



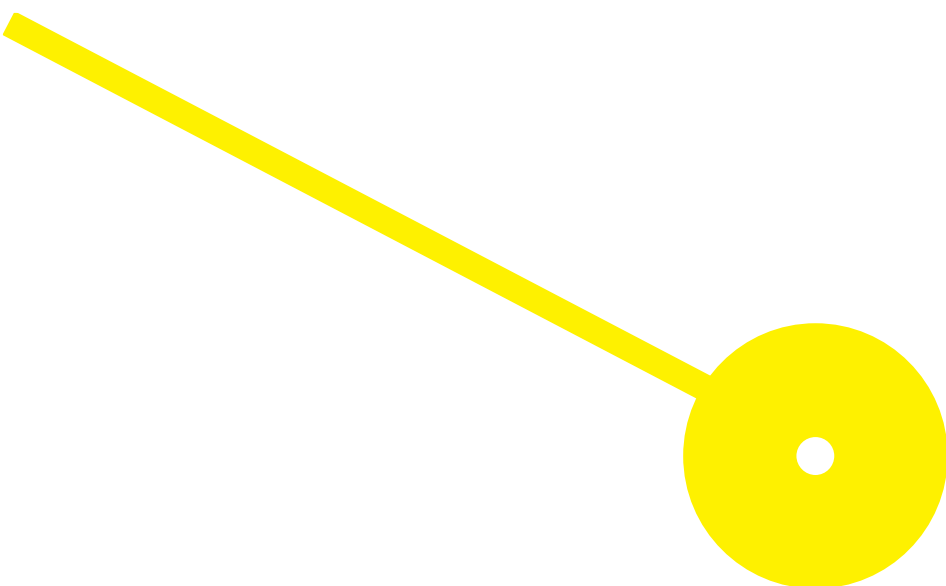
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA – PATOLOGIA MOLECULAR

Caraterização Molecular do Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células no Centro Hospitalar de Leiria

Ana Paula da Silva Melanda

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

**Caraterização Molecular do Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células no
Centro Hospitalar de Leiria**

Autor

Ana Paula da Silva Melanda

Orientadores

Doutor Ricardo dos Santos Celestino, Instituto de IBS da Universidade do Porto

Doutora Ana Rita Faria dos Santos, IBS da Universidade do Porto

Professora Doutora Regina Silva, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários
à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em
Biopatologia – Ramo de Patologia Molecular**– pela Escola Superior de
Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

“Querer é poder e teimar é vencer”

Foi o lema que me acompanhou desde que iniciei esta aventura

O conforto e apoio incondicional da minha família,

Depois, os que me ajudaram.

O primeiro agradecimento para o meu colega e amigo:

Dr. Luís Cirnes, pelas ideias e pelas preciosas listagens;

À Dr.^a Sónia Silva, Pneumologista Oncológica,

que apesar do seu valioso tempo, me conseguiu disponibilizar algum;

À Dr.^a Cristina Pissaro por estar lá, quando precisei.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do CHL,

À Instituição CHL por imediatamente ter autorizado este projeto

Às orientadoras Doutora Ana Rita Santos e

Professora Doutora Regina Silva

Finalmente, um especial agradecimento ao meu Orientador

Doutor Ricardo Celestino,

pelos ensinamentos, pela cumplicidade e pela Amizade.

Resumo

O cancro do pulmão é a principal causa de morte no mundo e em Portugal, o quarto com maior incidência. Cerca de 85% dos casos diagnosticados correspondem a cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC).

A elegibilidade dos doentes com CPNPC avançado para potencial tratamento com terapia alvo e imunoterapia, depende do diagnóstico histológico e biomarcadores, do estadiamento clínico/extensão da doença, das condições clínicas do doente, beneficiando da comunicação entre patologistas e oncologistas.

Pretende-se a caracterização molecular dos doentes com CPNPC, no Centro Hospitalar de Leiria, entre 2017 e 2022, para avaliar a prevalência de biomarcadores preditivos para terapêuticas específicas e a sobrevida destes doentes, aferindo a importância dos estudos moleculares e da expressão da PD-L1.

Os casos em que foram feitos estudos moleculares, 31% e 21% foram positivos para *EGFR* e *KRAS*, respetivamente, com uma maior incidência do *EGFR* em mulheres jovens e não fumadoras e do *KRAS* em fumadores. A expressão da PD-L1 com TPS $\geq 50\%$ incidiu mais em fumadores e permitiu o tratamento de imunoterapia em monoterapia.

Verificou-se concordância dos resultados relativamente à prevalência de biomarcadores preditivos na população europeia e, acima de tudo, a possibilidade dos doentes com CPNPC estadio IV beneficiarem de terapêuticas inovadoras alvo e imunoterapia.

Palavras-chave: Cancro do pulmão de não pequenas células; terapia alvo no cancro do pulmão de não pequenas células; imunoterapia no cancro no pulmão de não pequenas células.

Abstract

Lung cancer is the leading cause of death in the world, and the fourth with the highest incidence in Portugal. Around 85% of cases corresponding to non-small cell lung cancer (NSCLC).

The eligibility of advanced NSCLC's patients for potential target therapy and immunotherapy, depends on histological diagnosis and biomarkers, clinical staging/extent of the disease, patient's clinical conditions and pathologists and oncologist's communication.

The aim is to carry out molecular characterization of patients with NSCLC at Leiria Center Hospital, between 2017 and 2022 to evaluate the prevalence of predictive biomarkers for specific therapies and the survival rate of these patients assessing the importance of molecular studies and PD-L1 expression.

Cases in which a molecular study was carried out, 31% and 21% were positive for EGFR and KRAS, respectively, with higher incidence of EGFR in young women and KRAS in smokers. PD-L1 expression with TPS $\geq 50\%$ was higher in smokers' patients and allowed immunotherapy treatment in monotherapy.

There was agreement between the results regarding the prevalence of predictive biomarkers in the European population, which allowed patients with stage IV NSCLC to benefiting from innovative target therapy and immunotherapy.

Keywords: non-small cell lung cancer; non-small cell lung cancer; non-small cell lung cancer immunotherapy.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Classificação do cancro do pulmão..... | 2 |
| 1.2. Carcinogénese..... | 4 |
| 1.3. Heterogeneidade tumoral..... | 6 |
| 1.4. Imunidade tumoral..... | 7 |
| 1.5. Alterações moleculares..... | 9 |
| 1.6. Terapia personalizada..... | 14 |
| 1.7. Imunoterapia..... | 16 |
| 2. Objetivo..... | 18 |
| 3. Métodos..... | 19 |
| 3.1. Metodologias do estudo..... | 19 |
| 3.2. Centros de referência..... | 20 |
| 3.3. Base de dados..... | 21 |
| 3.4. Análise estatística..... | 21 |
| 4. Resultados..... | 23 |
| 5. Discussão..... | 30 |
| 6. Conclusão..... | 34 |
| Referências Bibliográficas..... | 36 |

Índice de Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| ADC..... | Adenocarcinoma |
| AJCC..... | American Joint Committee on Cancer |
| ALK..... | Anaplastic Lymphoma Kinase |
| AMP..... | Association of Molecular Pathology |
| ASCO..... | American Society of Clinical Oncology |
| CAP..... | College American of Pathologists |
| CCE..... | Carcinoma de Células Escamosas ou Epidermoides |
| CHL..... | Centro Hospitalar de Leiria |
| CPPC..... | Cancro do Pulmão de Pequenas Células |
| CPNPC..... | Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células |
| EGFR..... | Epidermal Growth Factor Receptor |
| EMA..... | European Medicine Agency |
| EML4..... | Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 |
| ESMO..... | European Society for Medical Oncology |
| FDA..... | Food and Drug Administration |
| ECOG..... | Eastern Cooperative Oncology Group (for Performance status scale) |
| GTP..... | Guanosina Trifosfato |
| HER2..... | Human Epidermal Receptor2 |
| IASLC..... | International Association for the Study of Lung Cancer |
| ICI..... | Inibidores Checkpoint Imunológicos |
| IHQ..... | Imunohistoquímica |
| INFARMED..... | Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde |
| IPAC..... | Instituto Português de Acreditação |
| IPATIMUP..... | Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto |
| KRAS..... | Kirsten rat sarcoma |
| MAPK..... | Via Mitogénio Ativado por Proteína Cinase |
| MET..... | Mesenchymal Epithelial Transition |
| NCCN..... | National Comprehensive Cancer Network |
| NGS..... | Next Generation Sequencing |
| NLST..... | National Lung Screening Trial |
| OMS..... | Organização Mundial de Saúde |
| PD-1..... | Programmed Cell Death1 |
| PD-L1..... | Programmed Cell Death-Ligand |

| | |
|-------------|---|
| RET..... | <i>Rearranged During Transfection</i> |
| RECIST..... | <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i> |
| ROS1..... | <i>c-ros Oncogene 1</i> |
| SAP..... | <i>Serviço de Anatomia Patológica</i> |
| SEER..... | <i>Surveillance Epidemiology and End Results</i> |
| TAC..... | <i>Tomografia Axial Computorizada</i> |
| TKI..... | <i>Inibidor de Tirosina Cinase</i> |
| TMB..... | <i>Tumor Mutational Burden</i> |
| TPS..... | <i>Tumor Proportion Score</i> |
| TTF1..... | <i>Thyroid Transcription Factor 1</i> |
| UMA..... | <i>Unidades Maço-Ano</i> |
| USPSTF..... | <i>United States Preventive Services Task Force</i> |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Descrição T, N e M para classificação do cancro do pulmão (8ª edição) | 4 |
| Tabela 2 – Caraterísticas clínico-patológicas de doentes do CHL, com CPNPC estadio IV | 24 |
| Tabela 3 – Alterações moleculares nos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV | 25 |
| Tabela 4– Prevalência das mutações <i>EGFR</i> e <i>KRAS</i> nos doentes do CHL com CPNPC estadio IV | 26 |
| Tabela 5 – Sobrevida dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV com alterações moleculares acionáveis e não acionáveis para terapia alvo..... | 27 |
| Tabela 6 – Caraterísticas dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV com estudo da expressão da PD-L1..... | 28 |
| Tabela 7 – Sobrevida dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV com estudo da expressão da PD-L1 e sem mutações acionáveis para terapia alvo..... | 29 |
| Tabela 8 – Sobrevida em meses, dos doentes com CPNPC estadio IV do CHL..... | 29 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Número de novos casos de cancro em Portugal em 2020 | 1 |
| Figura 2 – Classificação do cancro do pulmão | 3 |
| Figura 3 – Alterações que ocorrem durante a carcinogénese no cancro do pulmão | 5 |
| Figura 4 – Principais mecanismos da heterogeneidade no cancro do pulmão | 7 |
| Figura 5 – Ciclo imunitário tumoral | 8 |
| Figura 6 – Disfunção e ativação das células T em microambiente tumoral | 8 |
| Figura 7 – Principais alterações moleculares no cancro do pulmão | 9 |
| Figura 8 – Ativação de sinal EGFR | 10 |
| Figura 9 – Evolução das terapias alvo no CPNPC | 15 |

1. Introdução

O cancro do pulmão é uma doença complexa, onde a melhor estratégia de terapêutica implica conhecimento do diagnóstico histológico e biomarcadores, do estadiamento clínico/extensão da doença, das características do doente, comorbilidades e *performance status* ECOG* (estado clínico), para além da comunicação entre patologistas e oncologistas.

O aumento da incidência do cancro no mundo está relacionado com o aumento e com o envelhecimento da população mundial. Por outro lado, a alteração da prevalência e os principais fatores de risco associados estão frequentemente relacionados com o desenvolvimento socioeconómico de cada região geográfica (1).

Com um número estimado em 2,2 milhões de novos casos e 1,8 milhões de mortes, o cancro do pulmão é o segundo mais diagnosticado e é a principal causa de morte no mundo, representando 11,4% dos cancros diagnosticados e 18% das mortes (1). Dados da Globocan (*The global cancer observation*) de 2020, revelam que em Portugal, o cancro do pulmão é o quarto com maior incidência (9%) e tem uma taxa de mortalidade de 15,9% (Figura 1).

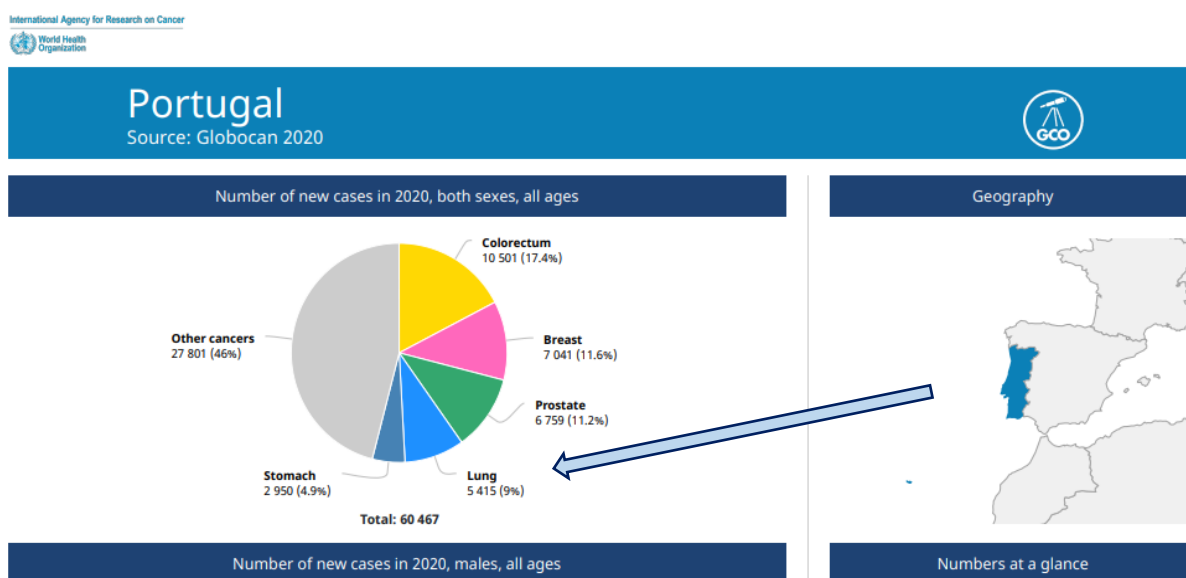


Figura 1 – Número de novos casos de cancro em 2020, em ambos os sexos e em todas as idades. Adaptado de Sung et al (1).

O cancro do pulmão tem maior incidência nos países desenvolvidos, onde os hábitos tabágicos são mais prevalentes. De facto, mais de 80% dos casos desta patologia estão relacionados com o consumo de tabaco (2,3). No entanto, tem-se verificado uma tendência de inflexão na curva da sobrevivência nos doentes com cancro do pulmão (4), devido a uma maior sensibilização aos efeitos nefastos do tabaco e ao aparecimento de novos tratamentos (5).

*Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) elaborou uma escala para medir a condição física, nomeadamente o nível funcional da capacidade de cuidados pessoais, atividades diárias e capacidade física como andar, trabalhar, etc

A elevada taxa de mortalidade desta doença está relacionada com o diagnóstico tardio e com o estadió avançado da doença (6), conseqüentemente associado a um pior prognóstico (7).

Um estudo feito pela *National Lung Screening Trial* (NLST) mostrou que um rastreio trianual com Tomografia Axial Computorizada (TAC), reduziu em 20% a taxa de mortalidade em doentes de alto risco (4,8,9). Na realidade, o diagnóstico precoce do cancro do pulmão é crucial em população com fortes hábitos tabágicos (mais de 30 unidades maço-ano – UMA), fumadores ativos ou que tenham deixado de fumar há menos de quinze anos, que não tenham doença na altura em que é feito o rastreio (6) e com idade entre os 55 e 80 anos (8,9). Também é considerada população de risco a que está exposta a fumos e a produtos tóxicos. Recentemente a *United States Preventive Services Task Force* (USPSTF) atualizou as *guidelines*, propondo no rastreio do cancro do pulmão uma redução da idade dos 55 para os 50 anos em pessoas de risco e para o consumo de tabaco de 30 para 20 UMA (4).

No entanto, continua a ser muito reduzida a percentagem de casos detetados num estadió clínico precoce, com 75% dos doentes a serem diagnosticados já em estádios avançados e com opções de tratamento mais limitadas em termos curativos (10).

Apesar de tudo, os progressos com técnicas menos invasivas para diagnóstico e o desenvolvimento de diferentes terapêuticas, como as terapias alvo e a imunoterapia, têm contribuído para o aumento da sobrevida destes doentes.

1.1. Classificação do Cancro do Pulmão

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os cancros do pulmão com base na histologia, imunohistoquímica (IHQ) e técnicas moleculares. A última atualização enfatizou a importância do estudo molecular, o qual permite a subclassificação de subtipos tumorais, com base nas anomalias genéticas específicas detetadas (11).

O cancro ou carcinoma do pulmão é classificado histologicamente em: carcinoma do pulmão de pequenas células (CPPC) e carcinoma do pulmão de não pequenas células (CPNPC), constituindo este último 85% do total de cancros do pulmão diagnosticados (7,8,12) (Figura 2).

Os CPNPC surgem principalmente nas zonas pulmonares periféricas e foram classificados pela OMS em três subtipos: os adenocarcinomas (ADC), que são os mais comuns, representando cerca de 40 %; os carcinomas de células escamosas ou epidermóides (CCE), que são cerca de 25 a 30 %, e os carcinomas de grandes células que são identificados em 5 a 10 % dos CPNPC. Alguns autores consideram um quarto subtipo – o tumor carcinóide brônquico (6). Adicionalmente, têm sido ainda identificados alguns subtipos histológicos mais complexos resultantes de variantes e combinações (8,13).

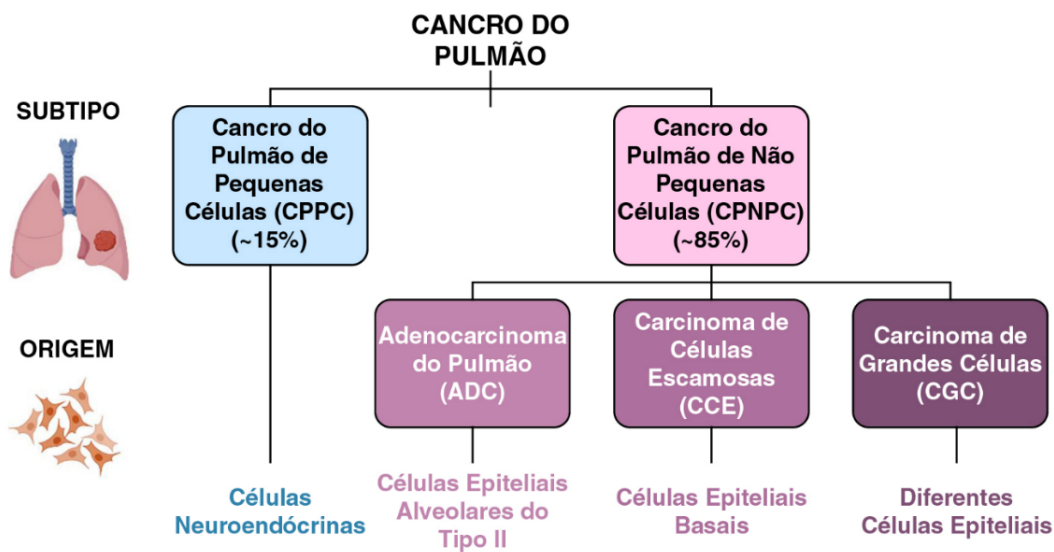


Figura 2 – Classificação do cancro do pulmão nos dois principais grupos: cancro do pulmão de pequenas células (CPPC; 15%) e cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC; 85%). O CPPC deriva de células da linhagem neuroendócrinas e o CPNPC tem origem em diferentes células. O CPNPC tem os subtipos: adenocarcinomas (ADC; origem nas células epiteliais alveolares do tipo II), carcinoma de células escamosas (CCE; origem em células epiteliais basais) e carcinoma de grandes células (CGC; origem em várias células epiteliais). Adaptado de Sanchez-Ortega et al (12).

Os ADC aparecem tipicamente na zona periférica do pulmão (12), têm origem nas células que segregam componentes surfactantes e o diagnóstico do padrão morfológico pode ser definido pela imunomarcaçã da *Thyroid Transcription Factor1* (TTF1) e da *Napsin A* com uma sensibilidade de aproximadamente 80% (14). Os CCE localizam-se normalmente na zona mais central do pulmão (12) e têm origem nas vias aéreas pulmonares, mais frequentemente nos brônquios principais. O diagnóstico morfológico é baseado na presença de células escamosas, queratinizadas e pontes intercelulares. Na inexistência deste padrão, a imunomarcaçã da p40, p63 ou citoqueratina 5/6 pode suportar o diagnóstico diferencial de CCE não queratinizado (14).

A estratégia de tratamento e prognóstico do CPNPC depende do diagnóstico e estadió da doença (15). Neste sentido, a *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) desenvolveu uma classificação com base na análise estatística de 100.000 doentes, sobre o estudo da descrição Tumor--Gânglio-Metástases - classificação TNM (9). Também a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) definiu o sistema de estadiamento TNM para os CPNPC (8), com o objetivo de categorizar os estadios com base no tamanho do tumor primário (T), na disseminação do tumor nos gânglios linfáticos (N) e na presença de metástases (M). A classificação TNM final tem quanto às características tumorais as categorias T1 a T4, quanto aos gânglios envolvidos as categorias N0 a N3, e quanto às metástases a ausência (M0) ou a presença (M1) (6).

Baseado nesta classificação TNM, estima-se que 60% dos doentes com um estadio clínico IA (T1, N0, M0), tenham uma sobrevivência a 5 anos de 60%, enquanto que os doentes com um estadio clínico II (T2b, N1, M0) a IV (tumor invade os órgãos adjacentes) uma taxa de sobrevivência a 5 anos entre 40% a 5% (6), ou seja, o prognóstico dos doentes com cancro do pulmão, está fortemente relacionada com o estadio da doença (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição T, N e M para a classificação do cancro do pulmão (8ª edição). Adaptado de Detterbeck et al (16). TNM – Tumor–Gânglios–Metástases

| T (primary tumor) | |
|--------------------------|---|
| T0 | No primary tumor |
| Tis | Carcinoma in situ (squamous or adenocarcinoma) |
| T1 | Tumor ≤3 cm |
| T1mi | Minimally invasive adenocarcinoma |
| T1a | Superficial spreading tumor in central airways* |
| T1a | Tumor ≤1 cm |
| T1b | Tumor >1 but ≤2 cm |
| T1c | Tumor >2 but ≤3 cm |
| T2 | Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving: visceral pleura, † main bronchus (not carina), atelectasis to hilum ‡ |
| T2a | Tumor >3 but ≤4 cm |
| T2b | Tumor >4 but ≤5 cm |
| T3 | Tumor >5 but ≤7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve; or separate tumor nodule(s) in the same lobe |
| T4 | Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe |
| N (regional lymph nodes) | |
| N0 | No regional node metastasis |
| N1 | Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes |
| N2 | Metastasis in ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes |
| N3 | Metastasis in contralateral mediastinal, hilar, or supraclavicular nodes |
| M (distant metastasis) | |
| M0 | No distant metastasis |
| M1a | Malignant pleural or pericardial effusion † or pleural or pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe |
| M1b | Single extrathoracic metastasis |
| M1c | Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ) |

*Superficial spreading tumor of any size but confined to the tracheal or bronchial wall. †Atelectasis or obstructive pneumonitis extending to hilum; such tumors are classified as T2a if >3 and ≤4 cm, T2b if >4 and ≤5 cm. ‡Pleural effusions are excluded that are cytologically negative, nonbloody, transudative, and clinically judged not to be due to cancer.

1.2. Carcinogénese

Apesar de estarem relativamente bem identificadas as causas do cancro do pulmão, o diagnóstico e o tratamento da doença num estadio precoce tem sido difícil, devido ao ainda pouco conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à carcinogénese (17). Neste caso, a compreensão da patogénese e do papel dos fatores genéticos no desenvolvimento da doença, permite conhecer as características morfológicas e moleculares, não só no cancro invasivo, mas também nas lesões pré-invasivas em fumadores sem cancro do pulmão (10), até porque, 25% dos casos de cancro do pulmão diagnosticados no mundo, não estão associados ao tabaco (2,18).

A importância da identificação dos fatores externos responsáveis pela carcinogénese está na capacidade em os controlar pela prevenção, informação e mudança de hábitos. Fumadores que deixem de fumar aos 40 anos reduzem em 90% o risco de contraírem doenças relacionadas com o consumo tabágico, comparativamente com os que continuam a fumar (19).

Um cancro invasivo pode ser precedido por alterações morfológicas como hiperplasia do epitélio brônquico, metaplasia escamosa, displasia e carcinoma *in situ*. A hiperplasia e a metaplasia surgem como reação a uma inflamação crónica e podem regredir espontaneamente após cessação tabágica, enquanto a displasia e o carcinoma *in situ* são consideradas alterações pré-malignas (10) (Figura 3).

No processo de progressão tumoral pode ainda ocorrer o aumento da expressão de fatores de crescimento, a angiogénese, a evasão à apoptose, devido a mutações dos genes anti-apoptóticos e pro-apoptóticos, o aumento da replicação celular, a invasão tecidual e a metastização (10). Das alterações moleculares resulta o enfraquecimento da estrutura do DNA e a maior suscetibilidade à desregulação do ciclo celular, causado tanto por mutações nos protooncogenes e nos genes supressores tumorais, como por alterações nos mecanismos de reparação do DNA.

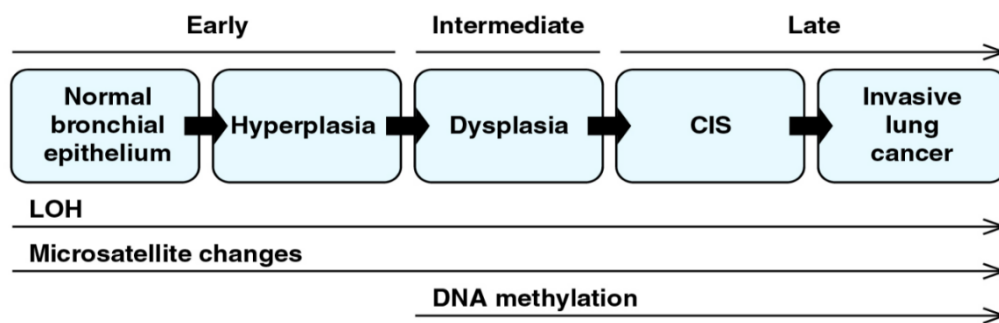


Figura 3 – Alterações sequenciais que ocorrem durante o processo da carcinogénese no cancro do pulmão. CIS – Carcinoma *in situ*; LOH – *Loss of heterozygosity*. Adaptado de Wadowska et al (10).

Os oncogenes codificam habitualmente proteínas que regulam vários processos celulares incluindo proliferação e sobrevivência da célula. Alterações moleculares nos oncogenes, como mutações, rearranjos e amplificações, podem levar à desregulação da sua expressão ou função (20) e a sobreexpressão pode desencadear a ativação de genes através de rearranjos cromossómicos (21).

Na carcinogénese as mutações que conferem vantagem no crescimento das células tumorais são as mutações condutoras ou *drivers* (10), pelo que, sinalizar uma mutação *driver* com potencial bloqueio por um inibidor específico é sinónimo de uma estratégia terapêutica bem-sucedida para o cancro (20), dado o seu envolvimento na ativação das cascatas de sinalização intracelular e, portanto, na proliferação e invasão celular. Por outro lado, estas mutações geram proteínas fundamentais para a manutenção e sobrevivência das células tumorais. Assim, o facto de existir dependência biológica das células tumorais

e alterações genéticas (devido às mutações *drivers* serem únicas), faz com que estas sejam biomarcadores importantes para a seleção de doentes para terapia alvo (10). Ou seja, quer a identificação dos oncogenes *driver*, quer o conhecimento da sua biologia têm permitido o desenvolvimento de agentes alvo (22).

No CPNPC, as mutações *driver* em oncogenes, estão frequentemente associadas a subtipos histológicos, a género, etnia, idade, passado de hábitos tabágicos e à relação com outros oncogenes (20). Na idade biológica, o encurtamento dos telómeros, o declínio do metabolismo NAD⁺ e a perda da capacidade celular para reparação do DNA são também fatores carcinogénicos (3).

Para além das alterações genéticas, também estão identificadas no CPNPC alterações epigenéticas (23), estimuladas por exposições ambientais a agentes carcinogénicos. Sob a influência de fatores externos, a cromatina (formada por DNA, por histonas e por outras proteínas nucleares) pode sofrer modificações reversíveis, as quais podem influenciar a expressão e regulação génica envolvida no processo celular, como a diferenciação e maturação (10).

Por outro lado, e por comparação com outros tipos de tumores, o cancro do pulmão é caracterizado pela elevada carga mutacional (20). Biomarcadores como a carga tumoral mutacional (TMB – *tumor mutational burden*) ou a presença e/ou as características dos linfócitos infiltrados no tumor, podem ajudar na seleção de sobreviventes de longa duração (24). Porém, em 2020, a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) excluiu o painel TMB como um biomarcador imunológico para doentes com CPNPC metastático, baseado em ensaios clínicos (25).

1.3. Heterogeneidade Tumoral

O cancro do pulmão pertence a um grupo de tumores com grande heterogeneidade, cujo conhecimento é relevante dada a sua implicação na patogénese, na carcinogénese, no diagnóstico histopatológico, na seleção do tecido para diagnóstico molecular, na decisão terapêutica e no prognóstico. Esta heterogeneidade é explicada em parte pelas diversas origens celulares ou vias de diferenciação, que se refletem na grande variedade de diagnóstico histopatológico e pode ser observada nos graus de diferenciação, nomeadamente se se trata de tumor muito ou pouco diferenciado. Nestes casos a OMS recomenda um diagnóstico feito com base no padrão histológico mais prevalente (26).

A aplicação de tecnologia molecular para a análise do genoma do cancro permite mostrar que os tumores sólidos do pulmão podem ter diferentes níveis de heterogeneidade – a heterogeneidade interdoentes que ocorre entre indivíduos com o mesmo tipo de tumor, e pode explicar as diferentes respostas a tratamentos em cada doente; a heterogeneidade intratumoral, em que se observa diversidade de células tumorais num único tumor e a heterogeneidade intertumoral em que se considera a diversidade entre o tumor primário e as suas metástases. Assim, dois cancros com a mesma origem histológica podem ter diferentes

variantes moleculares, as quais podem afetar o desenvolvimento do tumor e a resposta e resistência a terapias alvo (10,20).

Apesar de tradicionalmente, uma grande parte da heterogeneidade tumoral ser atribuída a alterações genéticas, esta está também associada a mecanismos epigenéticos, incluindo a metilação do DNA, a remodelação da cromatina e a modificação pós-translacional das histonas (20) (Figura 4).

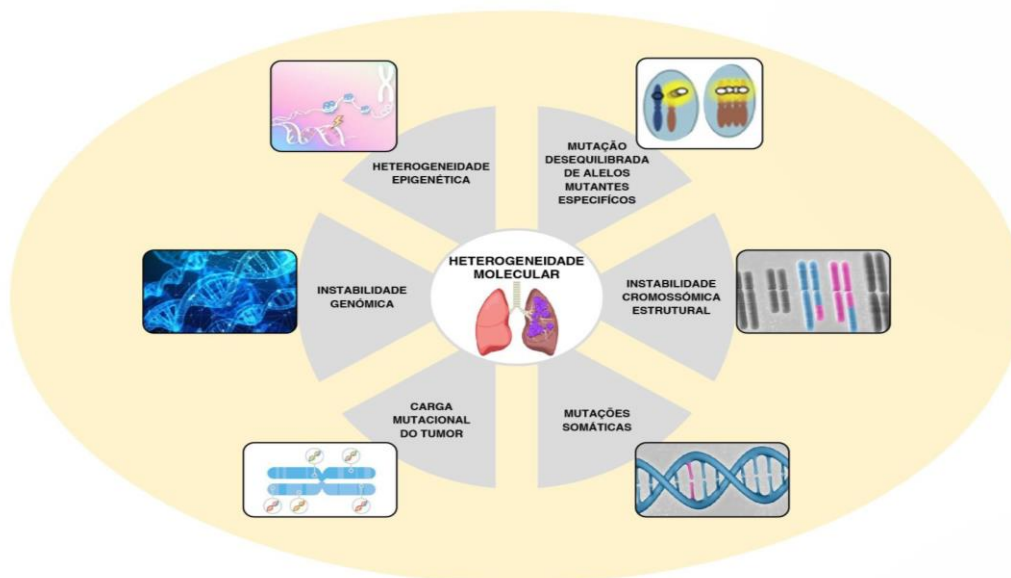


Figura 4 – Principais mecanismos que contribuem para a heterogeneidade do cancro do pulmão. Adaptado de Marino et al (20).

1.4. Imunidade Tumoral

Quando há formação de tumores no organismo, o sistema imunitário tem a capacidade de prevenir o seu desenvolvimento e progressão, nomeadamente através dos linfócitos T citotóxicos, que eliminam as células anormais, por um processo que compreende uma série de passos, designado por ciclo imunitário tumoral (27) (Figura 5).

A imunidade tumoral é regulada por inúmeros sinais estimuladores e inibidores que coletivamente se chamam *checkpoints* imunológicos. A *programmed cell death 1* (PD-1) é uma molécula *checkpoint* imunológica inibidora e reguladora que é expressa nos linfócitos T citotóxicos ativados, que desencadeia a eliminação de células tumorais. Porém, as células tumorais têm a capacidade de desenvolver mecanismos imunossupressores que levam à imunotolerância e inativação dos linfócitos T citotóxicos. Assim, se as células tumorais expressarem o ligando do recetor *programmed cell death ligand1* (PD-L1), podem escapar à resposta do sistema imune, assegurando a sua sobrevivência e a progressão tumoral. O bloqueio desta interação PD-1–PD-L1 com inibidores *checkpoints* imunológicos (ICI) permite recuperar a capacidade imunológica tumoral para eliminar as células anormais (8,27) (Figura 6).

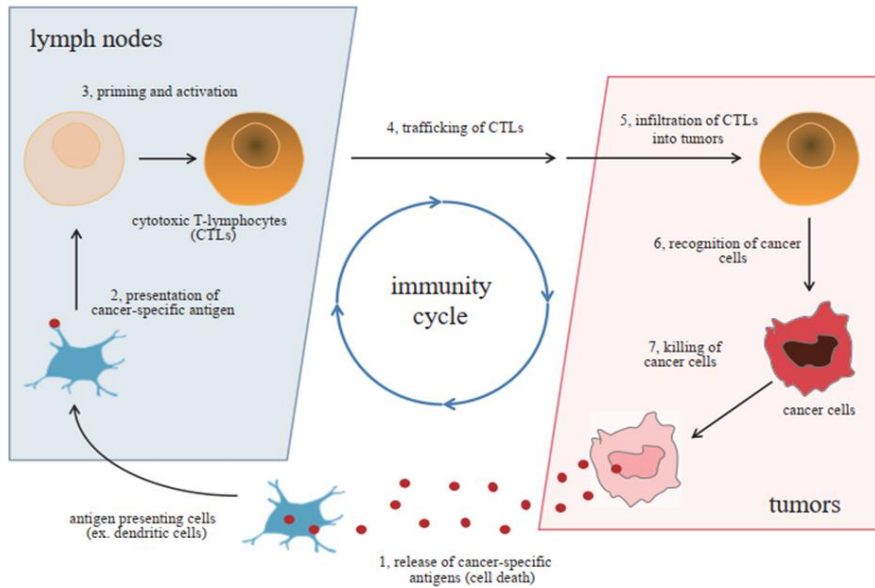


Figura 5 – Ciclo imunitário tumoral – os antígenos libertados pelo tumor, são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígeno, que os apresentam aos linfócitos T que por sua vez, eliminam as células tumorais. Adaptado de Yoneda et al (27).

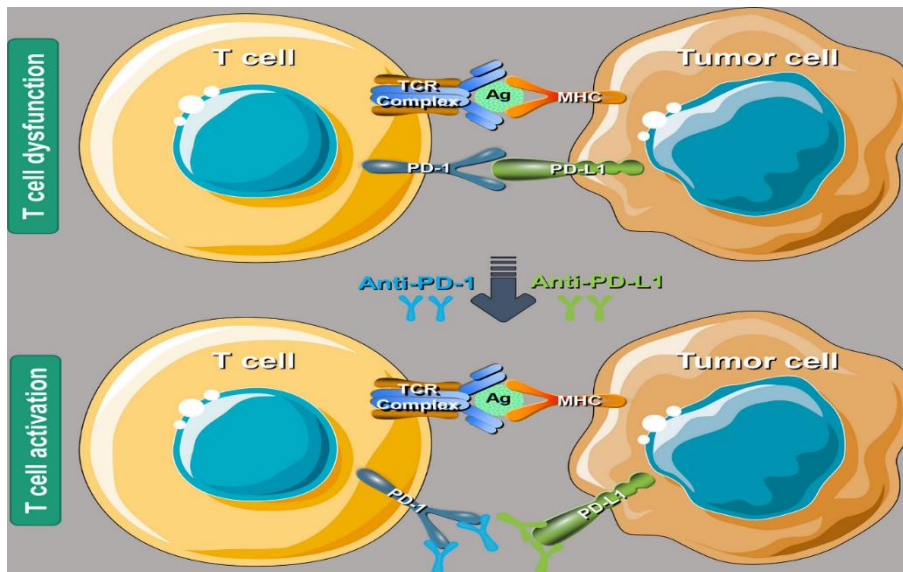


Figura 6 – Em microambiente tumoral a PD-L1 sobreexpressa na superfície da célula tumoral liga-se ao seu recetor, expresso à superfície da célula T, o PD-1, inibindo a sua ação destruidora (Célula T disfuncional). Os Inibidores de Checkpoints Imunológicos reativam o potencial imunológico, reativando as células T. Adaptado de Bie et al (28).

1.5. Alterações Moleculares

A identificação e o estudo das alterações genéticas presentes no cancro do pulmão têm assumido uma relevância cada vez maior. Muitas dessas alterações moleculares são consideradas clinicamente relevantes por constituírem biomarcadores de prognóstico e/ou preditivos de resposta à terapia alvo disponível para cancro do pulmão, estando identificadas as suas características na população mundial e a sua prevalência. São exemplos de biomarcadores em cancro do pulmão os genes *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *HER2* e *MET* (Figura 7).

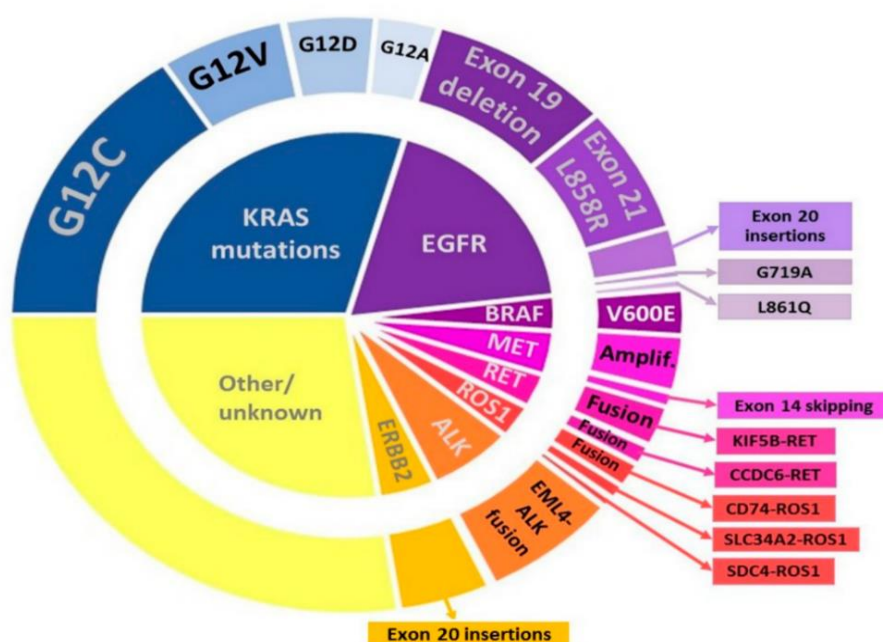


Figura 7 - Principais alterações moleculares que ocorrem no cancro do pulmão. Adaptado Sutic et al (29).

➤ Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

O *EGFR* é um dos quatro membros da família *ERBB* /*EGF* de recetores transmembranares do fator de crescimento epidermal humano (*HER1/EGFR/ERBB1*, *HER2/ERBB2*, *HER3/ERBB3* e *HER4/ERBB4*) (15,22). Cada recetor *HER* é um monómero inativo que dimeriza com um recetor do mesmo tipo ou com outro membro da família *HER* na resposta de ligação ao ligando. A ativação do recetor, desencadeia uma complexa rede de sinalização a jusante que leva à replicação celular (22,30) (Figura 8).

Em doentes com CPNPC, o *EGFR* desempenha um importante papel na proliferação celular, na inibição da apoptose, na angiogénese, na progressão tumoral e na quimioresistência (30,31), nomeadamente nos que albergam mutações no gene *EGFR* ou nas vias de sinalização envolvidas no tumor (15). As mutações neste gene estão presentes em 10 a 30% dos doentes CPNPC na Europa, sendo a prevalência mais alta na Ásia, com mutações em 50% dos casos (9). São também mais frequentes em mulheres jovens com ADC do que em homens (15,22), numa relação de aproximadamente 40% para 10%, e em não fumadores

comparativamente a fumadores ou ex-fumadores (aproximadamente 45% para 7%). Este facto indica que o crescimento deste tipo de tumor está apenas dependente das vias de ativação *EGFR*(30).

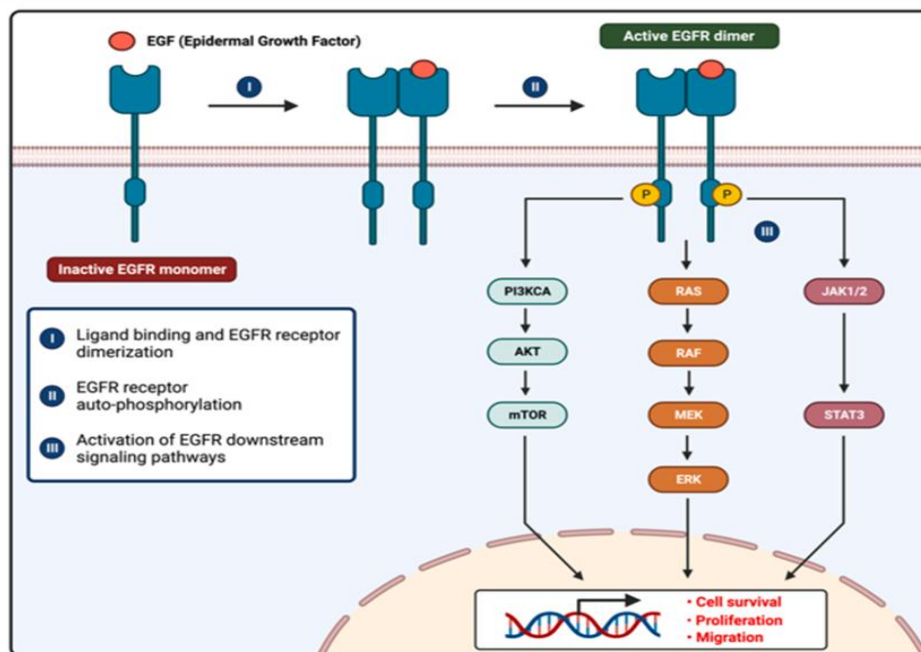


Figura 8 – Representação esquemática da ativação de sinal EGFR que leva à iniciação da cascata intracelular que regula a proliferação, o metabolismo e a sobrevivência célula. Adaptado de Papini et al (32).

A descoberta de mutações ativadoras do *EGFR* foi importante para o desenvolvimento de inibidores de tirosina cinase (TKI), enquanto preditivas de resposta à terapêutica com um TKI (21), levando a um aumento de sobrevida nos doentes com CPNPC avançado, comparativamente com a quimioterapia clássica (22).

As mutações clinicamente relevantes incluem substituições, deleções e inserções nos exões 18–21 as quais ativam a tirosina cinase e podem conferir sensibilidade ou resistência aos TKI-*EGFR* ou a outros fármacos (33). A possibilidade de ocorrerem mutações secundárias no domínio da tirosina cinase do *EGFR*, como as mutações T790M, e em outros genes envolvidos numa via molecular alternativa que desencadeiam resistência aos TKI, levou ao desenvolvimento de novos agentes alvo para as novas alterações moleculares de resistência (15).

Neste sentido, os TKI-*EGFR* de 1ª geração – *gefitinib* e *erlotinib* – administrados a doentes CPNPC com mutações *EGFR* ativadoras clássicas (deleção no exão 19 ou mutação no exão 21 L858R), mostraram bons resultados na resposta do tumor e na sobrevida. Os TKI-*EGFR* de 2ª geração – *afatinib* – também aprovados, revelaram maior toxicidade e têm sido substituídos pelos de 3ª geração – *osimertinib*. Estes apresentaram vantagens em relação aos das gerações anteriores, especialmente quando há metástases cerebrais e por serem eficazes na resistência aos TKI-*EGFR*, nomeadamente a mutação T790M, passando a ser utilizado como tratamento de 1ª linha (33).

➤ *Kirsten rat sarcoma (KRAS)*

Os genes *KRAS*, *NRAS* e *HRAS* constituem a família de oncogenes humanos mais frequentes (22). A família *RAS* codifica pequenas proteínas que hidrolizam a guanosina trifosfato (GTPase) a qual é inativa quando se liga à guanosina difosfato (GDP) e ativa quando se liga à guanosina trifosfato (GTP). A forma ativa do *KRAS* funciona como um interruptor que, com um estímulo extracelular, é capaz de ativar a montante recetores de superfície celular como o *EGFR*, o *FGFR* e o *ERBB2-4* e a jusante as vias de proliferação e sobrevivência celular (34,35). Basicamente, o *KRAS* é um protooncogene que funciona como regulador de ativação ou inativação molecular para a proliferação, maturação e diferenciação celular (15).

As mutações no gene *KRAS* são as alterações oncogénicas *driver* mais comuns no CPNPC, nomeadamente nos ADC (20 a 30%) (35), que neste caso têm uma localização na região hilar do pulmão, similar ao CCE e ao CPPC (11).

Algumas mutações no gene *KRAS*, como as do exão 2 e 3, impedem a hidrólise GTP e a quebra do sinal *KRAS* que resulta na activação constitutiva das proteínas *KRAS*. As mais frequentes dão origem à substituição de aminoácido no codão 12 ou no 13 da proteína *KRAS* (22). A mutação *KRAS* p.G12C, que substitui o aminoácido glicina por uma cisteína, está presente em aproximadamente 13% dos CPNPC e está fortemente associada a fumadores ou ex-fumadores (22). A mutação *KRAS* p.G12D, que envolve a substituição do aminoácido guanina por uma adenina, é mais comum entre os não fumadores (22,35,36). Os europeus têm maior prevalência de mutações *KRAS* que os asiáticos, sendo detetadas em 30% e 10% respetivamente, nos doentes diagnosticados com CPNPC (11,22). Estas mutações parecem não estar relacionadas nem com o género nem com a idade, se bem que as mulheres parecem ter maior suscetibilidade para a variante G12C (15,35).

O tratamento *standard* para os CPNPC com mutações *KRAS*, segue o princípio do CPNPC sem alterações de oncogenes *driver* ou seja, é a imunoterapia com ou sem quimioterapia baseada em platinos (22). Recentemente têm surgido avanços no desenvolvimento de alvos terapêuticos, nomeadamente para a mutação *KRAS* p.G12C, que mantêm o *KRAS* num estado inativo ligado ao GDP como é o caso dos TKI *sotorasib* e *adagrasib* (22,35). Porém, continua a existir uma percentagem de doentes que também não responde a esta terapêutica, o que pode estar relacionado com a heterogeneidade tumoral, com a resistência a inibidores *KRAS* ou mesmo com as vias independentes de ativação do *KRAS*, sendo uma das soluções terapêuticas, a combinação da terapia alvo com ICI (22).

A deteção das mutações *KRAS* é fundamentalmente recomendada para prever a evolução clínica da doença (22). As mutações que ocorrem no gene *KRAS*, conjuntamente com as mutações que ocorrem no gene *BRAF*, são preditivas de pior prognóstico (6).

➤ *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)*

A maioria das alterações *ALK*, são rearranjos cromossômicos que resultam na fusão de genes. A ativação constitutiva do *ALK* no ADC do pulmão é causada pelo rearranjo cromossômico que gera uma proteína de fusão que, através da interação a jusante com as vias de sinalização *JAK/STAT*, *PI3K/AKT* e *MEK/ERK*, leva à proliferação celular e à invasão (36).

Rearranjos do gene *ALK* com fusão do gene *echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)* são mais frequentes e encontrados em aproximadamente 5% dos CPNPC, principalmente nos ADC (8,22,23). Os doentes com tumores com estas translocações respondem bem a terapia com inibidores *ALK/MET/ROS1* e a outros inibidores *ALK* (11,21). Até ao presente, existem cinco *TKI-ALK* aprovados comercialmente: *crizotinib*, *ceritinib*, *alectinib*, *brigatinib* e *lorlatinib*, sendo estes três últimos recomendados para tratamento inicial (33). Porém encontram-se muitos outros em fase de teste no âmbito de ensaios clínicos.

A presença de rearranjos *ALK* no CPNPC parece estar relacionada com um estadió mais avançado do tumor (15). Estes rearranjos são frequentes em fumadores leves ou não fumadores (10,15,22), e podem ser encontrados em doentes mais jovens (cerca de 40 anos) ou em doentes mais velhos (acima dos 70 anos), e não parecem ter prevalência preferencial em nenhum dos sexos (15).

➤ *ROS oncogene1 (ROS1)*

O gene *ROS1* codifica para um recetor de tirosina cinase que pertence a uma família de recetores de insulina e estruturalmente relacionado com o *ALK* (22). *ROS1* e o *ALK* partilham sequências de aminoácidos com locais de ligação ATP homólogos e, por isso, os rearranjos identificados em ADC do pulmão, podem constituir um potencial alvo terapêutico com a administração de TKI (13).

Os rearranjos *ROS1* são raros, atuam como *drivers* oncogénicos em 1-2% dos CPNPC (9,22) e os mais comuns são as fusões *CD74-ROS1* e *SCL34A2-ROS1* (15). As alterações no gene *ROS1* estão associadas a doentes jovens, sem ou com hábitos tabágicos ligeiros (15). Tem uma incidência muito baixa de metástases cerebrais em comparação com os CPNPC onde são detetadas fusões *ALK*.

Nos domínios da tirosina cinase os genes *ROS1* e *ALK* parecem homólogos e por isso, muitos TKI- *ALK* atuam também para rearranjos *ROS1* do cancro do pulmão (13,21). *Crizotinib* ou *entrectinib* são recomendados pela *European Society for Medical Oncology (ESMO)*, sendo este último recomendado para doentes com metástases cerebrais (33). *Guidelines* recomendam iniciar o tratamento com *crizotinib*, sendo previsível a ocorrência de resistências. A mutação *ROS1*p.G2032R (análoga à mutação resistente *ALK*p.G1202R) foi identificada como a mutação resistente mais comum no domínio *ROS1* (36).

➤ *Rearranged During Transfection (RET)*

O gene *RET* é um protooncogene que codifica um recetor de tirosina cinase localizado na superfície celular, homólogo ao domínio cinase *ALK*, com o qual partilha 37% do domínio intracelular.

As alterações mais frequentes neste gene, são as fusões *RET* que ocorrem por rearranjos cromossômicos com a justaposição da região C-terminal da proteína *RET* com a porção N-terminal de outra proteína levando à ativação constitutiva da *RET* cinase. Estes rearranjos produzem proteínas de fusão quiméricas que podem provocar ativação constitutiva do ligando independente do *RET*, promovendo o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular (37).

Têm sido descritos vários padrões de rearranjos *RET*, dos quais os mais comuns são KIF5B e CCDC6 (22,37). Estão identificados em 1-2% dos ADC do pulmão, sendo mais frequentes em doentes jovens e não fumadores (23,37,38).

Por indicação da *European Medicine Agency* (EMA), o tratamento recomendado para doentes com CPNPC com fusão *RET* positiva e não tratados previamente com inibidores *RET* são o *selpercatinibe* e o *pralsetinib* (33).

➤ *Human Epidermal Receptor 2 (HER2/ERBB2)*

O gene *HER2/ERBB2* codifica para a proteína *HER2* que pertence à família de recetores de fator de crescimento epidérmico. A alteração genética no *HER2/ERBB2* pode resultar na dimerização constitutiva e ativação a jusante da via de sinalização que leva ao descontrolo da proliferação celular (22) e pode ser causada por mutações, amplificações e sobreexpressão da proteína (definida com *score* de expressão 3+ em IHQ). As mutações são habitualmente inserções ou pontos de mutação no exão 20 e encontram-se em aproximadamente 1-3% dos CPNPC, principalmente em ADC e em mulheres jovens, não fumadoras. As amplificações e a sobreexpressão no *HER2* são detetadas em 2-5% e 2-4% respetivamente no cancro do pulmão (15,22,38), sendo que as amplificações parecem ser mais frequentes em homens ex-fumadores (15).

Relativamente à terapia alvo *ERBB2*, continuam a decorrer ensaios clínicos que consideram cada uma das alterações uma entidade individual e com diferentes alvos moleculares (22,38).

➤ *Mesenchymal Epithelial Transition (MET)*

O *MET* é um protooncogene que codifica para um recetor de tirosina cinase para o fator de crescimento hepatócito, com domínio extracelular, transcelular, justamembranar e domínio cinase (38). O domínio intracelular justamembranar da proteína é codificado pelo exão 14 e contém elementos reguladores que promovem a degradação da proteína *MET* (15).

A desregulação do *MET* pode ocorrer por mecanismos oncogénicos, nomeadamente: sobreexpressão, amplificação e mutações *skipping* no exão 14 (15,23,38). As mutações no gene *MET* que causam *skipping* do exão 14, resultam num recetor mutado com sinal aumentado e potencial oncogénico, devido à perda da porção do domínio justa membranar (15). A mutação *skipping* do exão 14 do gene *MET* pode ser detetada em menos de 5% dos CPNPC (9,22) e parece afetar mais a população caucasiana, mais velha (acima dos

70 anos) e fumadores (15). As amplificações *MET* ocorrem mais em ADC e estão associadas a mecanismos de resistência adquirida a TKI-*EGFR*(15).

Nas recomendações da EMA, para doentes com mutações *skipping* do exão 14 no gene *MET* e com tratamento prévio com imunoterapia e quimioterapia baseada em platina, estão referenciados dois agentes inibidores *MET* – *capmatinib* e *tepotinib* (33).

As alterações no gene *MET* predizem para melhor prognóstico (15), dado a existência de inibidores *MET*.

1.6. Terapia Personalizada

A par de alterações moleculares específicas, ocorreram nas últimas décadas desenvolvimentos de novas terapias alvo, que permitiram uma abordagem personalizada, aumentando consideravelmente a sobrevida e qualidade de vida dos doentes. A Figura 9 representa esquematicamente a grande evolução na área das terapêuticas para o cancro do pulmão até 2020. No entanto, encontram-se permanentemente em aprovação novos fármacos pela EMA e INFARMED.

A tradicional quimioterapia citotóxica tem vindo a ser substituída por tratamentos dirigidos e definidos em *guidelines* da NCCN, da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), da ESMO e da IASLC de acordo com a classificação dos CPNPC (6).

A identificação das mutações somáticas no CPNPC é fundamental para a prescrição de terapia com TKI e também para conhecer a base molecular da resistência aos fármacos e encontrar atempadamente o reajustamento da terapia (22).

A decisão terapêutica para aplicação da medicina personalizada é baseada no diagnóstico histológico e nas características moleculares e genéticas do tumor, tendo em atenção o estado clínico do doente e as comorbilidades associadas. A heterogeneidade tumoral, constitui um importante desafio para a decisão terapêutica, nomeadamente neste tipo de patologia, em que a compreensão das lesões precursoras tumorais e da sua origem celular é relevante na classificação, no prognóstico e na decisão terapêutica (26).

A classificação da OMS de 2021 para os cancros do pulmão, recomenda a utilização por rotina de testes moleculares para pesquisa de mutações / fusões no *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF V600E*, *NTRK1-3*, *RET*, da expressão dos genes *KRAS* e *MET* e a pesquisa da PD-L1 por IHQ (11). A mesma abordagem faz o *College of American Pathologists* (CAP), a *Association of Molecular Pathology* (AMP) e a IASLC, que recomendam também painéis de sequenciação genética, com os genes *BRAF*, *RET*, *ERBB2*, *KRAS* e *MET*, como forma de identificar possíveis opções de tratamento (21). As mutações ativadoras *EGFR*, os rearranjos *ALK* e *ROS-1* representam as *hallmarks* preditivas de uma boa resposta ao tratamento com TKI no ADC (20).

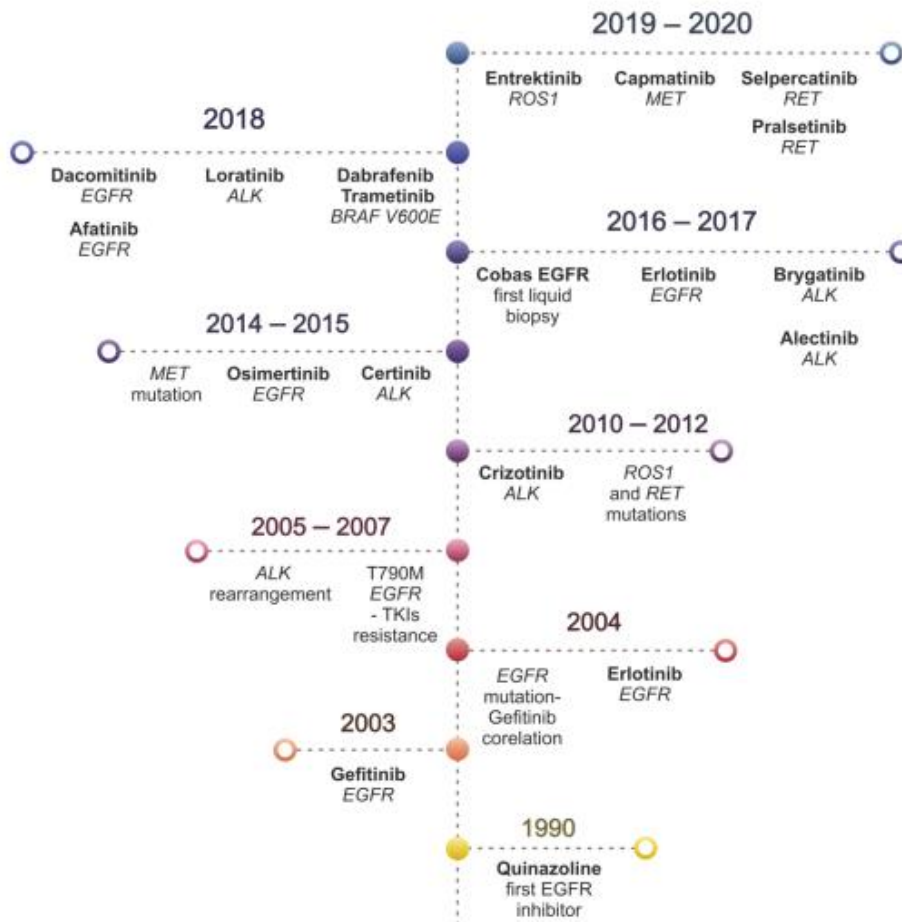


Figura 9 - Evolução das terapias alvo no CPNPC, particularmente na última década, aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA). Adaptado de Rodak et al (39).

Estudos evidenciam as vantagens efetivas e económicas de se testarem alterações genómicas utilizando um painel com tecnologia *Next Generation Sequencing* (NGS), ao invés de abordagens que requerem maior quantidade de amostra de tecido e que implicam frequentemente o recurso a nova colheita (36). A NGS é uma tecnologia de sequenciação massiva ou de alta *performance*, que permite a amplificação de um painel de genes pré-definidos num grande número de amostras e numa única reação (10). É muito utilizada na prática clínica, com o intuito de detetar alterações moleculares como mutações, mudanças na cópia dos genes e rearranjos, e assim, diagnosticar e selecionar os doentes elegíveis para terapia com TKI (10) em CPNPC, nomeadamente nos ADC.

A utilização do NGS em tumores sólidos implica a existência de amostras com quantidade suficiente de células, que permitam obter quantidade de ácidos nucleicos suficientes, e com qualidade, para que a testagem molecular seja possível. Por outro lado, a utilização de NGS em amostras de tecido, para deteção de mutações clinicamente relevantes no ADC do pulmão, tem maior sensibilidade que a utilização em amostras de plasma, e daí a utilização de tecidos ser preferencial para avaliação do perfil molecular (40).

1.7. Imunoterapia

No campo da imuno-oncologia, o conhecimento do papel dos *checkpoints* imunológicos na regulação da imunidade das células T facilitaram o desenvolvimento de ICI para o tratamento de câncros, incluindo o CPNPC avançado, sem alterações moleculares e sem outras opções de tratamento (41). Ao bloquearem a interação PD-1/PD-L1, os anticorpos monoclonais alvo PD-1 ou PD-L1, impedem a imunossupressão tumoral e promovem um aumento na sobrevida, para além de apresentarem toxicidade reduzida, comparando com a quimioterapia estandardizada (41,42).

Gradualmente têm sido aprovados anticorpos anti PD-L1, como o *Atezolizumab* e o *Durvalumab* e anticorpos PD-1, como o *Nivolumab* e o *Pembrolizumab*, com eficácia clínica no tratamento do CPNPC avançado (41). No entanto, é fundamental referenciar os doentes que podem beneficiar dos ICI, dado nem todos responderem aos tratamentos, os quais são caros e estão frequentemente associados a reações adversas (43).

Sendo a biópsia o *gold standard* para o diagnóstico anatomopatológico (6), a utilização da histologia é a base de estudo para a deteção e avaliação da expressão proteica da PD-L1 pela IHQ (27,42–44).

A utilização de diferentes testes de IHQ e a aplicação de diferentes critérios de análise, podem contribuir para resultados diferentes, pelo que, sem estandardização de procedimentos e de metodologias, a comparação dos resultados de diferentes biomarcadores é limitativo e pode ser incorreto, não beneficiando os doentes (44).

O *Pembrolizumab*, foi a primeira monoterapia aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para CPNPC metastático, conjuntamente com o diagnóstico complementar pela IHQ com o anticorpo anti-PD-L1, clone 22C3 *pharm DX test* (*Agilent*, Santa Clara, CA, EUA). O anticorpo anti PD-L1, clone 22C3 é um teste qualitativo, cuja expressão da PD-L1 é determinada pelo índice de proporção do tumor (ou *Tumor Proportion Score* - TPS), o qual representa a percentagem de células tumorais com marcação da membrana independentemente da intensidade (43). Considera-se que há expressão quando o TPS $\geq 1\%$ e que a expressão é elevada quando o TPS $\geq 50\%$.

Desta forma, a elegibilidade dos doentes com CPNPC avançado, está relacionada com a avaliação da expressão proteica da PD-L1 nas células tumorais, a qual é amplamente aceite como biomarcador preditivo da eficácia dos ICI (27). Assim, doentes com elevada expressão da PD-L1 (TPS $\geq 50\%$) podem beneficiar do *Pembrolizumab* como tratamento de primeira linha em monoterapia (27,45,46). No entanto, este biomarcador preditivo também é útil na identificação de doentes com CPNPC metastático com níveis de expressão mais baixa (TPS $\geq 1\%$) em que o *Pembrolizumab* é utilizado em combinação com quimioterapia (41,42,46).

Outros fatores podem estar associados ao tratamento com os ICI. A TMB referente ao número de mutações somáticas encontradas por sequenciação do DNA da amostra tumoral, pode ser um potencial indicador de terapia *checkpoint* (45). Porém as *guidelines* da NCCN em 2020, com base em dados de

ensaios clínicos e outras questões não especificadas, descartaram a TMB como biomarcador imunológico emergente para doentes com CPNPC metastizado (25).

Uma história de cancro do pulmão sem identificação de hábitos tabágicos parece estar associada a uma menor eficácia de ICI (33).

2. Objetivo

Este estudo teve como objetivo a caracterização molecular dos casos de CPNPC do Centro Hospitalar de Leiria (CHL), no período de 2017 a 2022, aferindo a prevalência de biomarcadores preditivos para terapêuticas específicas.

Para além do estudo do perfil de alterações genéticas que constituem biomarcadores preditivos de resposta a terapias dirigidas, foi efetuada a avaliação dos níveis de expressão proteica PD-L1 usando o *score* TPS (%) e taxa de sobrevivência global.

Pretende-se assim conhecer as características dos doentes com CPNPC de estadió avançado, relativamente às alterações somáticas moleculares e da expressão proteica PD-L1, num período de grandes avanços técnicos e científicos e propostas terapêuticas emergentes.

3. Métodos

3.1. Metodologia do Estudo

Neste estudo observacional retrospectivo efetuaram-se:

- Consulta dos relatórios anatomopatológicos de biópsias de doentes cujo diagnóstico histopatológico, realizado no Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do CHL, no período de 2017 a 2022, revelou CPNPC;
- Consulta dos processos clínicos correspondentes aos doentes com diagnóstico histopatológico de CPNPC, para identificação de doentes em estadio IV;
- Consulta dos relatórios com resultados de IHQ para a expressão da PD-L1, de doentes com diagnóstico histopatológico de CPNPC de estadio IV;
- Consulta dos relatórios de estudo molecular, por NGS, de doentes com diagnóstico histopatológico de CPNPC de estadio IV.

A consulta dos processos clínicos e dos relatórios apenas foi iniciada após aprovação pela Comissão de Ética, do Centro de Investigação e do Conselho de Administração da Instituição CHL. Os dados foram anonimizados e obedeceram às normas de confidencialidade exigidas pela Comissão de Ética do CHL.

Foram selecionados para o estudo, casos de CPNPC com material histológico de biópsia colhido por broncofibroscopia, por colheita transtorácica e/ou por toracoscopia guiada por TAC. O diagnóstico histopatológico de CPNPC foi efetuado no SAP do CHL, em doentes seguidos na consulta de Pneumologia Oncológica do CHL.

Os estudos moleculares e/ou imunohistoquímicos da expressão PD-L1 dos casos de CPNPC em estadio IV foram efetuados no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), um laboratório de referência nacional para o estudo anatomopatológico e molecular de casos de cancro do pulmão.

Para a seleção de casos de CPNPC em estadio IV foram aplicados os seguintes critérios de inclusão:

- Diagnóstico anatomopatológico disponível de CPNPC com estadio clínico IV, no período de 2017 a 2022 no SAP do CHL;
- Estudo molecular e/ou da expressão proteica da PD-L1 disponíveis;
- Doentes seguidos na consulta de Pneumologia Oncológica do CHL.

Os casos de CPNPC em estadio IV foram retirados do estudo, de acordo com os seguintes critérios de exclusão:

- Diagnóstico anatomopatológico de CPNPC cuja amostra histológica foi considerada insuficiente para estudo molecular e/ou para estudo de expressão proteica da PD-L1;
- Ausência de informação no processo clínico relativa aos estudos moleculares e/ou da expressão PD-L1;
- Doentes com mais que um cancro;

- Doentes que não iniciaram tratamento;
- Doentes com diagnóstico anatomopatológico de CPNPC efetuado no SAP do CHL, mas que foram seguidos noutra hospital.

Foram analisados os perfis das mutações acionáveis e da expressão da PD-L1 e a abordagem terapêutica de acordo com o preconizado pela instituição e registado em documento interno codificado pelo Gabinete da Qualidade. Foi ainda analisada a taxa de sobrevivência global, considerando a data do diagnóstico histopatológico e a ocorrência do evento morte do doente, inserido na seleção feita neste estudo e alvo de alguma abordagem terapêutica, ou a data do fim do estudo.

Não foram analisados no estudo os fármacos disponibilizados a cada doente com CPNPC estadio IV; nem a resposta à terapêutica pelos critérios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), que são critérios imagiológicos, nem o tempo livre de progressão da doença (ou PFS – *Progression free survival*). A taxa de recidiva também não foi analisada dado o período do estudo ser de apenas 6 anos.

3.2. Centros de Referência

No CHL, os testes moleculares – pelo método NGS – e a IHQ para pesquisa da expressão PD-L1, são feitos no IPATIMUP, que é um centro de referência. A Unidade de Patologia Molecular do IPATIMUP é acreditada pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) ISO 15189 – Exames Clínicos – e o Laboratório de Patologia e Citologia possui ainda a acreditação pelo CAP.

Na técnica molecular foi utilizado o painel *OncoPrint™ Focus Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)* para pesquisa de mutações e rearranjos dos genes nos casos diagnosticados com CPNPC, pela técnica de nova geração em ADN e ARN obtidos a partir da amostra do tumor. No relatório é descrito o controlo morfológico relativo à representatividade do tumor, em percentagem de células neoplásicas e dado o resultado das alterações moleculares detetadas.

A técnica IHQ foi feita em equipamento automatizado *BenchMark™XT Ventana Medical System (Roche, Oro Valley, Arizona, EUA)* com um protocolo adaptado ao equipamento. Foi usado o anticorpo PD-L1, clone 22C3 *pharma DX test (Agilent, Santa Clara, CA, EUA)* para identificar os doentes capazes de responder à imunoterapia. Conjuntamente, para atestar a fidelidade e fiabilidade do protocolo e dos reagentes, foram usados controlos positivos e controlos negativos. Na descrição microscópica do relatório é avaliada a qualidade da amostra – aceitável ou não –, sendo considerada positiva, a marcação parcial ou completa da membrana das células tumorais independentemente da intensidade. Marcação de citoplasma de células tumorais, de células imunes e áreas de necrose não são incluídas na avaliação. A percentagem de células tumorais marcadas é quantificada em toda a lâmina como TPS < 1%, TPS 1–49 % e TPS ≥ 50%.

3.3. Base de Dados

Os dados recolhidos, foram sistematizados numa base de dados construída no programa *Excel*. As informações foram obtidas através de relatórios de diagnósticos anatomopatológicos, de relatórios de estudos por IHQ para a expressão PD-L1, de relatórios de estudos moleculares e de processos clínicos.

Neste estudo foram recolhidos os seguintes dados dos doentes com CPNPC avançado selecionados:

- Idade;
- Género;
- Hábitos tabágicos;
- Diagnóstico anatomopatológico (tipo histológico);
- Estadio da doença;
- Locais das metástases (contabilizadas as cinco mais frequentes);
- Alterações moleculares detetadas;
- Resultado do *score* TPS para a expressão PD-L1.

Os resultados da expressão proteica PD-L1 foram apresentados de acordo com a classificação TPS (percentagem de células tumorais com expressão proteica PD-L1), estando divididos em três intervalos de expressão: TPS < 1 (negativo), TPS 1 – 49% e TPS ≥ 50%.

Na consulta dos relatórios dos estudos moleculares, foram selecionadas as mutações potencialmente acionáveis para terapêutica alvo disponível, com resposta favorável e espectável.

Outro dado recolhido foi o tempo de resposta à terapia aplicada: quimioterapia, imunoterapia em monoterapia ou imunoterapia combinada e terapia alvo. Este dado foi recolhido apenas para perceber a evolução na abordagem terapêutica, no período em estudo, enquanto influência na sobrevivência destes doentes.

Para cálculo da taxa de sobrevivência global, foi considerada como início, a data do diagnóstico histopatológico e como fim, o último dia do último mês do ano de 2022 ou a data do óbito.

3.4. Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada com o programa estatístico SPSS versão 29.0 (IBM^R SPSS^R *statistics*). Os resultados são apresentados em percentagem ou em médias.

Foi aplicada análise estatística descritiva aos casos selecionados para o estudo e correspondentes a doentes com CPNPC estadio avançado, relativamente às características epidemiológicas, ao tipo histológico e às alterações moleculares e/ou da expressão PD-L1. Foi feita a análise e comparação das diferentes informações aplicando o teste Qui-quadrado – teste exato de *Fisher* e *t-test*, quando adequado. Foram efetuadas análises de associação entre as diferentes variáveis em estudo, nomeadamente idade, género, hábitos tabágicos e a correlação com as alterações moleculares e/ou da

expressão PD-L1. O resultado das análises em que o teste tem resultado de valor $p < 0,05$ é considerado como tendo significância estatística.

A taxa de sobrevivência global foi analisada, considerando a data do diagnóstico histopatológico e o último dia do último mês do último ano do estudo dos doentes com CPNPC avançado e que iniciaram tratamento, ou até à data do óbito por qualquer motivo.

4. Resultados

No período entre 2017 e 2022, foram diagnosticados 259 casos de CPNPC aos quais foram pedidos estudos moleculares e/ou da expressão proteica PD-L1. Após a seleção dos CPNPC de estadios IV e a aplicação dos critérios de exclusão foram selecionados 110 casos.

A maioria dos doentes selecionados eram do género masculino (61%), com uma razão de 1,5 homens para cada caso diagnosticado em mulheres.

Os doentes diagnosticados com CPNPC tinham uma mediana de idades de 65 anos, em que a idade do doente mais novo era de 37 anos e a do mais velho de 88 anos (Tabela 2).

Relativamente aos hábitos tabágicos, 33% dos doentes com CPNPC eram não fumadores e 67% eram fumadores ou ex-fumadores. Como não existem critérios claros que definam tempo a partir do qual o doente é considerado ex-fumador, os doentes com CPNPC fumadores e ex-fumadores foram englobados no mesmo grupo. Em nove dos 110 doentes a informação relativa aos hábitos tabágicos era omissa (Tabela 2).

Dos 110 casos de CPNPC em estadio IV, 84% foram classificados histologicamente como adenocarcinomas, 14% como carcinomas epidermóides e 3% em que não foi possível determinar a sua classificação histológica (Tabela 2).

Em 58% dos doentes foram registadas metástases à distância, nomeadamente metástases ósseas com 39%, seguidas das cerebrais, hepáticas e na suprarrenal, presentes em 21%, 12% e 5% dos doentes respetivamente. Adicionalmente, foi detetado derrame pleural em 29% dos doentes (Tabela 2). Além destas, foram ainda identificadas metástases ganglionares, cutâneas, pericárdicas e pulmonares. Porém, neste estudo apenas se contabilizaram as cinco metástases mais frequentes, pelo que, o facto de em 10 doentes não terem sido registadas metástases, tal não significa inexistência das mesmas. Por outro lado, em 23 doentes identificaram-se mais que uma das metástases mais frequentes.

Dos 110 casos de CPNPC em estadio IV selecionados para o estudo, 74 casos tinham disponíveis os resultados do estudo molecular e da expressão da PD-L1, 26 casos tinham apenas disponível o resultado do estudo molecular efetuado e 10 casos tinham apenas disponível o resultado do estudo da expressão da PD-L1.

No total dos 100 casos com CPNPC estadio IV com estudo molecular, foram detetadas alterações moleculares em 64, 89% tinham a informação de hábitos tabágicos disponível, sendo 48% e 41% correspondentes a fumadores e não fumadores, respetivamente. Quanto ao género, foram detetadas mais mutações no género feminino que no masculino, numa percentagem de 55% e 45% respetivamente (Tabela 3).

Tabela 2 – Características clínico patológicas de doentes do CHL, com CPNPC em estadio IV

| | | N (%) |
|------------------------------|---------------------------------|--------------|
| Idade (mediana, anos) | | 65 (37 - 88) |
| Género | | |
| | Masculino | 67 (61) |
| | Feminino | 43 (40) |
| Diagnóstico | | |
| | Adenocarcinoma | 92 (84) |
| | Carcinoma Epidermóide | 15 (14) |
| | CPNPC sem outra classificação | 3 (3) |
| Hábitos Tabágicos | | |
| | Não Fumadores | 33 (33) |
| | Fumadores (inclui ex-fumadores) | 68 (67) |
| Metástases* | | |
| | Derrame Pleural | 32 (29) |
| | Óssea | 43 (39) |
| | Hepática | 13 (12) |
| | Cerebral | 23 (21) |
| | Suprarrenal | 6 (5) |

N – Número de doentes

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

*Indica as metástases mais frequentes. Cada doente pode ter mais que uma metástase ou não ter nenhuma das consideradas mais frequentes

Considerando os casos de CPNPC em estadio IV e com estudo molecular, verificou-se que 31% e 21% mostraram positividade para o *EGFR* e *KRAS*, respetivamente (Tabela 3). Quanto às variantes no gene *EGFR*, verificou-se a prevalência de 21% de deleções no exão 19, 9% de mutações no exão 21 e 3% de mutações no exão 20. Adicionalmente, 4 casos apresentaram a variante *EGFR* T790M, sendo estes referentes ao período entre 2017 e 2020. Porém, até ao momento a terapêutica alvo aplicada para as variantes *EGFR* exão 19 e exão 21 é a mesma, pelo que se considerou no geral a alteração molecular *EGFR* – com exceção para o exão 20 (Tabela 3).

Mutações mais raras ocorreram nos casos de CPNPC em estadio IV e com estudo molecular, nomeadamente 5% dos casos apresentavam mutações no exão 14 (*skipping*) do gene *MET*, 3% dos casos com mutações no gene *ERBB2* e 4%, 3% e 1% com rearranjos nos genes *ALK*, *ROS1* e *RET*, respetivamente.

Tabela 3 – Alterações moleculares em doentes do CHL, com CPNPC em estadio IV, com estudo molecular

| | | N (%) |
|-------------------------------------|---------------------------------|-----------|
| Doentes com estudo molecular | | 100 (100) |
| Alteração molecular | | |
| | <i>EGFR</i> | 31 (31) |
| | Exão 19 | 21 (21) |
| | Exão 20* | 3 (3) |
| | Exão 21 | 9 (9) |
| | T790M** | 4 |
| | <i>KRAS</i> | 21 (21) |
| | <i>MET</i> | 5 (5) |
| | <i>ALK</i> | 4 (4) |
| | <i>ROS-1</i> | 3 (3) |
| | <i>ERBB2</i> | 3 (3) |
| | <i>RET</i> | 1 (1) |
| Género | | |
| | Masculino | 29 (45) |
| | Feminino | 35 (55) |
| Hábitos Tabágicos | | |
| | Não Fumadores | 26 (41) |
| | Fumadores (inclui ex-fumadores) | 31 (48) |
| | Sem Informação | 7 (11) |

N – Número de doentes

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

*Apenas 1 doente só com a variante no exão 20

**Associada ao exão 19

A presença de mutações *KRAS* em casos de CPNPC em estadio IV estavam associadas, de forma estatisticamente significativa, aos doentes do sexo masculino, fumadores e ex-fumadores ($p = 0.035$) com uma percentagem de 57%, correspondendo 24% das mutações *KRAS* a doentes do sexo feminino fumadoras e ex-fumadoras. Refira-se que um doente do sexo masculino não tinha informação dos hábitos tabágicos (Tabela 4).

Contrariamente à presença de mutações *KRAS*, a presença de mutações *EGFR* em CPNPC em estadio IV estavam associadas, de forma estatisticamente significativa, a doentes do sexo feminino e não fumadores ($p < 0.001$), com 52% dos casos, comparativamente com 6% correspondentes a doentes do sexo masculino não fumadores. Em 16% dos casos de CPNPC estadio IV, não foi possível obter a informação dos hábitos tabágicos (Tabela 4).

Tabela 4 – Prevalência das mutações *EGFR* e *KRAS* nos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV

| Variáveis | Doentes selecionados com CPNPC estadio IV (n = 110) | | | |
|--|---|---------|-------------|---------|
| | EGFR N/% | Valor p | KRAS N/% | Valor p |
| Sexo / Hábitos Tabágicos | | | | |
| Masculino / Não Fumadores | 2 (6) | | 1 (5) | |
| Masculino / Fumadores (inclui ex-fumadores) | 7 (23) | | 12 (57) | 0.035 |
| Masculino / Sem informação | 1 (3) | | 1 (5) | |
| Feminino / Não Fumadoras | 16 (52) | < 0,001 | 2 (9) | |
| Feminino / Fumadoras (inclui ex-fumadoras) | 1 (3) | | 5 (24) | |
| Feminino / Sem informação | 4 (13) | | | |

N – Número de doentes

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

Nas restantes alterações moleculares encontradas, nomeadamente *ALK*, *ROS1*, *RET*, *MET* e *ERBB2*, não se encontrou significância estatística relativa a hábitos tabágicos, idade e género, provavelmente devido ao reduzido número de casos.

As alterações moleculares foram maioritariamente detetadas em ADC. Houve apenas um caso diagnosticado de CCE onde foi detetada uma mutação no gene *MET*, e um caso CPNPC sem classificação de subtipo histológico, onde foi detetada uma mutação *EGFR* (exão 19).

O principal interesse clínico para a identificação das alterações moleculares são as que têm terapia alvo aprovada pelas entidades nacionais e disponíveis. No caso de ser identificada mais que uma mutação, privilegia-se a que tem terapia alvo ou seguem-se as indicações das *guidelines* internacionais, nomeadamente a quimioterapia ou quimioterapia e imunoterapia.

À data do trabalho, os doentes com CPNPC avançado elegíveis para terapia alvo são todos os que apresentem positividade para *EGFR* (exão 19 e 21), translocações *ALK* e *ROS1* e que apresentem *performance status* e comorbilidades, compatíveis com a realização de tratamento oncológico dirigido.

A identificação e acompanhamento destes doentes mostrou benefícios, relativamente aos doentes com CPNPC avançado que abrigam outras mutações cujas opções terapêuticas são limitadas ou ainda não disponíveis no período de tempo selecionado para este estudo.

A análise dos casos em estudo mostrou que a sobrevida nos doentes com mutações *EGFR* (exão 19 e exão 21) foi em média de 18 meses, com um mínimo de 2 meses e um máximo de 54 meses e em que, apenas 5 doentes tiveram uma sobrevida igual ou inferior a 6 meses (Tabela 5).

Tabela 5 – Sobrevida dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV e com alterações moleculares acionáveis e não acionáveis para terapia alvo

| | Sobrevida (M) | | | Vivos (N) |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|-----------|
| | Terapia Alvo | Imunoterapia + Quimioterapia | Quimioterapia | |
| Com Terapia Alvo | | | | |
| <i>EGFR</i> (Exão 19 e 21) | 18* | 21 | | 12 |
| <i>ALK</i> | 5,6 | | | 1 |
| <i>ROS1</i> | 27 | | | 2 |
| Sem Terapia Alvo | | | | |
| <i>KRAS</i> | | 10,4 | 7,1 | 4 |
| <i>MET</i> (exão 14 <i>skipping</i>) | | 15,5 | 9 | |
| <i>ERBB2</i> | | | 4 | 1 |
| <i>RET</i> | | 22 | | |

N = Número de doentes; M = Meses

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

* Apenas 5 doentes com sobrevida menor ou igual a 6 meses

Os doentes com CPNPC estadio IV com mutação no exão 20 do gene *EGFR* estavam, à altura do estudo, com uma má resposta previsível à terapia alvo *Osimertinib*, contrariamente aos bons resultados com os doentes CPNPC estadio IV com as variantes no exão 19 e no exão 21 do gene *EGFR*, pelo que ficaram excluídos do grupo das mutações acionáveis. Refira-se que, dos três doentes com CPNPC estadio IV identificados com a mutação no exão 20 do gene *EGFR*, apenas um doente tinha só esta mutação, sendo que os outros dois tinham: um, outra mutação acionável para a qual foi tratado com terapia alvo, e o outro uma segunda mutação também não acionável.

Relativamente à avaliação da expressão da PD-L1 nos casos de CPNPC estadio IV, esta incidiu mais em fumadores que em não fumadores. Verificou-se também que, quer no género feminino, quer no masculino a expressão negativa da PD-L1 é a mais prevalente. Foram classificados com o *score* TPS 1 – 49% e com o *score* TPS \geq 50%, 30% e 26% dos doentes com estudo IHQ da PD-L1, respetivamente (Tabela 6).

O uso da quimioterapia, os ICI, a combinação terapêutica de quimioterapia e ICI, eram à data do estudo, os principais tratamentos para doentes com CPNPC avançado com expressão da PD-L1 e sem mutações potencialmente acionáveis, baseados nas *guidelines* internacionais e na aprovação dos fármacos pela FDA, pela EMA e pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED). Atualmente, só os doentes com CPNPC estadio IV com contraindicações para a imunoterapia ou combinação de quimioterapia com imunoterapia, são tratados apenas com quimioterapia. O principal

interesse clínico é identificar os doentes capazes de beneficiar das melhores abordagens terapêuticas e ganhar em qualidade de vida e em sobrevida.

Tabela 6 – Características dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV, com estudo da expressão PD-L1

| | | Expressão PD-L1 | | | Total N (%) |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|
| | | < 1 % N (%) | 1 – 49 % N (%) | ≥ 50 % N (%) | |
| | | 37 (44) | 25 (30) | 22 (26) | 84 (100) |
| Género | | | | | |
| | Masculino | 23 (40) | 18 (31) | 16 (28) | 57 (68) |
| | Feminino | 14 (52) | 7 (26) | 6 (22) | 27 (32) |
| Hábitos Tabágicos | | | | | |
| | Não Fumadores | 8 (35) | 11 (48) | 4 (17) | 23 (27) |
| | Fumador (inclui ex-fumadores) | 25 (44) | 14 (25) | 18 (32) | 57 (68) |
| | Sem Informação | | | | 4 (5%) |
| Subtipo Histológico | | | | | |
| | Adenocarcinoma | 32 (46) | 21 (30) | 17 (24) | 70 (83) |
| | Carcinoma Epidermoide | 5 (38) | 3 (23) | 5 (38) | 13 (15) |
| | CPNPC sem outra classificação | | 1 (8) | | 1 (1) |

N = Número de doentes

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

Nos casos com estudo IHQ da PD-L1 verificou-se que a sobrevivência dos doentes com *score* TPS ≥50%, tratados com ICI em monoterapia ou com a combinação quimioterapia e ICI, foi o dobro em comparação com os outros níveis de expressão, sendo de 20,1 meses e 10,8 meses respetivamente (Tabela 7).

Se for analisada a sobrevida dos doentes com CPNPC avançado do CHL em meses, é também evidente o benefício dos doentes em que foram identificadas mutações acionáveis, comparativamente aos doentes para os quais ainda não existe terapia alvo, em que 4% dos doentes atingiram uma sobrevida superior a 48 meses.

Relativamente aos doentes com CPNPC avançado com a expressão da PD-L1 ≥ 50%, os quais foram elegíveis para tratamento com ICI em monoterapia, foram 15 % os que tiveram uma sobrevida superior a 36 meses, comparativamente com os doentes com CPNPC avançado e expressão da PD-L1 < 50% em que apenas 3% alcançaram uma sobrevida igual ou superior a 24 meses (Tabela 8).

Tabela 7 – Sobrevida dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV, com estudo da expressão da PD-L1 e sem mutações acionáveis para terapia alvo

| | Sobrevida (Meses) | | Vivos (N) |
|-------------------------------|--|---------------|-----------|
| | Imunoterapia ou Imunoterapia + Quimioterapia | Quimioterapia | |
| PD-L1 ≥ 50 % | 20,1 | 7,5 | 7 |
| PD-L1 < 1% e PD-L1 ≥ 1% – 49% | 10,8 | 7,8 | 9 |

N = Número de doentes

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

Tabela 8 – Sobrevida em meses dos doentes do CHL, com CPNPC estadio IV

| Sobrevida (M) | Com Mutações acionáveis (N/%) | Sem Mutações acionáveis (N/%) |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | < 12 | 12 (52) |
| ≥ 12 | 6 (26) | 5 (24) |
| ≥ 24 | 2 (9) | 1 (5) |
| ≥ 36 | 2 (9) | 1 (5) |
| ≥ 48 | 1 (4) | |
| Vivos | 15 | 5 |

| Sobrevida (M) | PD-L1 ≥ 50% (N/%) | PD-L1 < 50% (N/%) |
|---------------|-------------------|-------------------|
| | < 12 | 5 (39) |
| ≥ 12 | 4 (31) | 7 (22) |
| ≥ 24 | 2 (15) | 1 (3) |
| ≥ 36 | 2 (15) | |
| Vivos | 7 | 10 |

M – Meses; N – Número de doentes

CHL – Centro Hospitalar de Leiria

CPNPC – Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

5. Discussão

Nos últimos anos assistiu-se ao desenvolvimento tecnológico com avanços significativos na caracterização de tumores. A testagem de biomarcadores para a identificação dos subgrupos de CPNPC com alterações em oncogenes *drivers* potencialmente acionáveis para terapia alvo, permite a elegibilidade dos doentes com CPNPC avançado para as novas abordagens terapêuticas personalizadas (33). Atualmente estão identificadas as características epidemiológicas, quer dos doentes diagnosticados com CPNPC, quer da prevalência das alterações moleculares da doença, registando os vários estudos científicos diferenças entre população ocidental e asiática (15). O facto de apenas 10 a 15% dos novos casos diagnosticados com CPNPC se encontrarem num estadio clínico precoce, implica que a abordagem aos casos avançados seja criteriosa e acompanhe as *guidelines* internacionais, quer em termos de diagnóstico histológico, quer da caracterização molecular e da expressão da PD-L1, para posterior aplicação das terapias alvo, imunoterapia e quimioterapia ou combinação de terapêuticas (10).

O CHL abrange uma população de 400.000 habitantes e é constituído por três Hospitais: o Hospital de S. André, em Leiria, o Hospital Distrital de Pombal e o Hospital Bernardino de Oliveira em Alcobaça. Tem um Serviço de Pneumologia Oncológica e um Serviço de Anatomia Patológica através dos quais pretende providenciar aos doentes o melhor diagnóstico e o melhor benefício terapêutico.

A classificação da OMS de 2021 para cancro do pulmão, recomenda a utilização por rotina de testes moleculares e pesquisa da expressão proteica PD-L1 por IHQ. Por essa razão, a partir do ano 2020, todos os doentes com CPNPC estadio IV do CHL passaram a efetuar o estudo de alterações moleculares e o estudo da expressão proteica PD-L1, sendo que os 10 doentes sem estudo molecular e os 26 doentes sem estudo da expressão proteica PD-L1, dos 110 casos selecionados, correspondem ao período anterior ao ano de 2020.

Nos casos de doentes diagnosticados com CPNPC avançado no CHL, o subtipo mais comum é o ADC, o que é coincidente com o descrito na literatura (7,8,15,22,23).

A mediana da idade encontrada nos doentes com CPNPC estadio IV deste estudo foi de 65 anos, e está de acordo com o descrito para a população portuguesa (47). A incidência do cancro do pulmão abaixo dos 40 anos é considerada baixa, porém, aumenta gradualmente até atingir um pico de incidência entre os 65 e os 84 anos, com 90% dos diagnósticos e mortes a acontecerem depois dos 55 anos (8). Na verdade, o elevado número de mortes em pessoas abaixo dos 65 anos, classifica o cancro do pulmão como o responsável pelo maior número de anos de vida perdidos e maior número de anos de vida útil perdidos (47).

O rácio de incidência entre sexos – 1,5 em homens para 1 em mulheres – é inferior ao referido no Globocan 2020, que indica um valor de 2 vezes mais alto em homens (1). Porém, encontra-se concordância na prevalência.

Na série selecionada de 110 doentes com CPNPC avançado no CHL, 31% dos casos apresentavam mutações no gene *EGFR*, maioritariamente em mulheres não fumadoras. A abordagem comparativa revelou uma prevalência aumentada do gene *EGFR*, comparativamente ao referido na literatura para a população ocidental e que varia de 10% a 20% (8,13,23) (Fig. 10). Contudo estudos também referem uma prevalência na Europa de 10% a 30% (9).

O *KRAS* é a mutação oncogénica *driver* mais frequentemente detetada no CPNPC com uma prevalência entre 20 e 40% no ADC do pulmão, sendo mais frequente em fumadores que em não fumadores (30% vs 10%) (34,38). Neste estudo as mutações *KRAS* estavam presentes em 21% dos casos de CPNPC em estadio IV, estando de acordo com o descrito na literatura (10,15,22,35). Adicionalmente, a presença de mutações *KRAS* em CPNPC em estadio IV estava associada, de forma estatisticamente significativa, aos doentes fumadores e ex-fumadores com CPNPC.

Relativamente às restantes alterações somáticas detetadas, encontram-se em concordância com o descrito na literatura, apesar da amostra ser muito pequena.

Relativamente à expressão proteica da PD-L1, a prevalência é mais elevada em tumores com estadio mais avançado. Num estudo de Skov et al, é referido que a prevalência do *score* TPS \geq 50% é mais prevalente nos ADC e nos CPNPC não especificados, que nos CCE. Referem ainda que fatores como o tipo e localização do material colhido para análise, a idade, o sexo ou hábitos tabágicos não têm impacto significativo na estratificação dos CPNPC por expressão proteica da PD-L1 (42).

Memmott et al e Velcheti et al, referem que aproximadamente um terço dos CPNPC avançado apresentam expressão PD-L1 com TPS $<$ 1% (considerado negativo), 28% a 31% apresentam expressão com *score* TPS \geq 1-49%, e 10% a 32% dos doentes apresentam *score* TPS \geq 50% (considerada expressão elevada) (43,46). Os valores encontrados neste estudo estão em conformidade com o referido na literatura.

A taxa de sobrevivência constitui parâmetro essencial na prática clínica para o tratamento do CPNPC avançado, uma vez que permite avaliar a eficácia de determinado fármaco (48). A base para a elegibilidade dos doentes para tratamento com terapia alvo, com imunoterapia ou com terapia combinada com quimioterapia, são os resultados do estudo das alterações moleculares e/ou da expressão da PD-L1.

O Serviço de Pneumologia do CHL tem elaborado protocolos de tratamento a aplicar aos doentes com cancro do pulmão, seguidos na consulta de Pneumologia Oncológica, os quais são periodicamente atualizados. O intuito é definir orientações terapêuticas, com terapia alvo ou com imunoterapia, nomeadamente para os doentes diagnosticados com CPNPC estadio IV, preferencialmente após resultado do estudo molecular e/ou da expressão da PD-L1. Refira-se que, no caso de serem doentes com doença agressiva e muito sintomática, o protocolado é um ciclo de quimioterapia antes da terapia alvo ou da imunoterapia. A decisão terapêutica dos doentes com CPNPC com estadio IV depende da sua *performance status* (estado funcional), das comorbilidades e de critérios estabelecidos internamente.

Outra variável da decisão terapêutica é a constante evolução em terapias inovadoras, sendo a abordagem feita à luz dos conhecimentos e orientações das *guidelines* mais atuais.

Os resultados do estudo permitiram encontrar diferenças de sobrevivência, avaliada em meses, nos doentes com alterações acionáveis, relativamente aos que abrigam mutações ainda sem terapia alvo.

Estes resultados demonstram a importância da necessidade de estudos moleculares, quer para o aumento da sobrevida dos doentes, quer para a sua qualidade de vida.

Com os enormes avanços científicos nesta área é igualmente importante a deteção das mutações não acionáveis, para as quais pode surgir aprovação a qualquer momento, dada a quantidade de ensaios clínicos em curso.

Foi também importante verificar a importância do estudo IHQ da deteção proteica da PD-L1 em doentes sem mutações acionáveis para terapia alvo. A sobrevivência dos doentes com CPNPC avançado com *score* elevado da expressão da PD-L1 tratados em monoterapia com o ICI, duplicou em relação aos doentes com os outros *scores*. No entanto, estes doentes com *scores* TPS < 1% e TPS ≥ 1% – 49%, também apresentaram benefício com o tratamento com imunoterapia ou com a imunoterapia combinada com quimioterapia, comparativamente ao tratamento clássico com quimioterapia.

Os resultados encontrados permitiram evidenciar e valorizar a importância da padronização dos métodos e a definição da positividade da expressão PD-L1 como biomarcador preditivo (44). Esta premissa parece salvaguardada com os procedimentos adotados quer na fase pré-analítica, quer na técnica IHQ realizada em laboratório de referência, uma vez que foram obtidos resultados da expressão da PD-L1 em todas as análises.

No período em estudo não foram encontradas análises histológicas inviáveis para estudo, ou seja, todas as amostras apresentaram boa qualidade em termos de preservação e processamento histológico. Este facto, indica o cumprimento dos parâmetros de qualidade na fase pré-analítica. A fixação com formol neutro tamponado, imediatamente após a colheita, com um tempo de isquémia fria mínima, e o processamento em equipamento automático com protocolo de biópsias otimizado, permitiu manter a integridade dos ácidos nucleicos do tumor e a antigenicidade do tecido. A quantidade habitualmente escassa de material foi salvaguardada, minimizando a utilização de técnicas desnecessárias – de cada bloco histológico apenas é feita uma lâmina para hematoxilina-eosina. A IHQ é feita sempre que há necessidade para classificação do subtipo histológico para diagnóstico. Estes são critérios defendidos pela literatura (7,21).

A premissa de standardização das metodologias é garantir resultados fiáveis e capazes de oferecer ao oncologista a melhor informação para a melhor e mais eficaz abordagem terapêutica para benefício do doente.

Uma das limitações deste estudo, foi o número reduzido de doentes (tendo em conta os critérios de inclusão e de exclusão definidos), o que parece dever-se ao facto de muitos doentes terem diagnóstico

com estudos moleculares e da expressão da PD-L1 realizados fora do CHL, mas que optaram por fazer o seu seguimento e tratamento na Pneumologia Oncológica do CHL. No início do estudo foram selecionados 259 doentes diagnosticados com CPNPC e com estudo molecular e/ou da expressão proteica da PD-L1. Critérios como diagnóstico histopatológico que não o CPNPC e estadio que não o estadio IV, amostra insuficiente, presença de mais que um tumor em simultâneo, ausência de informação no processo clínico, o não início do tratamento e o facto do doente deixar de ser acompanhado pela Instituição CHL, limitaram a seleção a apenas 110 doentes para o estudo.

Outra limitação foi a dificuldade na consulta de processos clínicos, com a ausência de alguns registos importantes, provavelmente relacionados com mudança de programas informáticos que limitaram a transferência de informação. Também a não uniformização dos registos, em parte relacionada com a especificidade da doença e dos doentes, quer em termos de comorbilidades, quer mesmo em aspetos sociais com interferência na abordagem do doente como um todo, tornou a pesquisa mais difícil.

Não foi abordada a discordância atual entre o valor da expressão da PD-L1 na lesão primária do pulmão e nas metástases, com implicações significativas no tratamento com imunoterapia nos doentes com CPNPC e que está relacionado com a heterogeneidade tumoral (20,26).

A heterogeneidade tumoral é vista de diferentes perspetivas pelo patologista (dado os diferentes padrões histológicos do tumor), pelo patologista molecular (dado as variações genéticas/moleculares e epigenéticas identificadas no tumor) e pelo oncologista (dada a relação existente entre a resposta à terapêutica e a resistência). É importante perceber que a heterogeneidade tumoral tem vindo a mudar o paradigma no sentido em que com a medicina de precisão, se considera cada doente, em cada momento da evolução da doença para um dado tratamento (26).

No CHL, a deteção de mutações em genes com terapêutica alvo permite uma abordagem clínica com o tratamento certo para o doente certo, tanto mais importante quanto o facto de se verificar um aumento do número de casos diagnosticados, nomeadamente de CPNPC, ano após ano.

Foi interessante verificar a interdisciplinaridade entre os serviços em prole do doente com CPNPC em estadio avançado. De facto, a qualidade obtida da fase pré-analítica à fase analítica, tendo em conta a urgência da resposta, permitiram obter resultados suficientemente consistentes e capazes de permitir ao clínico proporcionar ao doente, o tratamento adequado e de acordo com a sua condição física. A medicina de precisão é uma realidade que exige rigor na abordagem, qualidade nos procedimentos e fiabilidade nos resultados histopatológicos e da caracterização molecular, em cada momento da evolução da doença para um dado tratamento.

6. Conclusão

O cancro do pulmão é um problema de saúde pública. A *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), uma base estatística do estudo do cancro nos Estados Unidos alerta que 6,1% de homens e mulheres poderão ser diagnosticados com cancro do pulmão ou dos brônquios numa fase da sua vida.

Apesar de todos os avanços científicos que têm ocorrido nos últimos anos e malgrado a sobrevida dos doentes com CPNPC avançado ainda ser muito baixa, têm-se registado progressos com a utilização das terapêuticas inovadoras, como as terapêuticas alvo e a imunoterapia. Por isso, a caracterização molecular, assim como a expressão da PD-L1 destes doentes, é fundamental para a sua elegibilidade para a terapia personalizada.

O estudo dos doentes com diagnóstico histológico de CPNPC efetuado no SAP do CHL, no período de 2017 a 2022 e com estadio IV, permitiu conhecer as características epidemiológicas destes doentes nesta região geográfica em comparação com o descrito na literatura; permitiu conhecer a evolução das abordagens relacionadas com a atualização e acompanhamento das *guidelines* da OMS ao longo deste período; permitiu conhecer o benefício em termos de sobrevida, com as novas terapias dirigidas, aprovadas ao longo do período do estudo.

A investigação continua na procura de novos biomarcadores preditivos e terapias alvo capazes de melhorar não só os resultados, como o custo-efetividade no tratamento de doentes com CPNPC (29).

Estudos mostram também a capacidade de pequenas moléculas reguladoras, os microRNA, como biomarcadores (de diagnóstico e de prognóstico) em cancros como CPNPC, dado o seu aparente envolvimento na carcinogénese (49). Com base em alterações no microRNA do plasma, o cancro do pulmão pode ser previsível com 24 meses de antecedência, o que indica que um painel microRNA tem potencial para ser usado na deteção do cancro do pulmão em estadios precoces (10).

Fluídos orgânicos como sangue, expetoração e amostras de urina, têm sido estudados no sentido de detetar alterações num estadio mais precoce, continuando a biópsia a ser o *gold standard* para o estudo molecular e da expressão PD-L1 (apesar das limitações, considerando a heterogeneidade tumoral) (6).

O grande desafio é tornar o cancro do pulmão, nomeadamente o CPNPC, uma doença crónica e controlável, onde a associação da testagem correta permita uma seleção apropriada do doente de acordo com as características da sua doença, proporcionando os melhores cuidados com a correta utilização dos recursos disponíveis, onde o investimento na maior sensibilização para o *screening*, em pessoas de risco é também fundamental.

Referências Bibliográficas

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
2. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-pd1/pd-l1 immunotherapy for non-small cell lung cancer with actionable oncogenic driver mutations. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2021.
3. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. Vol. 25, *Wspolczesna Onkologia.* Termedia Publishing House Ltd.; 2021. p. 45–52.
4. Primm KM, Zhao H, Hernandez DC, Chang S. Racial and Ethnic Trends and Disparities in NSCLC. *JTO Clin Res Rep.* 2022 Aug 1;3(8).
5. Almodovar. T FAPereiraCEstevinhoFFSousaSLopesTSequeiraTToM. Associações de Imunoterapia em Doentes CPNPC em Estadio IV. Portugal P, editor. Lisboa; 2021. 1–34 p.
6. Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2021.
7. Miller R, Thorne-Nuzzo T, Loftin I, McElhinny A, Towne P, Clements J. Impact of Pre-Analytical Conditions on the Antigenicity of Lung Markers: ALK and MET. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.* 2020 May;28(5):331–8.
8. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. Vol. 94, *Mayo Clinic Proceedings.* Elsevier Ltd; 2019 Aug.
9. Alexander M, Kim SY, Cheng H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. Vol. 198, *Lung.* Springer; 2020 Dec.
10. Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki Ł, Śliwińska-Mossoń M. Genetic markers in lung cancer diagnosis: A review. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2020 Jul.
11. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. Vol. 17, *Journal of Thoracic Oncology.* Elsevier Inc.; 2022. p. 362–87.
12. Sánchez-Ortega M, Carrera AC, Garrido A. Role of NRF2 in lung cancer. Vol. 10, *Cells.* MDPI; 2021.
13. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EN. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. Vol. 157, *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* Elsevier Ireland Ltd; 2021.
14. Relli V, Trerotola M, Guerra E, Alberti S. Abandoning the Notion of Non-Small Cell Lung Cancer. Vol. 25, *Trends in Molecular Medicine.* Elsevier Ltd; 2019 Jul.
15. Fois SS, Paliogiannis P, Zinellu A, Fois AG, Cossu A, Palmieri G. Molecular epidemiology of the main druggable genetic alterations in non-small cell lung cancer. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2021. p. 1–19.
16. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. Vol. 151, *Chest.* Elsevier Inc; 2017. p. 193–203.
17. Ji M, Guan H, Gao C, Shi B, Hou P. Highly frequent promoter methylation and PIK3CA amplification in non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC Cancer.* 2011 Apr 20;11.
18. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: Roadmap for therapies. Vol. 33, *European Respiratory Journal.* 2009. p. 1485–97.
19. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021 Jan;71(1):7–33.
20. Marino FZ, Bianco R, Accardo M, Ronchi A, Cozzolino I, Morgillo F, et al. Molecular heterogeneity in lung cancer: From mechanisms of origin to clinical implications. *Int J Med Sci.* 2019;16(7):981–9.
21. Pina M, Pinto R, Domingues P, Silva S, Cirnes L. Patologia molecular em cancro do pulmão: Evolução e contributos. *Revista do Grupo de Estudos do Cancro do Pulmão [Internet].* 2020 Oct 20;17(1). Available from: https://www.gecp.pt/revistas_GECP/2020/07_Revista_GECP_17-1_Patologia_molecular_em_cancro_do_pulmao.pdf

22. Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol*. 2021 Apr 24;12(4):217–37.
23. Oberndorfer F, Müllauer L. Molecular pathology of lung cancer: Current status and perspectives. Vol. 30, *Current Opinion in Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 Mar.
24. Garon EB, Hellmann MD, Rizvi NA, Carcereny E, Leighl NB, Ahn MJ, et al. Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I KEYNOTE-001 Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019;37:2518–27. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.7889>.
25. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2022 May 1;20(5):497–530.
26. De Sousa VML, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology*. 2018 May 1;85(1–2):96–107.
27. YONEDA K, IMANISHI N, ICHIKI Y, TANAKA F. Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *J UOEH* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Jun 19];40(2):173–89. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/juoeh/40/2/40_173/_article
28. Bie F, Tian H, Sun N, Zang R, Zhang M, Song P, et al. Research Progress of Anti-PD-1/PD-L1 Immunotherapy Related Mechanisms and Predictive Biomarkers in NSCLC. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
29. Šutić M, Vukić A, Baranašić J, Försti A, Džubur F, Samaržija M, et al. Diagnostic, predictive and prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer (Nsclc) management. Vol. 11, *Journal of Personalized Medicine*. MDPI; 2021.
30. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Vol. 366, *Gene*. 2006. p. 2–16.
31. Hespanhol V. Tratamento sistémico do cancro do pulmão duas décadas de progresso – Um ponto de vista pessoal. *Revista do Grupo de Estudos do Cancro do Pulmão* [Internet]. 2020 Oct 20;17(1). Available from: https://www.gecp.pt/revistas_GECP/2020/06_Revista_GECP_17-1_Tratamento_sistemico_do_cancro_do_pulmao.pdf
32. Papini F, Sundaresan J, Leonetti A, Tiseo M, Rolfo C, Peters GJ, et al. Hype or hope – Can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC? Vol. 166, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2021.
33. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2023 Apr 1;34(4):339–57.
34. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. Vol. 41, *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2019 Mar.
35. Reck M, Carbone DP, Garassino M, Barlesi F. Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. Vol. 32, *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 1101–10.
36. Vu P, Patel SP. Non-small cell lung cancer targetable mutations: Present and future. Vol. 3, *Precision Cancer Medicine*. AME Publishing Company; 2020.
37. Drusbosky LM, Rodriguez E, Dawar R, Ikpeazu C V. Therapeutic strategies in RET gene rearranged non-small cell lung cancer. Vol. 14, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2021 Dec.
38. Rebuzzi SE, Zullo L, Rossi G, Grassi M, Murianni V, Tagliamento M, et al. Novel emerging molecular targets in non-small cell lung cancer. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1–25.
39. Rodak O, Peris-Díaz MD, Olbromski M, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P. Current landscape of non-small cell lung cancer: Epidemiology, histological classification, targeted therapies, and immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 1;13(18).

40. Lin LH, Allison DHR, Feng Y, Jour G, Park K, Zhou F, et al. Comparison of solid tissue sequencing and liquid biopsy accuracy in identification of clinically relevant gene mutations and rearrangements in lung adenocarcinomas. *Modern Pathology*. 2021 Dec 1;34(12):2168–74.
41. Xia L, Liu Y, Wang Y. PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Oncologist*. 2019 Feb 1;24(51):S31–41.
42. Skov BG, Rørvig SB, Jensen THL, Skov T. The prevalence of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer in an unselected, consecutive population. *Modern Pathology*. 2020 Jan 1;33(1):109–17.
43. Memmott RM, Wolfe AR, Carbone DP, Williams TM. Predictors of Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Lung Cancer Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. Vol. 16, *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier Inc.; 2021. p. 1086–98.
44. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 expression in lung cancer. Vol. 11, *Journal of Thoracic Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 964–75.
45. Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, Chen L, et al. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Facts and hopes. Vol. 25, *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc.; 2019. p. 4592–602.
46. Velcheti V, Patwardhan PD, Liu FX, Chen X, Cao X, Burke T. Real-world PD-L1 testing and distribution of PD-L1 tumor expression by immunohistochemistry assay type among patients with metastatic non-small cell lung cancer in the United States. *PLoS One*. 2018 Nov 1;13(11).
47. INFARMED. Vizimpro (dacomitinib) 2. 2020.
48. Goring S, Varol N, Waser N, Popoff E, Lozano-Ortega G, Lee A, et al. Correlations between objective response rate and survival-based endpoints in first-line advanced non-small cell lung Cancer: A systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer*. 2022 Aug 1;170:122–32.
49. Khafaei M. Early diagnostic biomarkers of Lung cancer; a review study. *Medical and Pharmaceutical Sciences Innovation* [Internet]. 2021;3:114–30. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/353237539>