseng JT, Lee YC, Xia W, Wang YN, Wu M et al. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2008 Aug;36(13):4337-51.
- 226- Zhu H, Cao X, Ali-Osman F, Keir S, Lo HW. EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett.* 2010 Aug 1;294(1):101-10.
- 227- Yang J, Yan J, Liu B. Targeting EGFRvIII for glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* 2017 Sep 10; 403:224-230
- 228- Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD Jr, Morse D et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res.* 2004 Feb 15;10(4):1212-8
- 229- Dungo, R.T., Keating, G.M. Afatinib: First Global Approval. *Drugs* agosto 2013 73, 1503–1515. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-013-0111-6>
- 230-. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005 Mar;2(3): e73
- 231- Kosaka T, Yamaki E, Mogi A, Kuwano H. Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:165214.
- 232- Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):560-2.
- 233- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005 May 4;97(9):643-55
- 234- Li AR, Chitale D, Riely GJ, Pao W, Miller VA, Zakowski MF, Rusch V, Kris MG, Ladanyi M. EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J Mol Diagn.* 2008 May;10(3):242-8.
- 235- Huang T, Zhuge J, Zhang WW. Sensitive detection of BRAF V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR. *Biomark Res.* 2013 Jan 16;1(1):3.

- 236- Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20;32(6):579-86.
- 237- Miotke L, Lau BT, Rumma RT, Ji HP. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal Chem*. 2014 Mar 4;86(5):2618-24.
- 238- Zhang Y, Xu Y, Zhong W, Zhao J, Chen M, Zhang L et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR. *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):5861-5873.
- 239- Burack WR, Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Shaw AS. Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):2837-41
- 240- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr; 27:16-25.
- 241- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887-95.
- 242- Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, Wiendl H. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2005 Jul;58(1):50-7
- 243- Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1537-44.
- 244- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):682-7.
- 245- Sanmamed MF, Chen L. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization. *Cell*. 2018 Oct 4;175(2):313-326.
- 246- Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci*. 2017 Apr 4;24(1):26.
- 247- Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, LaPlant BR, Kabat BF, Fernando D et al. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6446-53.
- 248- Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM et al. RGMB is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med*. 2014 May 5;211(5):943-59.

- 249-Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Dec;23(12):2965-70.
- 250- Pai-Scherf L, Blumenthal GM, Li H, Subramaniam S, Mishra-Kalyani PS, He K et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond. *Oncologist.* 2017 Nov;22(11):1392-1399.
- 251- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2455-65.
- 252- Wartewig T, Kurgys Z, Keppler S, Pechloff K, Hameister E, Öllinger R et al. PD-1 is a haploinsufficient suppressor of T cell lymphomagenesis. *Nature.* 2017 Dec 7;552(7683):121-125.
- 253- Meng Y, Liang H, Hu J, Liu S, Hao X, Wong MSK et al. PD-L1 Expression Correlates With Tumor Infiltrating Lymphocytes And Response To Neoadjuvant Chemotherapy In Cervical Cancer. *J Cancer.* 2018 Jul 30;9(16):2938-2945
- 254- Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T. Restriction of PD-1 function by *cis*-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science.* 2019 May 10;364(6440):558-566
- 255- Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J.* 2014 Jul-Aug;20(4):256-61.
- 256- Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med.* 2015 Jan;21(1):24-33.
- 257- Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K et al. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2015 Apr 28;112(9):1501-9.
- 258- Nunes-Xavier CE, Angulo JC, Pulido R, López JI. A Critical Insight into the Clinical Translation of PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Curr Urol Rep.* 2019 Jan 15;20(1):1.
- 259- Paterson AM, Brown KE, Keir ME, Vanguri VK, Riella LV, Chandraker A et al. The programmed death-1 ligand 1: B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo. *J Immunol.* 2011 Aug 1;187(3):1097-105.

- 260- Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1291-8.
- 261- Zhao R, Song Y, Wang Y, et al. PD-1/PD-L1 blockade rescue exhausted CD8+ T cells in gastrointestinal stromal tumours via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Cell Proliferation*. May 2019;52(3): e12571.
- 262- Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H (+)-ATPase. *Science*. 2011 Nov 4;334(6056):678-83.
- 263- Stutvoet TS, Kol A, de Vries EG, de Bruyn M, Fehrmann RS, Terwisscha van Scheltinga AG, de Jong S. MAPK pathway activity plays a key role in PD-L1 expression of lung adenocarcinoma cells. *J Pathol*. 2019 Sep;249(1):52-64
- 264- Chen N, Ma WY, She QB, Wu E, Liu G, Bode AM, Dong Z. Transactivation of the epidermal growth factor receptor is involved in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 2001 Dec 14;276(50):46722-8
- 265- Sanpaolo ER, Rotondo C, Cici D, Corrado A, Cantatore FP. JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling. *Mol Biol Rep*. 2020 Nov;47(11):9087-9096.
- 266- Harb J, Lin PJ, Hao J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr Oncol Rep*. 2019 Feb 4;21(2):12.
- 267- Castagnoli L, Cancila V, Cordoba-Romero SL, Faraci S, Talarico G, Belmonte B et al. WNT signaling modulates PD-L1 expression in the stem cell compartment of triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2019 May;38(21):4047-4060.
- 268- Kim DW, Wu N, Kim YC, Cheng PF, Basom R, Kim D, et. Genetic requirement for Mycl and efficacy of RNA Pol I inhibition in mouse models of small cell lung cancer. *Genes Dev*. 2016 Jun 1;30(11):1289-99.
- 269- Betzler AC, Theodoraki MN, Schuler PJ, Döscher J, Laban S, Hoffmann TK, Brunner C. NF-κB and Its Role in Checkpoint Control. *Int J Mol Sci*. 2020 May 31;21(11):3949.
- 270- Lim SO, Li CW, Xia W, Cha JH, Chan LC, Wu Y, et al. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell*. 2016 Dec 12;30(6):925-939.
- 271- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3059-87.

- 272- Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 2002 Jun 1;16(11):1433-40.
- 273- Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCLSE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal.* 2018 Mar 20;16(1):11.
- 274- Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci.* 2014 Jan;21(1):28-31.
- 275--Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, Foresta U, Mitsiades CS, Rossi M, Todoerti K, et al. Canonical and noncanonical hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 2012; 120:5002–5013.
- 276- Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothened and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel).* 2016 Feb 15;8(2):22.
- 277- Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J.* 2004 Mar 1;378(Pt 2):325-34.
- 278- Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 2007 Sep;17(9):438-47.
- 279- Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010 Apr 1;24(7):670-82.
- 280- Canettieri G, Di Marcotullio L, Greco A, Coni S, Antonucci L, Infante P, et al. Histon deacetylase e Cullin3-REN (KCTD11) ubiquitin ligase interplay regula a sinalização de ouriço através da acetilação gli. *Nat Cell Biol.* 2010; 12:132-42.
- 281- Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal.* 2012 Oct 16;5(246):re6.
- 282- Takenaka K, Kise Y, Miki H. GSK3beta positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Feb 9;353(2):501-8.
- 283-Kasper M, Schnidar H, Neill GW, Hanneder M, Klingler S, Blaas L et al. Selective modulation of hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. *Mol Cell Biol.* 2006;26: 6283–6298

- 284- Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, Yang SX, Ivy SP. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Aug;12(8):445-64.
- 285- George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015 Aug 6;524(7563):47-53.
- 286-McFadden DG, Papagiannakopoulos T, Taylor-Weiner A, Stewart C, Carter SL, Cibulskis K et al. Genetic and clonal dissection of murine small cell lung carcinoma progression by genome sequencing. *Cell*. 2014 Mar 13;156(6):1298-1311.
- 287- Voortman J, Lee JH, Killian JK, Suuriniemi M, Wang Y, Lucchi M et al. Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):13040-5.
- 288- Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell*. 2003 Sep;4(3):181-9.
- 289- Sellers TA, Bazyk AE, Bostick RM, Kushi LH, Olson JE, Anderson KE et al. Diet and risk of colon cancer in a large prospective study of older women: an analysis stratified on family history (Iowa, United States). *Cancer Causes Control*. 1998 Aug;9(4):357-67.
- 290- Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet*. 2012 Oct;44(10):1104-10.
- 291- Zhou M, Yan J, Ma Z, Zhou Y, Abbood NN, Liu J et al. Comparative and evolutionary analysis of the HES/HEY gene family reveal exon/intron loss and teleost specific duplication events. *PLoS One*. 2012;7(7):e40649.
- 292-. Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*. 2002 Jan;9(1):175-86.
- 293- Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2916-24.
- 294- Chappell J, Dalton S. Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Dec 1;3(12):a014381.
- 295- Jiang SX, Sato Y, Kuwao S, Kameya T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol*. 1995 Oct;177(2):135-8.

- 296- Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012 Oct;44(10):1111-6.
- 297- Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK et al. *Patologia e Genética: Tumores do Pulmão, Pleura, Timo e Coração Vol 1.* IARC:Lyon,2004
- 298- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.
- 299- Wu N, Jia D, Ibrahim AH, Bachurski CJ, Gronostajski RM, MacPherson D. NFIB overexpression cooperates with Rb/p53 deletion to promote small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016 Sep 6;7(36):57514-57524. doi: 10.18632/oncotarget.11583.
- 300-Umemura S, Tsuchihara K, Goto K. Genomic profiling of small-cell lung cancer: the era of targeted therapies. *Jpn J Clin Oncol.* 2015 Jun;45(6):513-9
- 301- Shi YX, Sheng DQ, Cheng L, Song XY. Current Landscape of Epigenetics in Lung Cancer: Focus on the Mechanism and Application. *J Oncol.* 2019 Dec 12;2019: 8107318.
- 302- Jia D, Augert A, Kim DW, Eastwood E, Wu N, Ibrahim AH et al. *Crebbp* Loss Drives Small Cell Lung Cancer and Increases Sensitivity to HDAC Inhibition. *Cancer Discov.* 2018 Nov;8(11):1422-1437.
- 303- Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res.* 2009 Jan 1;69(1):243-52.
- 304-Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye kai, Niu Beifang, Lu Charles et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013 Oct 17, 502: 333–339.
- 305-Li G, Vega R, Nelms K, Gekakis N, Goodnow C, McNamara P et al. A role for Alström syndrome protein, *alms1*, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence. *PLoS Genet.* 2007 Jan 5;3(1): e8.
- 306- Fong KW, Choi YK, Rattner JB, Qi RZ. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell.* 2008 Jan;19(1):115-25.
- 307- Jung YS, Wang W, Jun S, Zhang J, Srivastava M, Kim MJ, Lien EM, Shang J, Chen J, McCrea PD, Zhang S, Park JI. Dereglulation of CRAD-controlled cytoskeleton initiates mucinous colorectal cancer via β -catenin. *Nat Cell Biol.* 2018 Nov;20(11):1303-1314.

- 308- Ross JS, Wang K, Elkadi OR, Tarasen A, Foulke L, Sheehan CE, Otto GA et al. Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. *J Clin Pathol*. 2014 Sep;67(9):772-6.
- 309- Ross JS, Wang K, Elkadi OR, Tarasen A, Foulke L, Sheehan CE et al. Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. *J Clin Pathol*. 2014 Sep;67(9):772-6.
- 310- Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, Nye E, Poulsom R, Spencer-Dene B et al. The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2009 Nov 15;69(22):8645-51.
- 311- Meder L, König K, Ozretić L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP, Büttner R. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):927-38.
- 312- Meder L, König K, Ozretić L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP et al. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):927-38.
- 313- Fleming RJ, Hori K, Sen A, Filloramo GV, Langer JM, Obar RA, Artavanis-Tsakonas S, Maharaj-Best AC et al. An extracellular region of Serrate is essential for ligand-induced cis-inhibition of Notch signaling. *Development*. 2013 May;140(9):2039-49.
- 314- Heuss SF, Ndiaye-Lobry D, Six EM, Israël A, Logeat F. The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 12;105(32):11212-7.
- 315- Ayaz F, Osborne BA. Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol*. 2014 Dec 4;4: 345.
- 316- Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knochel W et al. RBP-Jkappa / SHARP recruit CtIP / CtBP corepressors to silence Notch's target genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 10379-90
- 317- Sasamura T, Ishikawa HO, Sasaki N, Higashi S, Kanai M, Nakao S, et al. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. *Development*. 2007 Apr;134(7):1347-1356
- 318- Geffers I, Serth K, Chapman G, Jaekel R, Schuster-Gossler K, Cordes R et al. Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *J Cell Biol*. 2007 Jul 30;178(3):465-76

- 319- Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009 Apr 17;137(2):216-3
- 320- Fryer CJ, White JB, Jones KA. Mastermind recruits CycC: CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell*. 2004 Nov 19;16(4):509-20.
- 321- Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS. Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability. *Curr Biol*. 2002 Jun 25;12(12):1006-11.
- 322- Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):908-12.
- 323- Acar M, Jafar-Nejad H, Takeuchi H, Rajan A, Ibrani D, Rana NA et al. Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell*. 2008 Jan 25;132(2):247-58.
- 324- Lee KS, Wu Z, Song Y, et al. Roles of PINK1, mTORC2, and mitochondria in preserving brain tumor-forming stem cells in a noncanonical Notch signaling pathway. *Genes & Development*. 2013 Dec;27(24):2642-2647.
- 325- Mulligan P, Yang F, Di Stefano L, Ji JY, Ouyang J, Nishikawa JL et al. A SIRT1-LSD1 corepressor complex regulates Notch target gene expression and development. *Mol Cell*. 2011 Jun 10;42(5):689-99
- 326- Ramakrishnan G, Davaakhuu G, Chung WC, Zhu H, Rana A, Filipovic A et al. AKT and 14-3-3 regulate Notch4 nuclear localization. *Sci Rep*. 2015 Mar 5;5: 8782.
- 327- Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol*. 2012 May;22(5):257-65.
- 328- Aster J, Pear W, Hasserjian R, Erba H, Davi F, Luo B, Scott M, Baltimore D, Sklar J. Functional analysis of the TAN-1 gene, a human homolog of *Drosophila* notch. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59: 125-36.
- 329- Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*. 2008 Sep 1;27(38):5124-31
- 330- Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Feb;17(1):52-9.
- 331- Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, et al. Notch1 controls cell chemoresistance in small cell lung carcinoma cells. *Thorac Cancer* 2016; 7:123-8.
- 332- Ball DW. Achaete-scute homolog-1 and Notch in lung neuroendocrine development and cancer. *Cancer Lett*. 2004 Feb 20;204(2):159-69

- 333- Espinoza I, Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 2013 Aug;139(2):95-110.
- 334- Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med.* 2015 Aug 26;7(302):302ra136
- 335- Chapman G, Sparrow DB, Kremmer E, Dunwoodie SL. Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Human Molecular Genetics.* 2011 Mar;20(5):905-916.
- 336- Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, He M, Augustyn A, Osborne JK et al. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep.* 2016 Aug 2;16(5):1259-1272.
- 337- Morimoto M, Nishinakamura R, Saga Y, Kopan R. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells. *Development.* 2012 Dec 1;139(23):4365-73
- 338- Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudo T et al. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development.* 2000 Sep;127(18):3913-21
- 339- Osada H, Tomida S, Yatabe Y, Tatematsu Y, Takeuchi T, Murakami H, et al Roles of achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res.* 2008. Mar 15;68(6):1647-55
- 340- Fujino K, Motooka Y, Hassan WA, Ali Abdalla MO, Sato Y, Kudoh S, et al. Insulinoma-Associated Protein 1 Is a Crucial Regulator of Neuroendocrine Differentiation in Lung Cancer. *Am J Pathol.* 2015 Dec;185(12):3164-77.
- 341- Jia S, Wildner H, Birchmeier C. Insm1 controls the differentiation of pulmonary neuroendocrine cells by repressing Hes1. *Dev Biol.* 2015 Dec 1;408(1):90-8.
- 342- Linnoila RI, Zhao B, DeMayo JL, Nelkin BD, Baylin SB, DeMayo FJ, Ball DW. Constitutive achaete-scute homologue-1 promotes airway dysplasia and lung neuroendocrine tumors in transgenic mice. *Cancer Res.* 2000 Aug 1;60(15):4005-9.
- 343-. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K.A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med.* 2015 Aug 26;7(302):302ra136

- 344- Rudin CM, Ismaila N, Hann CL, Malhotra N, Movsas B, Norris K et al. Treatment of Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the American College of Chest Physicians Guideline. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 2015 1;33(34):4106-11.
- 345- Rudin CM, Pietanza MC, Bauer TM, eady N, Morgensztern D, Glisson BS, et al. Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* 2017;18: 42–51.
- 346- Hipp S, Voynov V, Drobits-Handl B, et al. A Bispecific DLL3/CD3 IgG-Like T-Cell Engaging Antibody Induces Antitumor Responses in Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research: a Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2020 Oct;26(19):5258-5268.
- 347- Mathur D, Root AR, Bugaj-Gaweda B, Bisulco S, Tan X, Fang W, Kearney et al. A Novel GUCY2C-CD3 T-Cell Engaging Bispecific Construct (PF-07062119) for the Treatment of Gastrointestinal Cancers. *Clin Cancer Res*. 2020 May 1;26(9):2188-2202
- 348- Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011 Sep;138(17):3593-612.
- 349- Konishi J, Yi F, Chen X, Vo H, Carbone DP, Dang TP. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene*. 2010 Jan 28;29(4):589-96
- 350- Xie, M., He CS, Wei SH, and Zhang L .. 2013. Notch - 1 contributes to the acquired resistance of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer in vitro and in vitro alive. *EUR. J. Cancer* 49: 3559–3572
- 351- Lamberti G, Sisi M, Andrini E, Palladini A, Giunchi F, Lollini PL, Ardizzoni A, Gelsomino F. The Mechanisms of PD-L1 Regulation in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Which Are the Involved Players? *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 26;12(11):3129.
- 352- Ajay Aggarwal, Grant Lewison, Saliha Idir, Tariq Sethi, Jesme Fox, Richard Sullivan. The State of Lung Cancer Research: A Global Analysis. *J Thorac Oncol*. 2016 Jul; 11 (7): 1040-50.
- 353- Radonic, T., Duin, S., Vos, W. et al. Influence of preanalytical variables on performance of delta-like protein 3 (DLL3) predictive immunohistochemistry. *Virchows Arch* .2020jun2.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de expressão do marcador imunohistoquímico DLL3 em tecido neoplásico de pacientes com carcinoma neuroendócrino de pequenas células do pulmão e correlacionar com a expressão dos marcadores EGFR, PDL-1, Ciclina D1, Ki67 e com dados clínicos- demográficos que possam auxiliar no diagnóstico e delineamento de protocolos terapêuticos e avaliação prognóstica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão do marcador DLL3 nas células neoplásicas de pacientes com diagnóstico de carcinoma de pequenas células do pulmão;
- Correlacionar a expressão do marcador DLL3 em pacientes com carcinoma de pequenas células do pulmão com a expressão dos marcadores PDL-1, EGFR, CiclinD1 e Ki67;
- Correlacionar a expressão do marcador DLL3 em tecido neoplásico de portadores de carcinoma de pequenas células do pulmão com dados clínicos-demográficos;
- Avaliar a curva de sobrevida de acordo com a expressão do marcador DLL3 em tumores de pacientes portadores de carcinoma de pequenas células do pulmão.

4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

4.1 ARTIGO 1

International Journal of Innovative Research in Medical Science (IJIRMS)
Volume 06, Issue 04, April 2021,
<https://doi.org/10.23958/ijirms/vol06-i04/1102>

Original article



Evaluation of DLL3 Expression in Small Cell Lung Carcinoma in Southern Brazil and its Correlation with EGFR, PDL-1, CICLIN D 1, Neuroendocrine Markers and Clinical Findings

Josnel Maria Barcelos Marçal ¹, Giuseppe Dick Bonato ², Júlia Iaroseski ³, Caroline Baptistela ⁴, Janaina Ribeiro da Rosa ⁵, Rafael Fabiano Machado Rosa ⁶, Paulo Ricardo Gazzola Zen ⁷

¹Graduate Program in Pathology, Department of pathology and forensic medicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil, (ORCID ID: 0000-0001-9688-4506). Email: josnel.copetti@gmail.com

²Graduation in Medicine, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil. (ORCID ID:0000-0001-6900-3136). Email: g.d.bonato@hotmail.com

³Graduation in Medicine, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil. (ORCID ID:0000-0003-4433-1525). Email:julhiaroseski@gmail.com

⁴Technical in histology of the Laboratório de Patologia e Micologia of Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil. (ORCID ID:0000-0001-7459-8541).Email: carolbaptistella33@gmail.com

⁵Technical in Histology of the Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia of Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brazil. (ORCID ID: 0000-0001-8331-6059). Email: jr.rosa85@gmail.com

⁶Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, UFCSPA and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Brazil. (ORCID ID: 0000-0002-0660-5719). Email: rffmrosa@gmail.com

⁷Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, (UFCSPA) and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Brazil. (ORCID ID: 0000-0002-7628-4877). Email: paulozen@ufcspa.edu.br

*Corresponding author: MD Josnel Maria Barcelos Marçal–UFCSPA/ISCMPA. Rua Sarmento Leite, 245/403 - Bairro Centro. Porto Alegre, RS - Brasil. CEP: 90050-170 E-mail: josnel@ufcspa.edu.br

Received 03 March 2021;

Accepted 26 March 2021;

Published 01 April 2021

Abstract

Small cell lung carcinoma (SCSL) is a rare malignancy whose treatment is palliative. The knowledge of its biology is important for the development of new therapies. The expression of delta like 3 protein (DLL3) is involved in the regulation tumorigenic in SCSL.

The aim of this study was to evaluate the expression of DLL3 in small cells lung carcinoma (SCLC) and its correlation with clinical data, survival and association with other biomarkers.

Methods: a cohort retrospective of 56 patients from institution in Southern Brazil was analyzed. The expression of DLL3 was positive when present in 5% or more of the membranes and cytoplasm of neoplastic cells. PDL -1 and EGFR were positive when expressed in 1% or more of the membranes, ciclin D1 and KI 67 by the percentage of stained nucleus.

Synaptophysin, chromogranin and CD56 were tabulated with 1 positive and zero for negative. DLL 3 expression was evaluated as mean, standard deviation and quartiles. Clinical-demographic and death data were analyzed using Fisher's exact test and Pearson's test. Cox regression and the Kaplan-Meier curve were used for survival.

Results: Of 56 individuals, 16 were excluded because there was no tumor available and 13 patients (32.5%) had positive DLL 3.

EGFR expression was 46.2% (HR 2.4), PDL-1 30.8% (HR 3.56) cyclin D1 53.8% (HR 2.77) and chromogranin A 30.8% (HR 0.3)

All patients positive for chromogranin A were negative for anti-DLL3 (p> 0.17). The overall survival for positive DLL3 was slightly higher (p = 0,711) as well as for chromogranin A negative (p 0.299)

Conclusion: The DLL3 mutation acts on SCLC tumorigenesis. The study of its expression may be useful for the development of new therapies. The inverse correlation between DLL3 and chromogranin A may represented a protective factor, but it needs to be better studied in a larger cohort.

Keywords: Small-cell lung carcinoma; DLL3 protein; immunological checkpoints; biomarkers; immunohistochemistry; target drugs.

Introduction

Neuroendocrine small-cell lung carcinoma (SCLC) is a rare and extremely aggressive malignancy closely associated with the intensity and duration of smoking [1]. It has an aggressive clinical course and is resistant to chemotherapy and standard radiotherapy [1,2].

The American Cancer Society's estimates for lung cancer in the United States for 2020 are about 228,820 new cases of lung cancer (116,300 in men and 112,520 in women) and around 135,720 deaths from lung cancer (72,500 in men and 63,220 in women) [3,4].

In Brazil for the triennium (2020-2022) the estimates for lung cancer is 17760 new cases for men, occupying the third place and 12440 new cases for women, occupying the fourth place of all cancer. In the South region of Brazil the number of cases estimated is 31.07% for men and 12.09% for women [4,5].

The SCSL accounts for approximately 10 to 15% of lung cancer cases and the mortality rate in large series have an estimate of 10% with the relative average of 5-year survival of 15.7% [4,5]. So far, there are no effective therapeutic options. Treatment is palliative with high recurrence rates. The identification of Delta-like protein (DLL3) expression by neoplastic cells in SCLC and the knowledge of immunological checkpoints enabled the production of new target drugs like the antibody-drug conjugate, rovalpituzumab. This drug was being tested in a randomized study on SCLC patients and that was interrupted in phase III due to the cytotoxic effects [6,7].

The DLL3 biomarker is a ligand that inhibits the Notch signaling pathway essential for neuroendocrine development, involved in the regulation of the tumorigenic and regulated directly by Achaete-scute complex-like1(ASCL-1-family of transcription factors) [8,9,10,11,12].

Other immunohistochemical markers are expressed by SCLC cells to a lesser extent, such as the receptor tyrosine kinase (EGFR), present in 16% and the programmed death receptor PD-L1 in about 1.8% of the cases [13,14,15,16,17].

Recently, the Food and Drug Administration (FDA) approved immunotherapy drugs for advanced SCLC stages, anti-PD-L1 (atezolizumab), anti-PD-1 (nivolumab), and nivolumab plus ipilimumab- study CheckMate-032 study [18,19,20,21,22].

The objective of our study was to characterize the immunohistochemical expression of DLL3 in SCLC in a referral hospital in the south region of Brazil and evaluate its association with clinic pathologic features, survival and its correlation with the antibodies anti-EGFR, anti-PD-L1, cyclin D1 and the panel biomarkers used in routine [23].

Material and Methods

A retrospective cohort of 56 samples from patients diagnosed with SCSL, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin was selected in the archives of the pathological anatomy and mycology laboratory of the Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil (ISCMIPA), between 2006 at 2016.

Of the 56 patients with SCSL sixteen patients were excluded due to the scarcity of embedded material for immunohistochemical examinations. This retrospective study was conducted according to the ethical standards of the Helsinki Declaration and was approved by the Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre ethics committee. The requirement of informed consent was waived because this research did not involve any risk to the participants; the waiver will not adversely affect the

rights and well-being of the participants, scant samples have been preserved and data confidentiality maintained.

DLL3 expression on neoplastic cells and clinical findings

Specimens fixed in formalin and embedded in paraffin were used to prepare the slides. To evaluate the immunohistochemical expression of anti-DLL3 (100059 clone), anti-PDL-1 (Cal-10 Clone), anti-EGFR (SP111 clone) and anti-cyclin-D1 (SP4-R clone) antibodies were achieved sections of 2-microns, mounted on silanized slides and submitted to automated immunohistochemical processing.

The expression of membrane and/or cytoplasmic at any intensity was considered positive for DLL3, when present in 5% or more in of neoplastic cells. (Figures 1,2).

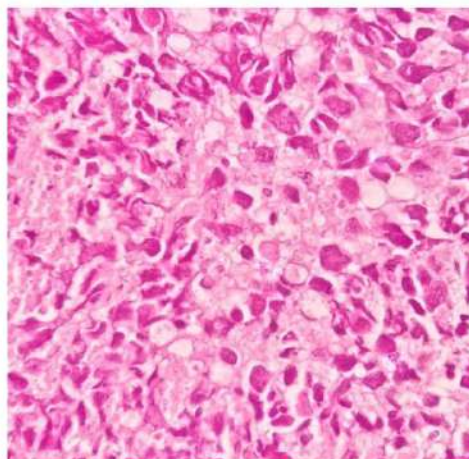


Figure1: Photomicrography.100x increase:H&E-Carcinoma of small lung cells

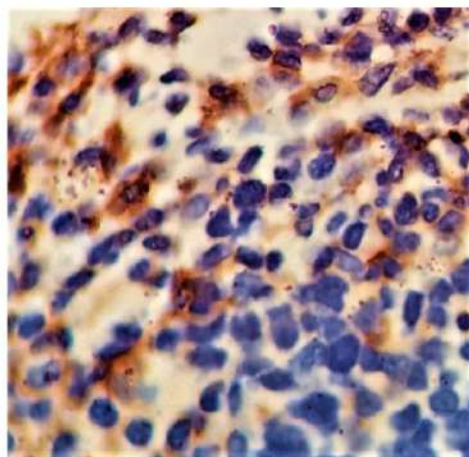


Figure 2: Photomicrography with an increase of 100x. Immunohistochemistry. Anti-DDI3.Carcinoma of small lung cells. Presence of strong cytoplasmic of neoplastic cells

The expression of PDL-1 and EGFR were evaluated by percentage of membrane stained in 1% or more of neoplastic cells.

Biomarkers previously analyzed in routine examinations were pooled in a table and assessed in a binary form: 1 for positive and 0 for negative, including: CK7, TTF1, Synaptophysin, Chromogranin, and CD56. Clinical data were collected from patient records and tabulated. (See the Methods section in the Supplementary Appendix)

Statistical Analysis

The statistical analysis for biomarkers expression were described as a function of mean, standard deviation, frequencies, and quartiles. Comparisons between quantitative data were formed by the Mann-Whitney U test and categorical data by the Fischer exact test. The Kaplan-Meier curve with statistical significance by the log rank test were used for the association with survival. Survival was defined as a period between the date of diagnosis and the date of

death or last record. Association strength based on the hazard ratio (HR) and their respective confidence intervals (CIs) were estimated using Cox proportional hazards regression.

Data were stored in the SPSS software for Windows (version 22.0), and p values <0.05 were considered significant.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Imandade Santa Casa de Misericórdia of Porto Alegre under opinion No. 1,856,228, of December 8, 2016. (See Supplementary Appendix)

Results

Patient Characteristics

Clinical data are summarized in table 1. The mean age of patients who were positive for DLL3 was 65.3-or+10.1, ranging from 42 to 89 years old. The presence of metastasis was 76.9% and smoking, 76.9% for patient DLL3 Positive.

Table 1: Clinical characteristics of patients with SCLC and their correlations with positive DLL3 vs. negative DLL3

Characteristics	DLL3 (+) n = 13	DLL3 (-) n = 27	P value
Age, years	65.3±10.1	67.7±10.5	0.480
Female sex, number (%)	6 (46.2)	12 (44.4)	>0.99
Metastasis, number (%)	10 (76.9)	21 (77.8)	>0.99
Smoking, number (%)	10 (76.9)	23 (85.2)	0.662
SAH, number (%)	7 (53.8)	13 (48.1)	>0.99
Dyslipidemia, number (%)	0 (0.0)	2 (7.4)	>0.99

DLL-3 Expression and correlation with biomarkers

Of the 40 patients suffering from SCLC included in the study to assess the expression of the DLL3 biomarker, 13 (32.5%) showed membrane and/or cytoplasmic expression in 5% or more of neoplastic cells, being 7 (53.8%) men and 6 (46.2%) women.

In positive DLL3 patients, 46.2% had membrane expression equal or more than 1% for the EGFR biomarker (OR: 2.04 and 95% CI: 0.52-8.00); 30.8% for PDL-1 (OR: 3.56 and 95%

CI: 0.66-19.11) and 53.8% Cyclin D1 (OR: 2.77 and 95% CI (0.71-10) Table 2.(See Supplementary Appendix)

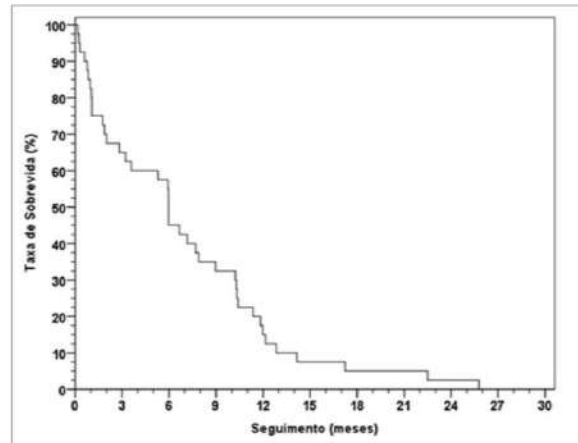
By assessing the markers previously examined in the laboratory routine, we observed a tendency of chromogranin to show less nuclear expression in DLL3 positive patients (30.8%) in comparison with DLL3 negative patients (60%), representing an inverse correlation, which probably could act as a protective factor (OR: 0.3 and 95%CI: 0.07-1.23) (Table 2).

Table 2: Distribution of positive results for selected markers among SCLC patients with positive DLL3 versus negative DLL3

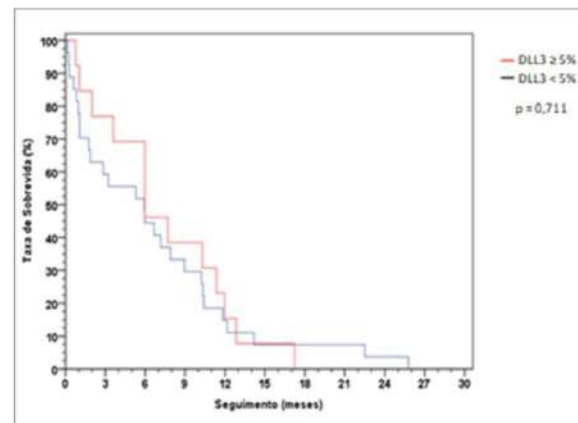
Positive markers	DLL3 (+) n = 13	DLL3 (-) n = 27	OR	95%CI	P value
Chromogranin A, number/ not evaluated (%)	4/13 (30.8)	15/25 (60.0)	0.30	0.07 - 1.23	0.170
CK7, number (%)	11 (84.6)	20 (74.1)	1.93	0.34 - 10.92	0.690
Synaptophysin, number/ not evaluated (%)	9/12 (75.0)	23/26 (88.5)	0.39	0.07 - 2.31	0.357
CD56, number (%)	13 (100.0)	23 (85.2)	5.17	0.25 - 104	0.284
TTF1, number (%)	12 (92.3)	25 (92.6)	0.96	0.08 - 11.66	>0.999
EGFR, number (%)	6 (46.2)	8 (29.6)	2.04	0.52 - 8.00	0.480
PD-L1, number (%)	4 (30.8)	3 (11.1)	3.56	0.66 - 19.11	0.187
Cyclin-D1, number (%)	7 (53.8)	8 (29.6)	2.77	0.71 - 10.88	0.175
Ki-67, number (%)	13 (100.0)	23 (85.2)	5.17	0.25 - 104	0.284

Outcome Survival

Overall survival for SCLC patients was six months. Median survival was 5.97 (Figure 3).



In figure 4 the survival rate is evaluated in patients suffering from SCLC who were positive (> or equal to 5%) and negative for DLL3 (<5%) (Figure 4). The Kaplan-Meier curve shows that DLL3 positive patients have a slightly higher survival rate (p 0.711).



The survival rate in positive chromogranin patients using the Kaplan-Meier test was slightly higher (p 0,299).Figure 5

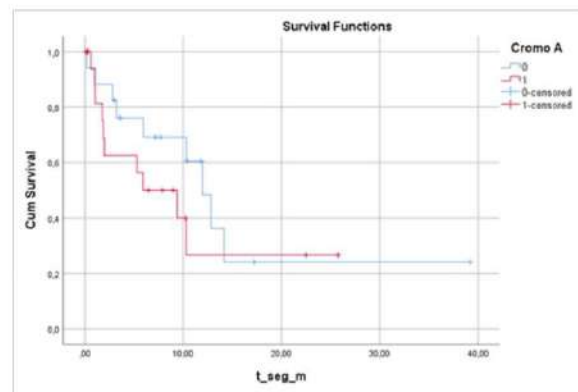


Figure 5: survival as a function of the association between DLL3 and chromogranin A

Discussion

SCLC is a low-incidence neoplasm whose treatment is limited to chemotherapy, radiotherapy and, more recently, immunotherapy in advanced stages. For the development of new systemic strategies it is necessary to understand oncogenesis in SCLC [22,23].

Saunders et al., in 2015, in a preclinical study in vitro and with xenograft in mice demonstrated the expression of DLL3 by SCLC neoplastic cells and concluded that this ligand from the Notch pathway acts as a predictive factor of response to treatment [24].

In 2018, Kentaro et al., reported in a cohort with 63 patients an expression of DLL3 of 83%. In that study there was no correlation between the expression of DLL3 and clinical, demographic or survival [25].

More recently, in 2019, Furata et al., in a cohort of 93 SCLC patients undergoing surgical resection, detected 83% of DLL3 expression. There was no statistical correlation between DLL3 and patient survival. However, the authors described that DLL3 acts as a regulator of cell migration and invasion in SCLC, suggesting that it plays a role as an oncogene in neuroendocrine neoplasms [26].

In addition, in July 2019, Owen et al., evaluated the expression of DLL3 by immunohistochemistry in 63 samples from patients with SCLC, of which 52 (83%) were positive. This study addresses the possibility of developing new therapies for SCLC such as antibody-drug conjugate, bispecific immunological therapy with involvement of T cells and chimeric antigen receptor, which redirects CD3 positive T cells to positive DLL3 tumors and promotes cell apoptosis. Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) has also been studied as strategy aimed at DLL3 for the treatment of SCLC [27].

In our study, the expression of DLL3 in neoplastic cells was 32.5%. As Kentaro et al. (2018), there was no correlation with clinical-demographic findings. We assessed the correlation between positive DLL3 and EGFR, PDL-1, Cyclin D1 and CD56. The HR values (table 2) indicate clinical impact on this correlation, although without statistical confirmation.

However, the finding that came closest to the stipulated statistical value was the correlation between DLL3 and chromogranin A. Positive DLL3 patients showed low expression of the biomarker chromogranin A (OR = 0.30 and IC-007-1.23), raising the hypothesis that there is an inverse correlation between the two biomarkers. Thus, this correlation would represent a greater tendency for protective action.

In the survival assessment, the positive DLL3 patient survives a little longer. However, around the 15th month, mortality in both groups is the same. In groups of positive DLL3 patients with negative chromogranin, the survival rate by the Kaplan-Meier test was slightly higher (p 0.299) [28,29].

Our data on the expression of chromogranin A corroborate with the studies by Kowalki et al. The authors report that chromogranin and synaptophysin are associated with SCLC survival and that they act as an indirect predictive factor. Neoplasms with high rates of chromogranin contain a greater amount of secretory vesicles in neuroendocrine cells, conferring a strong potential for malignant transformation [28,19].

Our study, carried out in southern Brazil, had several limitations. First, SCLC is a rare disease and we retrospectively assessed a small cohort of patients. In addition, differences in antibody choice, scoring method and cut-off values can impact immunohistochemical assessment and results. Considering the small size of the group of patients with positive DLL3, a

multivariate analysis may not adequately adjust the association of DLL3 expression with clinical results. On the other hand, we have a great inherent challenge, represented by the heterogeneous tumor microenvironment, in which incisional biopsies may not be representative of a specific genetic alteration.

We found strong evidence in the literature to consider that DLL3, PDL-1 and EGFR are interdependent markers, reinforcing the Delta-Like 3 study: the Notch3 and EGFR / MAPK pathways cooperate in modulating apoptosis; [31].

Notch-1 expression is positively regulated by EGFR-TKIs, promoting neoplastic cell resistance to therapies; [32] the activation of (EGFR) by its binding to the ligand (EGF) induces the expression of PD-L1 in NSCLC cells, through PI3K / Akt / mTOR [33]; preclinical data show that Rova-T increases the expression of PDL1 in tumor cells and the infiltration of immune cells in the tumor, suggesting that Rova-T may change the tumors to a more responsive state at the checkpoint [34].

In conclusion, we emphasize that the Notch pathway, when mutated, activates the DLL3 protein and alters the ASCL1 transcription, acting on CPCP tumorigenesis. Based on this knowledge, research involving the Notch pathway and its interdependence with other pathways in the cell cycle may be beneficial for the development of new target therapies

Acknowledgment

Research productivity fellowship Brazil (CNPq) (302931/2019-8)

Conflict of interests:

The authors declare that there is no conflict of interest

References

- [1] Azzopardi, JGI. Oat cell carcinoma of the bronchus. *Path Bac.* Vol178513-519, Londres, 1959
- [2] Travis, WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol.* Jan 2012;25suppl 1:S518-530
- [3] Sociedade Americana de Câncer: Cancer Facts and Figures 2018. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2018. Disponível online. Último acesso em 01/10/2020
- [4] H FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer.* New York, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, Apr. 2019; boken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.
- [5] Estimativa 2020. Rio de Janeiro, 4 de fevereiro de 2020. Documento disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil> último acesso em 01/10/2020.
- [6] Bryan A. Chan^{1,2} and Jermaine I. G. Coward. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013 Oct; 5(Suppl 5): S565–S578.
- [7] Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in immunology* 2006;90:51-81.
- [8] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* 2012;12:252-64.

- [9] Koval R, Ilagan MX. The canonical Notch Signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009 Apr 17;137(2):216-33.
- [10] Kentaro Takana, Isse K et al. Prevalence of delta-like protein 3 expression in patients with small-cell lung cancer. *LUNG CANCER*.2018(115)116-120.
- [11] Rudin CM¹, Pietanza MC², Bauer TM³, Ready N⁴, Morgensztern D⁵, Glisson BS⁶, Byers LA⁶, Johnson ML³, Burris HA 3rd³, Robert F⁷, Han TH⁸, Bheddah S⁸, Theiss N⁹, Watson S⁹, Mathur D⁹, Vennapusa B⁹, Zayed H⁸, Lally S⁸, Strickland DK¹⁰, Govindan R⁵, Dylla SJ⁵, Peng SL⁸, Spigel DR³; Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2017 Jan;18(1):42-51
- [12] Schultheis AM, Scheel, Ozretli L et al. Eur J cancer, 2015, feb;51(3):421-6. expression PDL-1 in small cell neuroendocrine carcinoma. *europen journal of cancer*, vol51(3);421-426. feb, 2015/
- [13] Alexander Y. Deneka, Yanis Bounber, Tim Beck, and Erica A. Golemis Tumor-Targeted Drug Conjugates as an Emerging Novel Therapeutic Approach in Small Cell Lung Cancer (SCLC) *Cancers (Basel)*. 2019 Sep; 11(9): 1297
- [14] Shiao TH¹, Chang YL, Yu CJ, Chang YC, Hsu YC, Chang SH, Shih JY, Yang PC. Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer: a brief report. *Thoracic Oncol* 2011 jan;6(1):195-8
- [15] Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol*. 2008 May;21 Suppl 2:S16-22.
- [16] Yun CH¹, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meyerson M, Eck MJ. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):217-27.
- [17] Karachaliou N. et al. Cellular and molecular Biology of Small Cell Lung cancer: an Overview. *Transl. Lung Cancer Res*. Feb. 2016;5(1):2-15
- [18] Scheel AH¹, Ansen S², Schultheis AM¹, Scheffler M², Fischer RN², Michels S³, Hellmich M³, George J⁴, Zander T⁵, Brockmann M⁵, Stoelben E⁶, Groen H⁷, Timens W⁸, Perner S⁹, von Bergwelt-Baildon M², Böttner R¹, Wolf J². PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncimmunology*. 2016 Mar 16;5(5):e1131379.
- [19] D'Incecco A¹, Andreozzi M², Ludovini V³, Rossi E¹, Capodanno A⁴, Landi L¹, Tibaldi C¹, Minuti G¹, Salvini F¹, Coppi E¹, Chella A¹, Fontanini G², Filice ME¹, Tomillo L², Incensati RM¹, Sami S¹, Crinò L³, Terracciano L², Cappuzzo F¹. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2015 Jan 6;112(1):95-102
- [20] Horstmann S , Ferrari S , Klempnauer KH . Regulation of B-Myb activity by cyclin D1. *Oncogene*, Jan 2000, 19(2):298-306
- [21] Saito, M.Saito K, et al. Identification of candidate responders for anti PD-1 immunotherapy.Rova-T therapy, or EZH2 inhibitory therapy in small-cell lung cancer. *Molecular and clinical Oncology*;310-314,dezenbro 2017
- [22] Zhao, H, Ren,D, LiuH & ChenJ. Comparison and discussion of the treatment guidelines for small-cell lung cancer. *Thoracic Cancer* 9-769-774,2018
- [23] Fu M¹, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5439-47
- [24] Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med* 2015;7:302ra136.
- [25] Tanaka K,Isse K,Fujiira T.et al. Prevalence of Delta-like protein 3 expression in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2018; 115: 116-120
- [26] Furata et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 2019 Nov;24(11):e1172-e1179.
- [27] Owen D H. et al. DLL3: an emerging target in small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*. 2019 Jun 18;12(1):61.
- [28] Kowalski M et al. Prognostic value of synaptophysin and chromogranin a expression in patients receiving palliative chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2013;85:289-296
- [29] Giacinto P D et al. Chromogranin A: From Laboratory to Clinical Aspects of Patients with Neuroendocrine Tumors. *International Journal of Endocrinology*. Jul 2028, V.2018: 8126087.
- [30] Alexander Y. Deneka, Yanis Bounber, Tim Beck, and Erica A. Golemis Tumor-Targeted Drug Conjugates as an Emerging Novel Therapeutic Approach in Small Cell Lung Cancer (SCLC) *Cancers (Basel)*. 2019 Sep; 11(9): 1297
- [31] Pancewicz-Wojtkiewicz J. Epidermal growth factor receptor and notch signaling in non-small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2016; 5 (12): 3572-3578. doi: 10.1002/cam4.944
- [32] Xie, M., He CS, Wei SH, and Zhang L .Notch - 1 contributes to the acquired resistance of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer in vitro and in vitro alive. *EUR. J. Cancer*.2013. 49: 3559-3572
- [33] Lamberti, G ; Brighi, N ; Maggio, I ; Manuzzi, L ; Peterle, C ; Ambrosini, V ; Ricci, C ; Casadei, R ; Campana, D. The role of mTOR in neuroendocrine tumors: Future pillar of a winning strategy? *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 747.
- [34] Vitorino P, Chuang CH, Iannello A, Zhao X, Anderson W, Ferrando R, Zhang Z, Madhavan S, Karsunky H, Saunders LR. Rova-T enhances the anti-tumor activity of anti-PD1 in a murine model of small cell lung cancer with endogenous Dll3 expression. *Transl Oncol*. 2020 Oct 15; 14 (1): 100883.

4.2 ARTIGO 2



GLOBAL JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH: C
 MICROBIOLOGY AND PATHOLOGY
 Volume 21 Issue 1 Version 1.0 Year 2021
 Type: Double Blind Peer Reviewed International Research Journal
 Publisher: Global Journals
 Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888

Characteristics Shared between Lung Development and Tumorigenesis: Mini Review Article

By Josenel Maria Barcelos Marçal, Júlia Iaroseski, Luiz Fillipe Pinto da Silva,
 Thales Augusto Della Torre Marzarotto, Giulia Righetti Tuppini Vargas,
 Vitória Morita Fukuoka, Luiza Carolina da Rosa Scherner,
 Rafael Fabiano Machado Rosa & Paulo Ricardo Gazzola Zen

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Abstract: Cells with characteristics of embryonic stem cells, and cancer stem cells are at the basis of both embryo development and the cancer process. At the same time, they share signaling pathways, such as the hedgehog, Notch, Wnt, TGF beta, among others. This knowledge is important for understanding the pulmonary regeneration process and for the development of new target therapies.

Keywords: *embryogenesis, alveolarization, lung, tumorigenesis, molecular biology, signaling pathways.*

GJMR-C Classification: *NLMC Code: WF 600*



Strictly as per the compliance and regulations of:



© 2021. Josenel Maria Barcelos Marçal, Júlia Iaroseski, Luiz Fillipe Pinto da Silva, Thales Augusto Della Torre Marzarotto, Giulia Righetti Tuppini Vargas, Vitória Morita Fukuoka, Luiza Carolina da Rosa Scherner, Rafael Fabiano Machado Rosa & Paulo Ricardo Gazzola Zen. This is a research/review paper, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 Unported License <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>, permitting all non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Characteristics Shared between Lung Development and Tumorigenesis: Mini Review Article

Josnel Maria Barcelos Marçal^a, Júlia Iaroseski^c, Luiz Fillipe Pinto da Silva^d,
Thales Augusto Della Torre Marzarotto^b, Giulia Righetti Tuppini Vargas^e, Vitória Morita Fukucka^f,
Luiza Carolina da Rosa Scherner^g, Rafael Fabiano Machado Rosa^h & Paulo Ricardo Gazzola Zen^e

Abstract- Cells with characteristics of embryonic stem cells, and cancer stem cells are at the basis of both embryo development and the cancer process. At the same time, they share signaling pathways, such as the hedgehog, Notch, Wnt, TGF beta, among others. This knowledge is important for understanding the pulmonary regeneration process and for the development of new target therapies.

Keywords: embryogenesis, alveolarization, lung, tumorigenesis, molecular biology, signaling pathways.

INTRODUCTION

The understanding of lung development during embryogenesis and the knowledge of several cell populations is essential for regenerative medicine and for the recognition of the cell of origin of lung neoplasms.

Several evidences suggest that the human lung contains a population of characteristic stem cells. This statement is explained by the fact that most patients with small cell lung cancer (CPCP) already have metastases, resistance or refractoriness to chemotherapy treatment at the moment. Likewise, patients with adenocarcinomas that express tyrosine kinase (EGFR) mutations, and who are initially sensitive to therapy, also acquire resistance. (Kobayashi et al. 2005; Pao et al. 2005; Kosaka et al.2006).

Another piece of evidence was the identification of cells from the lateral population, isolated by their ability to efflux the Hoechst dye and which exhibit increased expression of drug transporters, tumor propagation capacity and resistance to multiple chemotherapies (Ho et al.2007). It was identified that

CD133 positive lung tumor cells formed self-renewing spheres in culture with tumor propagation, when transplanted subcutaneously in immunodeficient mice (Erasmus et al. 2008).

With this review we intend to define the cell types and molecular biology data of the lung in embryogenesis and in the adult lung, drawing points of comparison and trying to correlate with the development of neoplasms.

I. PULMONARY DEVELOPMENT STAGES

The lung has a large internal surface and an airway conduction system with several branches. Conductive airways are formed first, followed by the formation and enlargement of the gas exchange area. Alveolarization is the last stage of the fetal period and continues in the postnatal period.

In the embryonic period, between 4-7 gestational weeks organogenesis occurs. The left and right lungs have their own ring, an external pouch of the anterior intestine (Cardoso and Lu 2006). Each pulmonary bud initiates a repetitive process of growth and branched morphogenesis to form future airways (Schittny and Burri 2008). Epithelial cells are supported by a basement membrane, surrounded by an extracellular matrix that is produced by mesenchymal cells. The components of the extracellular matrix, including the basement membrane, are different in the terminal bud, in the branching points and in the most proximal portions of the bronchial tree, where epithelial differentiation has already started (Schittny and Burri2004). The branching is coordinated by epithelial and mesenchymal cells, growth factors and transcription factors that the cells are producing.

The fetal period includes the pseudoglandular, canalicular and saccular stages. The postnatal lung period comprises the stages of classic and continuous alveolarization, as well as microvascular maturation. As most processes during lung development begin in the proximal area and extend to the periphery, all phases of lung development overlap (Schittny and Burri 2008; Wood and Schittny 2016)

The expression of growth factors, such as fibroblast growth factor 10 (FGF-10), bone morphogenic protein 4 (BMP-4), Sonic Hedgehog (Shh), retinoic acid, Notch and TGF- β provide the instructions for

Corresponding Author a: Graduate Program in Pathology, Department of pathology and forensic medicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil. e-mail: josnel.copetti@gmail.com

Author c p d e f g h: Graduation in Medicine, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil. (ORCID ID:0000-0003-4433-1525). e-mails: juliaiaroseski@gmail.com, luizfillipeps96@gmail.com, thalesmarzarotto@gmail.com, giu.righetti@gmail.com, vitoriamf@ufcspa.edu.br

Author i: Masters student of the post-graduate program in pathology, UFCSPS, Porto Alegre, Brazil. e-mail:lrscherner@gmail.com

Author v: Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, UFCSPA and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Brazil. e-mail: rfmrosa@gmail.com

Author e: Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, (UFCSPA) and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Brazil. e-mail: paulozen@ufcspa.edu.br

ramification in the period of morphogenesis. (Cardoso and Lu 2006; Hines and Sun 2014; Schittny and Burri 2008)

The negative feedback mechanism involves signaling by Shh (Sonic hedgehog), its Ptc1 receptor (Patched 1) and transcription factors such as Gli1-3, belonging to the Shh signaling pathway. The Shh pathway acts by inhibiting local expression of Fgf10, preventing branching from occurring indefinitely. The process also depends on complex regulation by signaling pathways of the Tgf β (Transforming Growth Factor Beta) family members, Wnt (Wingless- type) and Bmp4 (Bone Morphogenetic Protein 4, from the Tgf Beta family) (Park 1998; Rock and Hogan 2011; Katton and Morrissey 2014).

The Fgf (fibroblast Growth Factor) signaling pathway is activated by localized expression of Fgf10 in the mesoderm and its receptor Fgfr2 in the endoderm. This signaling induces branching, and Fgf10 stimulates the proliferation of epithelial cells. (Rock and Hogan 2011; Katton and Morrissey 2014).

Around the 10th gestational week, respiratory movements begin that cause additional stretching of the fetal lung tissue (Koos and Rajace 2014). These stimuli positively regulate the release of serotonin, promoting epithelial differentiation (Pan et al 2006).

A continuous layer of positive cells for α smooth muscle actin begins to form around the future proximal airways, becoming discontinuous distally in the bronchial tree and ending in front of the terminal buds. These contractile cells begin to perform spontaneous contractions, pushing peristaltic waves of interbronchial fluid to the periphery. These movements, too, stimulate branched morphogenesis and prevent uncontrolled airway expansion as lung fluid is secreted into the lung (Schittny et al. 2000; Sparrow et al. 1994).

The canalicular stage occurs between 16-26 gestational weeks and comprises the differentiation of the epithelium that allows the morphological distinction between the airways (acino / ventilatory unit) (Winkelmann and Noack 2010).

At the junction of the bronchioalveolar duct (BADJ), there is an abrupt change in the epithelium from hair cells and from Clear cells to type I and type II alveolar epithelial cells (Winkelmann and Noack 2010). This junction is formed at the canalicular stage, when epithelial differentiation occurs and is of particular importance, because it represents a niche of stem cells (McQualter et al. 2010). It has recently been shown that the junction bronchioalveolar remains constant throughout the lung development in the generation of the airways, where it was originally formed (Barre et al. 2014, 2016).

The saccular stage occurs between 24-38 gestational weeks and represents an intermediate stage, when the branching morphogenesis ceases and the alveolarization has not yet started (Cardoso and Lu

2006; Morrissey et al. 2013). they are coated by type 1 and type 2 cells (Cardoso; 2006; Rock and Hogan, 2011).

At the end of the saccular stage, the mesenchyme located between the future airways contains a loose three-dimensional vascular network in proliferation, due to intense angiogenesis, conferring a high capillary density. The future airways that will become alveolar ducts grow in width and length, change shape and appear as "canaliculi", which form the canalization of the mesenchyme through the airways and capillaries. The growth of the airways and apoptosis cause condensation of the mesenchyme., where the volume and the total number of mesenchymal cells decrease (Rogelj et al. 1989).

In parallel with alveolarization, the double layer capillary network of immature septa merges with a single layer network, resulting in an optimized configuration for gas exchange. Alveolarization still continues, because, in places where new septa are shedding pre-existing mature septa, the second necessary capillary layer will be formed instantly by angiogenesis, confirming a lifelong alveolarization capacity, which is important for any type of lung regeneration.

The lung mesoderm represents a source of essential paracrine instructional signals that regulate the proliferation and differentiation of the endoderm progenitor and also contributes to the various lung structures, including airway smooth muscle, vascular smooth muscle, endothelial cells, mesothelial cells and many less known mesodermal strains, such as pericytes, alveolar fibroblasts and lipofibroblasts. The lung mesoderm is believed to originate from the initial mesoderm that surrounds the ventral anterior intestine.

II. PULMONARY CELL TYPES

a) Embryonic Lung Cells

The embryonic pulmonary epithelium differentiates into hair, serous secretory cells, goblet cells, clear cells, basal cells and neuroendocrine (NE) cells. The proportions of these cells vary along the proximal-distal axis. In bronchioles, clear cells are more abundant than the ciliated ones, with some groupings of NE cells, called neuroepithelial bodies or NEBs. Goblet cells are marked by the expression of the transcription factor SPDEF and mucin-5ac (Muc5ac). (Morrissey and Hogan, 2010).

Neuroendocrine (NE) cells are the first epithelial cells to appear in the lung and are more abundant in fetal and neonatal lungs than in the adult lung. basic ID2 helix loop. These multipotent cells have the ability to give rise to all major types of respiratory epithelial cells, including PNECs (pulmonary neuroendocrine cells) (Rawlins et al 2009).

The evidence suggests that the specification of the fate of PNECs is controlled by interference between bHLH activating and repressing genes, a conserved mechanism between *Drosophila* and mammals (Ito et al 2006).

The ASCL1 complex activates NE differentiation, while the HES 1 gene suppresses this pathway, inhibiting the formation of the ASCL1 / TCF3 complex.

Notch signaling was also important in specifying the PNEC lineage. The delta-like Notch ligand 1 (DLL1) is expressed in NE cells in the proximal airways. Its activity may be under the control of ASCL1. Notch 2 mediates the fate of clear hair cells.

Finally, the migration control program for normal pulmonary neuroendocrine cells and malignant cells is extremely relevant for the understanding and treatment of metastasis of small cell lung cancer. Recently, a new form of epithelial cell migration shown by normal pulmonary neuroendocrine cells during pulmonary epithelial development has been demonstrated, called 'sliding', which is used to organize neuroendocrine cells into stereotyped groups (Kuo 2015). The normal sliding program involves the transient activation of an epithelial-mesenchymal transition (EMT), in which the pulmonary neuroendocrine cells migrate over and around other epithelial cells to meet, without ever invading the lung mesenchyma. The pulmonary NE cells are distributed throughout the bronchial epithelium, interspersed between secretory cells (Claras) and hair cells, the two main types of airway epithelial cells (Rock and Hogan, 2011; Semenova 2015). The clusters of NE or (NEBs) are highly innervated (Brouns et al., 2008) and have sensory and neurosecretory functions; stem cell function, which helps to replace the bronchial epithelium after severe injury (Guha et al., 2012; Reynolds et al., 2000; Song et al., 2012); and function of small cell lung cancer cell initiator (Song et al., 2012; Kuo 2015).

Further investigation into the sliding program is likely to reveal molecular dependencies directed at small cell carcinoma to attenuate or perhaps even prevent metastasis to extrapulmonary organs, which is the main cause of patient death (Semenova 2015; Kuo, 2015)

III. PULMONARY CELLS OF ADULTS

Pulmonary epithelial cells are largely subdivided into airways (tracheal / bronchiolar) and alveolar types. The tracheobronchial airways are lined with pseudostratified epithelium in which each cell comes into contact with the basement membrane. Below the basement membrane are blood and lymph vessels, smooth muscle, cartilage, fibroblasts and nerves (Hogan et al., 2014). The most distal intrapulmonary conduction airways are lined by simple columnar epithelium. The gas exchange is performed inside the alveolar epithelium.

PNECs represent only 0.4% of adult epithelial cells and have endocrine and neuronal cell properties. They express neural markers, such as NCAM1 and ASCL1 neural cell adhesion molecules (Chanda et al. 2014). They are associated with intraepithelial nerve fibers and can transmit signals to the central nervous system. Generally, it contains electron-dense vesicles, which accumulate peptides, related to the bombesin and calcitonin gene (CGRP), which acts as a vasodilator; and to the amines, represented by serotonin, which act as a vasoconstrictor. The functions of PNECs include control of airway tone, pulmonary blood flow and immunomodulation.

Brush cells make up less than 1% of the airway epithelium and have recently been shown to have a chemosensory role that can allow the detection of bacterial infections (Tizzano et al., 2011). Basal cells are stem cells that self-renew and differentiate into secretory and hair cells during homeostasis and repair (Teixeira et al., 2013; Watson et al., 2015). Secretory cells are predominantly of the mucous subtype. It is not clear whether mucus-secreting cells retain the ability to proliferate and function as stem / progenitor cells (Teixeira et al., 2013).

The alveolar epithelium consists of type I and type II alveolar cells (AT1 and AT2 cells) that are surrounded by capillaries and fibroblasts (Weibel, 2015). AT1 cells are flat, highly extended and specialized for gas exchange. AT2 cells are cuboidal, more common and specialized in the production of surfactant, a complex mixture of proteins and phospholipids that reduces surface tension in the alveolar region (Crapo et al., 1982; Hogan et al., 2014; Weibel, 2015; Williams, 2003). AT2 cells are the main alveolar epithelial stem cells and can self-renew and differentiate into AT1 cells (Barkauskas et al., 2013; Desai et al., 2014; Rock et al., 2011).

Traditionally, alveolar fibroblasts have been characterized mainly as myofibroblasts and lipofibroblasts, but their exact roles have not yet been defined and there are controversies about the existence of lipofibroblasts in human lungs. (Bhattacharya and Westphalen, 2016).

The lung also contains a resident population of immune cells and alveolar macrophages, which play important roles in surfactant homeostasis and innate immunity (Bhattacharya and Westphalen, 2016).

IV. MOLECULAR REGULATION IN EMBRYOGENESIS

The first indication of the respiratory precursor in the endoderm of the primitive intestinal tube is registered by the expression of TTF1 (Thyroid Transcription factor 1, homeobox or NKx2.1 type transcription factor) where the thyroid and lungs will be formed (Cardoso and Lu 2006).

CK8 / CK18 cytokeratins are the first keratins to appear in embryogenesis, already in pre-implantation embryos and also appear to be the oldest keratins during phylogenesis (Jackson, 1980; Blumenberg 1988). With respect to malignant tumors, K8 and K18 flush strongly the majority of adenocarcinomas, hepatocellular carcinomas, renal cell carcinomas and neuroendocrine carcinomas. These keratins can be useful in diagnostic immunohistochemistry in cases of carcinomas with low keratin content, such as small cell lung cancer, to prove their epithelial nature (Moll, 2008). P63 plays a prominent role in controlling the functions of epithelial stem cells and in differentiating and stratifying tissue derived from ectoderm during embryonic development. (Guerrini, 2011)

The transcription factor Sox2 marks proximal epithelial progenitors and Sox9 marks distal epithelial progenitors. Additional markers of Sox9 positive distal progenitor cells include surfactant proteins, such as surfactant protein C (Sftpc), the transcription factor Id2. Lineage screening studies have suggested that positive distal Id2 cells can generate distal and proximal cell lines. This capacity for multipotent differentiation is subsequently lost, and positive Id2 progenitor cells may form only distal alveolar epithelia (Rawlins 2018).

All early events in lung development are controlled by a variety of signaling pathways, including Fgf, Tgfb, Wnt, SOX, Hedgehog (Shh-Sonic hedgehog, its Patched 1 receptor and transcription factors like Gli-3), Notch and acid retinoic (Rock and Hogan 2011; Katton and Morrisey 2014).

The process also depends on a complex regulation by signaling pathways that includes members of the Tgfb (Transforming Growth Factor Beta) and Wnt (Wingless-type) family, Bmp4 (Bone Morphogenetic Protein 4, of the Tgfb family). Notch signaling plays an important role in controlling cell differentiation (Tsao 2011).

On the tenth day of the embryonic period, mesenchymal cells begin to express abundant vascular endothelial growth factor (VEGF) (White et al., 2007), which is an important ligand for the VEGF 2 receptor (VEGFR2) in vasculogenesis and angiogenesis (Chung and Ferrara, 2011; Karaman et al., 2018; Apte et al., 2019). VEGF expression stimulates the alveolar capillary network. FGF10 derived from the mesenchyme also stimulates mTORC1 / Spry2 epithelial signaling, and this signaling triggers the production of VEGF in the epithelium (Scott et al., 2010).

Columnar, non-ciliated epithelial cells are identified by the expression of the product CC10 (Clara Cell Secretory Protein 10KD) (Reynolds 2002).

Interleukins, IL4 and IL13, Foxa2 and Spdef transcription factors (Sam pointed Domain-containing etc. Transcription Factor) influence the differentiation of goblet cells (Chen 2009) that develop only in the postnatal period (Pack 1980) and are evaluated by the

expression of Muc5ac (Main Mucina Constituent of mucus) and Spdef.

The transcription factor called Foxj1 (Forkhead Box Transcription Factor) identifies respiratory progenitors that will give rise to hair cells (Rawlins 2007).

NE cells are identified using ACCGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) and PGP9.5 (Protein Gene Product 9.5). Mash 1 9Achaete-Scute-Complex-Like1) is a transcription factor of the basic helix-loop-helix family) that is fundamental in the formation of this cell type (Guilhemont 1993).

Basal cells are identified by the expression of specific molecular markers Trp-63 (Transcription Factor Transformation-related Protein or P63), cytokeratin 14 (Krt14) and cytokeratin 5 (Krt5) (School 2004)

Evidence indicates that basal cells comprise a population of multipotent parents (Rowlins and Hogan 2006).

Antigens such as ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) are abundantly expressed by type I pneumocytes and by expression of Type I Caveolins (Transmembrane Proteins). Type II pneumocytes express proteins associated with pulmonary surfactants, such as SP-A, SP-B, SP-C and SP-D (Costa 2001). Transcription factors such as cat-6, TTF1, Hnf3 / 3, C / ebpa, hormones glucocorticoids and Fgfs are involved in the differentiation of pneumocyte II (Cardoso 1997).

With aging, human lung functions decrease at a rate of 1% per year after the age of 25, even without lung diseases (Janssens et al., 1999; Sharma and Goodwin, 2006). The lung starts to exhibit several changes, including increased secretion of pro-inflammatory cytokines, attenuated immune response and changes in the structural proteins of the extracellular membrane (Meiners et al., 2015; Navarro and Driscoll, 2017). Structural changes occur, such as spaces increased air space, loss of surface area and decreased static elastic recoil, with the most significant decline in the number and functions of capillary endothelial cells (Thurlbeck and Angus, 1975).

Fases do desenvolvimento pulmonary e mediadores

V. EPIGENETIC REGULATORS OF FATE AND DIFFERENTIATION OF PULMONARY EPITHELIAL CELLS

Recent studies have also identified epigenetic mechanisms of histone changes in the control of lung development. Acetylation through Histone acetyltransferase (HATs) promotes genetic transcription, and deacetylated histone (HDACs) removes the acetyl group, leading to genetic silencing (Choudhary et al., 2009). There is evidence that HATs are necessary for embryonic lung development. The loss of Hdac in the pulmonary epithelium results in reduced expression of Sox2, preventing the development of multiple types of proximal cells (Wang et al., 2013). This change in Sox2

expression is, in part, mediated by increased expression of Bmp4, which also contributes to the severe branching defects seen in Hdac mutants. It has also been shown that hyperoxia during neonatal development results in decreased hdac activity, leading to alveolar hyperplasia and interrupted alveolarization (Zhu et al., 2012).

Although histone acetylation is known to play an important role in the lung, little is known about the roles of other epigenetic complexes during lung development. The methyltransferases Suv39H1 and Suv39H2, which induce transcriptional silencing through histone H3 lysine 9 methylation, directly repress the expression of the surfactant protein SP-A (Sftpa1) during hypoxia (Benlhabib and Mendelson, 2011). Suv39H1 and Suv39H2 are also highly expressed in early lung development, suggesting that they may inhibit SP-A transcription until later in development. During pulmonary fibrosis, DNA methylation by Dnmt1 represses the transcription of miR17~92, a microRNA cluster that regulates lung development (Dakhlallah et al., 2013). Likewise, Dnmt1 mediates the progression of lung cancer through the methylation of several promoter regions (Dakhlallah et al., 2013).

VI. CONCLUSION

Recent studies demonstrate that cell signaling and gene expression pathways, including PTEN, protein kinase C (iota), Wnt, hedgehog, c-kit, Akt and others that can play important roles in the transformation of endogenous progenitor cells into cancer cells lung.

Pluripotent stem cells (PSCs) can be derived from the internal cell mass of the initial embryo (in the case of embryonic stem cells, ESCs) or can be reprogrammed from fully differentiated cells (in the case of iPSCs). They retain the potential to differentiate into any type of cell in the body. For this reason, we can say that our organoid system provides a genetically treatable tool and, therefore, specific human characteristics of lung development should be investigated (Nicolic 2017).

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest

REFERENCES RÉFÉRENCES REFERENCIAS

- Apte, R. S., Chen, D. S., and Ferrara, N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 176, 2019, 1248–1264. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.02.
- Bhattacharya, J. and Westphalen, K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin. Immunopathol.* 2016, 38, 461-469. doi:10.1007/s00281-016-0569-x.
- Bhattacharya, S., Go, D., Krenitsky, D. L., Huyck, H. L., Solleti, S. K., Lunger, V. A., Metlay, L., Srisuma, S., Wert, S. E., Mariani, T. J. et al. Genome-wide transcriptional profiling reveals connective tissue mast cell accumulation in bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012, 186, 349-358. doi:10.1164/rccm.201203-0406OC.
- Barkauskas C. E., Crouse M. J., Rackley C. R., Bowie E. J., Keene D. R., Stripp B. R., Randell S. H., Noble P. W., Hogan B. L. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 2013, 123, 3025–3036.
- Barre SF, Habberthur D, Stampanoni M, Schittrny JC. Efficient estimation of the total number of acini in adult rat lung. *Physiol Rep.* 2014;2 doi: 10.14814/phy2.12063.
- Benlhabib H., Mendelson C. R. Epigenetic regulation of surfactant protein A gene (SP-A) expression in fetal lung reveals a critical role for Suv39h methyltransferases during development and hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 31, 20111949–1958.
- Blumenberg M. Concerted gene duplications in the two keratin gene families. *J Mol Evol.* 1998, 27(3):203–211.
- Koos BJ, Rajaei A. Fetal breathing movements and changes at birth. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 814:89–101. doi: 10.1007/978-1-4939-1031-1_8.
- Cardoso WW. Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:471–494
- Cardoso W. V. and Lu J. (2006). Regulation of early lung morphogenesis: questions, f-Carla F Bender Kim, Erica L Jackson, Amber E Woolfenden, Sharon Lawrence, Imran Babar, Sinae Vogel, Denise Crowley, Roderick T Bronson, Tyler Jacks. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer *Cell*, 2005 Jun 17;121(6):823-35;
- Carla F Bender Kim, Erica L Jackson, Amber E Woolfenden, Sharon Lawrence, Imran Babar, Sinae Vogel, Denise Crowley, Roderick T Bronson, Tyler Jacks. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer *Cell*, 2005 Jun 17;121(6):823-35;
- Chanda D, Otoupalova E, Smith SR, Volckaert T, De Langhe SP, Thannickal VJ. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2019; 65:56-69. doi:10.1016/j.mam.2018.08.004
- Chung, A. S., and Ferrara, N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22011, 27, 563–584. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154002
- Choudhary SS, Choudhary SR. Sleep effects on breathing and respiratory diseases. *Lung India.* 2009 Oct; 26(4):117-22. doi: 10.4103/0970-2113.56345. PMID: 20531993; PMCID: PMC2876696.
- Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280:L823–L838.

16. Coulombe, P., Paliouras, G. N., Clayton, A., Hussainkhel, A., Fuller, M., Jovanovic, V., et al. (2019). Endothelial Sash1 is required for lung maturation through nitric oxide signaling. *Cell Rep.* 27, 1769–1780.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.03.
17. Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:721–73
18. Dakhllallah D., Batte K., Wang Y., Cantemir-Stone C. Z., Yan P., Nuovo G., Mikhail A., Hitchcock C. L., Wright V. P., Nana-Sinkam S. P., et al. The epigenetic regulation of miR-1792 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Breathe. Care Med.* 2013, 187, 397-405.
19. Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature.* 2014; 507:190–194. doi: 10.1038/nature12930.
20. Ding BS, Nolan DJ, Guo P, Babazadeh AO, Cao Z, Rosenwaks Z, Crystal RG, Simons M, Sato TN, Worgall S, Shido K, Rabbany SY, Rafii S. Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization. *Cell.* 2011 Oct 28; 147(3):539-53. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.003.
21. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008 Mar; 15(3): 504-14. doi: 10.1038/sj.cdd.4402283. Epub 2007 Nov 30. PMID: 18049477
22. Guerrini R, Oguni H. Borderline Dravet syndrome: a useful diagnostic category? *Epilepsia.* 2011 Apr;52 Suppl 2:10-2. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.02995.x. PMID: 21463273.
23. Guha, A., Vasconcelos, M., Cai, Y., Yoneda, M., Hinds, A., Qian, J., Li, G., Dickel, L., Johnson, J. E., Kimura, S., Guo, J., McMahon, J., McMahon, A. P., & Cardoso, W. V. (2012). Neuroepithelial body microenvironment is a niche for a distinct subset of Clara-like precursors in the developing airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12592–12597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204710109>.
24. Hines, E.A., and Sun, X. Tissue crosstalk in lung development. *J. Cell. Biochem.* 2014, 115, 1469–1477.
25. Hogan B. L. M., Barkauskas C. E., Chapman H. A., Epstein J. A., Jain R., Hsia C. C. W., Niklason L., Calle E., Le A., Randell S. H. et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* 2014, 15, 123-138.
26. Hong K.U, Reynolds S.D, Giangreco A, Hurley C.M, Stripp B.R. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001; 24: 671-68.
27. Hong K. U., Reynolds S. D., Giangreco A., Hurley C. M. and Stripp B. R. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001, 24, 671-681. 10.1165/ajrcmb.24.6.4498.
28. Hong K. U., Reynolds S. D., Watkins S., Fuchs E. and Stripp B. R. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am. J. Pathol.* 2004 164, 577-588.
29. Ho M.M., et al. Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells. *Cancer Res* May 15 2007 (67) (10) 4827-4833; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3557; doi:10.1016/j.stem.2014.07.012.
30. Ito, K., and Barnes, P. J. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009, 135, 173–180. doi: 10.1378/chest.08-1419.
31. Jackson SR, Lee J, Reddy R, Williams GN, Kikuchi A, Freiberg Y, Warburton D, Driscoll B: Partial pneumonectomy of telomerase null mice carrying shortened telomeres initiates cell growth arrest resulting in a limited compensatory growth response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;300:L898-L909.
32. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP: Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 1999;13:197-205.
33. Karaman, S., Leppanen, V. M., and Alitalo, K. (2018). Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development* 145:dev151019. doi: 10.1242/dev.151019.
34. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 2005; 121:823–835.
35. Koos BJ, Rajaei A. Fetal breathing movements and changes at birth. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 814:89–101. doi: 10.1007/978-1-4939-1031-1_8.
36. Kobayashi Y, Sakao Y, Deshpande GA, et al. The association between baseline clinical-radiological characteristics and growth of pulmonary nodules with ground-glass opacity. *Lung Cancer* 2014; 83:61-6.
37. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5764–9.
38. Kotton, D. N., and Morrissey, E. E. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat. Med.* 2014, 20, 822–832. doi: 10.1038/nm.3642.

39. Kuo CS, Krasnow MA. Formação de um órgão neurosensorial por deslizamento de células epiteliais. *Célula*. 2015; 163: 394–405.
40. Zhang Y, Goss AM, Cohen ED, Kadzik R, Lepore JJ, Muthukumaraswamy K, Yang J, DeMayo FJ, Whitsett JA, Parmacek MS, Morrissey EE. A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration. *Nature Genetics*. 2008; 40:862–87.
41. Li C, Xiao J, Horni K, Borok Z and Minoo P. Wnt5a participates in distal lung morphogenesis. *Dev. Biol.* 2020;248, 68-81. 10.1006/dbio.2002.0729
42. Li C, Hu L, Xiao J, Chen H, Li J. T., Bellusci S, Delanghe S. and Minoo P. Wnt5a regulates Shh and Fgf10 signaling during lung development. *Dev. Biol.* 2005; 287, 86-97. 10.1016/j.ydbio.2005.08.035
43. Li J., Wang Z., Chu Q., Jiang K., Li J. and Tang N. (2018). The strength of mechanical forces determines the differentiation of alveolar epithelial cells. *Dev. Cell* 44, 297-312.e5. 10.1016/j.devcel.2018.01.008]
44. Li R., Herriges J. C., Chen L., Mecham R. P. and Sun X. FGF receptors control alveolar elastogenesis. *Development*. 2017, 144, 4563-4572. 10.1242/dev.149443
45. Liu X., Driskell R. R. and Engelhardt J. F. Airway glandular development and stem cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004, 64, 33-56. 10.1016/S0070-2153(04)64003-8.
46. Liu X., Li W., Fu X. and Xu Y. The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives. *Front Immunol* .2017;8, 645 10.3389/fimmu.2017.0064.
47. McQualter JL, Yuen K, Williams B, Bertoncello I. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:1414–1419. doi: 10.1073/pnas.0909207107.
48. Mendelson C. R., Gao E., Young P. P., Michael L. F. and Alcorn J. L. Transcriptional regulation of the surfactant protein-A gene in fetal lung. *Chest* .1997; 111, 96S-104S. 10.1378/chest.111.6_Supplement.96S-
49. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129(6):705-733. doi:10.1007/s00418-008-0435-6
50. Morrissey E. E. and Hogan B. L. M. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev. Cel*.2010; 18, 8-23. 10.1016/j.devcel.2009.12.010
51. Morrissey EE, Cardoso WV, Lane RH, Rabinovitch M, Abman SH, Ai X, Albertine KH, Bland RD, Chapman HA, Checkley W, Epstein JA, Kintner CR, Kumar M, Minoo P, Mariani TJ, McDonald DM, Mukoyama YS, Prince LS, Reese J, Rossant J, Shi W, Sun X, Werb Z, Whitsett JA, Gail D, Blaisdell CJ, Lin QS .Molecular determinants of lung development. *Ann Am Thorac Soc*.2013; 10:S12–S1.
52. Navarro S, Driscoll B. Regeneration of the Aging Lung: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017; 63(3):270-280. doi: 10.1159/000451081. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27825158.
53. Nikolic, M.Z., Sun, D., and Rawlins, E.L. Human lung development: recent progress and new challenges. *Development*.2018; 145, 145.
54. Pan J, Copland I, Post M, Yeger H, Cutz E. Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jan; 290(1): L185-93. doi: 10.1152/ajplung.00167.
55. Parera, M. C., van Dooren, M., van Kempen, M., de Krijger, R., Grosveld, F., Tibboel, D., et al. Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 288, L141–L149. doi: 10.1152/ajplung.00148.2004.
56. Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms, differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* 1993; 4, 1317–1326. doi: 10.1091/mbc.4.12.1317.
57. Park, W. Y., Miranda, B., Lebeche, D., Hashimoto, G., and Cardoso, W. V. FGF-10 is a chemotactic factor for distal epithelial buds during lung development. *Dev. Biol.* 1998; 201, 125–134. doi: 10.1006/dbio.1998.8994.
58. Rawlins E. L., Ostrowski L. E., Randell S. H. and Hogan B. L. M. Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104, 410-417. 10.1073/pnas.0610770104.
59. Rawlins E. L., Clark C. P., Xue Y. and Hogan B. L. M. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development*.2009a; 136, 3741-3745. 10.1242/dev.037317.
60. Rawlins E. L., Okubo T., Xue Y., Brass D. M., Auten R. L., Hasegawa H., Wang F. and Hogan B. L. M. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell*.2009b; 4, 525-534. 10.1016/j.stem.2009.04.002.
61. Rehan V. K., Sugano S., Wang Y., Santos J., Romero S., Dasgupta C., Keane M. P., Stahlman M. T. and Torday J. S. Evidence for the presence of lipofibroblasts in human lung. *Exp. Lung Res*.2006; 32, 379-393. 10.1080/01902140600880257.
62. Reynolds S. D., Giangreco A., Power J. H. and Stripp B. R. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am. J.*

- Pathol.2000; 156, 269-278. 10.1016/S0002-9440(10)64727-X.
63. Reynolds S. D., Reynolds P. R., Pryhuber G. S., FINDER J. D. and Stripp B. R. Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*2002; 166, 1498-1509. 10.1164/rccm.200204-285OC.
 64. Rock J. R., Onaitis M. W., Rawlins E. L., Lu Y., Clark C. P., Xue Y., Randell S. H. and Hogan B. L. M. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*2009; 106, 12771-12775. 10.1073/pnas.090685010.
 65. Rogelj S, Klagsbrun M, Atzmon R, Kurokawa M, Haimovitz A, Fuks Z, Vlodavsky I Basic fibroblast growth-factor is an extracellular-matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial-cells and the differentiation of Pc12 cells. *J Cell Biol.*1989; 109:823-831.
 66. Scott, C. L., Walker, D. J., Cwiklinski, E., Tait, C., Tee, A. R., and Land, S. C. Control of HIF-1{alpha} and vascular signaling in fetal lung involves cross talk between mTORC1 and the FGF-10/FGFR2b/Spry2 airway branching periodicity clock. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*2010; 299, L455-L471. doi: 10.1152/ajplung.00348.2009.
 67. Sharma, G., and Goodwin, J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clin. Interv. Aging.*2006; 1, 253-260. doi: 10.2147/cia.2006.1.3.25.
 68. Schittny J. C. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* 2017; 367, 427-444. 10.1007/s00441-016-254.
 69. Schittny JC, Burri PH (2004) Morphogenesis of the mammalian lung: aspects of structure and extracellular matrix components. In: Massaro D, Massaro GD, Chambon P (eds) Lung development and regeneration. Marcel Dekker, New York, pp 275-31.
 70. Schittny JC, Burri PH (2008) Development and growth of the lung. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM (eds) Fishman's pulmonary diseases and disorders, vol 1. McGraw-Hill, New-York, pp 91-114.
 71. Rock JR, et al. Múltiplas populações estromais contribuem para a fibrose pulmonar sem evidências de transição epitelial para mesenquimal. *Proc Natl Acad Sci US A.* 2011; 108: E1475-1483. doi: 10.1073 / pnas.1117988108.
 72. Semenova EA, Nagel R, Berns A. Origins, paisagem genética e terapias emergentes de câncer de pulmão de pequenas células. *Genes Dev.* 2015; 29: 1447-1462.
 73. Teixeira, V. H., Nadarajan, P., Graham, T. A., Pipinikas, C. P., Brown, J. M., Falzon, M., Nye, E., Poulosm, R., Lawrence, D., Wright, N. A. et al Stochastic homeostasis in human airway epithelium is achieved by neutral competition of basal cell progenitors.2013; *Elife* 2, e00966. doi:10.7554/eLife.00966.
 74. Tizzano, M., Cristoforetti, M., Sbarbati, A. and Finger, T. E. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm. Med.*2011; 11, 3. doi:10.1186/1471-2466-11-3.
 75. Watson, J. K., Rulands, S., Wilkinson, A. C., Wuidart, A., Ousset, M., Van Keymeulen, A., Göttgens, B., Blanpain, C., Simons, B. D. and Rawlins, E. L. Clonal dynamics reveal two distinct populations of basal cells in slow-turnover airway epithelium. *Cell Rep.* 2015; 12, 90-101. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.01.
 76. Wang Y., Huang C., Reddy Chintagari N., Bhaskaran M., Weng T., Guo Y., Xiao X., Liu L. (2013b). miR-375 regulates rat alveolar epithelial cell trans-differentiation by inhibiting Wnt/β-catenin pathway. *Nucleic Acids Res.* 41, 3833-3844.
 77. Wang Y., Tian Y., Morley M. P., Lu M. M., Demayo F. J., Olson E. N., Morrisey E. E. (2013c). Development and regeneration of Sox2+ endoderm progenitors are regulated by a Hdac1/2-Bmp4/Rb1 regulatory pathway. *Dev. Cell* 24, 345-358.
 78. Williams A. E., Moschos S. A., Perry M. M., Barnes P. J., Lindsay M. A. Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. *Dev. Dyn.* 2007; 236, 572-580.
 79. Winkelmann A, Noack T The Clara cell: a "Third Reich eponym"? *Eur Respir J.*2010; 36:722-727.
 80. Woods JC, Schittny JC (2016) Lung structure at preterm and term birth. In: Jobe AH, Whitsett JA, Abman SH (eds) Fetal lung development - clinical correlates & future technologies. Cambridge University Press, New York, pp 126-140.
 81. Weibel ER: On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:504-513.
 82. White, A. C., Lavine, K. J., and Ornitz, D. M. FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network. *Development.* 2007; 134, 3743-3752. doi: 10.1242/dev.004879.
 83. Yin Z., Gonzales L., Kolla V., Rath N., Zhang Y., Lu M.M., Kimura S., Ballard P. L., Beers M. F., Epstein J. A., et al. The hop works downstream of Nkx2.1 and GATA6 to mediate the HDAC-dependent negative regulation of lung gene expression. *Am. J. Physiol. Pulmonary cell Mol. Physiol.*2006; 291, L191-L199.
 84. Zacharias W. J., Frank D. B., Zepp J. A., Morley M. P., Alkhaleel F. A., Kong J., Zhou S., Cantu E. and Morrisey E. E. Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor. *Nature.*2018; 555, 251-255. 0.1038/nature2578.

CHARACTERISTICS SHARED BETWEEN LUNG DEVELOPMENT AND TUMORIGENESIS: MINI REVIEW ARTICLE

85. Zhu L., Li H., Tang J., Zhu J., Zhang Y. Hyperoxia arrests alveolar development through suppression of histone deacetylases in neonatal rats. *Pediatr. Pulmonol.* 2012; 47, 264–274.



4.3 ARTIGO 3



Meaning of The Fundamental Characteristics of Cancer in Tumorigenesis: Mini Review

Josenel Maria Barcelos Marçal^{1*}, Giuseppe Dick Bonato², Júlia Iaroseski², Lizandra Quandt², Andressa Gabriela dos Santos Lersch², JoãoLins Maués², Rafael Fabiano Machado Rosa³ and Paulo Ricardo Gazzola Zen³

¹Department of pathology and forensic medicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil

²Graduation in Medicine, UFCSPA, Brazil

³Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, UFCSPA and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Brazil

*Corresponding author: Mrs. Josenel Maria Barcelos Marçal–UFCSPA/ISCMPA. Rua Sarmento Leite, 245/403-Bairro Centro. Porto Alegre, RS-Brasil.

To Cite This Article: Josenel Maria Barcelos Marçal, Giuseppe Dick Bonato, Júlia Iaroseski, Meaning of The Fundamental Characteristics of Cancer in Tumorigenesis: Mini Review. *Am J Biomed Sci & Res.* 2021 - 11(6). *AJBSR.MS.ID.001697*. DOI: 10.34297/AJBSR.2021.11.001697.

Received: February 08, 2021; Published: February 12, 2021

Abstract

The theoretical framework on the fundamental characteristics of cancer and the tumor microenvironment has been the subject of many studies in recent years. Based on principles, several drugs were developed for the treatment of cancer, such as drugs that act on neoplastic cell metabolism, angiogenesis, apoptosis, genomic instability, among others center. In this review, we seek to provide, in a concise and objective way, data for understanding the process of cancer development and the resistance acquired by neoplastic cells.

Keywords: Cancer, Cancer biology, Brands, Malignancy, Therapies, Carcinogenesis

Fundamental Characteristics of Cancer

Cancer is a heterogeneous and complex disease at all levels (genetic, pathological, histological, prognostic and therapeutic), highly dynamic, with multiple molecular constituents in evolution. The emergence of a neoplasm occurs through the formation of transformed clones that generate diversified and selected subpopulations that acquire an increasing aggressiveness. The progression process occurs due to morphological, metabolic factors and changes in gene expression, caused by chromosomal abnormalities, point mutations and an aberrant DNA methylation status [1]. The accumulation of multiple changes leads the transformed cells to acquire typical characteristics and properties that provide advantages over their normal counterpart.

Hanahan and Weinberg [2] described six properties acquired from cancer during tumorigenesis: maintenance of cell proliferation, inhibition of tumor suppressor genes, cell immortality, evasion

of apoptosis, sustained angiogenesis, activation of invasion and metastasis [2].

In 2011, the same authors described other characteristics of neoplasms, including the development and progression of cancer in inflammatory processes; genomic instability; alteration of energy metabolism (Warburg effect) and immune avoidance [3]. Knowledge about cancer genetics has progressed remarkably, with the development of sequencing techniques for genetic mutations. The cancer mutation scenario has been integrated with transcriptome, epigenome and metabolome maps [4]. From this knowledge therapeutic drugs have been developed for the treatment of cancer (Figure 1).

In normal cells, cell proliferation is an event controlled by anti-proliferative signals or by induction of programmed cell death through an exogenous paracrine signal.





Figure 1: Therapeutic indications that act on each registered trademark of cancer [2].

In tumor cells, proliferation is mainly autonomous and decoupled from external mitogenic signals. Tumor cells synthesize growth factors through autocrine stimulation, causing the overexpression of a receptor that is more responsive to the normal concentration of ligand, or expressing constitutively activated surface receptors; or through the action of integrins (receptors that mediate cell matrix and cell-cell contact). Thus, they are able to increase cell survival, growth and maintenance of an aberrant regulation of the SOS-Ras-Raf-MAPK cascade that continues to transmit intracellular mitogenic signaling, even in the absence of normal upstream stimulatory signals [5].

During carcinogenesis, if the DNA is damaged, as well as if the nucleotides and nutrients are depleted, changes in the tumor suppressor RB (retinoblastoma) genes, which control entry into the cell cycle, may occur; and p53, which maintain the cell in the G1 / S phase of the cell cycle. Cancer cells use other strategies to escape programmed cell death, such as mutations that impair p53 function, with increased expression of apoptosis inhibitors (Bcl2, Bcl-xL), negative regulation of pro-apoptotic factors (Bax, Bim and Puma) and the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt6 survival pathway [5,6].

Tumor cells show unlimited replicative potential through the maintenance of telomerase or through a mechanism mediated by recombination, called ALT (alternative lengthening of telomeres) [7]. Angiogenesis occurs during the early stages of neoplastic progression. Endothelial cells are stimulated by endothelial growth factor-A (VEGF-A) and / or fibroblast growth factor (FGF) and negative regulation occurs through thrombospondin 1 (TSP1) or β -interferon8.

The new vessels contribute to the occurrence of metastases by the loss of expression or mutations of the E-cadherin gene, or by

overloading genes that encode proteins involved in cell migration, such as N-cadherin8.

It is worth mentioning that some elements within the tumor microenvironment are important for the development of a neoplasm. These elements include parenchyma cells, such as fibroblasts, endothelial cells, pericytes, in addition to immune and inflammatory factors recruited from T and B cells, macrophages, neutrophils, mast cells and other cells derived from bone marrow. These groups of cells are responsible for the synthesis of non-cellular components of the tumor-associated stroma, such as extracellular matrix proteins (ECM), proteases, cytokines and growth factors [9].

The tumor stroma fibroblasts secrete growth factors (HGF, EGF and b-FGF) and cytokines (SDF-1 and IL-6) leading to the infiltration of immune cells, which promote angiogenesis and metastatic spread; by ECM remodeling and, therefore, influencing the proliferation, survival and migration of cancer cells9. The Warburg effect is another property of the neoplastic cell that increases the energy potential with the production and secretion of lactate from glycogen, without using oxygen10. Infiltrating cells of the immune and inflammatory system include populations with a different and therefore functionally heterogeneous phenotype, mainly macrophages, dendritic cells (DCs), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and neutrophils. These cells can act in opposite ways, both antagonizing and promoting tumor development. Therefore, the frequency of inflammatory infiltration, as well as its stage of maturation and spatial location within the tumor microenvironment have decisive effects on the clinic and on the immune responses [11].

Other elements capable of affecting the behavior of malignant cells are of extracellular origin, such as pH, oxygen concentration

(O2), tissue pressure and fluid flow [10]. The identification of the participation of these cells in tumor progression is paving the way for research and development of new therapeutic possibilities, targeting non-cancerous cells in the tumor microenvironment, which often do not have unregulated proliferation rates or increased genetic instability.

We cannot fail to mention that recent studies indicate that a carcinogenesis cannot be explained only by genetic changes, but also by epigenetic changes, such as DNA methylation, modifications of histones and microRNAs. These molecular changes lead to permanent changes in the patterns of gene expression that regulate the neoplastic phenotype [12].

Activated macrophages of type 1 (M1) secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines, which lead the development and differentiation of auxiliary T lymphocytes 1 (Th1), Th17 and natural killer cells (NK). They have high microbicidal activity, immunostimulatory function and are present in incipient tumors, where they are capable of killing tumor cells¹³. Type 2 (M2) macrophages, on the other hand, express a set of different cytokines and chemokines, such as CCL17, CCL22 and CCL24, promoting the recruitment and development of regulatory T cells. This type of macrophage stimulates tissue repair and remodeling, the process of neoangiogenesis and tumor invasion and metastasis. Tumor cells can regulate the function of tumor-associated macrophages (TAMs), "educating" them for an M2 phenotype [13-16].

Dendritic cells, derived from bone marrow, are antigen presenting cells (APCs) for T lymphocytes in lymphoid organs and tissues, and comprise two subpopulations: myeloid dendritic cells, which inhibit neoangiogenesis by producing IL-12 interleukin; and plasmacytoid dendritic cells, which induce angiogenesis through the production of TNF- α and IL-8, as well as tumor progression and metastases through the secretion of proteases, such as MMP-1, -2, -3, -9 and -19 and their inhibitors, called tissue inhibitor metalloproteinases (TIMP) -1 and -2. These cells act as tumor-promoting cells, inhibiting innate and adaptive immunity and preventing the action of immunotherapy [3,16].

Neutrophils are capable of promoting the process of angiogenesis, directly secreting VEGF, or inducing its release through the production of MMPs, but, like other inflammatory cells, they also have antitumor activity. In fact, they can kill tumor cells by releasing proteases, membrane-perforating molecules, reactive oxygen specimens (ROS) and cytokines, in particular TNF- α and IL-

1 β . According to the signals within the tumor microenvironment, it can inhibit angiogenesis by elastase production [3].

Conclusion

Tumorigenesis is a dynamic, multi-phase process, characterized by the acquisition of genetic and epigenetic alterations in which tumor cells acquire characteristics that maintain their survival and adaptation to the stress of the tumor microenvironment. Thus, the fundamental marks of cancer represent the basis for cancer research and the development of anti-neoplastic therapies.

References

1. Nowell PC (2000) Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 12(4): 261-266.
2. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
4. Moses C, Garcia-Bloj B, Harvey AR, Blancafort P (2018) Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *Eur J Cancer* 93:10-18.
5. Youssef A, Aboalola D, Han VK (2017) The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int* 2017: 9453108.
6. Evan G, Littlewood T (1998) A matter of life and cell death. *Science* 281(5381): 1317-1322.
7. Bryan TM, Cech TR (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current opinion in cell biology* 11(3): 318-324.
8. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265(5178): 1582-1584.
9. Lukashev ME, Werb Z (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology* 8(11): 437-441.
10. Pavlova NN, Thompson CB (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* 23(1): 27-47.
11. De Palma M, Hanahan D (2012) The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Mol Oncol* 6(2): 111-127.
12. Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ (2014) Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep* 31(2): 523-532.
13. Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA (2010) Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328(5979): 749-752.
14. Hirata E, Sahai E (2017) Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(7): a026781.
15. Onuchic AC, Chammas R (2010) Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med (São Paulo)* 89(1): 21-31.
16. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-867.

5 CONCLUSÃO

O carcinoma neuroendócrino do pulmão de pequenas células (CPPC) é uma doença maligna rara e extremamente agressiva, responsável por 10 a 15% dos casos de câncer de pulmão, com uma taxa de mortalidade de 10% sobrevida média relativa em 5 anos de 15,7%.

O tratamento do CPCP ainda é paliativo. Ao contrário do adenocarcinoma, em que alvos moleculares, como mutações do *EGFR* transformaram paradigmas terapêuticos, não existem avanços pontuais para o carcinoma de pequenas células.

Entretanto, avanços recentes na genética e na biologia molecular permitiram a identificação de genes e proteínas produzidos ou superexpressos pelos tumores.

Foram identificados no CPCP mutações no P16/ciclina D1/via Rb, expressão de proteína c-Kit, MEN1, PARP, PD1-PDL-1, DLL3, mas todos em fase de estudo randomizado.

Tal como acontece com outros tumores sólidos, a busca de sucesso para prolongar a sobrevida no CPCP envolve estudos moleculares emergentes, que promovam o bloqueio de cascatas de sinalização inerentes à tumorigênese (EGFR, IGFR, mTOR, MET, PADL-1 sinalização Hedgehog, sinalização Notch).

Temos fortes evidências na literatura de que as vias de sinalização celular possuem uma interdependência, e, por este motivo, foi realizado no estudo um teste de correlação entre DLL3, EGFR e PDL-1, que demonstrou impacto clínico.

A avaliação da expressão de Notch pode ser determinada por interações compostas com EGFR, por meio da ativação da cascata PI3K / AKT / mTOR³⁴⁸.

As vias Notch3 e EGFR / MAPK cooperam na modulação da apoptose. Notch3 regula Bim, uma proteína BH-3 da via de sinalização MAPK. A perda da expressão de Bim previne a apoptose tumoral induzida pela inibição de Notch3. Portanto, as duas formas são interdependentes ou colaborativas³⁴⁹. A expressão de Notch é regulada positivamente por EGFR - TKIs, promovendo o desenvolvimento de células cancerosas de pulmão resistentes³⁵⁰. O incentivo ao estudo dessas vias é de especial importância para o desenvolvimento de terapias-alvo.

O primeiro ensaio clínico com o conjugado de anticorpo monoclonal direcionado a DLL3 clivável por catepsina e ogiva de pirrolobenzepipídeo(RovaT) teve resultados iniciais satisfatórios. No estudo TRINITY, na fase II, foi suspenso devido à alta toxicidade^{334,344,346}. Rova-T aumenta a expressão de PDL1 em células tumorais e aumenta a infiltração de células imunes no tumor, sugerindo que Rova-T pode alterar os tumores para um estado mais responsivo ao checkpoint. Rova-T ativa células dendríticas e aumenta ccl5, Il-12 e ICAM mais do que apenas anti-PD1³⁵¹.

Recentemente, foi demonstrada a expressão do DLL3 em outros tipos de órgãos e tumores, como bexiga, próstata, cérebro e novas pesquisas estão sendo realizadas, direcionadas ao DLL3.

Um exemplo é a utilização de DLL3 / CD3 ITE - novo anticorpo biespecífico para células T semelhante a IgG, que induz a infiltração de células CD4 e CD8 em tumores frios (não inflamados), tornando-os quentes (inflamados). Já com bons resultados em tumores hematológicos³⁴⁶.

A expressão de DLL3 no nosso estudo não foi significativamente alta em comparação com outros estudos. Nosso coorte foi retrospectivo, com amostras

antigas, sem detalhes sobre tipo e tempo de fixação; tipo de parafina; tamanho da amostra; além do conhecimento de que há um microambiente tumoral heterogêneo. Radonic *et al.* (2020) publicaram um estudo sobre variáveis pré-clínicas para expressão de DLL3 em imunohistoquímica, incluindo tempo de isquemia quente e fria, tipo de fixador e tempo de fixação, descalcificação; recuperação antigênica. Identificaram que amostras recentes fixadas por 24h têm maior expressão de DLL3; que o tipo de descalcificador pode reduzir a expressão de DLL3, e que lâminas com material para coloração posterior têm menor expressão de DLL3³⁵³. Dessa forma, o incentivo para pesquisar esses fatores relacionados à amostragem, processamento e coloração na avaliação do DLL3.

6 PERSPECTIVAS

No Brasil não há, até o momento, publicações sobre a expressão do DLL3 no CPCP. A comunidade científica mundial possui dados de outros países, mas não da América do Sul. Avaliar o comportamento sazonal e mesmo questionar os resultados pode fornecer uma visão global da epidemia do câncer de pulmão²⁴. Em nosso trabalho, demonstramos uma tendência à correlação inversa entre DLL3 e cromogranina , levantando a possibilidade de explorar o tema em estudos futuros, assim como desenvolver estudos correlacionados com a amostragem, processamento e coloração na avaliação do DLL3.

De acordo com Ajay cols. (2016) “não é apenas o tipo de pesquisa realizada por cada país que é relevante, mas o impacto que esta provavelmente terá na prática ou no incentivo a novos trabalhos”³⁵².

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Josenel corrigido.docx - Google Docs

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo Citogenético, Molecular e Imunohistoquímico de Carcinomas de Pequenas Células do Pulmão e sua Aplicação na Identificação de Marcadores com Influência sobre a Resposta Terapêutica e Prognóstica.

1º- O câncer de pulmão é o tumor maligno, globalmente, mais frequente e a principal causa de morte nos homens, sendo o principal fator de risco o tabagismo. O tipo histológico de maior agressividade e menor taxa de sobrevida é o carcinoma de pequenas células, considerado como doença incurável. Os objetivos atuais da terapia visam aliviar os sintomas e prolongar a sobrevida. Desta forma, nos últimos anos, tem havido interesse crescente na descoberta de agentes moleculares, que levem à produção de terapias que aumentem a sensibilidade ao tumor. Como mutações de EGFR representam testes mais precisos para predição de terapia anti-EGFR, propomos, iniciar a pesquisa, investigando anomalias nesse gene, posteriormente, incluindo outros genes e proteínas.

2º- Sendo assim, você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada "Estudo Citogenético, Molecular e Imunohistoquímico de Carcinomas de Pequenas células de Pulmão e sua Aplicação na Identificação de marcadores com Influência sobre a Resposta Terapêutica e o Prognóstico".

3º- O objetivo do estudo é investigar aspectos clínicos, moleculares e imunohistoquímicos em pacientes portadores de neoplasia de pulmão de pequenas células que possam auxiliar no diagnóstico, tratamento e avaliação da resposta terapêutica.

4º- O procedimento será análise de material de biópsia prévia, armazenado no laboratório de patologia e citologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Para avaliar dados como idade, sexo, resposta terapêutica, exames de imagem, sobrevida, serão utilizados os prontuários do paciente.

5º- Os benefícios esperados com os resultados desta pesquisa são direcionados aos pacientes incluídos na pesquisa, aos outros pacientes com o mesmo tipo de lesão; e para o desenvolvimento da ciência, o que poderá conferir mudanças no tratamento deste tipo de tumor no futuro. Não há risco, uma vez que será utilizado material arquivado, não sendo necessário nenhum tipo de intervenção. Todos os dados serão confidenciais, identidade e dados pessoais serão mantidos em sigilo. Não haverá danos físicos ou psicológicos relacionados com a pesquisa.

6º- É garantido que todos os gastos da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo, não havendo custos ao paciente ou familiar responsável.

7º- É dada a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao paciente. Ressaltamos que a concordância em participar não implica em qualquer modificação no tratamento que já esteja sendo realizado. Da mesma forma, a não concordância, também não irá alterar o tratamento.

8º- É assumido o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade em continuar no estudo.

9º- É dada a garantia de não ser identificado e ser mantido o caráter confidencial de informação em relação à privacidade de qualquer dado que possa produzir a identificação do paciente durante a pesquisa.

10º- A equipe se compromete em utilizar apenas o material proveniente da biópsia armazenada no laboratório de patologia e citologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ficando o restante do material adequadamente, preservado, na instituição depositária e à disposição do paciente.

10º- Caso existirem novas perguntas sobre este estudo, sobre os direitos como participantes do mesmo ou prejuízo de qualquer natureza pela participação, poderá ser contatado:

- Investigador principal- Paulo Ricardo Gazzola Zen- telefone 33038774. Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, 4º andar

- Co-investigador: Josenel Maria Barcelos Marçal- tel 98058286 ou 33038723. Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, subsolo

- Comitê de ética da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - sob coordenação Dr. Carlos Olea ou Dra. Elizete Keitel, tel: 3214.8571, Endereço: Av. Independência, 155-6º andar- Hospital Dom Vicente Scherer- POA-RS.

Estou ciente e de acordo com a realização de estudos complementares por equipe multidisciplinar e autorizo a utilização do material proveniente do Laboratório de patologia e citologia da Santa Casa para aplicação de técnicas necessárias ao estudo. Estou ciente que não serão violados os segredos profissionais obtidos. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios ou eventuais riscos.

A minha assinatura dará autorização ao coordenador do estudo a utilizar os dados obtidos, quando necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a privacidade.

Porto Alegre, _____, _____, _____

Nome do paciente ou representante legal

Assinatura: _____

Versão: 01/10/2016

Nome do orientador responsável

Assinatura: _____

APÊNDICE B – SUPLEMENTO

1

Supplementary appendix

Suplemento: Marçal J M B; Bonato, GD; I, Júlia: Baptistela, CG; , JR; Machado, RFR; Zen, PRG Evaluation of DLL3 expression in small cell lung carcinoma in southern Brazil and its correlation with EGFR, PDL-1, CICLIND 1, neuroendocrine markers and clinical findings

Sumário

Individual Study Information	2
1 INTRODUCTION	2
1.1 DELTA 3 PROTEIN (DLL3)	2
2 OBJECTIVES	3
2.1 GENERAL OBJECTIVE	3
2.2 SPECIFIC OBJECTIVES	3
3 SUPPLEMENTAL MATERIAL	3
4 IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUE	5
5 ETHICAL ASPECTS	6
6 REFERENCES	7
Attachment 1	10
Attachment 2	11
Attachment 3	12
Attachment 4	13
Unpublished Figures	14
Excel Table	16

Individual Study Information

This section describes the study and provides details on measurements, statistical evaluations and immunohistochemical results of local Research Ethics Committees and Institutional Review Boards.

1 INTRODUCTION

Small cell lung cancer is an aggressive cancer whose treatment is palliative, with a high mortality rate.

Recent advances in genetics and molecular biology have enabled the identification of genes and yields or overexpressed by neoplasms. Such products are tools for diagnosis, evaluation of future results and, more recently, have been used for the development of new targeted treatment modalities breaking the biological cycle of tumor progression. The biomarker DLL3 acts on the regulation of tumorigenic capacity, related to the spread and recurrence of small cell carcinoma. There are studies that have shown positive value for response to treatment. Others, no incidence between expression and clinical manifestations or mortality rate.

In Brazil, there are few studies on this biomarker, which makes it important to define its expression and correlation with clinical data, habits, diseases and mortality rate

1.1 DELTA 3 PROTEIN (DLL3)

The Delta-Like 3 or DLL3 protein is a 65-67 KDa member of the delta protein family. It is expressed in embryonic cells, such as somitic mesoderm, cochlear hair cells and neural tube hair cells, which are undergoing differentiation. (BULMAN et al, 2000). The DLL3 gene is located on chromosome 19q13.2, and is also known as delta 3, delta like 3, drosophila delta homologous 3, pudgy, SCDO1.

DLL3 is found mainly in the Golgi apparatus and endosome, where it promotes the degradation of the NOTCH family. Human DLL3 is a 592 amino acid type I transmembrane protein. It has a 466 amino acid extracellular domain that contains a NOTCH DSL binding domain (AA 176-215), followed by 6 EGF-type repeats (AA 216-465). There is an isoform variant that contains a substitution of alanine for AA 588-618. (SAUNDERS et al, 2016)

The DLL3 protein inhibits primary neurogenesis, being involved in the development of autosomal recessive diseases, such as spondylodysostosis 1 and spinal-costal dysostosis. It plays an important role in the formation of somite limits during segmentation of the paraxial mesoderm. (BULMAN et al, 2000)

2 OBJECTIVES

2.1 GENERAL OBJECTIVE

Evaluate the expression levels of the immunohistochemical marker DLL3 in neoplastic tissue of patients with neuroendocrine small cell lung cancer and correlate with the expression of the EGFR, PDL-1, Cyclin D1, Ki67 markers and with clinical-demographic data that can assist in the diagnosis and design of therapeutic protocols and prognostic evaluation.

2.2 SPECIFIC OBJECTIVES

- Assess the expression of marker DLL3 in neoplastic cells of patients diagnosed with small cell lung cancer
- Correlate the expression of the DLL3 marker in patients with small cell lung cancer with the expression of the PDL-1, EGFR, CyclinD1 and Ki67 markers
- Correlate the expression of marker DLL3 in neoplastic tissue of patients with small cell lung cancer with clinical-demographic data
- Assess the survival curve according to the expression of the marker DLL3 in tumors of patients with small cell lung cancer.

3 SUPPLEMENTAL MATERIAL

Term	Definition material suplementar
Conceptualization	Evaluation of DLL3 expression in small cell lung carcinoma in southern Brazil and its correlation with EGFR, PDL-1, CICLIN D 1, neuroendocrine markers and clinical findings
Methodology	Paraffin block sections in 2 microns (LEICA RT 2151). Glass blades with silane (3-aminopropyl), 30 min parafinization, For each panel: positive control and manufacturer dilution data, Anti-EGFR, anti-cyclin D1 and Ki67, Anti-Dll3 and anti-PDL-1-automated immunocoloration, Counter-coloring with Harris Hematoxylin, Ammonia, Oxalols, Xilol, Assembly, Olympus CX41 Optical Microscope, under magnifications of, 10X, 20X and 40X100X, PDL-1-marking membrane and cytoplasm, Anti-cyclin D1-nuclear marking, Anti-EGFR-cytoplasmic and membrane marking, Ki 67-nuclear marking
Software	Data processing and analysis: SPSS programs for Windows (version 22.0), Microsoft®
Valiation	Retrospective Cross-Sectional Study n = 40. Place of realization: Federal University of Sciences of The Health of Porto Alegre and Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. From January 2006 to April 2016. Data collection sheet diagnosis,

	smoking, alcohol consumption, symptomatology, previous oncologic history and treatments with chemotherapy and radiotherapy, ate of biopsy diagnosis. Date of death or date of the last follow-up for survival assessment obtained in prontuarios Positive controls for stains on each blade. Evaluation of data by two professional statistics
Formal analysis	Evaluation of data by two professional statistics. Comparison of variables, analysis of histopathological and immunohistochemical data. Absolute and relative and average frequency. Test Chi Square and Fisher's Exact Test. Kaplan Meier method to assess survival and progression of the disease.
Investigation	Conducting a bibliographic review, case listing, research project and their referral to the ethics committee of the Brotherhood Santa Casa de Misericordia. Selection of patients, obtaining the reports, review of prontuarios, organization of blocks. Purchase of antibodies. testing of stains. technical procedure of immunohistochemistry. Reading and annotations of results, statistical analysis, writing of the article, pictures of the blades.
Resources	PDL-1, clone Cal-10, dilution of 1:100 (Rabbit Monoclonal Antibody)-Manufacturer: BIOCARE MEDICAL, USA; -Anti-Cyclin D1, clone SP4-R- Dilution ready for use, Rabbit Monoclonal Antibody Manufacturer: VENTANA; -EGFR-A750del (SP111), Rabbit Monoclonal Antybody - diluição pronta para uso Fabricante: VENTANA; DLL3 Antibody orb 100059, Rabbit polyclonal- manufacturer: BIOCARE (Byorbyt, San Francisco, USA).
Writing – Original Draft	Project presented in the academic week of the graduate program of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre
Writing – Review & Editing	Preparation, creation and/or presentation of the published work by those from the original research group, specifically critical review, commentary or revision – including pre-or postpublication stages.
Visualization	Preparation, creation and/or presentation of the published work, specifically visualization/ data presentation in August, 2019.
Supervision Administration	Supervision-professor Paulo Ricardo Gazzola Zen; execution and distribution of tasks-MD, PhD student of the graduate program Josenel Maria Barcelos Marçal.

Funding acquisition	Acquisition of materials with own proceeds
----------------------------	--

4 IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUE

2-micron sections in a rotating microtome (LEICA RT 2151) of tissues fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin, were mounted on glass slides coated with silane (3-aminopropylsilane). histological (De LEO) at 60 degrees Celsius for 30 minutes. For each panel, a positive control was chosen and previously tested, using the manufacturers' dilution data.

For anti-EGFR, anti-cyclin D1 and Ki 67 antibodies, the VENTANA BenchMark Ultra automated immunostaining platform was used, accompanied by the VENTANA ultraview DAB IHC detection kit. For anti-DLL 3 and anti-PDL-1 antibodies, processing was performed by an automated DAKO AUTOSTEINER LINK 48 system, containing the staining reagents composed of a buffer (wash buffer 20%), vision flex peroxidase-blocking, flex + mouse, flex + rabbit, flexHRP. After automatic processing, the slides were washed in distilled water and counterstained with Harris' hematoxylin (1 minute), ammonia (2 minutes), dehydrated in a series of 90% ethyl alcohol, clarified in xylol and assembled with Canadian balsam.

Characteristics of the Primary Antibodies Tested:

PDL-1, Cal-10 clone, (Rabbit Monoclonal Antibody).	Manufacturer: BIOCARE MEDICAL, USA Diluição 1:100	Control: lung adenocarcinoma	Cell localization: membrane / cytoplasm	Isotope IgG
Anti-Cyclin D1, SP4-R- Rabbit Monoclonal Antibody,	Manufacturer: VENTANA dilution ready for use	Control: Mantle cell lymphoma	Location: core	-
Anti-EGFR-A750del (SP111), Rabbit Monoclonal Antibody-	Manufacturer: VENTANA dilution ready for use	Control: lung adenocarcinoma	Location: membrane and cytoplasm	-
Ki67- clone 30-9, Rabbit Monoclonal Antibody	Manufacturer: VENTANA dilution ready for use	Control- amygdala	location: core	-
Anti-DLL3 Antibody orb 100059, Rabbit polyclonal	BIOCARE (Byorbyt, San Francisco, USA).	Control: normal cerebral cortex	Location: membrane / cytoplasm	Isotope IgG

	Dilution: 1: 100			
--	---------------------	--	--	--

5 ETHICAL ASPECTS

The waiver of the use of IC was requested, based on the following data:


a) As it is a retrospective descriptive study, which used only information from medical records, information systems available at the institution;

b) Because all data were handled and sported anonymously, without the nominal identification of the research participants;

c) Because the results of the study obtain the aggregated training, not allowing the individual identification of the participants;

d) Because it is a non-interventionist study (without medicine) and without changes / influences in the research participant's routine / treatment, and consequently without adding risks or losses to their well-being.

e) Mainly because the deceased participants and / or no contact possibilities (without regular monitoring at the institution, without valid residential means and / or without contact after at least three frustrations), based on Res. CNS 466/12 item IV.8 which contemplates the waiver of the IC in situations of impossibility to obtain it.

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Attached is Ethics and Research Committee of the Santa Casa de Misericordia in Porto Alegre-RS (ISCAMP), opinion substantiated number 1.856.228
Address: Rua profº Annes Dias,295,hospital Dom vicente Scherer
Neighborhood: center,6º floor CEP: 90.020-090
UF:RS County:Porto Alegre
Telephone:55(51)3214-8571 FAX:55(51)32148571 Email:cep@santacasa.tche.br

6 REFERENCES

1. Azzopardi, JGJ. Oat cell carcinoma of the bronchus. *Path. Bac.* Vol 78:513-519, Londres, 1959
2. Travis, WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol.* Jan 2012; 25(suppl 1):S518-530
3. Sociedade Americana de Câncer: Cancer Facts and Figures 2018. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2018. Disponível online. Último acesso em 01/10/2020
4. H FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, New York, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, Apr. 2019; *oboken*, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.
5. Estimativa 2020. Rio de Janeiro, 4 de fevereiro de 2020. Documento disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil> último acesso em 01/10/2020.
6. Bryan A. Chan^{1,2} and Jermaine I. G. Coward. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013 Oct; 5(Suppl 5): S565-S578.
7. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in immunology* 2006;90:51-81.
8. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* 2012; 12:252-64.
9. Koval R, Ilagan MX. The canonical Notch Signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009 Apr 17; 137(2):216-33.
10. Kentaro Takana, Isse K et al. Prevalence of delta-like protein 3 expression in patients with small-cell lung cancer. *LUNG CANCER*, 2018(115):116-120.
11. Rudin CM¹, Pietanza MC², Bauer TM³, Ready N⁴, Morgensztern D⁵, Glisson BS⁶, Byers LA⁶, Johnson ML³, Burris HA^{3rd}, Robert F⁷, Han TH⁸, Bheddah S⁸, Theiss N⁹, Watson S⁹, Mathur D⁹, Vennapusa B⁹, Zayed H⁸, Lally S⁸, Strickland DK¹⁰, Govindan R⁵, Dylla SJ⁸, Peng SL⁸, Spigel DR³; Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase I study. *Lancet Oncol.* 2017 Jan; 18(1):42-51
12. Schultheis AM, Scheel, Ozreti L et al. Eur J cancer, 2015, fev; 51(3):421-6. expression PDL-1 in small cell neuroendocrine carcinoma. *European journal of cancer*, vol 51(3):421-426. feb, 2015/
13. Alexander Y. Deneka, Yanis Boumber, Tim Beck, and Erica A. Golemis. Tumor-Targeted Drug Conjugates as an Emerging Novel Therapeutic Approach in Small Cell Lung Cancer (SCLC) *Cancers (Basel)*. 2019 Sep; 11(9): 1297

14. Shiao TH1, Chang YL, Yu CJ, Chang YC, Hsu YC, Chang SH, Shih JY, Yang PC. Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer: a brief report. *Thoracic Oncol* 2011 Jan;6(1):195-8
15. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol*. 2008 May;21 Suppl 2:S16-22.
16. Yun CH1, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meverson M, Eck MJ. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):217-27.
17. Karachaliou N. et al. Cellular and molecular Biology of Small Cell Lung cancer:na Overview. *Transl Lung Cancer Res*. Feb.2016;5(1):2-15
18. Scheel AH1, Ansén S2, Schultheis AM1, Scheffler M2, Fischer RN2, Michels S2, Hellmich M3, George J4, Zander T2, Brockmann M5, Stoelben E6, Groen H7, Timens W8, Perner S9, von Bergwelt-Baildon M2, Büttner R1, Wolf J2 . PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncoimmunology*. 2016 Mar 16;5(5):e1131379.
19. D'Incecco A1, Andreozzi M2, Ludovini V3, Rossi E1, Capodanno A4, Landi L1, Tibaldi C1, Minuti G1, Salvini J1, Coppi E1, Chella A4, Fontanini G5, Filice ME1, Tornillo L2, Incensati RM1, Sani S1, Crinò L3, Terracciano L2, Cappuzzo F1. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2015 Jan 6;112(1):95-102
20. Horstmann S, Ferrari S, Klempnauer KH. Regulation of B-Myb activity by cyclin D1. *Oncogene*, Jan 2000, 19(2):298-306
21. Saito, M.Saito K, et al. Identification of candidate responders for anti PD-1 immunotherapy, Rova-T therapy, or EZH2 inhibitory therapy in small-cell lung cancer. *Molecular and clinical Oncology*. 310-314, dezembro 2017
22. Zhao, H, Ren, D, Liu H & Chen J. Comparison and discussion of the treatment guidelines for small-cell lung cancer. *Thoracic Cancer* 9:769-774, 2018
23. Fu M1, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5439-47
24. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med* 2015;7:302ra136.
25. Tanaka K., Isse K., Fujiira T. et al. Prevalence of Delta-like protein 3 expression in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2018; 115: 116-120
26. Furata et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*, 2019 Nov;24(11):e1172-e1179.
27. Owen D H. et al. DLL3: an emerging target in small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*. 2019 Jun 18;12(1):61.
28. Kowalski M. et al. Prognostic value of synaptophysin and chromogranin a expression in patients receiving palliative chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2013;85:289-296

29. Giacinto P D et al. Chromogranin A: From Laboratory to Clinical Aspects of Patients with Neuroendocrine Tumors. *International Journal of Endocrinology*. Jul 2028, V.2018: 8126087.
30. Alexander Y. Deneka, Yanis Bounber, Tim Beck, and Erica A. Golemis. Tumor-Targeted Drug Conjugates as an Emerging Novel Therapeutic Approach in Small Cell Lung Cancer (SCLC) *Cancers (Basel)*. 2019 Sep; 11(9): 1297

Attachment 1

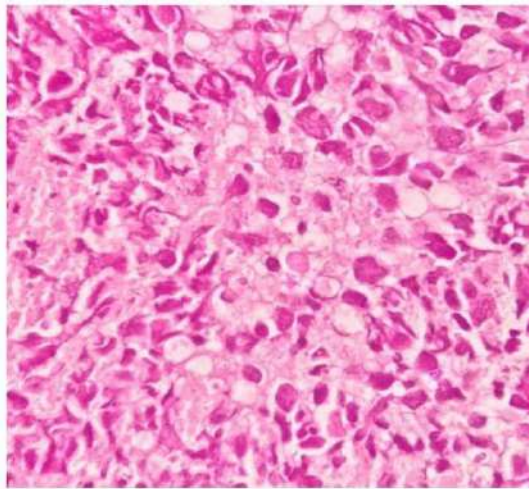


Figure 1: Photomicrography,400x increase:H&E-Carcinoma of small lung cells

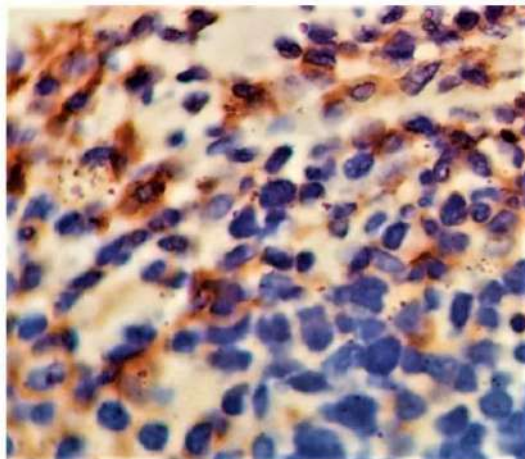


Figure 2: Photomicrography with an increase of 400x. Immunohistochemistry. Anti-DDI3. Carcinoma of small lung cells. Presence of strong cytoplasmic of neoplastic cells

Attachment 2

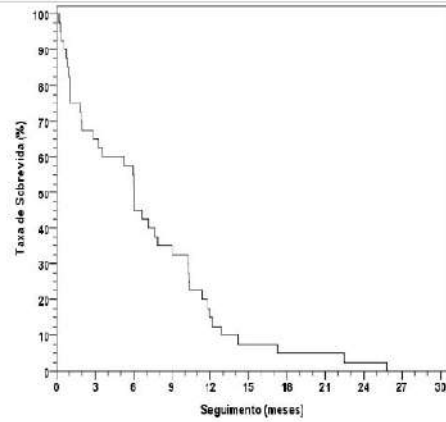
Table 1: Clinical characteristics of patients with SCLC and their correlations with positive DLL3 vs. negative DLL3.

Characteristics	DLL3 (+) n = 13	DLL3 (-) n = 27	P value
Age, years	65.3±10.1	67.7±10.5	0.480
Female sex, number (%)	6 (46.2)	12 (44.4)	>0.99
Metastasis, number (%)	10 (76.9)	21 (77.8)	>0.99
Smoking, number (%)	10 (76.9)	23 (85.2)	0.662
SAH, number (%)	7 (53.8)	13 (48.1)	>0.99
Dyslipidemia, number (%)	0 (0.0)	2 (7.4)	>0.99

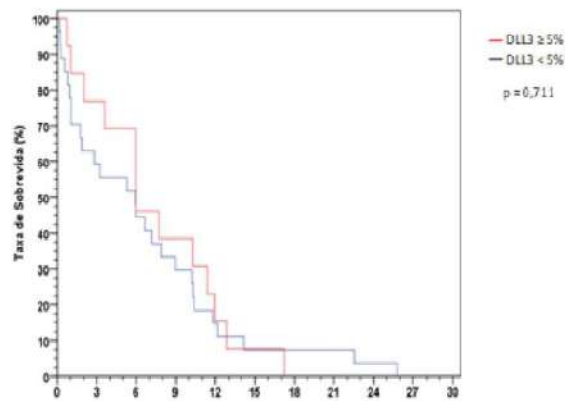
Table 2: Distribution of positive results for selected markers among SCLC patients with positive DLL3 versus negative DLL3.

Positive markers	DLL3 (+) n = 13	DLL3 (-) n = 27	OR	95%CI	P value
Chromogranin A, number/ not evaluated (%)	4/13 (30.8)	15/25 (60.0)	0.30	0.07 - 1.23	0.170
CK7, number (%)	11 (84.6)	20 (74.1)	1.93	0.34 - 10.92	0.690
Synaptophysin, number/ not evaluated (%)	9/12 (75.0)	23/26 (88.5)	0.39	0.07 - 2.31	0.357
CD56, number (%)	13 (100.0)	23 (85.2)	5.17	0.25 - 104	0.284
TTF1, number (%)	12 (92.3)	25 (92.6)	0.96	0.08 - 11.66	>0.999
EGFR, number (%)	6 (46.2)	8 (29.6)	2.04	0.52 - 8.00	0.480
PD-L1, number (%)	4 (30.8)	3 (11.1)	3.56	0.66 - 19.11	0.187
Cyclin-D1, number (%)	7 (53.8)	8 (29.6)	2.77	0.71 - 10.88	0.175
Ki-67, number (%)	13 (100.0)	23 (85.2)	5.17	0.25 - 104	0.284

Attachment 3

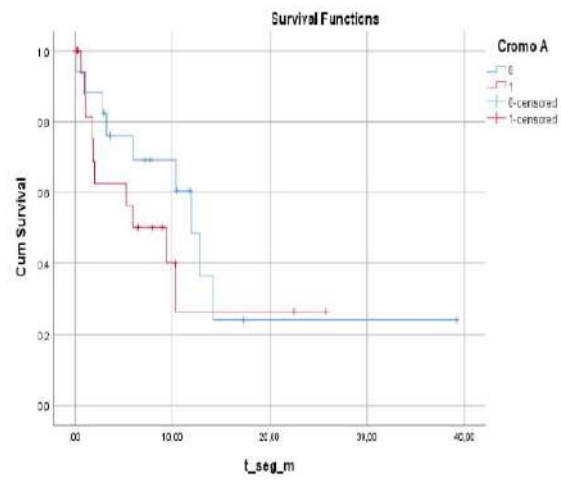


Graphic1:Global survival of patients with neuroendocrine of Small lung cell



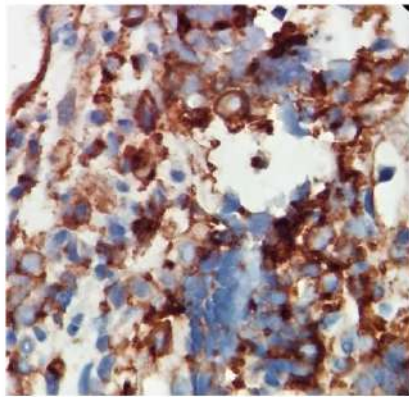
Graphic2:survival in patients with positive DLL3 lung neuroendocrine Carcinoma and negative DLL3.

Attachment 4

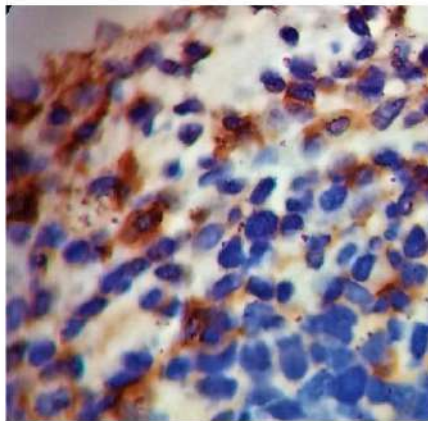


Graph 3: survival as a function of the association between DLL3 and chromogranin A

Unpublished Figures

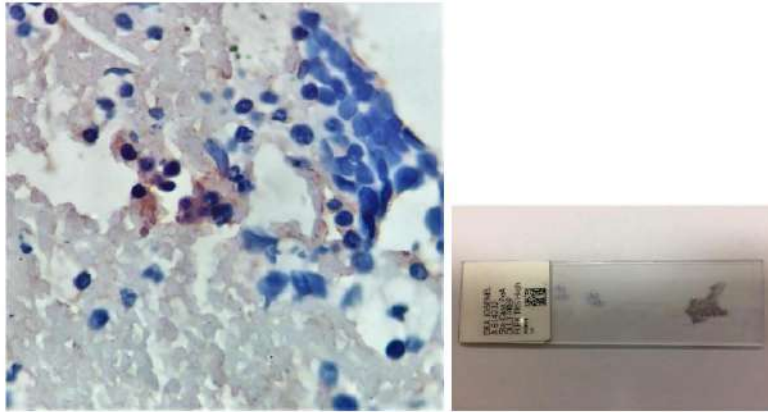


Photomicrography: 400X- magnification. Immunohistochemistry. Positivity for DLL3.
The staining is intense, but does not adequately define the membrane and cytoplasm.

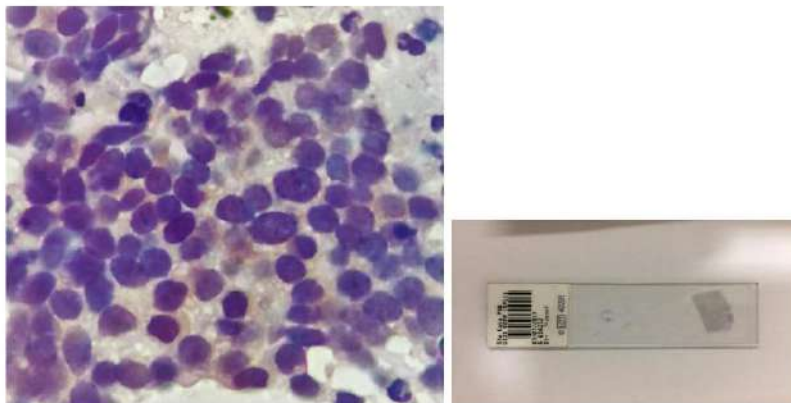


15

Photomicrography: 400X- magnification. Immunohistochemistry. Cytoplasmic and membrane positivity for DLL3



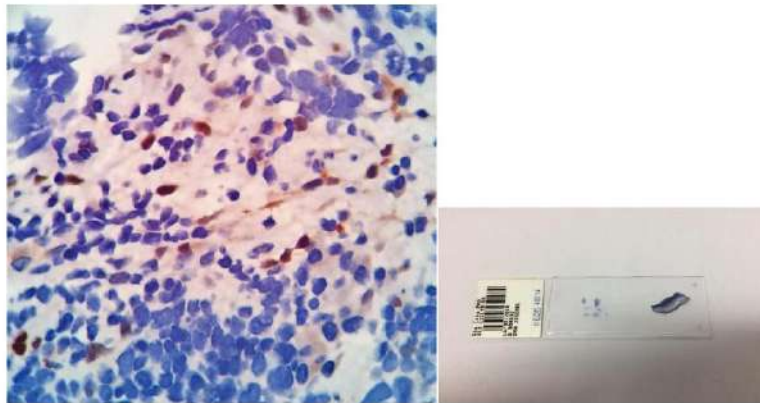
Photomicrography: 400X- magnification. Immunohistochemistry. Cytoplasmic and membrane positivity for DLL3. Note that there is extensive necrosis



Fragments on the blade are scarce

Photomicrography: 400X- magnification. Immunohistochemistry. Cytoplasmic and membrane positivity for DLL3. The cell has little cytoplasm, and the staining is weak

16



Photomicrography: 400X- magnification. Immunohistochemistry .Cytoplasmic and membrane po sitivity for DLL3. Few positive cells, but strongly stained

Excel Table

	A	B	C	D
2		Negativo	Positivo	p
3	metástases	77.8%	76.9%	>0.99
4	tabagismo	85.2%	76.9%	0.66
5	HAS	48.1%	53.8%	>0.99
6	dislipidemia	74.0%	0.0%	>0.99
7	DM	37.0%	15.4%	0.27
8	DPOC	51.9%	30.8%	0.31
9	gastrointestinal	14.8%	23.1%	0.66
10	cardiopulmonar	14.8%	23.1%	0.66
11	perda de peso	29.6%	15.4%	0.45
12	sexo feminino	44.4%	46.2%	>0.99
13	idade	67.7±10.5	65.3±10.1	0.48

Excel Table.DLL3-related clinical data

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO CEP

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo citogenético, molecular e imunohistoquímico de carcinomas de pulmão e sua aplicação na identificação de marcadores com influência sobre a resposta terapêutica e o prognóstico

Pesquisador: Paulo Ricardo Gazzola Zen

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61138416.7.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.856.228

Apresentação do Projeto:

Estudo retrospectivo transversal, realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, no período de janeiro de 2006 a abril de 2016. As amostras serão obtidas a partir de blocos de parafina de espécimes de biópsias de brônquio e pulmão, perfazendo um total de 40 amostras de pacientes com carcinoma de pequenas células de pulmão. Estas peças serão avaliadas sob vários aspectos (clínicos, citogenéticos, moleculares e imunohistoquímicos) para auxiliar no diagnóstico, delineamento do protocolo terapêutico e no prognóstico.

Objetivo da Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados e adequados.

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@sanlacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.856.228

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi solicitado pelo pesquisador através de documento anexado à Plataforma Brasil, a dispensa da utilização do TCLE, com base na Res.CNS 466/12.Em reunião havida em 01/11/2016 no Comitê de Ética da Santa Casa definiu-se a solicitação do uso TCLE, quando aplicável.O que necessita é comprovar a tentativa de contato com paciente ou familiar.

Resposta:

- TCLE: foi anexado na Plataforma Brasil em 21/11 e está adequado.
- Carta resposta: foi anexada na Plataforma Brasil em 22/11 com o procedimento que será realizado para utilização do TCLE e está adequado.

Pendências atendidas, projeto aprovado!

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_806759.pdf	22/11/2016 22:22:22		Aceito
Outros	cartaresposta2211.pdf	22/11/2016 22:22:04	Josenel Maria Barcelos Marçal	Aceito

Endereço: R. Profª Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicenta Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.856.228

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2211.pdf	22/11/2016 22:21:30	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Outros	formulario1010.pdf	17/10/2016 10:25:58	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaoautorizacaochefia1010.pdf	17/10/2016 10:25:07	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Orçamento	INCTIDM14set.pdf	17/10/2016 10:24:49	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Orçamento	OrcamentoDetalhadoJosenei.pdf	17/10/2016 10:21:50	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodecompromissoparauidados1010.pdf	17/10/2016 10:21:06	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaodeonusinstituicao1010.pdf	17/10/2016 10:20:34	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	17/10/2016 10:20:19	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaoparautilizacaooprontuarios1010.pdf	17/10/2016 10:20:07	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SolicitacaodeisencaodoTCLE1010.pdf	17/10/2016 10:19:46	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodeconfidencialidade1010.pdf	17/10/2016 10:19:25	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoJosenei1010.pdf	17/10/2016 10:12:21	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoJosenei1710.pdf	17/10/2016 10:11:52	Josenei Maria Barcelos Marçal	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Dezembro de 2016

Assinado por:
ELIZETE KEITEL
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@sanlacasa.tche.br

ANEXO B – ACEITE ARTIGO



GLOBAL JOURNALS
 A DELAWARE, USA INCORPORATED ORGANIZATION
 COMPUTER SCIENCE AND TECHNOLOGY | RESEARCH IN ENGINEERING
 MEDICAL RESEARCH | MANAGEMENT AND BUSINESS RESEARCH
 SCIENCE FRONTIER RESEARCH

Global Headquarters
 945th Concord Streets
 Framingham Massachusetts, Pin: 01701
 United States of America
 Call to Subscribe: 1-888-839-7392
 Subscription Fax: 1-888-839-7392

Letter of Acceptance

This is to certify that Josenel Maria Barcelos Marçal, Júlia Iaroseski, Luiz Fillipe Pinto da Silva, Thales Augusto Della Torre Marzarotto, Giulia Righetti Tuppini Vargas, Vitória Morita Fukuoka, Luiza Carolina da Rosa Scherner, Rafael Fabiano Machado Rosa, Paulo Ricardo Gazzola Zen had submitted a research manuscript entitled Characteristics Shared between Lung Development and Tumorigenesis: Mini Review Article which is accepted for GJMR Volume 21 Issue 1 and may be published if billing and copyright formalities are completed on time.

This letter/email is an official provisional confirmation of acceptance. As per ethics, the paper is now under the Copyright privilege of Global Journals Inc., and therefore cannot be further published or reproduced as whole/in part elsewhere without prior permission.

We are delighted by your research activities.

Dr. Vivek Dubey
 Ph.D., MS, FARSE
 University of Wisconsin
 Editor-in-Chief,
 Global Journals Incorporated, USA
 editorusa@globaljournals.org

The Incorporation Office

Global Journals®
 Headquarters 945th Concord Streets,
 Framingham Massachusetts, Pin: 01701,
 United States of America
 Phone: +1-508-620-4529 Call to
 Subscribe: +1-888-839-7392
 Subscription Fax: +1-888-839-7392

UK & Europe Incorporation Office

Global Journals®
 2nd, Lansdowne, Lansdowne Rd.,
 Croydon-Surrey
 Pin: CR9 2ER
 United Kingdom

India Publishing Office

Global Journals®
 E-3130 Sudama Nagar, Indore, M.P.,
 India,
 Pin: 452009
 Phone: +91 786-940-8000, +91
 882-711-1112

USA Incorporation No.: 0423089 | USA Tax ID (Emp ID): 098-0673227 | NCAGE Code: SNX33
 Licence No.: 42125/022010/1186 | TAN No.: BPLS12299A | Reg. No.: 430374 | Import-Export Code: 1109007027

GlobalJournals.org | AssociationofResearch.org | ScientificStandards.org
 ComputerResearch.org | MedicalResearchJournal.org | JournalofBusiness.org
 SocialScienceResearch.org | EngineeringResearch.org | JournalofScience.org