

João Neif Antonio Junior

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES PD-1 E PD-L1 EM TUMORES DE SÍTIO
PRIMÁRIO DESCONHECIDO E SEU MICROAMBIENTE TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Co-Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Barretos, SP
2020

João Neif Antonio Junior

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES PD-1 E PD-L1 EM TUMORES DE SÍTIO
PRIMÁRIO DESCONHECIDO E SEU MICROAMBIENTE TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Co-Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Barretos, SP
2020

A635a Antonio Junior, João Neif.

Avaliação da expressão dos biomarcadores PD-1 e PD-L1 em tumores de sítio primário desconhecido e seu microambiente tumoral / João Neif Antonio Junior - Barretos, SP 2020.

116 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Dissertação (Mestrado) – Fundação Pio XII – Hospital de Amor Barretos, 2020.

1. Biomarcadores. 2 PD-1. 3 PDL-1. 4 Tumores de sítio Primário. 5 Microambiente tumoral. 6 Neoplasias. I. Autor. II. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Amor Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: João Neif Antonio Junior

Título: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES PD-1 E PD-L1 EM TUMORES DE SÍTIO PRIMÁRIO DESCONHECIDO E SEU MICROAMBIENTE TUMORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 23/09/2020

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Nora Manoukian Forones

Instituição: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

Instituição: Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata

Prof. Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Orientador

Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Coorientador

Prof. Dra. Bianca Sakamoto Ribeiro Paiva

Presidente da Banca

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas de Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital do Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição de metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.”

*Dedico este trabalho a minha esposa Larissa, por tamanho apoio e compreensão em
momentos essenciais;
aos meus orientadores Dr. Flavio Cárcano e Dr. Vinicius Duval, por alavancarem e guiarem
meu desenvolvimento pessoal e científico;
a Deus, aos meus pacientes e à minha família, meus grandes alicerces.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flavio Mavignier Cárcano, pelos ensinamentos, paciência e confiança.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, por compartilhar comigo a luz do seu conhecimento.

À Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro, pela generosa oportunidade de mergulhar e experimentar a ciência.

Aos Drs. Cristovam Scapulatempo Neto e Lucas Tadeus Bidinotto, pelas participações e sábias orientações ao longo do meu percurso.

Aos meus colegas e amigos da Onco-Urologia Dr. Luis Eduardo Rosa Zucca e Dr. Daniel D'Almeida Preto, pelo aprendizado e incentivo diários.

À graduanda em medicina Priscila Neves Bernécule, pelo interesse no aprendizado e tamanha colaboração.

Ao biologista Dr. Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli, pela imensa contribuição e disponibilidade.

À toda equipe do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos, principalmente a equipe de Pós-Graduação e do Núcleo de Bioestatística, em especial ao estatístico Marcos Alves de Lima.

À Escola Paulista de Medicina, onde tudo começou.

À minha família, em especial esposa, filhos e pais, por compreender tanto tempo de ausência pelo exercício literal da medicina.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Conceito e epidemiologia	1
1.2 Apresentação clínica e prognóstico	1
1.3 Patologia	2
1.4 Avaliação inicial	3
1.5 Tratamento	5
1.6 Avaliação molecular	6
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Delineamento do Estudo	14
4.2 População de Estudo	14
4.2.1 Critérios de Inclusão	14
4.2.2 Critérios de Exclusão	14
4.3 Coleta de Dados Clínicos	15
4.4 Recuperação das Amostras Biológicas	15
4.5 Técnica Imuno-histoquímica	16
4.6 Variáveis de Estudo	20
4.7 Análise Estatística	20
4.8 Aspectos Éticos	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Caracterização da população do estudo	22
5.1.1 Dados demográficos	22
5.1.2 Dados clínicos	23
5.1.3 Frequência dos marcadores imuno-histoquímicos	24

5.1.4 Curva de Receiver Operating Characteristic (ROC) para expressão de PD-L1 e sobrevida	27
5.1.5 Expressão dos biomarcadores	28
5.2 Correlação entre as características da população do estudo	30
5.2.1 Relação entre a expressão de PD-1 nas células tumorais e características clínico-patológicas	30
5.2.2 Relação entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais e características clínico-patológicas	31
5.2.4 Relação das características clínico-patológicas e biomarcadores com sobrevida global – Regressão de Cox	34
5.3 Representação das curvas de sobrevida	35
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	52
Anexo A	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo evasão tumoral (Fonte: Stefani Sparnger <i>et al</i> et al, 2018)	08
Figura 2 -	Atuação dos inibidores de PD-1 e PD-L1 (Fonte: Gong <i>et al</i> , 2018)	09
Figura 3 -	Foto-micrografias das expressões imuno-histoquímicas dos marcadores PD-1 e PD-L1 na célula tumoral do CUP (400x)	19
Figura 4 -	Frequência dos marcadores imuno-histoquímicos	25
Figura 5 -	Frequência dos marcadores imuno-histoquímicos por gênero	26
Figura 6 -	Curva ROC para a expressão de PD-L1 e sobrevida	27
Figura 7 -	Curva de Sobrevida Global	35
Figura 8 -	Curva de Sobrevida Global de acordo com a expressão de PD-L1	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo para detecção de PD-1	17
Tabela 2 -	Protocolo para detecção de PD-L1	17
Tabela 3 -	Dados demográficos	23
Tabela 4 -	Dados clínicos	24
Tabela 5 -	Coordenadas da curva ROC	28
Tabela 6 -	Expressão quantitativa dos biomarcadores PD-1 e PD-L1	24
Tabela 7 -	Tabulação cruzada para os valores de expressão de PD-1 e PD-L1	29
Tabela 8 -	Expressão de PD-1 em células tumorais e características clínico-patológicas	30
Tabela 9 -	Expressão de PD-L1 em células tumorais e características clínico-patológicas	33
Tabela 10 -	Análise univariada para estimativa do risco relativo de óbito conforme características clínico-patológicas	
Tabela 11 -	Análise multivariada – sobrevida global em pacientes com CUP	34
Tabela 12 -	Medidas de concordância Kappa para TPS e CPS	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD-80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CEC	Carcinoma espinocelular
CPS	<i>Combined Positive Score</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
CUP	<i>Carcinoma of Unknown Primary</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG	Fluorodeoxiglicose-18F
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IHQ	Imuno-histoquímico/a
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MSI-H	Microsatellite Instability High
N	número
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>
PET-CT	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PS	<i>Performance Status</i>
PSA	Antígeno Prostático Específico
REDCap	Research Electronic Data Capture
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
TC	Tomografia Computadorizada
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TILs	Linfócitos Infiltrantes do Tumor

TPS *Tumor Proportion Score*

USG Ultrasonografia

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual
°C	graus Celsius
χ^2	qui-quadrado

RESUMO

Neif, J.A. Avaliação da expressão dos biomarcadores PD-1 e PD-L1 em tumores de sítio primário desconhecido e seu microambiente tumoral. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020.

INTRODUÇÃO: O câncer de sítio primário desconhecido é um grupo heterogêneo de tumores para os quais a origem permanece desconhecida, apesar de detalhada investigação. Os sintomas por ele causados são geralmente decorrentes da metástase e a sua apresentação clínica pode ser influenciada não somente por processos biológicos do tumor, mas também decorrente de processos regulatórios no microambiente tumoral como a expressão dos biomarcadores PD-1 (*programmed cell death 1*) e seu ligante PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*), que se configuram como *checkpoints* imunológicos.

OBJETIVOS: Avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 em tumores de sítio primário desconhecido e seu microambiente tumoral e suas possíveis associações com características clínico-patológicas e desfechos clínicos em pacientes com este tipo de tumor. **MATERIAIS E**

MÉTODOS: A expressão de PD-1 e PD-L1 foi avaliada em cânceres de sítio primário desconhecido, utilizando a técnica de imuno-histoquímica e esta última analisada por TPS e CPS *score*. A sobrevida global foi analisada utilizando o método de Kaplan Meier e comparações das curvas através do teste de log rank. **RESULTADOS:** 108 pacientes foram analisados e a expressão de PD-L1, avaliada tanto por TPS quanto CPS, foi de aproximadamente 18. PD-1 estava expresso em cerca de 8% dos casos. A expressão de PD-L1 é significativamente menos frequente em pacientes com predomínio de metástase hepática ou óssea e mais frequente nos pacientes com metástase em linfonodos. A sobrevida global mediana foi de cerca de 4 meses e a predominância de metástases hepáticas esteve associada a pior prognóstico, enquanto o uso de quimioterapia e baixo PS-ECOG associaram-se a melhor sobrevida. A expressão de PD-L1 associou-se curiosamente a uma melhor sobrevida global. **CONCLUSÃO:** PD-L1 é expresso em um subgrupo de pacientes com câncer de sítio primário desconhecido e está associado a uma melhor sobrevida. É necessário explorar melhor o microambiente deste tipo de tumor para entender os fatores associados à sua imunobiologia e consequentes desfechos clínicos. Imunoterapia pode ter um papel importante em mudar a sua história natural e merece ser avaliada.

Palavras-chaves: PD-1; PD-L1, Neoplasias, Primário Desconhecido; Microambiente Tumoral.

ABSTRACT

Neif, J.A. Thesis (MS). Evaluation of the expression of PD-1 and PD-L1 biomarkers in tumors of unknown primary site and their tumor microenvironment. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2020.

BACKGROUND: Cancer of unknown primary site is a heterogeneous group of tumors for which the origin remains unknown, despite detailed investigation. Its clinical presentation occurs due to symptoms resulting from metastasis, which can be influenced not only by biological processes of the tumor, but also due to regulatory processes in the tumor microenvironment such as the expression of the PD-1 biomarkers (programmed cell death 1) and its PD ligand -L1 (programmed cell death ligand 1), which are configured as immunological checkpoints. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression of PD-1 and PD-L1 in tumors of unknown primary site and tumor microenvironment and their possible associations with clinical-pathological characteristics and clinical outcomes in patients with this type of tumor. **METHODS:** The expression of PD-1 and PD-L1 was evaluated in cancers of unknown primary site, using the immunohistochemistry technique and measured by CPS and TPS score. Overall survival was analyzed using the Kaplan Meier method and comparisons of the curves using the log rank test. **RESULTS:** 108 patients were analyzed and the expression of PD-L1, assessed by both TPS and CPS, was approximately 18. PD-1 was expressed in about 8% of cases. PD-L1 expression is significantly less frequent in patients with a predominance of hepatic or bone metastasis and more frequent in patients with a predominance of nodal metastasis. The median overall survival was about 4 months and the predominance of liver metastases was associated with a worse prognosis, while the use of chemotherapy and low PS-ECOG were associated with better survival. The expression of PD-L1 was curiously associated with better overall survival. **CONCLUSION:** PD-L1 is expressed in a subset of patients with cancer of unknown primary site and is associated with better survival. It is necessary to better explore the microenvironment of this type of tumor to understand the factors associated with its immunobiology and consequent clinical outcomes. Immunotherapy can play an important role in changing your natural history and deserves to be evaluated.

Keywords: PD-1; PD-L1; Neoplasms, Unknown Primary; Metabolism; Tumor Microenvironment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e epidemiologia

Os tumores de sítio primário desconhecido, do inglês CUP (*Cancers of Unknown Primary*), são neoplasias metastáticas confirmadas histologicamente, em que o sítio primário não pode ser identificado após extensa avaliação clínica.^{1,2} Eles representam cerca de 3 a 5% de todos os tumores mais frequentemente diagnosticados nos países desenvolvidos, com a incidência equivalente em homens e mulheres, sendo a idade média ao diagnóstico em torno de 60 anos.²

Nos Estados Unidos, foram estimados 31.480 novos casos diagnosticados em 2019, correspondendo à aproximadamente 2% de todos os casos de câncer para este país. Entretanto, o número de mortes estimadas atingiu 45.140 para o mesmo ano. É possível que ocorra um desconhecimento da real incidência deste tipo tumoral, visto que os registros das causas de óbitos são imprecisos.³

No Brasil, os dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer) não incluem tumores de sítio primário desconhecido.⁴

1.2 Apresentação clínica e prognóstico

Tumores de sítio primário desconhecido são caracterizados por possuírem uma ampla variedade de apresentações clínicas e, na maioria dos casos, determinantes de um prognóstico ruim, relacionado a um comportamento agressivo e imprevisível, por não apresentarem um padrão de disseminação característico.⁵

Em mais de 50% dos casos diagnosticados, são observados múltiplos sítios de metástases, com predomínio para determinados órgãos como fígado, pulmões, ossos e linfonodos.⁶ Dados na literatura revelam que em 20 a 50% dos casos o tumor primário pode não ser identificado ao longo do curso da doença e a realização da necrópsia pode ser uma ferramenta valiosa para tal. Ainda assim, porém com baixa frequência, o tumor primário latente seja altamente provável de surgir no decorrer do tempo.^{7,8}

O prognóstico é ruim em 80% dos pacientes diagnosticados com CUP e a sobrevida global mediana é de apenas 6 meses.² Há algumas características que interferem na sobrevida. Dentre as desfavoráveis, destacam-se sexo masculino, pessoas com idade maior

ou igual a 65 anos, *Performance Status* (PS) ruim, múltiplas comorbidades, adenocarcinomas com metástases envolvendo múltiplos órgãos, presença de metástases peritoneais ou múltiplas metástases cerebrais de adenocarcinoma ou de carcinoma espinocelular (CEC).⁹ Para esses pacientes, o tratamento quimioterápico empírico comumente é realizado.

As características que determinam um prognóstico favorável são tumor único, pequeno e potencialmente ressecável, carcinoma pouco diferenciado com disseminação nodal em linha média, CEC com envolvimento de linfonodo cervical, CEC com adenopatia inguinal isolada, carcinomas neuroendócrinos, mulheres com adenocarcinoma papilífero na cavidade peritoneal, mulheres com adenocarcinoma envolvendo apenas linfonodos axilares e homens com metástases ósseas osteoblásticas associado a um valor de antígeno prostático específico (PSA) elevado.¹⁰ Para tais pacientes, as abordagens terapêuticas direcionadas devem ser consideradas, visto que podem promover algum benefício clínico. Nesse contexto entram os tratamentos loco-regionais ou regimes específicos de quimioterapia.

1.3 Patologia

Após a avaliação microscópica inicial, o CUP pode ser classificado em 5 subtipos histológicos principais. São eles: adenocarcinoma bem ou moderadamente diferenciado (60%); adenocarcinoma pouco diferenciado ou carcinoma indiferenciado (25 a 30%), carcinoma espinocelular (5%); neoplasia maligna pouco diferenciada (5%) e tumores neuroendócrinos (1%).² A complementação com o estudo imuno-histoquímico (IHQ) é necessária na tentativa de identificar o tecido de origem.^{11, 12}

O uso da imuno-histoquímica (IHQ), mesmo que não recomendado de maneira indiscriminada, é baseado na existência de perfis de expressão concordantes entre o câncer primário e a sua metástase.^{13, 14} Contudo, há limitações envolvidas no processo, representadas por fatores que interferem na antigenicidade tecidual; variabilidade interpretativa intra e interobservador; heterogeneidade tecidual e inadequação das amostras biopsiadas. Apesar disso, quando os painéis imuno-histoquímicos são bem executados e interpretados, a correta identificação do sítio primário ocorre em cerca de 75% das amostras.¹⁵ Eles trazem informações sobre a linhagem do tumor, o tipo celular e o diagnóstico patológico.¹⁶ Nesse processo, contudo, não é recomendado que uma grande série de marcadores imuno-histoquímicos sejam avaliados, pois não estabelece correlação

com a precisão diagnóstica.¹⁷ A primeira etapa do estudo preconiza a determinação da linhagem, ou seja, classificar inicialmente o tumor em carcinoma, sarcoma, linfoma ou melanoma. Após essa avaliação inicial, se procede com os marcadores específicos na tentativa de se identificar o sítio primário.¹⁵

Sendo assim, a análise IHQ associada a uma ampla propedêutica, composta por anamnese detalhada, exame físico minucioso, exames laboratoriais e de imagem, colabora para presumir o diagnóstico e conseqüentemente estabelecer o melhor tratamento.¹⁸

1.4 Avaliação inicial

Os pacientes com suspeita de neoplasia metastática devem ser submetidos a uma avaliação propedêutica inicial bastante ampla, que deve incluir história clínica completa e exame físico minucioso. Nessa abordagem, são recomendados rotineiramente exames laboratoriais, pesquisa de sangue oculto nas fezes e tomografia computadorizada de tórax, abdômen e pelve, visto que o exame de imagem representa um papel fundamental na avaliação diagnóstica.¹⁹ A endoscopia pode ser incluída na avaliação inicial apenas se clinicamente indicado.

Apesar da tomografia computadorizada (TC) representar a modalidade de imagem mais frequentemente utilizada em pacientes com CUP, a tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) pode ser justificada em algumas situações, já que se demonstrou útil para o diagnóstico, estadiamento e reestadiamento de muitas neoplasias malignas.^{20, 21} Como exemplo, pode ser uma ferramenta valiosa para os pacientes com sítio único de metástase e passível de ressecção com intenção curativa.²² No entanto, apesar de ter demonstrado especificidade intermediária e alta sensibilidade em alguns estudos, são necessários outros estudos randomizados e maiores para se determinar a mais adequada utilidade clínica do PET.²³ Uma das principais limitações do método está relacionada ao pouco acúmulo do radiofarmaco fluorodeoxiglicose-18F (FDG) em determinados tecidos neoplásicos, que coloca limites em estabelecer a localização anatômica das anormalidades funcionais. Nesse cenário, a combinação do PET com TC ou ressonância nuclear magnética (RNM) pode fornecer informações mais precisas e úteis.²⁴

O acometimento de linfonodos axilares e mediastinais por adenocarcinoma é altamente suspeito para neoplasia de mama e o exame de mamografia é recomendado. Quando este não é capaz de estabelecer o diagnóstico, a RNM ou a ultrassonografia (USG)

podem ser considerados. Especialmente para as mulheres com tecido mamário denso, a RNM também pode ter um papel importante para avaliar a extensão da doença e a parede torácica.²⁵

Quando se dá o acometimento de linfonodos mediastinais por adenocarcinoma em homens com menos de 50 anos e para àqueles portadores de massas retroperitoneais com menos de 65 anos, deve-se presumir o diagnóstico de tumor de células germinativas de testículo.²⁶ Assim, são recomendadas as dosagens de determinados marcadores tumorais, tais como beta-hCG e alfa-fetoproteína, assim como uma USG dos testículos, principalmente se as dosagens séricas estiverem acima do limite superior da normalidade.

Para os homens com acometimento mediastinal, em que a investigação não indicou um tumor primário de células germinativas, é recomendado que se proceda análises patológicas adicionais no sentido de avaliar a possibilidade de neoplasia de pulmão de células não pequenas.²⁶

Em mulheres com acometimento por adenocarcinoma em linfonodos mediastinais e/ou inguinais, acompanhado ou não por derrame pleural, ascite ou massa em retroperitônio, pode-se presumir diagnóstico de neoplasia de ovário e é recomendado nesses casos a dosagem sérica do marcador tumoral CA-125, assim como avaliação ginecológica.²⁷

Todos os homens com mais de 40 anos portadores de adenocarcinoma de sítio primário indeterminado, com exceção daqueles com metástases limitadas ao fígado ou ao cérebro, devem ter a dosagem dos níveis de PSA. Da mesma maneira para àqueles que apresentam metástases ósseas ou múltiplos locais de envolvimento, independentemente da idade.²⁸

Em pacientes com acometimento de linfonodo inguinal é recomendada a avaliação proctológica para investigar neoplasias de reto ou ânus.²⁹ A avaliação endoscópica é recomendada para pacientes com metástase hepática e sugerida caso haja acometimento ganglionar em região supraclavicular, mas não recomendada rotineiramente para os pacientes que apresentam ascite maligna. Como a diferenciação entre adenocarcinoma metastático para o fígado e carcinoma hepatocelular primário é por vezes um desafio, pode-se lançar mão do uso de alfa-feto proteína como marcador diagnóstico.³⁰ Na ausência de um resultado positivo para a presença de sangue oculto nas fezes ou outros fatores clínicos que possam sugerir neoplasia de cólon, como obstrução intestinal ou carcinomatose, a

colonoscopia tem um baixo rendimento para se estabelecer o diagnóstico e não deve ser recomendada.³¹

Diante dessa dificuldade em transmitir aos pacientes informações diagnósticas mais precisas sobre a doença, é de fundamental importância discutir com os mesmos a história natural e o prognóstico desse tipo de neoplasia e fornecer apoio psicológico, visto que manifestações psiquiátricas, incluindo ansiedade e depressão são mais comuns em pacientes com CUP do que naqueles com primário conhecido.³² Agregado ao suporte psicossocial e diante da gravidade e incurabilidade da doença, o gerenciamento de sintomas, as discussões sobre finitude e as intervenções em cuidados paliativos devem ser muito bem explorados.³³

1.5 Tratamento

Uma gama de esquemas de tratamentos quimioterápicos foi avaliada em pacientes com CUP objetivando ganho em sobrevida e controle dos sintomas. Apesar de vários regimes terem demonstrado eficácia em estudos de fase II, uma revisão sistemática publicada em 2012 que abrangeu pacientes com apresentações desfavoráveis, concluiu que nenhum regime específico pode ser recomendado como padrão.³⁴ Historicamente, taxas de resposta de 20% e sobrevida global mediana de 6 meses foram observadas em pacientes tratados com esquemas baseados em taxano ou platina.²⁶ Outra revisão sistemática com metanálise publicada em 2013 chegou praticamente a mesma conclusão, com os taxanos mostrando possível pequena vantagem sobre os esquemas baseados em platina.³⁵ As diretrizes recomendam tratamento quimioterápico para os pacientes sintomáticos, desde que estejam clinicamente aptos para recebê-lo, visto que a eficácia é limitada e toxicidade considerável.

O regime de quimioterapia deve ser escolhido com base no tipo histológico e no grau de diferenciação, sendo que os tumores indiferenciados parecem ser responsivos à quimioterapia baseada em cisplatina.^{36, 37}

Há alguns regimes que podem ser utilizados baseados em estudos de fase II e III. A combinação que utilizou paclitaxel e carboplatina, associado ou não ao etoposídeo foi testada em alguns estudos e se mostrou efetiva no tratamento do adenocarcinoma de sítio primário indeterminado.³⁸ Os regimes baseados em platina também são utilizados para tratar carcinoma espinocelular disseminado, sendo o regime que envolve a combinação de

cisplatina e fluorouracil o mais frequentemente prescrito para o CEC de sítio primário desconhecido.³⁹

Outra modalidade terapêutica que pode ser considerada circunstancialmente é a radioterapia, principalmente na doença localizada e particularmente no cenário adjuvante. Também pode ser indicada para o tratamento de lesões ósseas, massas em retroperitônio ou CEC com acometimento linfonodal.⁴⁰ No cenário paliativo, pode ser considerada para situações que envolvem controle de dor, fratura patológica ou síndrome de compressão medular.

1.6 Avaliação molecular

O CUP se caracteriza por apresentar anormalidades cromossômicas, superexpressão de vários genes, tais como *EGFR*, *c-Kit/PDGFR*, *Ras*, *BCL2*, *HER2* e mutação de *p53*.^{41, 42}

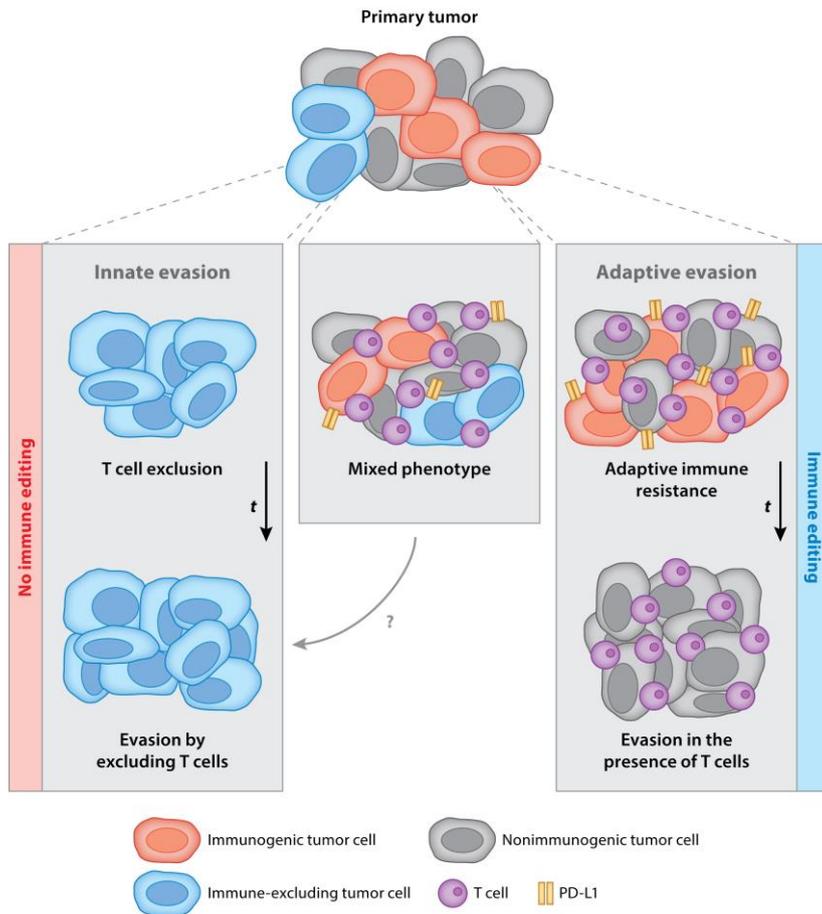
Nos últimos anos diversos estudos têm tentado traçar os perfis moleculares com o principal objetivo de identificar o tecido de origem no CUP.¹⁷ O racional desses ensaios é baseado na suposição de que o perfil das metástases é semelhante ao do tumor primário, sendo as plataformas utilizadas baseadas em RNA mensageiro ou micro RNA's.⁴³⁻⁴⁷ A taxa de precisão demonstrada quando a validação é realizada utilizando amostras de tipos de tumores conhecidos alcança valores de 85 a 90%. Particularmente para o CUP, como há dificuldade de confirmar o local de origem do tumor, essa precisão é absolutamente difícil de ser mensurada e se faz necessário correlacionar com os dados de IHQ, apresentação clínica e resposta ao tratamento. No transcorrer desse processo, o alerta ao eventual aparecimento do tumor primário latente é pertinente.⁴⁸

O sequenciamento genético de nova geração (NGS) também tem sido explorado para caracterização do genoma de CUP e tem o potencial de identificar biomarcadores capazes de direcionar para uma terapia alvo, possibilitando melhores desfechos para uma doença de prognóstico bastante desfavorável. Um ensaio recente de NGS, que envolveu amostras de 200 pacientes com CUP, permitiu a identificação de pelo menos uma alteração genômica com alvo terapêutico em potencial em 85% dos casos.⁴⁹ Entretanto, o benefício clínico baseado nesses ensaios moleculares permanece incerto e outros estudos prospectivos são necessários para verificar a efetividade do tratamento dos pacientes com CUP vinculado à avaliação molecular.⁵⁰ Assim, até que resultados mais robustos e dados comparativos de eficácia estejam disponíveis, os patologistas e oncologistas devem usar essa ferramenta de

modo bastante criterioso e em casos individualizados.⁵¹ Dessa forma, apesar das duas metodologias oferecerem uma faixa de precisão semelhante na classificação do tumor em relação a sua origem, ainda não está claro se a predição gênica conduz a melhores desfechos clínicos para os pacientes, motivo pelo qual, essa avaliação ainda não é recomendada na investigação diagnóstica de pacientes com CUP.

Atualmente, é notória a maior compreensão do papel do sistema imunológico no processo de carcinogênese, sendo a evasão tumoral ao sistema imunológico considerada uma das características fundamentais do câncer. Este processo caracteriza-se pela perda da capacidade de vigilância imunológica, não se estabelecendo o reconhecimento e a eliminação das células tumorais.⁵²

Os mecanismos gerais envolvidos no escape imunológico incluem a evasão inata, na qual as células T e outras células imunes são excluídas do microambiente tumoral e a evasão adaptativa, que permite ao tumor o estabelecimento de equilíbrio com o infiltrado de células T existente, processo este que envolve a seleção de clones de células tumorais menos imunogênicas ou células que adquirem mutações de perda de função em genes envolvidos no reconhecimento imunológico ou nas vias efetoras (figura 1).⁵³



 Spranger S, Gajewski TF. 2018. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2:213–28

Figura 1 – Mecanismos de evasão tumoral. Durante a evasão adaptativa, as células tumorais imunogênica (vermelhas) são eliminadas e os mecanismos de resistência imunológica adaptativa, como o PD-L1 (amarelo), são regulados positivamente (Fonte: Stefani Spranger *et al*, 2018)

Algumas caminhos descritos relacionados à evasão inata merecem destaque como: a ativação da via de sinalização da β -Catenina levando a falta de infiltração de células T por diminuição de células apresentadoras de antígenos; a mutação de PTEN por perda de função levando a falta de ativação das células dendríticas e macrófagos; a ativação da sinalização do c-Myc e por último, a ativação da via HIF, que resulta na ativação do VEGF-A e Cox, permitindo assim que oxigênio e nutrientes cheguem ao tumor. Outros caminhos se relacionam à evasão adaptativa, tais como perda da β -2 microglobulina levando a expressão pobre do MHC; perda da função dos genes que codificam JAK, resultando em sinalização diminuída do INF com diminuição da expressão de MHC e do recrutamento de linfócitos T CD8 e por fim, o aumento da regulação positiva de PD-L1.⁵³

Ainda, os tumores podem desenvolver barreiras físicas, tais como o colágeno e a fibrina, ou estabelecer máscaras antigênicas.⁵⁴ Sabe-se também que, após a sinapse imunológica, os sinais que estimulam ou inibem o sistema imune são originados a partir de moléculas correletórias, que são denominadas *checkpoints* imunológicos.⁵⁵

Muitos estudos de imunologia relacionados ao tratamento do câncer vêm sendo desenvolvidos. O primeiro ensaio clínico foi realizado na década de 1970, no qual foram feitas instilações intravesicais de BCG (Bacilo Calmette-Guérin) em pacientes com tumores de bexiga superficiais, com conseqüente estímulo imunológico, o qual levou ao controle da doença, principalmente por diminuir as taxas de recidiva e progressão.⁵⁶ No início dos anos 2010, foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de câncer de próstata metastático uma imunoterapia celular autóloga com Sipuleucel, que conferiu ganho em termos de sobrevida global. Neste tipo de tratamento, as células sanguíneas dos pacientes, tais como as células dendríticas, são extraídas através de leucaferese e fundidas com uma porção do antígeno prostático, sendo reinfundidas na corrente sanguínea para estimular o sistema imunológico.⁵⁷ No mesmo ano, foi aprovado pelo FDA para tratamento de melanoma metastático um anticorpo chamado Ipilimumabe, que atua contra o antígeno CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*). Este alvo está presente na superfície das células T e contribui para a inibição da resposta imunológica quando interage com uma proteína tumoral chamada CD-80 (*cluster of differentiation 80*) ou B7-1.⁵⁸

Nesse mesmo contexto, outros alvos imunológicos foram sendo estudados e os resultados aplicados na prática clínica oncológica. Surgiram então pesquisas com PD-1 (*Programmed Cell Death 1 Receptor*) e o seu ligante PD-L1 (*Programmed Cell Death Ligand 1*), revelando que a hiperexpressão ou o aumento de função dos mesmos são mecanismos de evasão imune das células tumorais (Figura 2).^{59, 60}

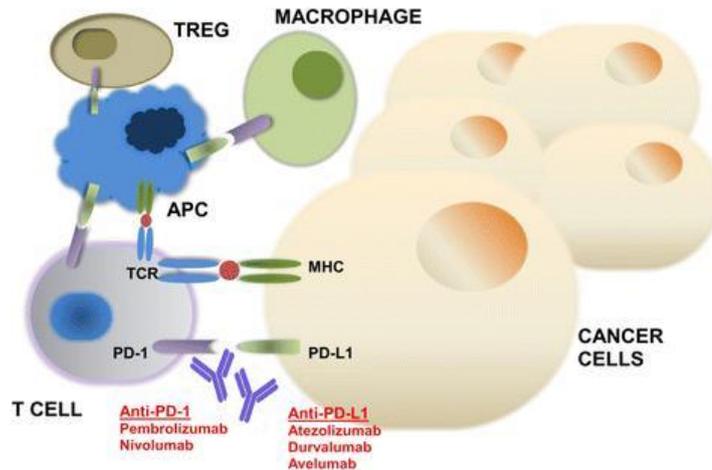


Figura 2 – Atuação dos inibidores de PD-1 e PD-L1 (Fonte: Gong *et al*, 2018)

O PD-1 é definido como uma proteína de membrana do tipo 1 e pertence à família de moléculas reguladoras de células T, denominadas CD28/B27.⁶¹ É formado por um domínio extracelular, por uma região transmembranar e uma cauda intracelular, sendo expresso na superfície das células T ativadas, células B e macrófagos.⁶² Atua principalmente nos tecidos periféricos, local em que ocorre a interação com seus ligantes imunossupressores, que podem estar expressos tanto nas células tumorais, quanto nas estromais.⁶³ Em modelos pré-clínicos, demonstrou-se que a inibição da interação entre PD-1 e PD-L1 pode estimular a resposta de células T *in vitro* e, conseqüentemente, aumentar a atividade antitumoral.^{64, 65} Com estas descobertas, ficou claro que o PD-1 e os seus ligantes têm um papel importante no processo de evasão tumoral ao sistema imunológico. Dessa forma, vários estudos clínicos foram executados e, a partir deles, tratamentos com bloqueadores do complexo PD-1/PD-L1 têm sido amplamente utilizados pela comunidade oncológica.⁶⁶ Nos anos de 2010 e 2012, foram divulgados dados de atividade antitumoral e segurança de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 (BMS-936558), posteriormente denominado Nivolumabe, em pacientes com neoplasias sólidas em estadios avançado e refratárias aos tratamentos estabelecidos, tais como melanoma, colorretal, rim, próstata e pulmão. Além disso, verificou-se uma relação entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais e a taxa de resposta ao tratamento com o anticorpo.⁶⁷⁻⁶⁹ Em 2013, um outro estudo analisou a atividade e a segurança de um anticorpo anti-PD-L1 (MPDL3280A), denominado Atezolizumabe, sendo observadas taxas de resposta em neoplasias de pulmão, rim e mieloma múltiplo.⁷⁰

No ano de 2014, foi dada a aprovação do pembrolizumabe para o tratamento de melanoma avançado e o desenvolvimento clínico dos inibidores de PD-1 e PD-L1 no arsenal terapêutico oncológico se intensificou, culminando atualmente em uma gama de inibidores aprovados pelo FDA. Como mencionado e baseado nos resultados do estudo KEYNOTE-001, o pembrolizumabe tornou-se o primeiro inibidor de PD-1 a receber aprovação para o tratamento do melanoma avançado ou irressecável após falha a primeira linha, representando uma taxa de resposta significativa e impacto também na sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG) mediana.⁷¹ No ano seguinte, a indicação do pembrolizumabe se expandiu também para a primeira linha após os resultados do estudo de fase III KEYNOTE—006.⁷²

Também em 2014, o nivolumabe foi aprovado pela primeira vez como tratamento de segunda linha em melanoma irressecável ou metastático, com base no estudo CheckMate 037.⁷³

Aprovações subsequentes permitiram o emprego dos inibidores do ponto de verificação imune para outros tipos de neoplasias como câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, carcinomas de células renais, carcinoma urotelial, carcinoma de células de Merkel e neoplasias com alta instabilidade microssatélite (MSI-H).⁷⁴

Assim, as indicações aprovadas para essa classe de drogas deixaram de ser apenas para os tumores e se expandiram para incluir malignidades hematológicas e fenótipos moleculares específicos, independentemente da histologia do tumor sólido.

Contudo, apesar da atividade tumoral oferecida pelos agentes anti PD-1 e anti-PD-L1, prever respostas tumorais ao bloqueio continua sendo um desafio, uma vez que nem todos os pacientes obtêm benefícios terapêuticos e a busca pelo biomarcador ideal de resposta está sendo investigada ativamente, cenário em que a alta carga mutacional pode também prever benefícios da imunoterapia em diversos tipos de tumores, justificada pela imunogenicidade dos neoantígenos, como é o caso dos tumores com MSI-H ou defeitos no reparo do DNA.^{75, 76}

2. JUSTIFICATIVA

O microambiente tumoral vem mostrando uma importante contribuição para a compreensão da biologia dos tumores, como melanoma, pulmão, cabeça e pescoço, bexiga, rim, entre outros, sendo que alguns participantes da sua modulação têm sido apontados como alvos para potenciais estratégias terapêuticas.

Até o momento, os dados relacionados ao microambiente imunológico de tumores de sítio primário desconhecido são escassos e explorar a expressão de PD-1 e PD-L1 pode ajudar a explicar a apresentação clínica da metástase sem um primário evidente.

Este estudo exploratório pode gerar novas hipóteses e levar ao desenvolvimento de novos ensaios clínicos para uma doença com poucas opções terapêuticas efetivas, contribuindo para um melhor manejo clínico das neoplasias de sítio primário desconhecido.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Através deste estudo, pretendeu-se analisar a expressão de proteínas de *checkpoint* imunológico e a possível associação com as características clínico-patológicas de pacientes diagnosticados com tumor de sítio primário desconhecido.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a expressão de PD-1 e PD-L1 em tumores de sítio primário desconhecido e no seu microambiente tumoral;
- Testar a associação da expressão de PD-1 e PD-L1 com os dados de sobrevida global;
- Testar a associação da expressão de PD-1 e PD-L1 com variáveis clínico-patológicas dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo de coorte e de epidemiologia molecular de tumores de sítio primário desconhecido.

Uma coorte de pacientes com câncer de sítio primário desconhecido que foram diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos (HCB) foi avaliada através de dados clínicos e moleculares de acordo com os objetivos do estudo.

4.2 População de Estudo

A amostragem foi definida por conveniência e preenchida por pacientes diagnosticados no HCB entre o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016.

Conforme dados analisados do Registro Hospitalar de Câncer e obedecendo os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos, foram estimados aproximadamente 150 pacientes para que se tornassem elegíveis para o estudo.

4.2.1 Critérios de Inclusão

- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Diagnóstico clínico/radiológico de câncer de sítio primário desconhecido, CID10: C80;
- Estudo imuno-histoquímico;
- Avaliação do PSA para sujeitos do sexo masculino;
- Avaliação de beta hCG para os casos de carcinoma pouco diferenciado;
- Material biológico disponível e incluído em parafina no Departamento de Patologia do HCB.

4.2.2 Critérios de Exclusão

- Carcinoma de células escamosas limitado aos linfonodos cervicais;
- Mulher com adenocarcinoma limitado aos linfonodos axilares;
- Mulher com adenocarcinoma e envolvimento isolado da cavidade peritoneal;
- Homem jovem (< 55 anos) com tumor crescendo na linha média, onde uma neoplasia de células germinativas possa ser esperada;

- Carcinoma neuroendócrino;
- Metástase de melanoma;
- Metástase de tumor de pequenas células;
- Presença de outra neoplasia maligna primária, com exceção de tumores de pele não-melanoma;
- Pacientes com sorologia positiva para o vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*);
- Pacientes em uso crônico de agentes imunossupressores.

4.3 Coleta de Dados Clínicos

A população do estudo foi selecionada a partir dos dados de Registro Hospitalar do HCB. Todos os pacientes que preencheram os critérios do estudo e submetidos ao tratamento no período estabelecido foram estudados. Como documento fonte, foram considerados os prontuários arquivados no SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatístico) do HCB, além de segundas vias dos exames dos laboratórios de suporte, caso estes estivessem referenciados em prontuário, mas ilegíveis ou inacessíveis.

Todos os dados clínicos do estudo foram coletados e administrados utilizando a ferramenta de captura eletrônica de dados REDCap (*Research Electronic Data Capture*) hospedada pela própria Instituição.⁷⁷ O REDCap é um aplicativo seguro, baseado em rede e desenhado para suportar a captura de dados em estudos de pesquisa, proporcionando 1) interface intuitiva para entrada de dados válidos; 2) viabilidade de auditoria para o rastreamento de manipulação de dados e procedimentos de exportação; 3) procedimentos de exportação automática para transferência de dados sem cortes para pacotes estatísticos comuns; e 4) procedimentos para importar dados de fontes externas.

4.4 Recuperação das Amostras Biológicas

As amostras biológicas foram recuperadas através dos números de registro no Departamento de Patologia, sendo todas provenientes de tumores primários desconhecidos e em condições técnicas para análise. Todos os casos foram revistos por um patologista independente para estabelecer as leituras propostas, além de filtrar alguma divergência entre o laudo registrado e o laudo emitido pela análise atual.

4.5 Técnica Imuno-histoquímica

Após selecionadas as lâminas com o tumor, os blocos de parafina correspondentes foram submetidos a cortes histológicos de 4 µm de espessura e colocados em lâminas com carga positiva (Starfrost®).

Com a finalidade de avaliar a imunoexpressão das proteínas, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 65 °C durante 1 hora. A reação imuno-histoquímica para a detecção das proteínas PD-1 e PD-L1 foram realizadas em plataforma de automação *BenchMark Ventana Ultra™* (Ventana, Tucson, AZ, USA), por meio da utilização de múltiplo acoplado ao HRP (*Horse Radish Peroxidase*). Os kits de detecção utilizados foram: *EnVision Flex High pH (Link)*, Ref.: K8000 e *OptiView DAB IHC Detection Kit*, Ref.: 06396500001.

Para a análise do PD-1, foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-PD-1, clone NAT 105, *Cell Marque*, Ref.: 315M-96 e para a análise de PD-L1, foi utilizado o anticorpo PD-L1 (E1L3N®) XP® *Rabbit mAb, Cell Signaling Technology*, Ref.: 06396500001. Como controles positivos foram utilizados, respectivamente, cortes histológicos de tonsilas palatinas (amígdala) e placenta.

Após a coloração realizada na plataforma de automação, as lâminas foram secas e passadas em xilol para recebimento do meio de montagem orgânico (*Dako Mounting Medium – Dako*, Ref.: CS703), sendo aplicado 1 gota por lâmina e adicionado a lamínula. Após a secagem, as lâminas foram visualizadas em microscopia.

As tabelas 1 e 2 sintetizam o protocolo de processamento aplicado pelo Laboratório de Histoquímica, Imuno-histoquímica e ISH (*In Situ Hybridization*) do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 1. Protocolo para detecção de PD1 (Mb MAB PD1 Clone: NAT105, Ref.: 315M-96 Cell Marque)

Tipo de Procedimento	EnVision Flex High pH (Link), Ref.: K8000
Desparafinização	60 min, 65°C – Estufa de Aquecimento
Recuperação antigênica (Condicionador Celular / Identificação de Antígenos)	20 minutos a 97°C. EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (1x), Ref.: K8004
Enzima (Protease)	Não se aplica
Anticorpo Primário	PD1, Clone: NAT105, Cell Marque. Ref.: 315M-96 Diluição: 1/100, Incubação: 40 minutos
Amplificação	EnVision FLEX+ Mouse (LINKER), (Link). Ref.: K8021 por 15 minutos
Corante de Contraste	EnVision Flex Hematoxylin, Ref.: K8008, 5 minutos
Pós-Corante de Contraste	EnVision Flex Wash Buffer 1X, Ref.: K8007, 1 minuto

Tabela 2. Protocolo para detecção de PDL1 (Rb MAB PD-L1 Clone: E1L3N, Ref.: 13684 - Cell Signaling)

Tipo de Procedimento	OptiView DAB IHC Detection Kit, Ref.: 06396500001
Desparafinização	60 min, 65°C – Estufa de Aquecimento; 4 min, 70°C – Ventana Ultra
Recuperação antigênica (Condicionador Celular / Identificação de Antígenos)	64 minutos a 97°C. ULTRA Cell Conditioning Solution 1 (ULTRA CC1)”, Ref.: 05424569001
Enzima (Protease)	Não se aplica
Anticorpo Primário	Rabbit MAB PD-L1 (E1L3N), Ref.: 13684 - Cell Signaling; Diluição: 1/200, Incubação: 60 minutos
Amplificação	Não se aplica
Corante de Contraste	Hematoxilina II, 8 minutos
Pós-Corante de Contraste	(Coloração azulada) Bluing Reagent, 4 minutos

Como as padronizações de contagem preconizadas diferem para os variados tipos de neoplasias e não existe um protocolo estabelecido para CUP, no momento das leituras, foram atribuídos valores quantitativos contínuos para as expressões de PD-1 e PD-L1, sendo considerado um *cut off* de positividade acima de 1.

Para a contagem de expressão de PD-1, foi estabelecido o percentual de células imunes positivas mais notadamente em membrana celular, sem referência para a intensidade de coloração.

Para a contagem de expressão de PD-L1, foi adotado o TPS, do inglês “*Tumor Proportion Score*”, em que a pontuação da proporção do tumor é a porcentagem de células

tumorais viáveis que apresentam coloração parcial ou completa da membrana em relação à todas as células tumorais viáveis presentes na amostra.⁷⁸

Em análise complementar, também foi utilizado um score combinado, denominado CPS, do inglês *Combined Positive Score*. Nele, a avaliação é feita com base no número total de células positivas para PD-L1 (tumor, linfócitos e macrófagos) em relação ao total de células tumorais, o que permitiu a captura de células tumorais e imunológicas em uma mesma leitura.⁷⁹ Essa parametrização foi adotada, visto que em determinados tumores a coloração de PD-L1 em células imunes está associada a resultados clínicos.

As fórmulas para os cálculos de TPS e CPS seguem abaixo representadas:

$$\text{TPS}(\%) = \frac{\text{No. PD-L1-stained tumor cells}}{\text{Total No. of viable tumor cells}} \times 100$$

$$\text{CPS} = \frac{\text{No. PD-L1-stained cells (tumor cells, lymphocytes, macrophages)}}{\text{Total No. of viable tumor cells}} \times 100$$

A figura 3 ilustra foto-micrografias das expressões imuno-histoquímicas dos marcadores PD-1 e PD-L1 na célula tumoral do CUP (400x), assim como os respectivos controles.

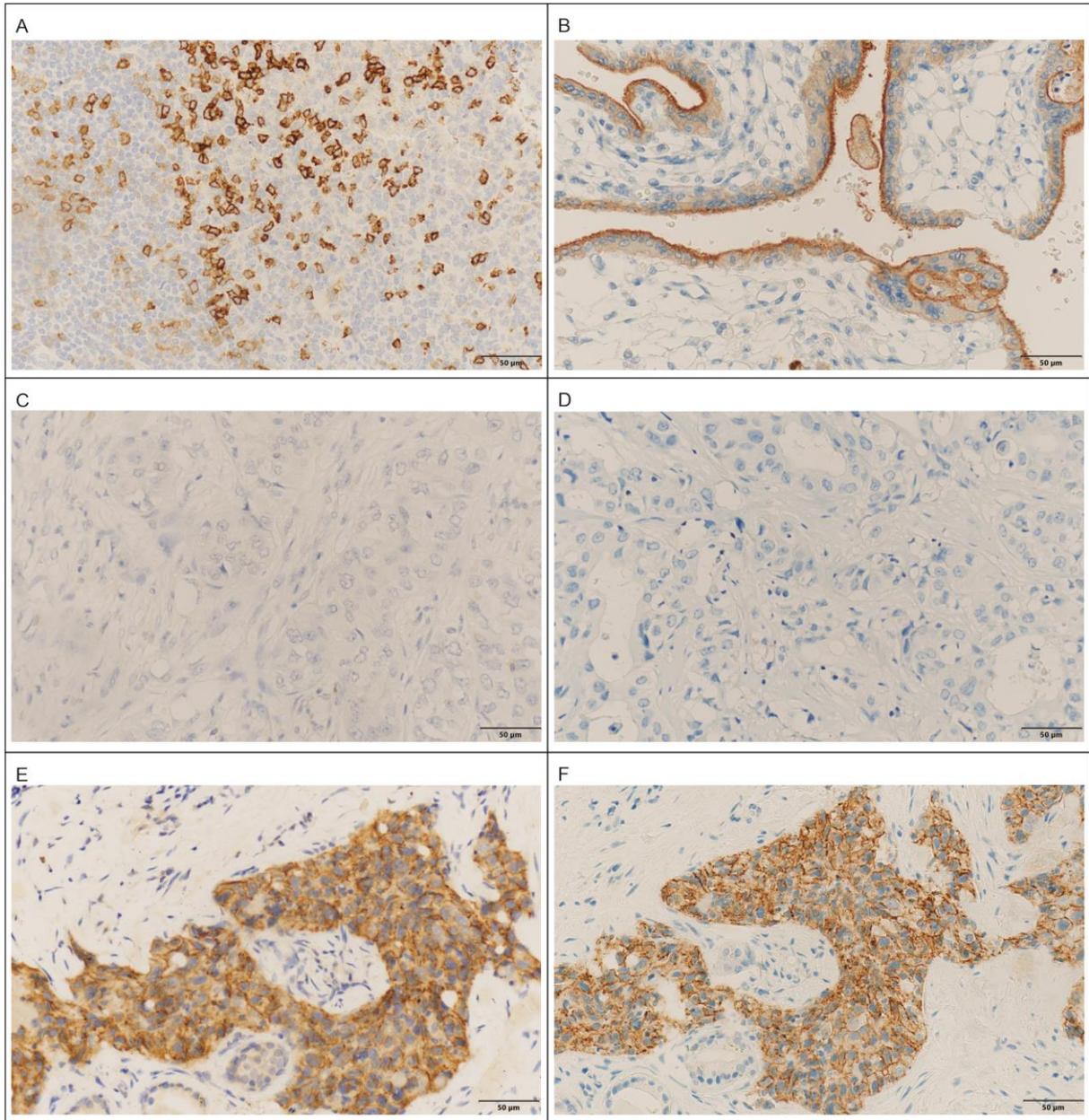


Figura 3 - Foto-micrografias das expressões imuno-histoquímicas dos marcadores PD-1 e PD-L1 na célula tumoral do CUP (400x). A. Controle de PD-1 (amígdala). B. Controle de PD-L1 (placenta). C. Expressão de PD-1 negativa em carcinoma metastático para fígado. D. Expressão de PD-L1 negativa em carcinoma metastático para fígado. E. Expressão de PD-1 fortemente positiva em carcinoma metastático para linfonodo. F. Expressão de PD-L1 fortemente positiva em carcinoma metastático para linfonodo.

4.6 Variáveis de Estudo

Foram utilizadas como variáveis do estudo os seguintes dados clínicos e moleculares como se segue:

- demográficos;
- patológicos;
- imuno-histoquímicos;
- metástases;
- hábitos e história familiar;
- exame físico e laboratorial;
- tratamento sistêmico;
- expressão de PD-1
- expressão de PD-L1 por TPS e CPS

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos na avaliação da expressão dos diferentes marcadores biológicos foram analisados utilizando-se o software estatístico IBM-SPSS (versão 21.0, EUA). A descrição da amostra foi feita através de medidas de frequência, tendência e dispersão. Os grupos para análise foram definidos mediante a graduação final obtida na avaliação das reações imuno-histoquímicas descrita no ponto 4.5. A análise univariada foi utilizada para comparar categorias da amostra em relação às frequências encontradas dos marcadores biológicos analisados. Para isso, foram utilizados o teste do χ^2 ou o teste exato de Fischer, de acordo com a característica da amostra. O teste *t* de *student* foi utilizado para análise de variáveis contínuas. As curvas de sobrevida global foram plotadas através do método de Kaplan-Meier e comparações univariadas de tempos de sobrevida foram realizadas através do teste de log rank. Para a análise de sobrevida global, foi considerado o tempo entre o diagnóstico e o óbito como evento de interesse ou a data da última informação do paciente vivo, sendo este último censurado. O modelo de regressão proporcional de risco de Cox foi utilizado para análise multivariada da sobrevida. O resultado foi considerado como significativo quando os testes apresentarem um alfa de 0,05 em um teste de hipótese bicaudal.

4.8 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos sob o registro CAAE 51579715.0.0000.5437. Comprovante N. 029721/2017.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da população do estudo

5.1.1 Dados demográficos

Um total de 2585 prontuários médicos foram recuperados de pacientes classificados como CID10 C80, diagnosticados entre 2002 e 2016. Muitos casos foram excluído devido a classificação à admissão hospitalar como CID10 C80 e, após devida propedêutica diagnóstica, sofreram reclassificação para sítios primários conhecidos. Em 13 casos que possivelmente seriam incluídos, não havia material disponível no arquivo do departamento de patologia e em 6 casos a leitura não foi possível diante da baixa celularidade representada no corte (< 100 células). Após seleção cuidadosa e respeitando os critérios do estudo, foram selecionados 108 casos de CUP para análise.

No que diz respeito ao perfil epidemiológico, ilustrado na tabela 3, foi evidenciado predomínio das pacientes do sexo feminino (61 casos; 56,5%), com idade média ao diagnóstico de 60 anos e com extremos de idade de 20 e 89 anos. A maioria era procedente da região sudeste (87 casos; 80,6%), portadores de histórico familiar de câncer e não pertencentes ao grupo de tabagistas ou etilistas. A minoria dos pacientes pertencia a escala funcional PS-ECOG ≥ 2 (37 casos; 37,3%).

Tabela 3 - Dados demográficos

Variável	Categoria	N	(%)
Idade	média	60	
	mediana	61	
	intervalo	20 - 89	
Região	Sudeste	87	80,6
	Centro-Oeste	12	11,1
	Nordeste	7	6,5
	Norte	1	0,9
	Sul	1	0,9
Gênero	Masculino	47	43,5
	Feminino	61	56,5
ECOG	0	12	11,1
	1	29	26,8
	≥ 2	37	34,3
	Ignorado	30	27,8
Tabagismo	Sim	47	43,5
	Não	57	52,7
	Ignorado	4	3,80
Etilismo	Sim	25	23,1
	Não	74	68,5
	Ignorado	9	8,4
História familiar de câncer	Sim	39	53,7
	Não	58	36,1
	Ignorado	11	10,2

5.1.2 Dados clínicos

Conforme os dados ilustrados na tabela 4, o tipo histológico mais frequente foi adenocarcinoma (64 casos; 59,3%), seguido por carcinoma (33 casos; 30,6%) e CEC (11 casos; 10,2%). Os sítios de metástases mais comuns foram linfonodo e fígado, sendo que este último também representou o sítio dominante de metástase mais frequente (42 casos; 38%). O tipo de tratamento mais adotado foi a quimioterapia paliativa (51 casos; 47,2%) e o principal esquema adotado a associação de carboplatina com paclitaxel (25 casos; 49%).

Tabela 4 - Dados clínicos

Variável	Categoria	N	%
Tipo histológico	Adenocarcinoma	64	59,3
	Carcinoma	33	30,6
	CEC	11	10,2
Sítio da biópsia	Fígado	35	32,4
	Linfonodo	30	27,8
	Osso	26	24,1
	Pulmão	0	0,0
	SNC	4	3,7
	Outro	13	12,0
Sítios de metástase	Fígado	58	53,7
	Linfonodo	61	56,4
	Osso	46	42,5
	Pulmão	25	23,1
	SNC	5	4,6
	Outro	16	14,8
Sítio dominante de metástase	Fígado	42	38,9
	Linfonodo	27	25,0
	Osso	25	23,1
	Pulmão	2	1,9
	SNC	4	3,7
	Outro	8	7,4
Tipo de tratamento	Cirurgia	16	14,8
	Radioterapia	40	37,0
	Quimioterapia 1ª linha	51	47,2
	Quimioterapia 2ª linha	15	13,8
	Quimioterapia > 2ª linha	6	5,5
Tipo de quimioterapia	Carboplatina/Paclitaxel	25	49,0
	Gencitabina/Cisplatina	4	7,8
	Etoposídeo/Cisplatina	1	2,0
	Outra	21	41,2

5.1.3 Frequência dos marcadores imuno-histoquímicos

A figura 4 ilustra os marcadores explorados pelos patologistas e suas respectivas frequências. Destaque principal para as citoqueratinas CK7 e CK20, que foram representadas em cerca de 90% dos casos. A figura 5 ilustra a frequência dos marcadores imuno-histoquímicos por gênero. Em média foram testados 7,56 marcadores por paciente, com desvio padrão de 2,64.

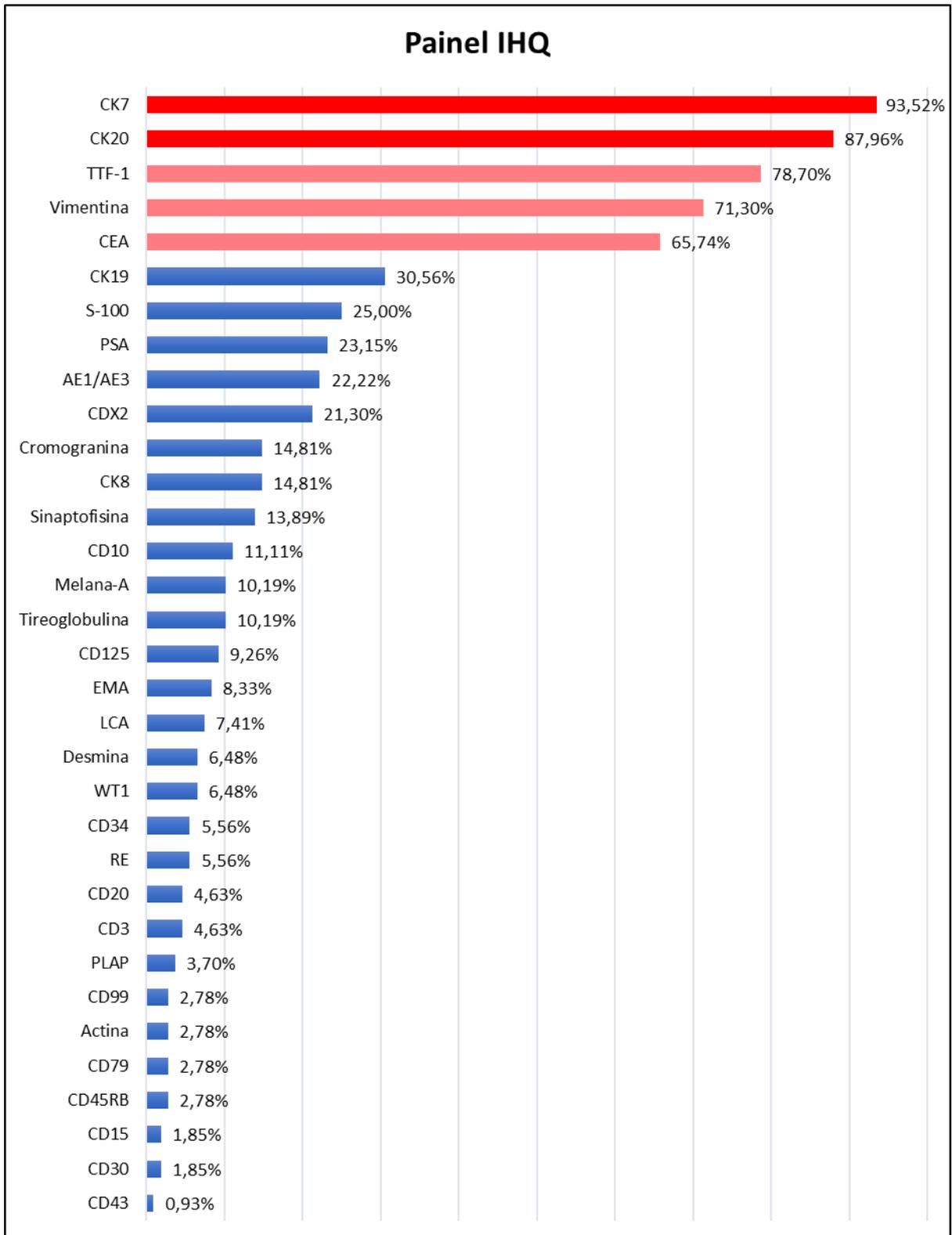


Figura 4 – Frequência dos marcadores imuno-histoquímicos

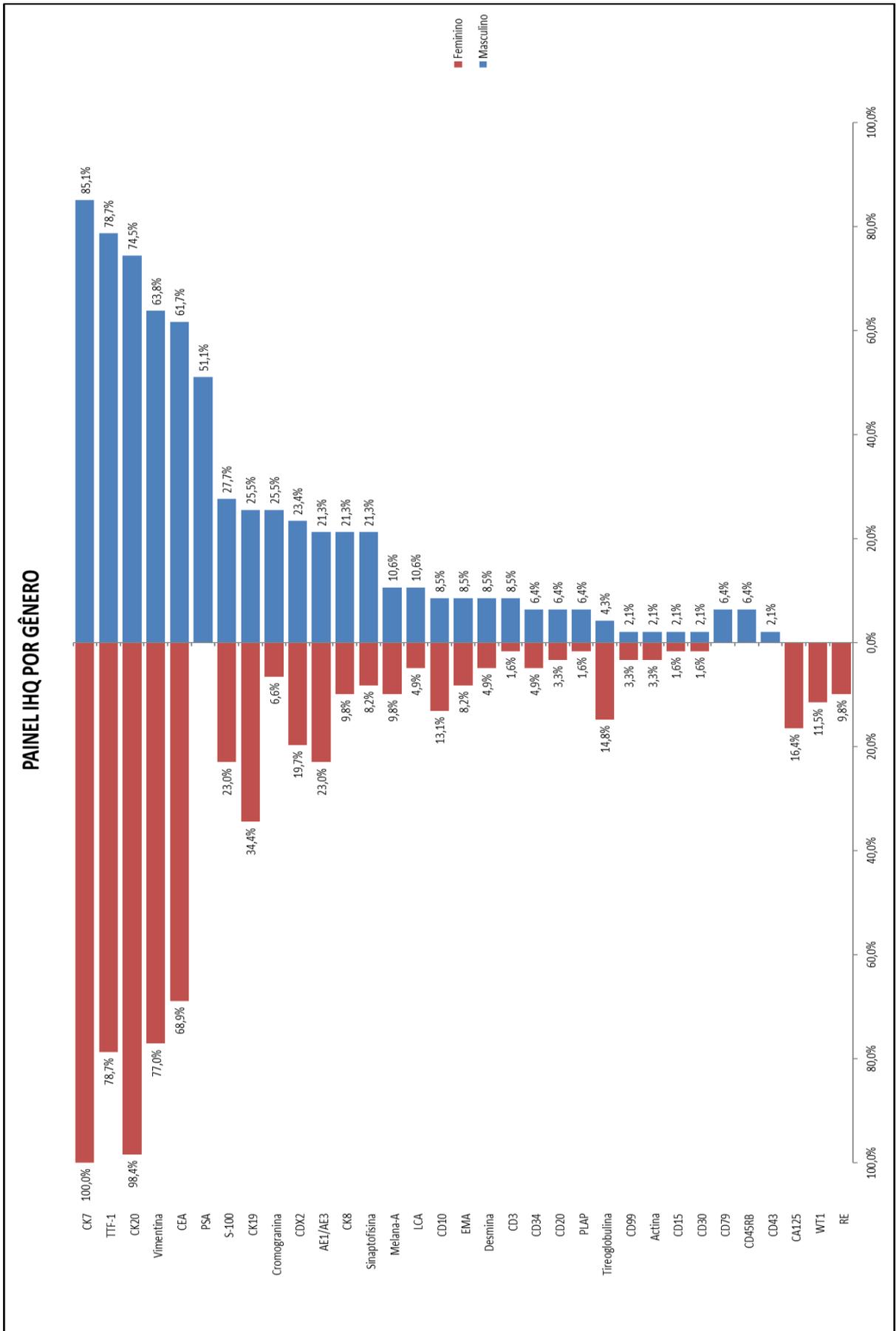


Figura 5 – Frequência dos marcadores imuno-histoquímicos por gênero

5.1.4 Curva de *Receiver Operating Characteristic* (ROC) para expressão de PD-L1 e sobrevida

A figura 6 representa uma curva ROC traçada com o objetivo de identificar o *cut off* ideal de positividade para a expressão de PD-L1, no âmbito de estabelecer a relação com dados de sobrevida. Conforme ilustrado, o valor de 0,32 atribuído a área sobre a curva configura pouca representatividade estatística. Apesar do *cut off* de 12,5 ser o ponto supostamente de melhor sensibilidade e especificidade, conforme ilustrado na tabela 5, o N da amostra compromete tal determinação e a diferença de número de casos entre o uso do *cut off* 12,5 e 1, é de apenas 3 casos. Portanto, considerando-se também as referências da literatura^{71, 80}, optou-se por manter a convenção do critério de positividade > 1%, respeitando o caráter exploratório do estudo.

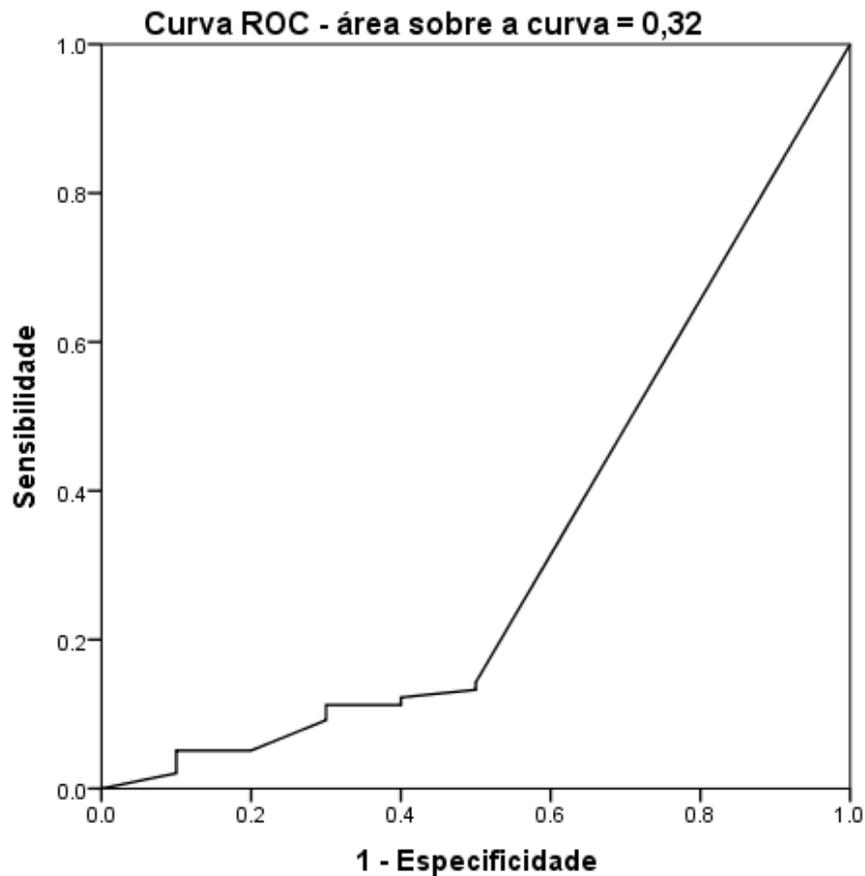


Figura 6. Curva ROC

Tabela 5 - Coordenadas da Curva ROC

Positivo se maior que ou igual a ^a	Sensibilidade	1 - Especificidade
-1,00	1,00	1,00
0,50	0,14	0,50
1,50	0,13	0,50
2,50	0,12	0,40
4,00	0,11	0,40
12,50	0,11	0,30
25,00	0,09	0,30
42,50	0,05	0,20
57,50	0,05	0,10
65,00	0,03	0,10
75,00	0,02	0,10
81,00	0,00	0,00

a. O menor valor de corte é o valor mínimo de teste observado menos 1 e o maior valor de corte é o valor máximo de teste observado mais 1. Todos os outros valores de corte são as médias de dois valores de teste reservados ordenados consecutivos.

5.1.5 Expressão dos biomarcadores

A tabela 6 ilustra a expressão das proteínas PD-1 e PD-L1, mostrando que a grande maioria dos casos estudados não as expressaram, visto que 91,6% (99 casos) não marcaram PD-1 e 82,4% (89 casos) não marcaram PD-L1. Exatamente a mesma proporção foi encontrada quando a avaliação se deu através do sistema de pontuação combinado (CPS).

Tabela 6 - Expressão quantitativa dos biomarcadores PD-1 e PD-L1

Variável	Categoria	N	%
PD-1	Negativa	99	91,6
	Positiva (> 1%)	9	8,4
PD-L1 (TPS)	Negativa	89	82,4
	Positiva (> 1 %)	19	17,6
PD-L1 (CPS)	Negativa	89	82,4
	Positiva (> 1)	19	17,6

A tabela 7 descreve as medidas das expressões de PD-1 e PD-L1 quando relacionadas. Ficou evidente que na grande maioria dos casos (77,8%), ambas assumiram expressões concomitantemente negativas.

Tabela 7 - Tabulação cruzada para os valores de expressão de PD-1 e PD-L1

	PD-1 Negativo	PD-1 Positivo	Total
CPS Negativo	84 (77,8%)	5 (4,6%)	89 (82,4%)
CPS Positivo	15 (13,9%)	4 (3,7%)	19 (17,6%)
Total	99 (91,6%)	9 (98,3%)	108 (100%)

5.2 Correlação entre as características da população do estudo

5.2.1 Relação entre a expressão de PD-1 nas células tumorais e características clínico-patológicas

Tal como demonstrado na tabela 8, nenhuma das características estudadas mostrou associação significativa com a expressão de PD-1 nos casos.

Tabela 8- Expressão de PD-1 em células tumorais e características clínico-patológicas

Variável	Categoria	Negativa		Positiva		p valor	
		N	%	N	%		
Idade	< 60 anos	46	46,5	3	33,3	0,51	
	≥ 60 anos	53	53,5	6	66,7		
Gênero	Masculino	43	43,4	4	44,4	> 0,99	
	Feminino	56	56,6	5	5,6		
ECOG	0	11	15,5	1	14,3	0,49	
	1	28	39,4	1	14,3		
	2	14	19,7	3	42,9		
	3	15	21,1	2	28,6		
	4	3	4,2	0	0,0		
Tabagismo	Sim	43	45,3	4	44,4	> 0,99	
	Não	52	54,7	5	55,6		
Etilismo	Sim	22	24,4	3	33,3	0,69	
	Não	68	75,6	6	66,7		
História familiar	Sim	36	40,4	3	37,5	> 0,99	
	Não	53	59,6	5	62,5		
Tipo histológico	Adenocarcinoma	58	58,6	6	66,7	0,77	
	Carcinoma	30	30,3	3	33,3		
	CEC	11	11,1	0	0,0		
Sítio de metástase	Fígado	55	56,7	3	33,3	0,36	
	Linfonodo	57	58,2	4	44,4	0,75	
	Osso	40	43,5	6	75,0	0,08	
	SNC	5	6,4	0	0,0	0,99	
	Pulmão	24	24,7	1	11,1	0,99	
	Outro	15	17,2	1	12,5	0,99	
Sítio dominante de metástase	Fígado	Sim	40	40,4	7	61,1	0,47
		Não	59	59,6	2	38,9	
	Linfonodo	Sim	27	27,3	3	33,3	0,71
		Não	72	72,7	6	66,7	
	Osso	Sim	25	25,3	2	22,2	> 0,99
		Não	74	74,7	7	77,8	
	SNC	Sim	4	4,0	0	0,0	> 0,99
		Não	95	96,0	9	100,0	
	Pulmão	Sim	2	2,0	0	0,0	> 0,99
		Não	97	98,0	9	100,0	
	Outro	Sim	6	6,1	2	22,2	0,13
		Não	93	93,9	7	77,8	
	Quimioterapia	Sim	47	47,5	4	44,4	> 0,99
		Não	52	52,5	5	55,6	

5.2.2 Relação entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais e características clínico-patológicas

A análise dos dados numéricos apresentados na tabela 9, que demonstraram relevância estatística, permitiu afirmar que nos pacientes portadores de metástases predominantemente hepáticas ou predominantemente ósseas, a expressão de PD-L1 foi ausente ou negativa em maior frequência e nos pacientes portadores de metástases predominantemente linfonodais, a expressão de PD-L1 foi positiva em maior frequência.

Tabela 9 - Expressão de PD-L1 em células tumorais e características clínico-patológicas

Variável	Categoria	Negativa		Positiva		p valor	
		N	%	N	%		
Idade	< 60 anos	37	41,6	12	63,2	0,09	
	≥ 60 anos	52	58,4	7	36,8		
Gênero	Masculino	41	46,1	6	31,6	0,25	
	Feminino	48	53,9	13	68,4		
ECOG	0	9	14,1	3	21,4	0,14	
	1	23	36,9	6	42,9		
	2	13	20,3	4	28,6		
	3	17	26,6	0	0,0		
	4	2	3,1	1	7,1		
Tabagismo	Sim	37	43,0	10	55,6	0,43	
	Não	49	57,0	8	44,4		
Etilismo	Sim	20	24,7	5	27,8	0,77	
	Não	61	75,6	13	72,2		
História familiar	Sim	31	38,8	8	47,1	0,52	
	Não	49	61,3	9	52,9		
Tipo histológico	Adenocarcinoma	52	58,4	12	63,2	0,91	
	Carcinoma	28	31,5	5	26,3		
	CEC	9	10,1	2	10,5		
Sítio de metástase	Fígado	52	59,1	6	33,3	0,13	
	Linfonodo	48	53,9	13	72,2	0,29	
	Osso	41	49,4	5	29,4	0,22	
	SNC	3	4,5	2	11,1	0,65	
	Pulmão	24	27,0	1	5,9	0,19	
	Outro	14	18,2	2	11,1	0,73	
Sítio dominante de metástase	Fígado	Sim	39	43,8	3	15,8	0,03
		Não	50	56,2	16	84,2	
	Linfonodo	Sim	21	23,6	9	47,4	0,04
		Não	68	76,4	10	52,6	
	Osso	Sim	26	29,2	1	5,3	0,04
		Não	63	70,8	18	94,7	
	SNC	Sim	2	2,2	2	10,5	0,14
		Não	87	97,8	17	89,5	
	Pulmão	Sim	2	2,2	0	0,0	> 0,99
		Não	87	97,8	19	100,0	
	Outro	Sim	3	3,4	5	26,3	< 0,01
		Não	86	96,6	14	73,7	
Quimioterapia	Sim	42	47,2	9	47,4	> 0,99	
	Não	47	52,8	10	52,6		

5.2.3 Relação das informações clínico-patológicas e biomarcadores com sobrevida global

Em análise univariada, cujos dados numéricos estão apresentados na tabela 10, algumas características da população do estudo notadamente determinaram impacto no tempo de sobrevida global mediana, com significância estatística. Assim, pode-se inferir que quanto melhor a condição clínica do doente, representada por menores valores numéricos atribuídos ao PS-ECOG, maior a sobrevida para o paciente. Enquanto a presença de metástases hepáticas, assim como o predomínio delas nesse órgão, foram fatores deletérios e impactaram em uma menor sobrevida global, a presença de metástase predominante em linfonodos foi um fator de proteção. Outro fator de proteção que merece destaque foi o tratamento com quimioterapia, visto que os pacientes que a receberam sobreviveram mais. Por último, o grupo de pacientes que tiveram a expressão de PD-L1 positiva também obteve melhores resultados em termos de sobrevida.

Tabela 10 – Análise univariada para estimativa do risco relativo de óbito conforme características clínico-patológicas

Variável	Categoria	N	%	Sobrevida	IC 95%	HR	p valor		
Idade	< 60 anos	49	45,37	6,28	3,12 – 9,44	1,00	0,43		
	≥ 60 anos	59	54,63	3,32	2,05 – 4,59	1,17			
Gênero	Masculino	47	43,5	3,12	1,82 – 4,43	1,00	0,29		
	Feminino	61	56,5	5,32	2,58 – 8,07	0,80			
ECOG	0	12	15,38	17,96	3,55 – 32,36	1,00	< 0,01		
	1	29	37,17	7,07	3,37 – 10,77	2,59	0,02		
	2	17	21,79	5,19	2,32 – 8,07	5,08	< 0,01		
	3	17	21,79	1,51	0,00 – 3,15	4,94	< 0,01		
	4	3	3,87	0,49	0,00 – 1,12	7,33	< 0,01		
Tabagismo	Sim	47	45,19	4,63	2,24 – 7,03	0,87	0,5		
	Não	57	54,81	5,19	2,11 – 8,28	1,00			
Etilismo	Sim	25	25,25	3,12	0,97 – 5,27	1,35	0,21		
	Não	74	74,75	5,32	3,03 – 7,62	1,00			
História familiar	Sim	39	53,7	5,33	3,25 – 7,40	0,79	0,29		
	Não	58	36,1	3,2	0,70 – 5,69	1,00			
Tipo histológico	Adenocarcinoma	64	59,3	3,68	1,47 – 5,89	1,00	0,87		
	Carcinoma	33	30,6	5,19	2,27 – 8,12	0,93	0,76		
	CEC	11	10,2	4,63	0,03 – 9,24	0,85	0,64		
Sítio de metástase	Fígado	Sim	58	54,7	2,43	1,45 – 3,41	1,75	< 0,01	
		Não	48	45,3	6,61	4,78 – 8,44	1,00		
	Linfonodo	Sim	46	23	3,19	2,82 – 7,57	0,76	0,19	
		Não	61	57	5,199	1,59 – 4,78	1,00		
	Osso	Sim	46	46	6,25	2,76 – 9,73	0,88	0,55	
		Não	54	54	3,15	0,45 – 5,86	1,00		
	SNC	Sim	5	6	9,83	0,79 – 18,87	0,57	0,27	
		Não	79	94	5,19	2,59 – 7,80	1,00		
	Pulmão	Sim	25	23,6	2,03	3,11 – 7,28	1,29	0,27	
		Não	81	76,4	5,19	1,03 – 3,04	1,00		
	Outro	Sim	16	16,9	2,1	0,00 – 4,49	1,63	0,08	
		Não	79	83,1	5,29	3,24 – 7,35	1,00		
	Sítio dominante de metástase	Fígado	Sim	42	38,9	2,4	1,32 – 3,47	1,74	< 0,01
			Não	66	61,1	5,62	4,17 – 7,07	1,00	
Linfonodo		Sim	27	25	7,07	0,00 – 19,07	0,58	0,03	
		Não	81	75	3,16	1,80 – 4,50	1,00		
Osso		Sim	25	23,1	6,61	2,11 – 11,1	0,86	0,55	
		Não	83	76,9	3,39	1,19 – 5,58	1,00		
SNC		Sim	4	3,8	5,62	1,17 – 10,07	0,86	0,77	
		Não	104	96,2	3,38	1,16 – 5,16	1,00		
Pulmão		Sim	2	1,9	1,11	0,424 – 1,81	4,04	0,06	
		Não	106	98,1	4,96	3,18 – 6,75	1,00		
Outro		Sim	8	7,5	2,1	0,24 – 3,96	0,98	0,96	
		Não	100	92,5	4,63	2,86 – 6,40	1,00		
Expressão de PD-1		Negativa	99	91,6	4,63	2,55 – 6,71	1,00	0,96	
		Positiva	9	8,4	5,32	2,4 – 8,25	0,98		
Expressão de PD-L1 (TPS e CPS)	Negativa	89	82,4	3,19	1,15 – 5,22	1,00	0,02		
	Positiva	19	17,6	17,96	1,21 – 34,70	0,42			
Quimioterapia	Sim	51	47,2	10,6	5,3 – 15,89	0,42	< 0,01		
	Não	57	52,8	1,8	0,89 – 2,72	1,00			

5.2.4 Relação das características clínico-patológicas e biomarcadores com sobrevida global – Regressão de Cox

Após regressão logística e conforme representado na tabela 11, a presença de metástases predominantemente hepáticas reafirmou-se como fator deletério para sobrevida global mediana, enquanto a expressão de PD-L1 positiva, o tratamento quimioterápico e ECOG com representações numéricas menores reafirmaram-se como fatores protetores.

Tabela 11 – Análise multivariada – sobrevida global em pacientes com CUP

Variável	Categoria	OR	IC 95%		p
			LI	LS	
Sítio dominante de metástase no fígado	Sim	2,85	1,63	4,97	0,00022
Expressão de PD-L1	Positiva	0,37	0,16	0,83	0,01585
Quimioterapia	Sim	0,37	0,19	0,69	0,00179
ECOG	0				0,00024
	1	4,03	1,72	9,40	0,00126
	2	7,48	2,91	19,22	0,00003
	3	3,80	1,54	0,36	0,00369
	4	15,46	3,40	70,29	0,00039

5.3 Representação das curvas de sobrevida

A sobrevida global mediana dos doentes incluídos nesse estudo foi de apenas 3,7 meses, tal como representado no gráfico ilustrado pela figura 7 abaixo.

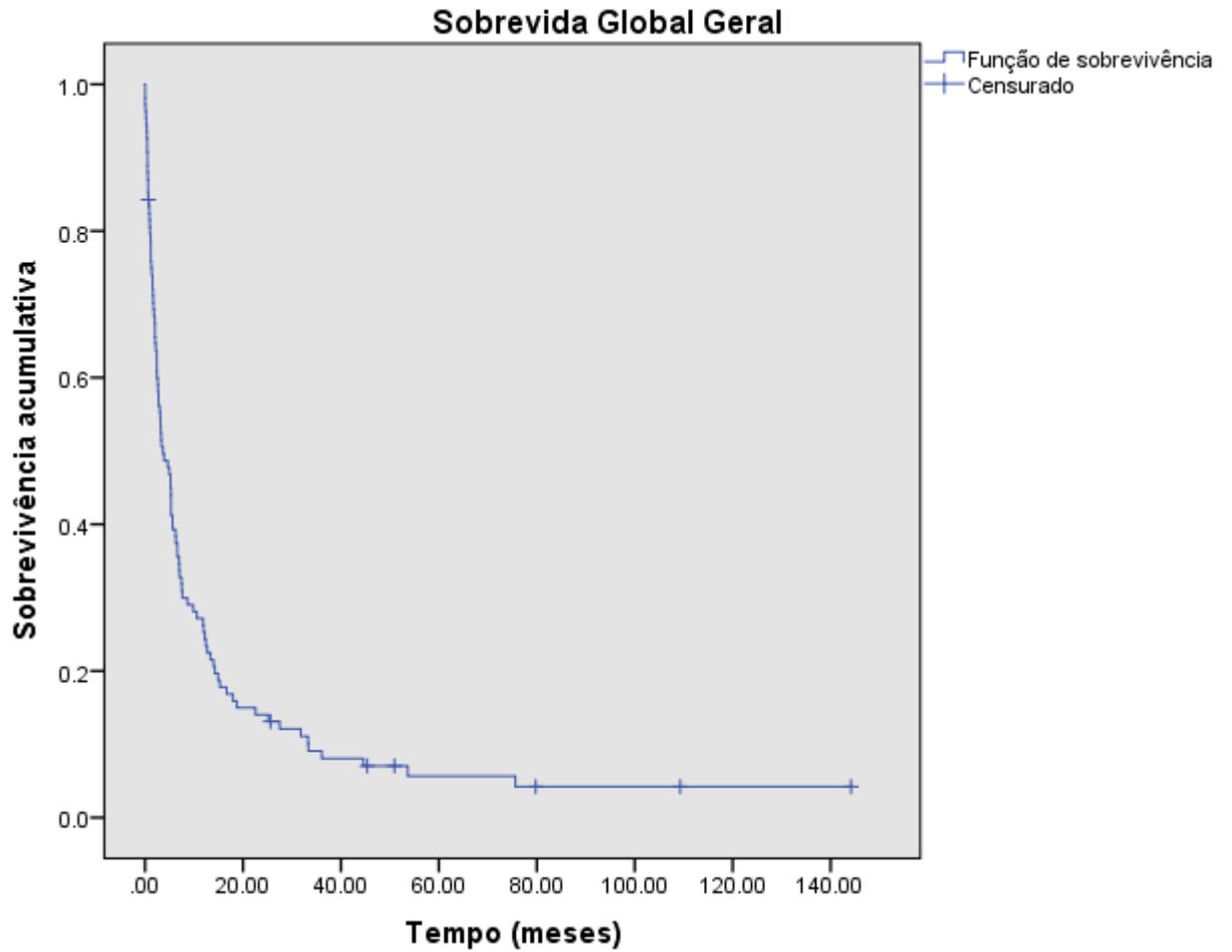


Figura 7 – Curva de Sobrevida Global Geral

A expressão de PD-L1 teve impacto na sobrevida, conforme representado pela figura 8. Os pacientes com expressão de PD-L1 apresentaram maior sobrevida global mediana: 17,96 X 3,15 meses (HR 0,42; p: 0,02). Esses valores traduzidos na curva de Kaplan Meyer representam a avaliação da expressão de PD-L1 tanto por TPS, quanto pelo *score* combinado CPS, visto que o Coeficiente de Concordância de Kappa foi perfeito (Tabela 12).

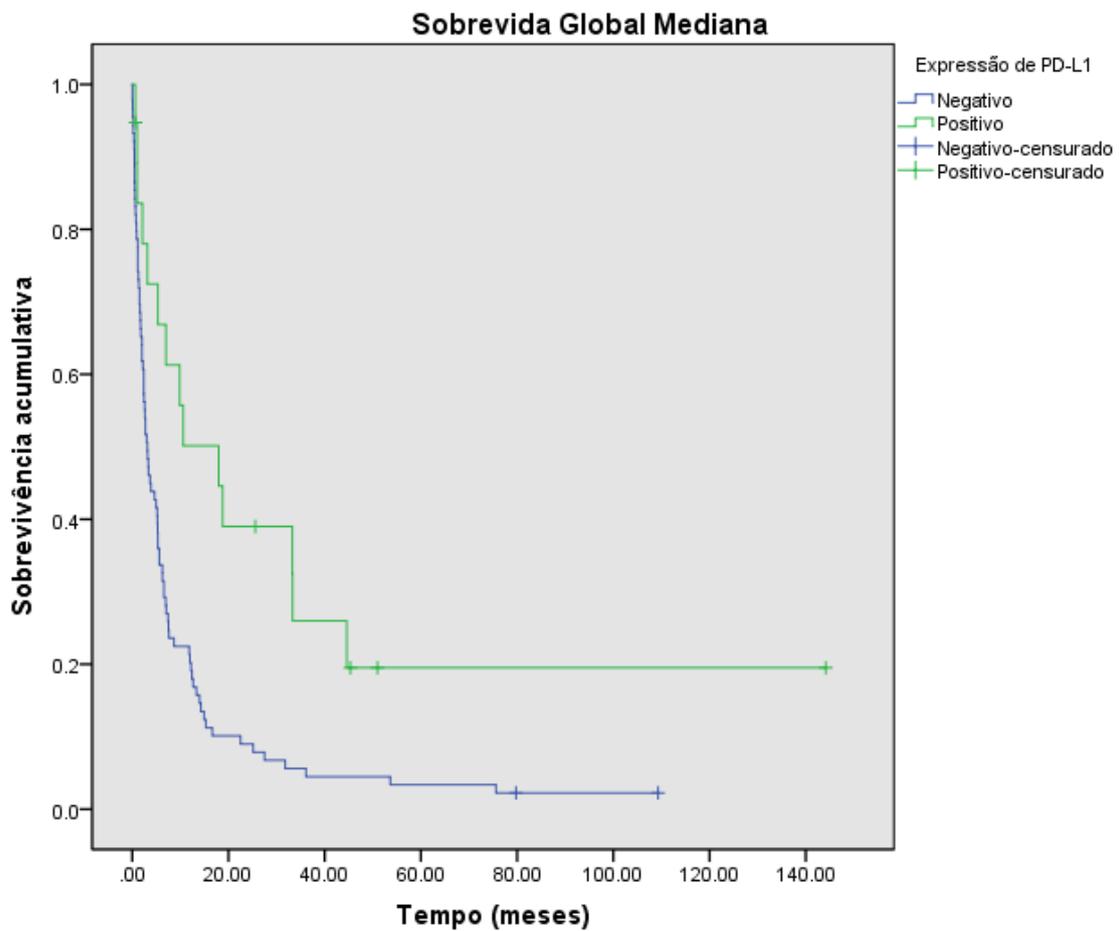


Figura 8 – Curva de Sobrevida Global Mediana de acordo com a expressão de PD-L1

Tabela 12 - Medidas simétricas

	Valor	Erro padronizado assintótico ^a	T aproximado ^b	Significância aproximada
Medida de concordância Kappa	1	0	10,39	0
Nº de casos válidos	108			

a. Não assumindo a hipótese nula.

b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

6 DISCUSSÃO

O câncer de sítio primário desconhecido é uma entidade patológica com comportamento biológico e clínico próprio, cuja atipia e agressividade relegam aos doentes uma sobrevida mediana configurada em poucos meses e cujo tratamento sistêmico traz ainda resultados modestos.⁸¹ Tratando-se de tumor sólido raro, reunimos uma significativa casuística de um grande centro brasileiro de tratamento do câncer, seguindo critérios de seleção bastante restritos, diante de uma doença com apresentação clínica heterogênea. Ao demonstrar a expressão dos *checkpoints* imunológicos PD-1 e PD-L1, tornamos possível explorar a hipótese da imunoterapia como potencial terapêutico para o CUP.

Nossa amostra foi representada por uma idade média de 60 anos como demonstrada em outros estudos para apresentação da doença.⁸² A sobrevida global dos pacientes foi de apenas 3,7 meses, seguindo os achados de outros estudos.⁸³ Em um estudo de registros canadense, mais de 45.000 pacientes com metástases foram avaliados e 1743 deles possuíam sítio primário desconhecido.⁸⁴ A sobrevida mediana encontrada para pacientes com CUP foi de apenas 2 meses. Interessante notar que aqueles que não receberam tratamento tinham uma sobrevida mediana ainda pior, de apenas 1,1 meses. Em nossa análise, mais da metade dos pacientes não receberam tratamento com quimioterapia e isso se deve principalmente a baixa performance clínica deles ao diagnóstico, chamando atenção para a necessidade de estratégias para um diagnóstico mais precoce e um intervalo mais curto entre o diagnóstico e início do tratamento sistêmico.

Estudos tem demonstrado com maior frequência a relação entre a expressão de PD-L1 e prognóstico desfavorável^{85, 86}, o que se coaduna com o entendimento que a expressão de PD-L1 pelo tumor promoveria a evasão do sistema imune proporcionando vantagens para a progressão da doença.⁸⁷ Nós demonstramos que a expressão de PD-L1 tanto através do CPS quanto do TPS *score* foi associado curiosamente a uma sobrevida mediana quase seis vezes maior (17,96 X 3,15 meses (HR 0,42; p: 0,02). Entretanto, alguns tipos tumorais estudados quanto a expressão de PD-L1 também se associaram a melhor prognóstico, não sendo exclusividade do nosso estudo.^{88, 89} Em uma metanálise de Huang e col.⁸⁹ estudando câncer de mama, a expressão de PD-L1 positiva esteve associada a uma sobrevida mais curta. Interessante notar que quando observado a expressão de PD-L1 apenas nos Linfócitos

Infiltrantes do Tumor (TIL's), esta associação se inverteu com redução do risco relativo de morte de 59%. Nós encontramos uma redução de 58% do risco relativo de morte com a expressão de PD-L1, entretanto não exploramos a presença de TIL's e sua expressão diferencial de PD-L1. Recentemente, tem sido descrito o papel de PD-L1 extracelular na forma de exossomos ou de proteína livre solúvel, atuando no microambiente tumoral de forma a inibir o sistema imune, e isso tem fomentado o desenvolvimento de terapias de bloqueio da produção de exossomos.⁹⁰ Não foi possível explorar se estes elementos estavam presentes em nossa amostra. Entretanto, fica evidente que outros fatores podem atuar como *players* importantes no emprego dos *Immune checkpoints* e isso deve de alguma forma, ainda não inteiramente entendida, influenciar nos desfechos clínicos. Adicionalmente, em uma metanálise, Pyo e col. investigaram a expressão de PD-L1 e a sua correlação com a taxa de sobrevida em vários tumores malignos.⁹¹ Na análise, foram incluídos 16.176 pacientes de 97 estudos elegíveis e mostrou que a expressão de PD-L1 foi significativamente correlacionada com uma menor SG (HR: 1.27, IC95%, 1.097 – 1.486), em especial no câncer de esôfago e no carcinoma de células renais. No entanto, não foi encontrada associação entre a expressão de PD-L1 e a SG em pacientes com carcinoma colorretal, carcinoma hepatocelular, melanoma, tumores testiculares ou tumores tímicos. Os autores concluíram que essa heterogeneidade provavelmente estaria relacionada às diferentes abordagens metodológicas para avaliar PD-L1 em cada tipo de tumor, despertando atenção para uma verdadeira necessidade do estabelecimento de critérios padronizados no sentido de melhorar a previsibilidade prognóstica.

A expressão de PD-L1 por IHQ é a mais comumente empregada, mas não há biomarcador preditivo reconhecidamente ideal para designar pacientes aos tratamentos com inibidores do ponto de verificação imune e tão pouco para CUP. Utilizando um *cut-off* de 1%, encontramos uma expressão de 17,6% para PD-L1 e de 8,4% para PD-1. Entretanto, existem diversos anticorpos e plataformas de processamento, assim como diferentes *cut-offs* utilizados para identificar a expressão dessas proteínas. Koomen e col. produziram uma revisão sistemática direcionada em câncer de pulmão de células não pequenas, para comparar ensaios IHQ padronizados com foco específico na coloração e pontuação das células tumorais. Observou-se alta concordância interensaios entre os ensaios 22C3, 28-8, SP263 e testes desenvolvidos em laboratórios com validação adequada, como por exemplo

com o E1L3N[®], o mesmo utilizado em nosso estudo. No entanto, uma diminuição da concordância interobservadores foi verificada com o uso de um ponto de corte de 1%. Os autores concluíram que isso poderia ser problemático na prática clínica, visto que a discordância dos patologistas nesse ponto de corte poderia resultar na negação de opções valiosas de tratamento para alguns pacientes.⁹²

Apesar dos esforços para afirmação do PD-L1 como um biomarcador preditivo de resposta terapêutica, os pacientes cuja doença é negativa para PD-L1 por IHQ ainda podem obter benefício clínico com terapias anti-PD-1 ou anti-PD-L1⁹³, demonstrando que o valor preditivo negativo também é abaixo do ideal. Essa baixa confiabilidade da IHQ como biomarcador para imunoterapias está provavelmente relacionada à múltiplas variáveis, como mencionado anteriormente, uma das quais vinculada ao fato de que a expressão de PD-L1 é regulada por vários mecanismos, incluindo as vias MAPK e PI3K ou Akt, fatores transcricionais HIF1, STAT3 e NFκB e fatores epigenéticos.⁹⁴ Além disso, a expressão de PD-L1 pode ser transitória e ainda existir heterogeneidade tanto no paciente, quanto no tumor.⁹⁵ Esse contexto possibilita fortalecer a ideia de que a amostragem do tumor em um único ponto no tempo ou em apenas um local ou parte de um tumor, pode não refletir com precisão o estado do eixo PD-1 ou PD-L1 em um paciente. Uma segunda variável importante é a baixa uniformidade nos anticorpos IHQ para PD-L1 e os diferentes limiares para a positividade que estão sendo utilizados.⁹⁶ Os limiares de positividade para a expressão de PD-L1 para os estudos variam, o que proporciona um viés ao compará-los. Existem diferentes plataformas (Dako, Roche *Diagnostics* (Ventana)) para avaliação da expressão de PD-L1 com diferentes anticorpos (28-8, 22C3, SP263, SP142 e MIH1, dentre outros) e não há uma padronização quanto a um *cut-off* para positividade. Alguns estudos utilizaram 1%, 5%, 50% ou mais para considerar a expressão de PD-L1 positiva.⁹⁷

Uma meta-análise que envolveu 41 ensaios clínicos e mais de 6000 pacientes com tumores sólidos avançados investigou o valor preditivo da expressão de PD-L1 em células tumorais e células imunes peri-tumorais, sendo todos utilizando ensaios imunohistoquímicos em plataformas automatizadas, tais como Dako 28-8, Dako 22C3, Ventana SP 142, Ventana SP263 e Dako Clone 73-10. É importante ressaltar que nenhum dos tumores estudados incluíam CUP. Os resultados conseguiram demonstrar que a expressão de PD-L1 foi preditiva de resposta em todos os tipos de tumores (HR 2,26, IC 95% , 1,85 - 2.75, p <

0.001)⁹⁸. No entanto, nenhum estudo relatou um limite para o qual o valor preditivo positivo ou preditivo negativo se aproxima de 100%.

Outra questão a ser salientada está relacionada a viabilidade do biomarcador que será medido e analisado no tecido. Garon e col. observaram que havia deterioração de PD-L1 em amostra tumorais cortadas em um período maior que 6 meses antes da reação⁹⁹. No presente estudo, a coloração foi feita menos de um mês depois dos cortes.

Poucos estudos anteriores tiveram o objetivo de investigar o perfil imunológico do CUP.¹⁰⁰ Galatica e col. fizeram uma pesquisa abrangente de biomarcadores preditivos para o bloqueio do ponto de verificação imune no CUP e encontraram que 28% dos 389 casos apresentavam um ou mais biomarcadores preditivos (MSI-H, PD-L1 e/ou alta carga mutacional total), sugerindo a imunoterapia como um potencial terapêutico. Nesse estudo, o *cut off* para a positividade na expressão de PD-L1 foi de 5% e foi observada em 22,5% dos tumores, enquanto a presença de PD-1 expressando TILs foi observada em 58,7% dos casos. Os autores não objetivaram correlacionar com os dados de sobrevida.¹⁰¹ Um outro estudo japonês de Haratani e col. avaliou em uma coorte retrospectiva no Hospital Universitário Kindai o perfil da expressão de PD-L1, a densidade dos linfócitos infiltrantes do tumor e o perfil da expressão de genes relacionadas ao sistema imunológico de 164 pacientes. Foi revelado que a expressão de moléculas do ponto de verificação imune era semelhante à das neoplasias sólidas responsivas a imunoterapia e concluído que há um potencial benefício desse tipo de tratamento para o CUP. Nesse estudo, os autores estratificaram os pacientes em 2 grupos baseado em características prognósticas favoráveis e desfavoráveis. Notadamente houve uma diferença marcante nos dados de sobrevida (29,3 X 7,1 meses).¹⁰² Esse tipo de questionamento sobre o perfil imunológico dessas neoplasias é cada vez mais justificado pelo impacto em que a imunoterapia causou na sobrevida de pacientes com diversos tipos de neoplasias avançadas.¹⁰³

Existem algumas limitações em o nosso estudo que merecem destaque. Trata-se de um desenho retrospectivo e o número de pacientes foi relativamente pequeno, o que pode trazer questões relacionadas a viés de seleção. Outro aspecto importante é que se trata de um estudo uni-institucional e questões relacionadas a referência e contra-referência de pacientes, ao acesso ao tratamento e protocolos de serviço, podem influenciar nos resultados clínicos o que limita generalizações dos resultados encontrados. No entanto,

utilizamos um protocolo de IHQ validado em nossa instituição, com critérios de seleção rígidos, tornando a amostra mais homogênea possível e, reunimos uma casuística relevante, tratando-se de tumor sólido conhecidamente raro. Apesar das limitações, nosso estudo teve caráter exploratório e poderá proporcionar a geração de novas hipóteses relacionadas aos mecanismos envolvidos na imunobiologia dos CUP e na imunomodulação no seu microambiente. Nossos resultados também apontam para a imunoterapia como estratégia terapêutica em potencial para a patologia em questão e alguns ensaios clínicos têm afirmado tal tendência.^{104, 105} Entretanto, são necessários que mais resultados demonstrem e concretizem a eficácia dos inibidores do ponto de verificação imune no CUP (NCT03498521 em clinicaltrials.gov).

7 CONCLUSÃO

Concluimos que PD-L1 é expresso em um subgrupo de pacientes com câncer de sítio primário desconhecido e está associado a uma melhor sobrevida. É necessário explorar melhor o microambiente deste tipo de tumor para entender os fatores associados à sua imunobiologia e consequentes desfechos clínicos.

REFERÊNCIAS

1. Greco FA, JD. H. *Cancer of Unknown Primary Site*. . *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology*. 11th edition. ed. **Philadelphia: Wolters Kluwer**; 2019. p. 1720-37.
2. Losa F, Soler G, Casado A, Estival A, Fernandez I, Gimenez S, et al. *SEOM clinical guideline on unknown primary cancer (2017)*. **Clin Transl Oncol**. 2018;20(1):89-96.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2019*. **CA Cancer J Clin**. 2019;69(1):7-34.
4. Birendra R, Kekre NS. *Re: A Retrospective Analysis of the Effect on Survival of Time from Diagnosis to Neoadjuvant Chemotherapy to Cystectomy for Muscle Invasive Bladder Cancer: J. C. Park, N. M. Gandhi, M. A. Carducci, M. A. Eisenberger, A. S. Baras, G. J. Netto, J. J. Liu, C. G. Drake, M. P. Schoenberg, T. J. Bivalacqua and N. M. Hahn J Urol 2016;195:880-885*. **J Urol**. 2016.
5. Pavlidis N. *Cancer of unknown primary: biological and clinical characteristics*. **Ann Oncol**. 2003;14 Suppl 3:iii11-8.
6. Chorost MI, Lee MC, Yeoh CB, Molina M, Ghosh BC. *Unknown primary*. **J Surg Oncol**. 2004;87(4):191-203.
7. Bugat R, Bataillard A, Lesimple T, Voigt JJ, Culine S, Lortholary A, et al. *Summary of the Standards, Options and Recommendations for the management of patients with carcinoma of unknown primary site (2002)*. **Br J Cancer**. 2003;89 Suppl 1:S59-66.
8. Blaszyk H, Hartmann A, Bjornsson J. *Cancer of unknown primary: clinicopathologic correlations*. **APMIS**. 2003;111(12):1089-94.
9. Culine S. *Prognostic factors in unknown primary cancer*. **Semin Oncol**. 2009;36(1):60-4.
10. Hainsworth JD, Fizazi K. *Treatment for patients with unknown primary cancer and favorable prognostic factors*. **Semin Oncol**. 2009;36(1):44-51.
11. Oien KA. *Pathologic evaluation of unknown primary cancer*. **Semin Oncol**. 2009;36(1):8-37.
12. Wick MR. *Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors*. **Ann Diagn Pathol**. 2008;12(1):72-84.
13. Monzon FA, Koen TJ. *Diagnosis of metastatic neoplasms: molecular approaches for identification of tissue of origin*. **Arch Pathol Lab Med**. 2010;134(2):216-24.
14. Bender RA, Erlander MG. *Molecular classification of unknown primary cancer*. **Semin Oncol**. 2009;36(1):38-43.

15. Kandalaf PL, Gown AM. *Practical Applications in Immunohistochemistry: Carcinomas of Unknown Primary Site*. **Arch Pathol Lab Med**. 2016;140(6):508-23.
16. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications*: Elsevier Health Sciences; 2017.
17. Handorf CR, Kulkarni A, Grenert JP, Weiss LM, Rogers WM, Kim OS, et al. *A multicenter study directly comparing the diagnostic accuracy of gene expression profiling and immunohistochemistry for primary site identification in metastatic tumors*. **Am J Surg Pathol**. 2013;37(7):1067-75.
18. Conner JR, Hornick JL. *Metastatic carcinoma of unknown primary: diagnostic approach using immunohistochemistry*. **Adv Anat Pathol**. 2015;22(3):149-67.
19. Kim KW, Krajewski KM, Jagannathan JP, Nishino M, Shinagare AB, Hornick JL, et al. *Cancer of unknown primary sites: what radiologists need to know and what oncologists want to know*. **AJR Am J Roentgenol**. 2013;200(3):484-92.
20. Chen K, Chen X. *Positron emission tomography imaging of cancer biology: current status and future prospects*. **Semin Oncol**. 2011;38(1):70-86.
21. Demir H, Berk F, Raderer M, Plowman PN, Lassen U, Daugaard G, et al. *The role of nuclear medicine in the diagnosis of cancer of unknown origin*. **Q J Nucl Med Mol Imaging**. 2004;48(2):164-73.
22. Seve P, Billotey C, Broussolle C, Dumontet C, Mackey JR. *The role of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose positron emission tomography in disseminated carcinoma of unknown primary site*. **Cancer**. 2007;109(2):292-9.
23. Delgado-Bolton RC, Fernandez-Perez C, Gonzalez-Mate A, Carreras JL. *Meta-analysis of the performance of 18F-FDG PET in primary tumor detection in unknown primary tumors*. **J Nucl Med**. 2003;44(8):1301-14.
24. Townsend DW, Carney JP, Yap JT, Hall NC. *PET/CT today and tomorrow*. **J Nucl Med**. 2004;45 Suppl 1:4S-14S.
25. Bleicher RJ, Morrow M. *MRI and breast cancer: role in detection, diagnosis, and staging*. **Oncology (Williston Park)**. 2007;21(12):1521-8, 30; discussion 30, 32-3.
26. Pentheroudakis G, Stoyianni A, Pavlidis N. *Cancer of unknown primary patients with midline nodal distribution: midway between poor and favourable prognosis?* **Cancer Treat Rev**. 2011;37(2):120-6.

27. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. *Ovarian carcinoma diagnosis*. **Cancer**. 2000;89(10):2068-75.
28. Katagiri H, Takahashi M, Inagaki J, Sugiura H, Ito S, Iwata H. *Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: a retrospective study*. **Cancer**. 1999;86(3):533-7.
29. Varadhachary GR, Abbruzzese JL, Lenzi R. *Diagnostic strategies for unknown primary cancer*. **Cancer**. 2004;100(9):1776-85.
30. Swaid F, Downs D, Rosemurgy AS. *A practical approach to liver metastasis from unknown primary cancer: What surgeons need to know*. **Cancer Genet**. 2016;209(12):559-66.
31. Saliminejad M, Bemanian S, Ho A, Spiegel B, Laine L. *The yield and cost of colonoscopy in patients with metastatic cancer of unknown primary*. **Aliment Pharmacol Ther**. 2013;38(6):628-33.
32. Hyphantis T, Papadimitriou I, Petrakis D, Fountzilas G, Repana D, Assimakopoulos K, et al. *Psychiatric manifestations, personality traits and health-related quality of life in cancer of unknown primary site*. **Psychooncology**. 2013;22(9):2009-15.
33. Kaasa S, Loge JH, Aapro M, Albrecht T, Anderson R, Bruera E, et al. *Integration of oncology and palliative care: a Lancet Oncology Commission*. **Lancet Oncol**. 2018;19(11):e588-e653.
34. Amela EY, Lauridant-Philippin G, Cousin S, Ryckewaert T, Adenis A, Penel N. *Management of "unfavourable" carcinoma of unknown primary site: synthesis of recent literature*. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2012;84(2):213-23.
35. Lee J, Hahn S, Kim DW, Kim J, Kang SN, Rha SY, et al. *Evaluation of survival benefits by platinum and taxanes for an unfavourable subset of carcinoma of unknown primary: a systematic review and meta-analysis*. **Br J Cancer**. 2013;108(1):39-48.
36. Hainsworth JD, Johnson DH, Greco FA. *Cisplatin-based combination chemotherapy in the treatment of poorly differentiated carcinoma and poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site: results of a 12-year experience*. **J Clin Oncol**. 1992;10(6):912-22.
37. van der Gaast A, Verweij J, Henzen-Logmans SC, Rodenburg CJ, Stoter G. *Carcinoma of unknown primary: identification of a treatable subset?* **Ann Oncol**. 1990;1(2):119-22.
38. Huebner G, Link H, Kohne CH, Stahl M, Kretschmar A, Steinbach S, et al. *Paclitaxel and carboplatin vs gemcitabine and vinorelbine in patients with adeno- or undifferentiated carcinoma of unknown primary: a randomised prospective phase II trial*. **Br J Cancer**. 2009;100(1):44-9.

39. Jeremic B, Zivic DJ, Matovic M, Marinkovic J. *Cisplatin and 5-fluorouracil as induction chemotherapy followed by radiation therapy in metastatic squamous cell carcinoma of an unknown primary tumor localized to the neck. A phase II study.* **J Chemother.** 1993;5(4):262-5.
40. Janssen S, Glanzmann C, Huber G, Studer G. *Individualized IMRT treatment approach for cervical lymph node metastases of unknown primary.* **Strahlenther Onkol.** 2014;190(4):386-93.
41. van de Wouw AJ, Jansen RL, Speel EJ, Hillen HF. *The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review.* **Ann Oncol.** 2003;14(2):191-6.
42. Kamposioras K, Pentheroudakis G, Pavlidis N. *Exploring the biology of cancer of unknown primary: breakthroughs and drawbacks.* **Eur J Clin Invest.** 2013;43(5):491-500.
43. Monzon FA, Dumur CI. *Diagnosis of uncertain primary tumors with the Pathwork tissue-of-origin test.* **Expert Rev Mol Diagn.** 2010;10(1):17-25.
44. Meiri E, Mueller WC, Rosenwald S, Zepeniuk M, Klinke E, Edmonston TB, et al. *A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin.* **Oncologist.** 2012;17(6):801-12.
45. Ferracin M, Pedriali M, Veronese A, Zagatti B, Gafa R, Magri E, et al. *MicroRNA profiling for the identification of cancers with unknown primary tissue-of-origin.* **J Pathol.** 2011;225(1):43-53.
46. Sokilde R, Vincent M, Moller AK, Hansen A, Hoiby PE, Blondal T, et al. *Efficient identification of miRNAs for classification of tumor origin.* **J Mol Diagn.** 2014;16(1):106-15.
47. Santos MTD, Souza BF, Carcano FM, Vidal RO, Scapulatempo-Neto C, Viana CR, et al. *An integrated tool for determining the primary origin site of metastatic tumours.* **J Clin Pathol.** 2018;71(7):584-93.
48. Hainsworth JD, Greco FA. *Gene expression profiling in patients with carcinoma of unknown primary site: from translational research to standard of care.* **Virchows Arch.** 2014;464(4):393-402.
49. Ross JS, Wang K, Gay L, Otto GA, White E, Iwanik K, et al. *Comprehensive Genomic Profiling of Carcinoma of Unknown Primary Site: New Routes to Targeted Therapies.* **JAMA Oncol.** 2015;1(1):40-9.
50. Gatalica Z, Millis SZ, Vranic S, Bender R, Basu GD, Voss A, et al. *Comprehensive tumor profiling identifies numerous biomarkers of drug response in cancers of unknown primary site: analysis of 1806 cases.* **Oncotarget.** 2014;5(23):12440-7.
51. Hainsworth JD, Rubin MS, Spigel DR, Boccia RV, Raby S, Quinn R, et al. *Molecular gene expression profiling to predict the tissue of origin and direct site-specific therapy in patients with*

carcinoma of unknown primary site: a prospective trial of the Sarah Cannon research institute. J Clin Oncol. 2013;31(2):217-23.

52. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell.* 2011;144(5):646-74.
53. Spranger S, Gajewski TF. *Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion.* 2018;2(1):213-28.
54. Cerezo-Wallis D, Soengas M. *Understanding Tumor-Antigen Presentation in the New Era of Cancer Immunotherapy. Curr Pharm Des.* 2016.
55. Sharpe AH, Freeman GJ. *The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):116-26.
56. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J Urol.* 1976;116(2):180-3.
57. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N Engl J Med.* 2010;363(5):411-22.
58. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.
59. Thompson RH, Gillett MD, Chevillat JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. *Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17174-9.
60. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3360-5.
61. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J.* 1992;11(11):3887-95.
62. Blank C, Mackensen A. *Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):739-45.
63. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med.* 2000;192(7):1027-34.
64. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. *Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol.* 2012;24(2):207-12.

65. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002;99(19):12293-7.
66. Leventakos K, Mansfield AS. *Advances in the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer: Focus on Nivolumab, Pembrolizumab, and Atezolizumab.* **BioDrugs.** 2016.
67. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. *Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates.* **J Clin Oncol.** 2010;28(19):3167-75.
68. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.* **N Engl J Med.** 2012;366(26):2443-54.
69. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer.* **N Engl J Med.** 2012;366(26):2455-65.
70. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients.* **Nature.** 2014;515(7528):563-7.
71. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. *Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial.* **Lancet.** 2014;384(9948):1109-17.
72. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. *Pembrolizumab versus ipilimumab in Advanced Melanoma.* **N Engl J Med.** 2015;372(26):2521-32.
73. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial.* **Lancet Oncol.** 2015;16(4):375-84.
74. Balar AV, Weber JS. *PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions.* **Cancer Immunol Immunother.** 2017;66(5):551-64.
75. Dijkstra KK, Voabil P, Schumacher TN, Voest EE. *Genomics- and Transcriptomics-Based Patient Selection for Cancer Treatment With Immune Checkpoint Inhibitors: A Review.* **JAMA Oncol.** 2016;2(11):1490-5.
76. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. *Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study.* **Lancet Oncol.** 2017;18(9):1182-91.

77. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. *Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support.* **J Biomed Inform.** 2009;42(2):377-81.
78. Roach C, Zhang N, Corigliano E, Jansson M, Toland G, Ponto G, et al. *Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer.* **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 2016;24(6):392-7.
79. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. *Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer.* **Arch Pathol Lab Med.** 2019;143(3):330-7.
80. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. *Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma.* **N Engl J Med.** 2015;373(19):1803-13.
81. Golfinopoulos V, Pentheroudakis G, Salanti G, Nearchou AD, Ioannidis JP, Pavlidis N. *Comparative survival with diverse chemotherapy regimens for cancer of unknown primary site: multiple-treatments meta-analysis.* **Cancer Treat Rev.** 2009;35(7):570-3.
82. Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. *Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary.* **Eur J Cancer.** 2003;39(14):1990-2005.
83. Greco FA, Pavlidis N. *Treatment for patients with unknown primary carcinoma and unfavorable prognostic factors.* **Semin Oncol.** 2009;36(1):65-74.
84. Kim CS, Hannouf MB, Sarma S, Rodrigues GB, Rogan PK, Mahmud SM, et al. *Survival outcome differences based on treatments used and knowledge of the primary tumour site for patients with cancer of unknown and known primary in Ontario.* **Curr Oncol.** 2018;25(5):307-16.
85. Wen Y, Chen Y, Duan X, Zhu W, Cai C, Deng T, et al. *The clinicopathological and prognostic value of PD-L1 in urothelial carcinoma: a meta-analysis.* **Clin Exp Med.** 2019;19(4):407-16.
86. Zhou ZJ, Zhan P, Song Y. *PD-L1 over-expression and survival in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis.* **Transl Lung Cancer Res.** 2015;4(2):203-8.
87. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment.* **Nat Immunol.** 2013;14(10):1014-22.
88. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Luber BS, Wang H, et al. *PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival.* **Cancer Immunol Res.** 2013;1(1):54-63.

89. Huang W, Ran R, Shao B, Li H. *Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis.* **Breast Cancer Res Treat.** 2019;178(1):17-33.
90. Daassi D, Mahoney KM, Freeman GJ. *The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion.* **Nat Rev Immunol.** 2020;20(4):209-15.
91. Pyo JS, Kang G, Kim JY. *Prognostic role of PD-L1 in malignant solid tumors: a meta-analysis.* **Int J Biol Markers.** 2017;32(1):e68-e74.
92. Koomen BM, Badrising SK, van den Heuvel MM, Willems SM. *Comparability of PD-L1 immunohistochemistry assays for non-small-cell lung cancer: a systematic review.* **Histopathology.** 2020;76(6):793-802.
93. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma.* **N Engl J Med.** 2015;373(1):23-34.
94. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. *Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer.* **Ann Oncol.** 2016;27(3):409-16.
95. Mansfield AS, Murphy SJ, Peikert T, Yi ES, Vasmatazis G, Wigle DA, et al. *Heterogeneity of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Multifocal Lung Cancer.* 2016;22(9):2177-82.
96. Patel SP, Kurzrock R. *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy.* **Mol Cancer Ther.** 2015;14(4):847-56.
97. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba, II, Hirsch FR, et al. *Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art?* **J Thorac Oncol.** 2015;10(7):985-9.
98. Khunger M, Hernandez AV, Pasupuleti V, Rakshit S, Pennell NA, Stevenson J, et al. *Programmed Cell Death 1 (PD-1) Ligand (PD-L1) Expression in Solid Tumors As a Predictive Biomarker of Benefit From PD-1/PD-L1 Axis Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis.* 2017(1):1-15.
99. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer.* **N Engl J Med.** 2015;372(21):2018-28.
100. Hainsworth JD, Greco FA. *Cancer of Unknown Primary Site: New Treatment Paradigms in the Era of Precision Medicine.* **Am Soc Clin Oncol Educ Book.** 2018;38:20-5.
101. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. *Comprehensive analysis of cancers of unknown primary for the biomarkers of response to immune checkpoint blockade therapy.* **Eur J Cancer.** 2018;94:179-86.

102. Haratani K, Hayashi H, Takahama T, Nakamura Y, Tomida S, Yoshida T, et al. *Clinical and immune profiling for cancer of unknown primary site*. **J Immunother Cancer**. 2019;7(1):251.
103. Ribas A, Wolchok JD. *Cancer immunotherapy using checkpoint blockade*. **Science**. 2018;359(6382):1350-5.
104. Naing A, Meric-Bernstam F, Stephen B, Karp DD, Hajjar J, Rodon Ahnert J, et al. *Phase 2 study of pembrolizumab in patients with advanced rare cancers*. **J Immunother Cancer**. 2020;8(1).
105. Tanizaki J, Yonemori K, Akiyoshi K, Minami H, Ueda H, Takiguchi Y, et al. *NivoCUP: An open-label phase II study on the efficacy of nivolumab in cancer of unknown primary*. 2020;38(15_suppl):106-.

ANEXOS

Anexo A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação do microambiente de tumores de sítio primário desconhecido

Pesquisador: Flávio Mavignier Cárcano

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51579715.0.0000.5437

Instituição PropONENTE: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.016.358

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_801241_E1.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 02/04/2017):

Resumo: Introdução: O câncer de sítio primário oculto é um grupo heterogêneo de cânceres para os quais a origem permanece desconhecida, apesar de detalhada investigação. A sua apresentação clínica ocorre por sintomas decorrentes da metástase, que pode ser influenciada não somente por processos biológicos do tumor, mas também decorrente de processos regulatórios do microambiente tumoral. ADAMTS-1, uma metaloproteinase envolvida em vários processos fisiológicos, atua no microambiente tumoral como regulador negativo da angiogênese, importante processo na tumorigênese e desenvolvimento de metástase. Outro fenômeno associado ao microambiente tumoral, a reprogramação metabólica tumoral, também se mostra importante na tumorigênese e o perfil de expressão de moléculas envolvidas neste processo, tem sido associadas a diferentes histologias do câncer de sítio primário oculto. Novas moléculas envolvidas nos checkpoints regulatórios do sistema imune também se mostraram importantes alvos terapêuticos em outros tumores, mas ainda não foram estudados em câncer de sítio primário oculto. **Objetivos:**

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancoerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

Avaliar a expressão de moléculas associadas ao microambiente de tumores primários desconhecido e suas possíveis associações com características clinicopatológicas e desfechos clínicos em pacientes com este tipo de tumor. Metodologia: Imunohistoquímica será utilizada para avaliar a expressão de moléculas associadas ao metabolismo tumoral, ADAMTS-1, PD-1 e PDL-1. Desfechos clínicos como sobrevida livre de eventos e sobrevida global serão analisados utilizando as curvas de Kaplan Meier e comparações pelo log rank.

Introdução: 1. INTRODUÇÃO 1.1 CÂNCER DE SÍTIO PRIMÁRIO OCULTO Em 2012, o câncer acometeu mais de 14 milhões de novas pessoas e matou mais de 8 milhões em todo mundo.¹ No Brasil, foram estimados, em 2014, a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país.² O câncer de sítio primário oculto, ou de origem desconhecida (CUP, do inglês cancer of unknown primary), é um grupo heterogêneo de cânceres para os quais a origem permanece desconhecida apesar de detalhada investigação.³ Estima-se que cerca de 3 a 5% de todos os casos novos de tumores epiteliais seja de CUP e a incidência padronizada para a idade em todo o mundo seja de 4 a 19 casos por 100.000.⁴ Atualmente, a definição de CUP está associada ao fracasso dos métodos diagnósticos em definir a exata origem tumor primário. Dentre estes métodos, inclui-se história médica detalhada, exame físico completo, incluindo exame pélvico e digital do reto, hemograma e bioquímica, análise da urina, imunohistoquímica do material de biópsia da metástase, exames de imagem do tórax, abdome e pelve e, em alguns casos, mamografia e PET -CT.⁵ Comumente, o paciente apresenta-se com um câncer metastático ao diagnóstico cuja histopatologia revela um carcinoma, adenocarcinoma, carcinoma escamoso ou neoplasia maligna pouco diferenciada.⁶ Os sintomas estão principalmente relacionados aos efeitos locais de onde se encontram as metástases ou então associados eventualmente a síndromes paraneoplásicas.⁶ Apesar de 80% dos casos apresentar um mau prognóstico, existem grupos clínicos que podem apresentar um prognóstico favorável com maiores sobrevidas, devido ao comprometimento locoregional restrito e à possibilidade de melhor controle terapêutico.⁷ A quimioterapia tem sido a base do tratamento do CUP. Esquemas que unem drogas ativas em diversos tipos de tumores sólidos já foram testados em CUP, apresentando toxicidade elevada, taxas de resposta entre 10 - 25%, intervalo livre de doença curto e sobrevida mediana em torno de 7 - 9 meses.^{8,9} Ainda que se possa determinar o primário do CUP, não é possível saber se o uso do tratamento sítio-específico poderá mudar o prognóstico para muitos casos. Isso se deve, em parte, ao fato de muitos tumores primários conhecidos ainda não possuírem tratamento efetivo. Pode-se entender,

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancoerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

também, que um tumor incapaz de expressar marcadores típicos de seu primário possa corresponder à sua variante mais agressiva do ponto de vista clínico-patológico. Ainda não está claro se o CUP é uma entidade clínico-patológica com características genéticas e fenotípicas distintas ou um grupo de tumores primários não identificados.¹⁰ Recentemente, métodos de análise de expressão gênica definiram assinaturas de tumores primários para alguns tipos de câncer e elas faziam correspondência com vários CUP's, o que sugeriu que estes possuem características biológicas similares com suas contrapartes primárias.¹¹⁻¹³ Além disso, estas novas técnicas abriram a possibilidade de direcionar o tratamento e mudar os resultados clínicos, principalmente para aqueles tumores com reconhecida quimiosensibilidade.¹⁴ Interessante notar que, um tumor capaz de emitir metástases sem que o seu primário se manifeste clinicamente pode ter uma assinatura que favoreça a invasão, migração e metástase de forma precoce. Embora não se tenha confirmado diferenças em relação a outros tipos de tumores, os dados têm sugerido um perfil de angiogênese altamente ativo nos CUP com expressão de reguladores chaves como VEGF, MMPs, e TIMP-1.¹⁰

1.2 ADAMTS-1 ADAM trata-se do acrônimo de "A Disintegrin And Metalloprotease", e dá nome a uma glicoproteína com função de metaloprotease dependente de zinco, que desempenha papel na sinalização celular, fusão celular e interação célula-célula. A subfamília particular ADAMTS (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs) reflete a arquitetura dos domínios proteicos, que combina uma metaloproteinase tipo-ADAM com repetições trombospondina tipo-1.¹⁵ Membros individuais desta família diferem no número de motivos trombospondina (TS) no C-terminal sendo que ADAMTS1 contém duas alças desintegrinas e três motivos TS no C-terminal.¹⁶ As desintegrinas compõem uma família de peptídeos anticoagulantes encontrados em venenos de cobras, as quais são caracterizadas por um alto teor de cisteína e funcionam como um ligante de integrina com capacidade de romper a interação célula-matriz. A similaridade de sequência entre ADAMTS1 e da toxina hemorrágica "Ht-e", estende-se para o domínio desintegrina e sete resíduos de cisteína que estão conservadas em ADAMTS1 (Figura 01).¹⁷

Figura 01. Representação esquemática da organização de domínio de ADAMTS1 e outras proteínas da família metaloproteinase-desintegrina. TM, transmembrana; TSP, motivo trombospondina tipo I, EGF, motivo tipo fator de crescimento epidérmico. Posição de ligação do zinco é indicado por Zn. Extraído de Kuno et. al.¹⁷

A ADAMTS1 é conhecida também pela sinonímia METH1 e possui a localização gênica 21q21.2. Trata-se de um gene bem conservado durante a evolução, mostrando homologia com seus ortólogos. Além da função de protease, diversas outras funções foram descritas tais como ligante da heparina, de íons metálicos e zinco, e atividade anti-angiogênica, estando envolvida em processos como a formação da

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

trabécula cardíaca, sinalização celular mediada por integrina, desenvolvimento renal, ovulação e regulação negativa da proliferação celular.¹⁶ A ADAMTS1 foi descrita pela primeira vez por Kuno et. al¹⁷ como uma proteína rica em cisteína com uma sequência similar à metaloproteinase do veneno da cobra e também à trombospondina. Diferente de outras ADAMs, ADAMTS1 não possui um domínio transmembrana e é supostamente uma proteína secretada. Os autores conseguiram demonstrar que o domínio homólogo à trombospondina de ADAMTS1 é capaz de interagir com glicocojugados sulfatados (como a heparina) em concentração fisiológica. Além disso, utilizando linhagem celular de adenocarcinoma de cólon murino, observou-se aumento no nível do RNA mensageiro (RNAm) de ADAMTS1 após estimulação com interleucina-1 (IL-1), o que sugere que ADAMTS1 não seja constitutivamente expressa e sim, um gene induzido. Os autores demonstraram também que ADAMTS1 é fracamente expressa em tecidos como o coração e o rim e indetectável em outros tecidos como pulmão, fígado, cérebro e músculo. Entretanto, após indução de inflamação sistêmica em camundongos, observa-se que o RNAm de ADAMTS1 é significativamente aumentado no coração e rim, mas não em outros órgãos, indicando uma possível associação com a inflamação. A angiogênese é um evento muito importante em diversos processos patológicos, incluindo a progressão tumoral¹⁸, e uma importante relação entre ADAMTS1 e a angiogênese tem sido descrita na última década. Rodríguez-Manzaneque e colaboradores¹⁸ modificaram geneticamente camundongos para desenvolverem câncer de mama e super-expressar ou não expressar TS. A avaliação histológica dos tumores revelou adenocarcinomas pouco diferenciados muito semelhantes, mas com diferenças marcantes na vascularização, mesmo macroscopicamente. Uma redução significativa do número de vasos foi encontrada em tumores com super-expressão de hTSP1 (homólogo TS1), mas nenhuma alteração foi observado em tumores hTSP1 ausente, quando comparado ao grupo de controle. Estas evidências apontam para o TSP1 como um regulador negativo da vasculatura tumoral. Além disso, observou-se que, nos tumores sem expressão de hTSP1, a proteína do Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) estava complexada com um dos seus receptores, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) e, em contraste, esta associação não era tão evidente nos tumores com super-expressão de hTSP1. Luque e colaboradores¹⁹ demonstraram que a capacidade de ADAMTS1 para inibir a neo-vascularização in vivo foi maior do que a da endostatina e TSP1. In vitro, observou-se que ADAMTS1 foi capaz de diminuir drasticamente a fosforilação do VEGFR2 por um mecanismo envolvendo ligação direta e sequestro de VEGF¹⁶⁵. Esta interação foi também verificada in vivo. Liu e colaboradores²⁰, utilizando modelos murinos de câncer de mama e pulmão, demonstraram que ADAMTS-1 pode possuir atividade pró ou antitumoral, de acordo

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400

UF: SP Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: oep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

com a forma de ADAMTS-1 presente. Esta sofre clivagem autoproteolítica gerando os fragmentos ADAMTS-1NTF e ADAMTS -1CTF, que, por sua vez, demonstram atividade antitumoral, por inibição do extravasamento da célula tumoral, proliferação, sobrevivência e por repressão da angiogênese, ao contrário de sua forma não clivada. Os autores também mostraram que a atividade metaloproteinase de ADAMTS-1 na forma não clivada é necessária para a sua atividade pró-tumoral. Além disso, a atividade antitumoral dos fragmentos de ADAMTS-1 requer o motivo TS-1, que está provavelmente oculto na forma não clivada. Foi também observado que a clivagem de ADAMTS-1 pode ser inibida por heparina/heparan sulfato (HS) e que o nível de proteoglicanos HS no microambiente tumoral provavelmente regula qual forma de ADAMTS-1 (completa ou clivada) está disponível naquele microambiente para exercer sua atividade pró-tumoral ou antitumoral, respectivamente. Recentemente, um ensaio utilizando camundongos inoculados com células de câncer de mama mostrou a presença de ADAMTS-1 e seus substratos no microambiente tumoral, assim como a inibição do crescimento tumoral, quando utilizado um anticorpo anti-ADAMTS-1.²¹ Outras isoformas de ADAMTS têm sido associadas com sobrevidas divergentes em pacientes com câncer de mama e colorretal.²² Assim, a ADAMTS1 é uma molécula funcionalmente complexa que pode fazer uma papel chave na fisiopatogenia dos CUPs sendo que as suas relações com os atores deste cenário, assim como o seu valor prognóstico e preditivo, merecem investigação.

1.3 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA Nas regiões de desenvolvimento tumoral, a concentração de oxigênio decresce com a distância ao capilar, de tal forma que as células oxigenadas ficam limitadas a certa distância dos vasos sanguíneos.²³ Como a membrana basal das células permanece intacta e a proliferação celular causa um espessamento da camada epitelial, inevitavelmente, são desenvolvidas regiões de hipóxia perto do limite de difusão do oxigênio.^{23,24} Estas regiões de hipóxia favorecem o metabolismo anaeróbico, selecionando algumas células e permitindo a atividade metabólica na ausência de oxigênio.^{23,25} No entanto, esta alteração do metabolismo das células tumorais é mais do que uma simples adaptação à hipóxia enfrentada durante a carcinogênese, uma vez que persistem mesmo em condições de normóxia (efeito de Warburg ou glicólise aeróbia). Assim, as células tumorais produzem energia preferencialmente pela glicólise, em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial, sendo que o consumo elevado de glicose apresenta uma relação com a agressividade do tumor. Assim, em um câncer não invasivo, as células apresentam um baixo consumo de glicose quando comparadas a um câncer altamente invasivo.^{23,26} No contexto da hipóxia, o HIF-1 (hypoxia inducible factor 1-alfa) surge como o regulador chave, na medida em que é um fator de transcrição que induz a expressão de várias proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, tais como o transportador de glicose 1

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400

UF: SP Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: oep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

(GLUT1), a anidrase carbônica (CAIX) e os transportadores de monocarboxilatos (MCTs).²⁷⁻²⁹ Os MCTs pertencem a uma família de proteínas codificadas pelos genes da família SLC16A, composta por 14 membros. No entanto, apenas quatro membros (isoformas 1 a 4) foram bioquimicamente caracterizados.³⁰ O MCT1, um transportador com afinidade intermédia para o substrato, é encontrado em praticamente todos os tecidos humanos mas apresenta uma importante expressão no coração e músculo.^{31,32} O MCT2 é considerado um transportador de alta afinidade, sendo encontrado em tecidos que utilizam o lactato como substrato para o metabolismo aeróbio como por exemplo o rim e o fígado, onde o lactato é o principal substrato.^{31,33-35} O MCT3 possui uma distribuição ainda mais restrita, sendo encontrado principalmente no pigmento da retina e no epitélio do plexo corioide.^{36,37} Finalmente, o MCT4 é um transportador de baixa afinidade e tem sido observado em tecidos altamente glicolíticos, como fibras musculares esqueléticas, astrócitos e células brancas do sangue.^{32,38,39} A expressão e atividade dos MCTs é regulada pela expressão de proteínas auxiliares, chamadas chaperonas. No caso do MCT1, MCT3 e MCT4, a proteína associada é a CD147.⁴⁰ Já no caso do MCT2, este encontra-se associado à gp70.⁴¹ Recentemente, a CD44 também foi descrita como proteína chaperona do MCT1 e MCT4.⁴² Na adaptação metabólica característica das células tumorais, os MCTs apresentam um papel essencial; as isoformas MCT1 e MCT4, em particular, desempenham um duplo papel na manutenção do fenótipo metabólico de células de tumor. Por um lado, elas facilitam o efluxo de lactato e, por outro lado, contribuem para a preservação do pH intracelular, através do co-transporte com um próton. Assim, estas isoformas apresentam-se aumentadas em células tumorais que apresentam altas taxas glicolíticas, surgindo como importantes potenciais alvos terapêuticos para tratamento de câncer, por inibir a fase final da glicólise.⁴³ O GLUT1 é responsável pelo aumento do influxo de glicose, especialmente em situações de hipóxia.^{44,45} A sua expressão e atividade estão aumentadas em algumas situações, como nas células de neoplasias malignas.⁴⁴ Esta sobreexpressão foi detectada em diferentes tipos de câncer e é frequentemente associada a um pior prognóstico.^{44,46-48} Já a CAIX contribui para a manutenção no pH intracelular das células cancerosas glicolíticas e é considerada um marcador de agressividade tumoral⁴⁹, sendo que alguns estudos mostraram um provável papel da CAIX também como uma resposta inicial à hipóxia das células tumorais.⁵⁰ Um estudo recente tem mostrado diferenças no perfil de expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo nos CUPs, de acordo com o subtipo histológico e características clínicas.⁵¹ O conhecimento do perfil metabólico e seus atores nos CUPs pode gerar novas hipóteses e possibilidades terapêuticas. Além disso, algumas drogas antineoplásicas podem interferir no metabolismo tumoral, abrindo a possibilidade de novos

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400

UF: SP Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: oep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII



Continuação do Parecer: 2.016.358

protocolos terapêuticos. 1.4 CHECKPOINTS PD-1 / PDL-1 Atualmente, é notória a maior compreensão do papel do sistema imunológico no processo de carcinogênese e a evasão tumoral ao sistema imunológico é considerada uma das características fundamentais do câncer.⁵² Este escape imunológico pode acontecer por diferentes mecanismos, como a perda da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), o recrutamento de células T reguladoras com função imunossupressora, ou produção de citocinas, também com papel de imunossupressão, como TGF- (Transforming Growth Factor Beta) e interleucina-10; ou ainda, os tumores podem desenvolver barreiras físicas, tais como o colágeno e a fibrina, ou estabelecer máscaras antigênicas.⁵³ A imunoterapia contra o câncer vem sendo utilizada desde a década de setenta, através de instilações intravesicais de BCG (Bacilo CalmetteGuérin) em pacientes com tumores de bexiga superficiais, com conseqüente estímulo imunológico, o qual levou ao controle da doença, principalmente em termos de recidiva e progressão.⁵⁴ O ressurgimento do interesse desta prática terapêutica veio do desenvolvimento de novas tecnologias e da descoberta de novas moléculas regulatórias envolvidas no processo tumoral de evasão do sistema imune.⁵⁵ Moléculas como o CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen 4), presente na superfície das células T e que contribui para a inibição da resposta imunológica pela interação com a proteína tumoral CD-80, tem sido alvo de novas drogas contra o melanoma e levou ao aumento de sobrevida nesta doença.⁵⁶ Sabe-se que, após a sinapse imunológica, os sinais que estimulam ou inibem o sistema imune são originados a partir de moléculas corregulatórias, que são denominadas checkpoints imunológicos. No contexto tumoral, tanto as células tumorais quanto as células apresentadoras de antígeno podem alterar a atividade do sistema imune, utilizando para isso, entre outros, o receptor PD-1 e seus ligantes, como o PDL-1 (B7-H1) e o PDL-2 (B7-DC).⁵⁷ O PD-1 é definido como uma proteína de membrana do tipo 1 e pertence à família de moléculas reguladoras de células T, denominadas CD28/B27.⁵⁸ É formado por um domínio extracelular, por uma região transmembranar e uma cauda intracelular, sendo expresso na superfície das células T ativadas, células B e macrófagos.⁵⁹ Atua principalmente nos tecidos periféricos, local em que ocorre a interação com seus ligantes imunossupressores, que podem estar expressos tanto nas células tumorais, quanto nas estromais.⁶⁰ Em modelos pré-clínicos, demonstrou-se que a inibição da interação entre PD-1 e PDL-1 pode estimular a resposta de células T in vitro e, conseqüentemente, aumentar a atividade antitumoral.^{61,62} Vários estudos clínicos têm sido realizados com bloqueadores do complexo PD-1/PDL-1 e nos últimos anos, a atividade antitumoral e segurança de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 denominado Nivolumabe, tem sido demonstrada em pacientes com neoplasias sólidas em estádios avançados e refratários aos tratamentos

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: oep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII



Continuação do Parecer: 2.016.358

estabelecidos, tais como melanoma e cânceres colorretal, de rim, de próstata e de pulmão.⁶³⁻⁶⁵ Há dois anos o FDA aprovou o Nivolumab como linha terapêutica para carcinoma de pulmão, tanto de histologia escamosa quanto não escamosa.^{66,67} Recentemente, outro estudo analisou a atividade e a segurança de um anticorpo anti-PD-L1 denominado Atezolizumabe, sendo observadas taxas de resposta significativas em neoplasias de pulmão, rim e no mieloma múltiplo.⁶⁸

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Através deste estudo, pretende-se avaliar a possível associação entre a expressão de proteínas envolvidas no microambiente tumoral e características clínico-patológicas e desfechos clínicos de pacientes diagnosticados com tumor de sítio primário desconhecido. Mais especificamente serão avaliadas a expressão de ADAMTS1, MCT1, MCT2, MCT4, CD147, GLUT1, CAIX, PD-1 e PDL-1 em uma série de tumores de sítio primário desconhecido e suas associações a características clínico-patológicas e desfechos clínicos, incluindo, sobrevida global, sobrevida livre de eventos e resposta ao tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os dados de pacientes serão obtidos exclusivamente de forma retrospectiva em prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) e o material biológico humano que será utilizado a partir do Biobanco do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos está em acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde No 441. Em acordo com a Resolução CNS/MS No 446, todas as informações referentes ao estudo serão mantidas em sigilo, sob a responsabilidade do investigador principal, não havendo divulgação pública do nome ou de qualquer outra informação que possa identificar o envolvimento dos mesmos neste estudo. Devido à necessidade de se manter material estocado no Departamento de Patologia para possíveis testes diagnósticos futuros, o bloco de parafina não será esgotado ou prejudicado. Assim, trata-se de um projeto com um risco mínimo ao participante de pesquisa, caracterizado apenas pela eventual quebra de sigilo.

Benefícios: Não haverá benefício direto ao participante de pesquisa, no entanto, futuros pacientes diagnosticados com metástase de tumor primário desconhecido poderão se beneficiar do conhecimento gerado durante neste estudo.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: oep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente submissão trata-se de E1 ao projeto para as seguintes alterações:

Este projeto propõe, desde a sua concepção, o estudo de moléculas envolvidas no microambiente dos tumores de sítio primário desconhecido. Com as recentes descobertas e avanços terapêuticos relacionados ao papel do sistema imune nos microambientes tumorais, a nossa equipe de pesquisa considerou pertinente o estudo da molécula PD-1 e seu ligante nos tumores de sítio primário desconhecido. Está evidente que podem ser alcançadas respostas tumorais com medicações que atuam nos checkpoints imunológicos, como é o caso dos anticorpos anti-PD1/PDL-1. O conhecimento da expressão destas moléculas no microambiente tumoral pode auxiliar no entendimento da interação microambiente-sistema imune e, isso, ainda é obscuro nos tumores de sítio primário desconhecido. Como trata-se de uma doença com prognóstico reservado entre os diversos tipos de câncer, conhecer a presença do PD-1 e seu ligante no microambiente dos tumores de sítio primário desconhecido, pode abrir uma janela de oportunidade para alcançar uma nova estratégia terapêutica. Portanto, esta emenda propõe a adição de um novo objetivo ao projeto com a avaliação da expressão de PD-1 e PDL-1 em uma série de tumores de sítio primário desconhecido, através da mesma técnica já descrita no projeto, a imunohistoquímica. Este objetivo, será tema do Mestrado acadêmico do aluno João Neif Antonio Jr. Adicionalmente, as análises imunohistoquímicas não serão mais feitas através da fabricação de TMA's e sim utilizando laminas inteiras. Isso se deve à percepção da dificuldade técnica no uso do material biológico, já que muitos são provenientes de biópsias e isso dificulta a fabricação adequada dos TMA's. Ajustes nos métodos também serão necessários no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos pertinentes a emenda foram adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1055/2015, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetido em 02/04/2017;

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hcancoerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- (x) O Estudo deve Continuar;
 () O Estudo deve ser Interrompido;
 () O Estudo está Finalizado;
 () Solicita-se Esclarecimento;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_801241_E1.pdf	02/04/2017 16:38:19		Aceito
Outros	Emenda_revisada.pdf	02/04/2017 16:35:16	Flávio Mavignier Cárcano	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_Emenda_Abril_2017.pdf	02/04/2017 16:34:33	Flávio Mavignier Cárcano	Aceito
Outros	Relatorio_material_patologia.pdf	05/01/2016 20:50:09	Flávio Mavignier Cárcano	Aceito
Outros	Corresponsabilidade_alunos.pdf	03/12/2015 17:55:29	Bruna Aline Roque Alves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	03/12/2015 17:00:44	Flávio Mavignier Cárcano	Aceito
Outros	Ciencia_departamento.pdf	03/12/2015 15:33:57	Flávio Mavignier Cárcano	Aceito
Outros	Cadastro_NAP.pdf	03/12/2015 01:17:09	FLAVIO MAVIGNIER CARCANO	Aceito
Outros	MABIN.pdf	03/12/2015 01:16:43	FLAVIO MAVIGNIER CARCANO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade.pdf	03/12/2015 01:16:11	FLAVIO MAVIGNIER CARCANO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Fonte_financiamento.pdf	03/12/2015 01:15:37	FLAVIO MAVIGNIER CARCANO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Corresponsabilidade.pdf	03/12/2015 01:15:01	FLAVIO MAVIGNIER CARCANO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.016.358

BARRETOS, 15 de Abril de 2017

Assinado por:
Thiago Buosi Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
UF: SP Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: oep@hccancerbarretos.com.br