TABATHA GUTIERREZ PRIETO MARTINS ROCHA

Avaliação dos genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal e sua relação com a progressão e a invasão tumoral em câncer de pulmão

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Programa de Patologia

**Orientadora: Profª Drª. Vera Luiza
Capelozzi**

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Tabatha Gutierrez Prieto Martins
Avaliação dos genes envolvidos na transição
epitelial-mesenchimal e sua relação com a progressão
e a invasão tumoral em câncer de pulmão / Tabatha
Gutierrez Prieto Martins Rocha. -- São Paulo, 2018.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Câncer de pulmão 2.Transição
epitelial-mesenchimal 3.Progressão tumoral
4.Metástase 5.Biomarcador molecular 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-295/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico este trabalho a Deus e aos meus avós,
Isabel Prieto Vieira e Florentino Gutierrez Terciado,
com a certeza de que um dia iremos nos reencontrar.

AGRADECIMENTOS

Durante todo o processo de desenvolvimento dessa tese eu pude contar com pessoas maravilhosas sem as quais jamais teria chegado até aqui.

Primeiramente, agradeço a Deus por permitir que eu pudesse desempenhar essa tarefa árdua, mas extremamente gratificante. Por ter guiado meu caminho e me auxiliado sempre, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha família que sempre torce por mim e, especialmente, à minha mãe Maria del Pilar e ao meu esposo Tenisson, por todo auxílio, suporte e apoio mas, principalmente, pela força que sempre me impulsionou para que eu pudesse realizar esse trabalho. E não poderia deixar de agradecer à minha filha Isabela, que mesmo ainda pequena, é sempre a grande motivação de todas as minhas conquistas.

À Prof^a Dr^a Vera Capelozzi gostaria de agradecer pela oportunidade, por todo aprendizado e por ser tão paciente e compreensiva. Obrigada por ser um exemplo de generosidade e de excelência.

Aos amigos do laboratório Maristela Rangel, Vanessa Martins, Vanessa K. de Sá pela força em todos os momentos, e em especial à minha querida amiga Wilka Porto pelo carinho e incentivo de sempre. Ao Thiago e a Weluma da Secretaria da Pós-graduação do Departamento de Patologia, pelo apoio administrativo.

Às queridas amigas e colaboradoras do laboratório de Imuno-histoquímica, Sandra, Esmeralda e Solange pelo apoio e carinho.

Aos pesquisadores do AC Camargo Cancer Center, Dr^a. Dirce Carraro e Dr. Fernando Soares, em especial, à amiga Eloisa Olivieri, agradeço por toda colaboração e apoio.

Gostaria igualmente de agradecer aos pesquisadores Dr. Rui Reis e Dr. Eduardo Caetano do Hospital do Câncer de Barretos pela colaboração.

Pelo suporte financeiro da pesquisa e pela oportunidade de realizar esse magnífico trabalho, agradeço à FAPESP e ao CNPq.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de biblioteca e documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Câncer de pulmão – Incidência e mortalidade.....	21
1.2 A influência do tabaco na carcinogênese pulmonar.....	22
1.3 Classificação anatomopatológica do câncer de pulmão.....	23
1.4 Lesão pré-neoplásica.....	26
1.5 O que é a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a razão pela qual ela ocorre.....	28
1.6 Invasão tumoral e a transição epitelial-mesenquimal no câncer de pulmão.....	33
1.7 O envolvimento da transição epitelial-mesenquimal na resistência às drogas e na aquisição do fenótipo de células-tronco no carcinoma pulmonar.....	40
1.8 O advento da imunoterapia nos carcinomas pulmonares e a influência da EMT na expressão do PD-L1.....	42
2. HIPÓTESE.....	46
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Gerais.....	47
3.2 Específicos.....	47
4. MÉTODOS.....	49
4.1 Casuística (Tecidos).....	49
4.2 Microscopia Óptica.....	50
4.3 Técnica de Imuno-histoquímica (padrão) para análise dos imunomarcadores PD-1, PD-L1, CD8 e CD45RO.....	52
4.4 Técnicas de biologia molecular para análise da expressão dos genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal.....	54
4.5 Tabulação dos dados e análise estatística.....	59

5. RESULTADOS.....	61
5.1 Características demográficas dos pacientes selecionados para o estudo.....	61
5.2 Características dos genes altamente expressos nos tecidos tumorais dos pacientes.....	63
5.3 Associações entre as expressões gênicas e as variáveis clínico-patológicas.....	64
5.4 Associação das variáveis clínicas e das expressões gênicas com a sobrevida global.....	66
5.5 Associações entre as expressões gênicas da EMT e proteínas dos imuno-marcadores (PD-1/PD-L1, CD8 e CD45RO) com as variáveis clínico-patológicas e com a sobrevida global.....	71
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÃO.....	93
8. ANEXOS.....	96
9. REFERÊNCIAS.....	123
10. APÊNDICE.....	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrando aos diferentes tipos de EMT. A) Representa a EMT tipo I, relacionada ao desenvolvimento embrionário; B) Representa a EMT tipo II, encontrada no processo de cicatrização e fibrose, e C) Representa a EMT tipo III associada a progressão tumoral e a metástase. Adaptado do artigo de Kalluri, Weinberg “The basics of epithelial-mesenchymal transition”, *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1420-1428.....29

Figura 2 – O esquema demonstra as modificações que ocorrem na célula tumoral durante a EMT, o processo de metástase e a reversão da MET, até sua chegada ao novo sítio para formação do tumor secundário. 1) O processo de EMT tem início quando as células tumorais começam a perder seu fenótipo epitelial, através de modificações no seu perfil de expressão gênica; 2 e 3) As células tumorais já adquirem um fenótipo mais mesenquimal, inicia a perda da adesão célula-célula e as células estromais também começam a sofrer modificações, como perda de receptores de ancoragem de integrinas (representadas em roxo); 4) Ocorre aumento da secreção de metaloproteinases na matriz extracelular, com sua degradação e consequente invasão das células tumorais por meio da lâmina basal; 5) Expansão da invasão das células tumorais, e algumas dessas células passarão pela reversão fenotípica (MET) e darão início ao tumor secundário na nova localização; 6) Ao passarem pela MET, as células voltam a possuir os receptores de integrina e reestabelecem a adesão célula-célula voltando sua característica epitelial original, agora no sítio secundário. Adaptado do artigo – Heerboth, *et al.* EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine* 2015; 4:6.....32

Figura 3 – O esquema demonstra as principais vias de sinalização envolvidas no processo de EMT. A perda de marcadores epiteliais, como a E-caderina e a aquisição de marcadores mesenquimais, como a vimentina são considerados marcos importantes do início da EMT. Em muitos tipos de tumores, a ativação de receptores tirosina-quinases (RTK) induzem a sinalização via PI3K/Akt e MAPK/ERK que estimulam a expressão de fatores de transcrição (ZEB1/2 e

Snail1/2) ativando o processo de EMT por meio da repressão do gene da E-caderina. O TGF- β é capaz de induzir a EMT por meio da via de sinalização dependente de Smad2 ou por outra via não-canônica, como (PI3K/Akt ou MAPK/ERK). Já a ativação da via NF- κ B pode induzir a EMT através da superexpressão de Twist1/2. Outras vias de sinalização também podem estar associadas a progressão da EMT, como via Notch, Wnt/ β -catenina e Hedgehog através da regulação do fator transcricional Snail1/2. Adaptado do artigo Li, *et al.*, Signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Molecular Cancer* 2017; 6:6.....37

Figura 4 – Subtipos histológicos dos carcinomas pulmonares coletados para o estudo – A) Adenocarcinoma; B) Carcinoma de células escamosas; C) Tumor carcinoide típico; D) Tumor carcinoide atípico; E) Carcinoma neuroendócrino de grandes células; F) Carcinoma de pequenas células. Adaptado de *WHO Classification* 2015.....51

Figura 5 – Placa do RT²Profiler PCR Array sensibilizada com os 84 genes da EMT utilizada para a realização da análise da expressão gênica através da PCR em tempo real. Os genes de controles endógenos descritos como “HK”, são respectivamente, HK1 – beta-actina, HK2 – beta-2-microglobulina, HK3 – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, HK4 – hipoxantina fosforibosiltransferase 1, HK5 – proteína ribossomal grande.....58

Figura 6 – Curvas de sobrevida geradas pelo método de Kaplan Meier. **A)** Observou-se menor sobrevida para os pacientes com elevada expressão dos genes *MMP2* e *SPARC*; **B)** Os pacientes portadores de CEC ou AD com baixa expressão gênica de *ILK* e *SPP1* apresentaram menor risco de morte (OR - 7,02; -0,4, respectivamente) quando comparados aos pacientes portadores de CNE com elevada expressão desses genes; **C)** Os pacientes portadores de CEC ou AD com baixa expressão gênica de *ITGB1* e *COL1A2* apresentaram menor risco de morte (OR -3,02; -1,3, respectivamente) quando comparados aos pacientes portadores de CNE com elevada expressão desses genes. Os valores de significância encontram-se na Tabela 10.....70-71

Figura 7 – Expressão de PD-L1 em células tumorais vs PD-L1 em células imunes associadas ao tumor nos subtipos histológicos de CNEPs; Coloração

por H & E: A) Tumor carcinoide típico, B) Tumor carcinoide atípico, C) Carcinoma neuroendócrino de grandes células, D) Carcinoma pulmonar de pequenas células; Imuno-histoquímica para PD-L1 em CNEPs: E) CT, PD-L1⁺; F) CA, PD-L1⁺; G) CNEGC, PD-L1⁺; H) CPPC, PD-L1⁺.....74

Figura 8 – Diferença entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais (TC) vs PD-L1 nas células imunes associadas ao tumor (TAIC) nos carcinomas neuroendócrinos pulmonares.....74

Figura 9 – Diferença da expressão de CD45RO entre o Carcinoma pulmonar de pequenas células (do inglês, *small cell lung carcinoma* – SCLC) e o Carcinoma neuroendócrino de grandes células (do inglês, *large cell neuroendocrine carcinoma* – LCNEC). **A)** Expressão de CD45RO em LCNEC, **B)** Expressão de CD45RO em SCLC.....77

Figura 10 – Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier para 24 pacientes com CNEPs correlacionadas à expressão de CD8⁺, PD-1⁺ e *MAP1-B*. **(A)** Expressão de CD8⁺ em TILs; **(B)** Pacientes com CNEP com maior expressão de linfócitos T CD8⁺ demonstraram um prognóstico significativamente pior do que àqueles que apresentaram menor expressão (P = 0,01); **(C)** Expressão de PD-1⁺ em TILs; **(D)** Pacientes com CNEP com alta expressão de PD-1 em TILs demonstraram prognóstico significativamente melhor do que os que tiveram menor expressão (P = 0,01); **(E)** Pacientes com CNEP com maior expressão gênica de *MAP1-B* apresentaram pior prognóstico do que os que tiveram menor expressão desse gene (P=0,01). **Abreviaturas:** PD-1, do inglês, *programmed death 1*; CNEPs, carcinomas neuroendócrinos pulmonares; TILs, do inglês, *tumor-infiltrating lymphocytes*.....79

Figura 11 – Correlação entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais e as expressões gênicas de *MAP1-B* e *SPP1*. **A)** A expressão de *MAP1-B* apresentou-se inversamente correlacionada com a expressão de PD-L1; **B)** A expressão de *SPP1* demonstrou-se diretamente associada a alta expressão de PD-L1.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Anexo 1) - Características demográficas dos 60 pacientes em relação ao tipo histológico do tumor e ao estadiamento, – A. C. Camargo Cancer Center, HC-FMUSP e Hospital do Câncer de Barretos.....	96
Tabela 2 (Anexo 2) – Resultados obtidos das porcentagens de área neoplásica e não-neoplásica encontradas nas amostras de tecidos dos pacientes pela análise das lâminas de H&E.....	100
Tabela 3 (Anexo 3) - Mix de eliminação de DNA genômico para a síntese de c-DNA.....	105
Tabela 4 (Anexo 4) - Mix para realização da Transcrição Reversa (2ª etapa da técnica para síntese de c-DNA).....	106
Tabela 5 (Anexo 5) – Apresentação dos 84 genes da EMT que tiveram sua expressão analisada durante o estudo.....	107
Tabela 6 – Características demográficas dos pacientes avaliados pelo estudo.....	61
Tabela 7 (Anexo 6) – Genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal significativamente expressos nos tecidos tumorais dos 60 pacientes avaliados.....	109
Tabela 8 (Anexo 7) – Análise da expressão gênica do tecido tumoral e a correlação com as variáveis mensuradas pela média, erro padrão e valor de significância p	113
Tabela 9 – Análise de sobrevida com estratificação binária em alto e baixo das variáveis pelo método de Kaplan–Meier e as diferenças demonstradas pelo teste de Log-Rank.....	67
Tabela 10 – Análise multivariada de sobrevida pelo modelo de risco proporcional de Cox (Chi-Square = 57,76, $p < 0,01$).....	69
Tabela 11 – Características demográficas e clínico-patológicas de 24 pacientes diagnosticados com tumor neuroendócrino pulmonar.....	72

Tabela 12 – Análise univariada para o prognóstico dos pacientes diagnosticados com CNEP.....	75
Tabela 13 (Anexo 8) - Resultado dos RNAs extraídos do tecido tumoral dos pacientes em estudo portadores de carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC).....	115
Tabela 14 (Anexo 9) - Resultados dos c-DNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos do tecido tumoral dos pacientes portadores de CPNPC.....	117
Tabela 15 (Anexo 10) - Resultado dos RNAs extraídos do tecido tumoral dos pacientes em estudo portadores de carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC).....	119
Tabela 16 – (Anexo 11) - Resultados dos c-DNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos dos pacientes portadores de CPPC.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC – do inglês, *Atypical Carcinoid*, carcinoide atípico

AD – Adenocarcinoma

ATS – do inglês, *American Thoracic Society*, Sociedade Torácica Americana

CA – Carcinoide atípico

CCLE - do inglês, *The Cancer Cell Line Encyclopedia*, Enciclopédia da linhagem celular do câncer

c-DNA – do inglês, *complementary DNA*, DNA complementar

CEC – Carcinoma escamo-celular (de células escamosas)

CNE – Carcinoma neuroendócrinos

CNEP – Carcinoma neuroendócrino pulmonar

CNEGC – Carcinoma neuroendócrino de grandes células

CP – Câncer de pulmão

CPGC – Carcinoma pulmonar de grandes células

CPNPC – Carcinoma pulmonar não-pequenas células

CPPC – Carcinoma pulmonar de pequenas células

CT – Carcinoide típico

CTLA-4 – do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*, proteína 4 associada aos linfócitos T citotóxicos

DIPNECH – do inglês, *Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia*, hiperplasia pulmonar idiopática difusa de células neuroendócrinas

DNA – do inglês, *Desoxyribonucleic Acid*, ácido desoxirribonucleico

EGF – do inglês, *Epidermal Growth Factor*, fator de crescimento epidérmico

EMT – do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*, Transição epitelial-mesenquimal

EMTneg – EMT negativo

EMTpos – EMT positivo

ERS – do inglês, *European Respiratory Society*, Sociedade Respiratória Européia

FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*

FGF-2 – do inglês, *Fibroblast Growth Factor 2*, Fator de crescimento fibroblástico 2

HAS – do inglês, *Hyaluronic Acid Synthase*, Ácido Hialurônico Sintase

HCB – Hospital do Câncer de Barretos

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

H&E – Hematoxilina e Eosina

HGF – do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*, fator de crescimento de hepatócitos

IARC – do inglês, *International Agency for Research on Cancer*, Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IASLC – do inglês, *International Association for the Study of Lung Cancer*, Associação Internacional para o Estudo de Câncer de Pulmão

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LCNEC – do inglês, *Large Cell Neuroendocrine Carcinoma*, carcinoma neuroendócrino de grandes células

MAPK – do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinase*, Proteína quinase ativada por mitógeno

MB – Membrana Basal

MEC – Matriz Extracelular

MET – do inglês, *Mesenchymal-Epithelial Transition*, transição mesenquimal-epitelial

MIA – do inglês, *Minimally Invasive Adenocarcinoma*, adenocarcinoma minimamente invasivo

MMPs – do inglês, *Matrix Metalloproteinases*, Metaloproteinases de matriz

ng/μl – Nanograma por microlitro

OMS / WHO – Organização Mundial de Saúde / *World Health Organization*

PD-1 – do inglês, *Programmed Death-1*, Proteína de morte programada-1

PDGF – do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*, fator de crescimento derivado de plaqueta

PD-L1 – do inglês, *Programmed Death Ligand-1*, ligante de morte programada-1

qRT-PCR – do inglês, *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

RNA – do inglês, *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico

RT-PCR – do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, Reação da Transcriptase Reversa, seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

SCLC – do inglês, *Small Cell Lung Carcinoma*, carcinoma pulmonar de pequenas células

TAIC – do inglês, *Tumor-Associated Immune Cells*, células imunes associadas ao tumor

TC – do inglês, *Typical Carcinoid*, carcinoide típico

TILs – do inglês, *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, linfócitos do infiltrado tumoral

TCGA – do inglês, *The Cancer Genome Atlas*, o atlas do genoma do câncer

TGF- α – do inglês, *Transforming Growth Factor alpha*, Fator de crescimento transformante alfa

TGF- β – do inglês, *Transforming Growth Factor beta*, fator de crescimento transformante beta

TIMPs – do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, Inibidores teciduais de metaloproteinases

VEGF – do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*, fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Rocha TGPM. *Avaliação dos genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal e sua relação com a progressão e a invasão tumoral em câncer de pulmão* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: As recidivas e as metástases são os fatores responsáveis pela morte de pacientes com câncer de pulmão (representando 90% dos casos), indicando a necessidade de conhecer as múltiplas vias sinalizadoras envolvidas em sua patogênese, progressão, invasão e metástase. Adenocarcinomas e carcinomas de grandes células invadem primariamente vasos sanguíneos e linfáticos, metastatizando à distância. Já os carcinomas de células escamosas envolvem diretamente o mediastino, sobretudo, linfonodos e pericárdio. Carcinomas neuroendócrinos de baixo grau (carcínoides típicos e atípicos) invadem e metastatizam apesar de serem indolentes, enquanto que carcinomas neuroendócrinos de alto grau (carcinoma neuroendócrino de grandes células e carcinoma de pequenas células), rapidamente metastatizam à distância. Esse espectro diferencial de invasividade nos carcinomas de pulmão ainda não pôde ser definitivamente demarcado por biomarcadores, sobretudo nas variantes neuroendócrinas. Neste aspecto, acredita-se que a EMT esteja mais intimamente envolvida no processo de invasão, despontando como potencial biomarcador.

OBJETIVO: Realizar o mapeamento genético da EMT nos carcinomas pulmonares, estabelecendo uma assinatura gênica capaz de prever o potencial de invasão nos diferentes tipos histológicos do câncer de pulmão. **MÉTODOS:** Espécimes de tumores ressecados cirurgicamente e criopreservados de 60 pacientes foram submetidos a análise de expressão gênica através da qPCR em tempo real, por meio do kit RT² Profiler PCR array para a EMT com 84 genes de interesse.

RESULTADOS: Observou-se a elevada expressão de 24 genes (*AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*,

TGFβ3, *VPS13A*, *WNT5A*) que participam do processo da EMT e atuam no desenvolvimento da neoplasia pulmonar. Tumores em estágio avançado e com metástases linfonodais apresentaram significante maior expressão dos seguintes genes, *COL1A2*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGAV*, *ITGB1*, *MAP1B*, *SNAI2* e *VPS13A*. Comparando-se carcinomas não-neuroendócrinos (CEC e AD) e neuroendócrinos (CT, CA, CPPC, CNEGC), observou-se que os neuroendócrinos apresentaram elevada expressão significativa dos genes: *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B* e *VPS13A*. Em relação à sobrevida, a análise univariada demonstrou menor sobrevida para pacientes em estágio avançado do tumor com metástase linfonodal e portador de carcinoma neuroendócrino que apresenta a hiperexpressão de todos os 24 genes da EMT, com exceção dos genes *COL3A1* e *SPP1*. Pela análise multivariada demonstrou-se que pacientes com carcinomas neuroendócrinos com expressão elevada de *MMP2* e *SPARC* apresentaram maior risco de morte (OR 5,41 e 4,94, respectivamente), enquanto que pacientes portadores de carcinomas de células escamosas ou adenocarcinomas com baixa expressão gênica de *ILK*, *SPP1*, *COL1A2*, *ITGB1* apresentaram menor risco de morte (OR -7,02; -0,4, -1,3 e -3,02). **CONCLUSÃO:** Através do presente estudo estabeleceu-se uma assinatura gênica de 24 genes capaz de prever o potencial de agressividade histológica, de invasão e de metástases nos carcinomas pulmonares neuroendócrinos e não-neuroendócrinos.

Descritores. câncer de pulmão; transição epitelial-mesenquimal; progressão tumoral; metástase; biomarcador molecular; prognóstico.

ABSTRACT

Rocha TGPM. *Evaluation of genes involved in the epithelial-mesenchymal transition and its relation to tumor progression and invasion in lung cancer* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Metastasis are responsible for the death of 90% of patients with lung cancer, indicating the need to know the multiple signaling pathways involved. Adenocarcinomas (Adc) and large cell carcinomas primarily invade blood vessels with distant metastasis, whereas squamous cell carcinoma (SqCC) involves the mediastinal lymph nodes. Neuroendocrine carcinomas of low-grade (typical and atypical carcinoid) are indolent, while high-grade neuroendocrine carcinoma (large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma) metastasize rapidly. Biomarkers of aggressiveness in lung carcinomas remain to be determined, especially in neuroendocrine variants. In these fields, Epithelial to mesenchymal transition (EMT) genes profile emerge promise as an indicator of invasion and metastasis. **AIMS:** Carry out the genetic mapping of EMT in lung cancer, establishing a gene signature capable of predicting the invasion potential of different histological types of lung cancer.

METHODS: Were included specimens of 60 patients and the EMT gene expression was quantified with a quantitative real-time (RT)- PCR carried out on StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with RT2 Profiler PCR Array System for the EMT pathway with 84 target genes. (Qiagen, Dusseldorf, Germany). Associations of the gene signature and clinicopathological features, as well as prognostic factors were evaluated.

RESULTS: Was observed high expression of 24 genes (*AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*, *TGFβ3*, *VPS13A*, *WNT5A*) that are involved in the EMT process and act in the development of pulmonary neoplasia. Tumors at the advanced stage and with lymph node metastasis shown a significant higher expression of the genes *COL1A2*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGAV*, *ITGB1*, *MAP1B*,

SNAI2 and *VPS13A*. Comparing the histological subtypes non-neuroendocrine (SqCC and AD) and neuroendocrine carcinomas (TC, AT, SCLC, LCNEC), was observed that the neuroendocrine variant shown a higher significant expression of the genes *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B* and *VPS13A*. Regarding survival, univariate analysis showed lower survival for patients in the advanced tumor stage, with lymph node metastasis and with neuroendocrine carcinoma histology that presenting overexpression for all 24 EMT genes, with the exception of the *COL3A1* and *SPP1* genes. Cox regression controlled by, histological types and gene expression of *ILK*, *MMP2*, *SPP1*, *SPARC*, *COL1A2* and *ITGB1* showed that patients with neuroendocrine carcinomas with higher expression of *MMP2* and *SPARC* had a higher risk of death (OR 5.41 and 4.94, respectively), whereas patients with squamous cell carcinomas or adenocarcinomas with lower gene expression of *ILK*, *SPP1*, *COL1A2*, *ITGB1* showed lower risk of death (OR -7.02, -0.4, -1.3 and -3.02). **CONCLUSION:** Was established a potential gene signature of 24 genes involved in the EMT process and capable of predicting the histological aggressiveness, invasion and metastasis in neuroendocrine and non-neuroendocrine variants of lung carcinomas.

Descriptors: lung cancer; epithelial-mesenchymal transition; tumor progression; metastasis; molecular biomarker; prognosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de pulmão – Incidência e mortalidade

Segundo estimativa realizada pela *WHO (World Health Organization)*, o número global de mortes por câncer aumentará em 45% no ano de 2030 (11,5 milhões de mortes) em relação ao ano de 2007 (7,9 milhões de mortes). O câncer de pulmão é a forma de tumor maligno mais frequente e letal, com mais de 1,8 milhão de casos e 1,5 milhão de mortes anuais, de acordo com os dados do GLOBOCAN 2012 (WHO, 2016; IARC, 2016). Estados Unidos, Canadá, Europa central e Leste europeu representam as maiores taxas de incidência relacionadas ao câncer de pulmão. O Brasil, por sua vez, apresenta grande variação regional, tendo seus valores mais significativos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (INCA, 2018).

Estudos realizados pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), no Brasil para cada ano do biênio de 2018-2019 estimam-se um total de 31.270 novos casos de câncer de pulmão, sendo 18.740 para homens e de 12.530 para as mulheres (INCA, 2018). Atualmente, a sobrevida média em cinco anos é estimada, nos países desenvolvidos, entre 13 e 21%; e, nos países em desenvolvimento, entre 7 e 10% (IARC, 2016).

Apesar dos avanços no tratamento dos tumores pulmonares primários, as recidivas e as metástases são os fatores mais comuns responsáveis pela morte de pacientes, representando 90% dos casos.

O câncer de pulmão tem apresentado aumento do número de casos em países em desenvolvimento. Todavia, especificamente quanto aos norte-americanos, estudos demonstraram que as taxas permanecem inalteradas em relação às mulheres e diminuíram em relação aos homens. Já no Brasil, verificou-se aumento das taxas brutas de mortalidade quanto a ambos os sexos (Saad *et al.*, 2009).

1.2. A influência do tabaco na carcinogênese pulmonar

O câncer de pulmão encontra-se fortemente relacionado ao tabagismo. Há mais de 1 bilhão de pessoas fumantes no mundo e estima-se que a doença seja de 10 a 20 vezes mais frequente em fumantes do que em não fumantes. Com efeito, o câncer de pulmão tornou-se uma das principais causas de morte evitável (Saad, *et al.*, 2009).

Existem múltiplas substâncias mutagênicas que compõem o cigarro, e esses compostos podem agir na iniciação da carcinogênese pulmonar (Travis, *et al.*, 2004).

A exposição ao tabaco permite que essas substâncias interajam com o DNA, modificando-o quimicamente. Entre os agentes mutagênicos envolvidos, destacam-se o 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) e o N-nitrosonornicotine (NNN), responsáveis pela mutação dos genes que regulam o crescimento e proliferação celular, como o TP53 e o KRas, com consequente iniciação da oncogênese (Travis, *et al.*, 2011).

Existem, ainda, linhas de pesquisas que evidenciam a correlação entre o uso do cigarro e o aumento da ocorrência de metástases em câncer de pulmão e em outras neoplasias, como câncer de mama, de pâncreas e de bexiga (Micalizzi, *et al.*, 2010).

Apesar de o cigarro ter em sua composição mais de 4 mil substâncias, a nicotina é o componente que se encontra em maior quantidade. Há que se observar, contudo, que, embora a nicotina não seja por si só carcinogênica, estudos recentes têm revelado sua capacidade de – além de induzir angiogênese e proliferação celular – conferir, às células neoplásicas, resistência à apoptose (Ettinger, *et al.*, 2012).

O tabagismo é capaz de ativar a carcinogênese pulmonar de quaisquer tipos histológicos, entretanto se encontra mais intensamente relacionado com o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e de células escamosas (Micalizzi, *et al.*, 2010).

1.3. Classificação anatomopatológica do câncer de pulmão

Os carcinomas representam o principal tipo histológico da neoplasia pulmonar, considerando-se que os demais tipos existentes compreendem menos de 1% de todos os casos. Historicamente a classificação histológica dos carcinomas pulmonares não-pequenas células (CPNPC) tornou-se mundialmente aceita em 1967, quando um painel de especialistas da *WHO* criou a nomenclatura padrão (Travis *et al.*, 2004). Atualizaram os dados da

histopatologia em CPNPC utilizando como critério as características moleculares e morfológicas dessa neoplasia. A partir de dados obtidos em séries publicadas sobre incidência de câncer em cinco continentes, os carcinomas pulmonares de pequenas células (CPPC) compreendem 20% dos casos; e os carcinomas pulmonares de grandes células (CPGC), em torno de 9%. Para outros tipos histológicos, a proporção difere entre os sexos: carcinomas de células escamosas (CEC) compreendem 44% em homens e 25% em mulheres, enquanto os adenocarcinomas (AD) compreendem 28% dos casos em homens e 42% em mulheres. O carcinoma de células escamosas revela maior correlação com o tabagismo. Esses carcinomas surgem, em sua maioria, no hilo pulmonar ou próximo a ele, por quebra dos mecanismos de defesa pulmonar proximais. Em nível microscópico, apresentam invasão de estroma fibroso, pérolas córneas, pontes intercelulares e proeminente camada de queratina. O adenocarcinoma constitui o câncer de pulmão mais comum em mulheres e homens. Com frequência, manifesta-se na forma de massa periférica, como fenótipo resultante da quebra dos mecanismos distais de defesa pulmonar. Os aspectos microscópicos característicos incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina e normalmente se observa uma resposta tecidual desmoplásica adjacente. Dentro dos adenocarcinomas existe um largo espectro patológico, molecular e radiológico, de forma que uma nova classificação foi proposta pela *IASLC.ATS.ERS. 2011*, no sentido de uniformizar os vários subtipos histológicos, direcionando-os na determinação do tratamento e prognóstico dos pacientes (Travis, *et al.*, 2011). O carcinoma de grandes células apresenta-se como lesão periférica, focos de necrose, cicatriz central e antracose.

Histologicamente é caracterizado por células grandes, citoplasma abundante, núcleos grandes, cromatina vesiculosa e nucléolo evidente. Apresenta as seguintes variantes: carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNGC), carcinoma neuroendócrino de grandes células combinado, carcinoma basaloide, carcinoma linfo-epitelioma “like”, carcinoma de células claras e carcinoma de grandes células fenótipo rabdoide. O carcinoma neuroendócrino de pequenas células é definido por mitoses numerosas, estrutura organoide, células densamente agrupadas, escasso citoplasma, cromatina fina granular, ausência de nucléolos e mitoses frequentes. O padrão fusiforme pode ser uma característica proeminente. Entre as variantes, o carcinoma de pequenas células pode vir combinado ao adenocarcinoma ou carcinoma de grandes células (Rekhtman, 2010).

De maneira geral, o câncer de pulmão pode ser descrito, então, em dois grandes grupos: os carcinomas pulmonares de não pequenas células (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células), e os carcinomas pulmonares de pequenas células, que compreendem as variantes neuroendócrinas, (tumor carcinoide típico, tumor carcinoide atípico, carcinoma neuroendócrino de grandes células e carcinoma pulmonar de pequenas células) (Inamura, 2017).

1.4. Lesão pré-neoplásica

Quando o epitélio brônquico é submetido a agressões sucessivas por meio de diversas substâncias carcinogênicas, notadamente o tabaco, ocorre a formação de lesões pré-neoplásicas.

A metaplasia escamosa, alteração histológica que acomete a porção proximal da árvore brônquica em decorrência da ação do carcinógeno, origina uma formação displásica que predisporá ao carcinoma “*in situ*”. Com efeito, essa lesão acarretará o surgimento de dois tipos histológicos de câncer de pulmão: o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de pequenas células. Contudo, se a agressão for causada diretamente em nível alveolar, haverá intensa reação inflamatória, mediada por macrófagos, conferindo ao epitélio característica hiperplásica. Continuada a agressão, o epitélio hiperplásico passa a dar origem a estruturas glandulares, adquirindo a conformação de hiperplasia adenomatosa. Com o desenvolvimento da lesão, a hiperplasia adenomatosa torna-se atípica e, posteriormente, forma-se o adenocarcinoma. Ainda nesse contexto, ocorre a formação do carcinoma pulmonar de células grandes, respeitando as mesmas alterações histológicas.

As lesões precursoras dos tumores neuroendócrinos (CPPC) são, ainda, pouco conhecidas. Todavia, algumas dessas lesões caracterizadas como hiperplasia de células neuroendócrinas pulmonar idiopática difusa (DIPNECH) têm sido associadas ao desenvolvimento de outros tipos de tumores neuroendócrinos pulmonares, como os tumores carcinoides típico e atípico.

Essa lesão consiste na proliferação de pequenos nódulos e células neuroendócrinas presentes nos epitélios brônquico e bronquiolar (Kerr, 2000).

Caracterizando as lesões precursoras dos CPPC, estudos observaram grande incidência de mutações genéticas relacionadas a esse tipo de tumor. Sugere-se que o acúmulo de sucessivas mutações seja responsável pelo desenvolvimento de malignidade no epitélio brônquico (Sá *et al.*, 2013).

Considerada uma patologia genética, o câncer de pulmão encontra-se fortemente relacionado a alterações moleculares que influem em sua patogênese, como as mutações de genes responsáveis pelo crescimento, pela proliferação e pela sobrevivência celular (Sá *et al.*, 2012; Christiansen *et al.*, 2006).

Muitos eventos influenciam o comportamento dessas células, e a disseminação do tumor encontra-se intimamente relacionada à mudança fenotípica que ocorre nas células neoplásicas.

Recidivas e metástases são os principais fatores responsáveis pela morte dos pacientes, representando 90% dos casos. Neste contexto, se faz necessário o conhecimento das múltiplas vias sinalizadoras envolvidas em sua patogênese e progressão.

1.5. O que é a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a razão pela qual ela ocorre

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é o processo biológico reversível pelo qual as células epiteliais passam a expressar genes específicos de células mesenquimais, adquirindo, assim, fenótipo semelhante aos das células de mesênquima (Creighton, *et al.*, 2013).

Esse processo pode ocorrer de três formas distintas que acarretam consequências bem diferentes. Dessa forma, a EMT é classificada em: EMT tipo 1, que ocorre durante a embriogênese e no desenvolvimento dos órgãos; EMT tipo 2, que ocorre durante a reparação tecidual e fibrose, e EMT tipo 3, que ocorre durante a progressão tumoral e metástase (Figura 1).

Figura 1 – Esquema ilustrando aos diferentes tipos de EMT. A) Representa a EMT tipo I, relacionada ao desenvolvimento embrionário; B) Representa a EMT tipo II, encontrada no processo de cicatrização e fibrose, e C) Representa a EMT tipo III associada a progressão tumoral e a metástase. Adaptado do artigo de Kalluri, Weinberg “The basics of epithelial-mesenchymal transition”, *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1420-1428

EMT tipo 1 – embriogênese e desenvolvimento dos órgãos

Durante os estágios mais precoces da embriogênese, na gastrulação, células individuais desprendem-se do ectoderma e migram em direção a região interna no centro do embrião para formação do mesoderma, precursor dos tecidos mesenquimais, que compreende os fibroblastos e as células hematopoiéticas.

Nesse contexto, a conversão em células de caráter mesodermal das células ectodermais, que nesse estágio são ordenadas em camadas de células epiteliais, envolve a EMT. De maneira semelhante, as células neuroepiteliais da crista neural migram para o mesênquima de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento passando igualmente pelo processo de mudança de fenótipo por meio da EMT (Weinberg, 2009).

EMT tipo 2 – Reparação tecidual, cicatrização e fibrose

Durante o processo de reparação tecidual, na margem da lesão dentro do epitélio, é possível observar células em EMT. Essas células encontram-se nesse estado de forma transiente com o objetivo de migrar para dentro do local lesionado e fechar as lacunas existentes nas camadas de células epiteliais, que ocorreram por razão da lesão sofrida, restabelecendo a integridade do epitélio.

No processo de fibrose ocorre a diferenciação de células epiteliais em fibroblastos/miofibroblastos, (EMT), que secretam componentes da matriz extracelular (MEC) como, colágenos, lamininas e elastinas, causando uma excessiva acumulação de tecido conjuntivo fibroso que é depositado sobre o tecido lesionado culminando em uma cicatriz permanente ou no mal funcionamento do órgão (Li *et al.*, 2016).

EMT tipo 3 – Progressão tumoral e metástase

Ao longo do processo de progressão tumoral, as células epiteliais neoplásicas, frequentemente induzidas por sinais do estroma reativo, deixam suas características epiteliais, como a polaridade, a adesão célula-célula e a ausência de motilidade para expressar genes específicos das células

mesenquimais, adquirindo, assim, as propriedades e o fenótipo das células de mesênquima. Nesse novo contexto, com a transformação epitelial-mesenquimal, essas células adquirem motilidade e passam a produzir componentes da MEC, por meio da alteração do seu perfil genético, que podem contribuir para a ativação da EMT, aumentando seu grau de malignidade. Essas células neoplásicas são frequentemente observadas na margem invasiva dos carcinomas primários e são consideradas as mais capacitadas para promover a invasão e a metástase. Contudo, uma vez que tenham se desprendido do tumor primário e chegado ao final do processo de progressão tumoral, com a colonização em sítios distantes, as células de carcinomas, sob a influência de um novo microambiente, não reativo, deixam de receber os sinais específicos que provinham do estroma desmoplásico e, dessa forma, na ausência desse contexto, podem ser submetidas a transição mesenquimal-epitelial (MET) revertendo seu fenótipo para o original, de células epiteliais (Figura 2) (Kalluri, Weinberg, 2009).

Figura 2 – O esquema demonstra as modificações que ocorrem na célula tumoral durante a EMT, o processo de metástase e a reversão da MET, até sua chegada ao novo sítio para formação do tumor secundário. 1) O processo de EMT tem início quando as células tumorais começam a perder seu fenótipo epitelial, através de modificações no seu perfil de expressão gênica; 2 e 3) As células tumorais já adquirem um fenótipo mais mesenquimal, inicia a perda da adesão célula-célula e as células estromais também começam a sofrer modificações, como perda de receptores de ancoragem de integrinas (representadas em roxo); 4) Ocorre aumento da secreção de metaloproteínas na matriz extracelular, com sua degradação e consequente invasão das células tumorais por meio da lâmina basal; 5) Expansão da invasão das células tumorais, e algumas dessas células passarão pela reversão fenotípica (MET) e darão início ao tumor secundário na nova localização; 6) Ao passarem pela MET, as células voltam a possuir os receptores de integrina e reestabelecem a adesão célula-célula voltando sua característica epitelial original, agora no sítio secundário. Adaptado do artigo – Heerboth, *et al.* EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine* 2015;4:6

1.6. Invasão tumoral e a transição epitelial-mesenquimal (EMT) no câncer de pulmão

Essa transição apresenta grande relevância em relação à invasão e progressão tumoral, pois confere a célula, antes epitelial, uma morfologia mais migratória, facilitando a disseminação. No entanto, esse fenômeno é controlado por diversos fatores moleculares associados, principalmente, ao microambiente tumoral – matriz extracelular (MEC) (Chammas, Brentani 2002).

Durante a EMT, as células epiteliais perdem muitas de suas principais características, como a sua polaridade e a adesão célula-célula proporcionada pela E-caderina (molécula presente nas junções aderentes epiteliais), passando a expressar marcadores tipicamente mesenquimais, como a vimentina, a fibronectina e a N-caderina. A perda de E-caderina é um importante fator indicativo de EMT, pois, sem a presença dessa molécula, as células perdem a aderência e ganham motilidade. Em pesquisas sobre as alterações epigenéticas em câncer de pulmão, pode ser observado que o gene *CDH1*, que codifica para E-caderina, encontra-se frequentemente inibido pela hipermetilação do seu promotor. Além disso, durante a modificação do fenótipo epitelial, enquanto a E-caderina deixa de ser expressa, a N-caderina (típica de fibroblastos) passa a ser expressa em seu lugar. As moléculas de N-caderina aumentam a afinidade das células neoplásicas pelas células estromais, permitindo a invasão. Em contato com o estroma reativo, a frente invasiva poderá avançar recebendo a sinalização que dele provém (Wu, Zhou 2008; Ferreira, Rocha 2004).

Muitos estudos acerca desse assunto descrevem um grupo de fatores, que, por meio de diversas vias de sinalização, promovem o mecanismo molecular que desencadeia essa transformação.

Alguns fatores de crescimento e outras moléculas podem estar envolvidos nessa alteração de fenótipo, como HGF (*hepatocyte grow factor*), EGF (*epidermal grow factor*), PDGF (*platelet-derived grow factor*), VEGF (*vascular endothelial grow factor*) e TGF- β (*transforming grow factor β*). Agindo em conjunto e de forma integrada, essas moléculas controlam o evento de forma que o resultado do processo seja atingir a metástase, proporcionando às células neoplásicas a disseminação em locais distantes (Bourboulia, Stevenson 2010).

Para tanto, após a perda de expressão de E-caderina, ganhando motilidade e de aspecto fibroblástico, as células transformadas iniciam o processo migratório pela MEC. Contudo, a MEC é composta por uma complexa mistura de proteínas, como as proteínas estruturais fibrosas (colágeno e elastina), as glicoproteínas (fibronectina, laminina e integrinas) e um gel de proteoglicanos e glicosaminoglicanos que conferem suporte aos tecidos. Ela representa importante papel na regulação da expressão de genes, na ativação de fatores de crescimento e transdução de sinal (Robbins, Cotran 2000).

A degradação da MEC é um dos eventos que integram a EMT, caracterizada como um fator predisponente da metástase. Entre os agentes efetores da degradação estão as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs). Essas proteinases, além de atuarem na destruição da membrana

basal (MB) e outros componentes da MEC, têm sua atividade aumentada durante o desenvolvimento tumoral. Nesse mesmo contexto, há o aumento da expressão de metaloproteinases (MMPs), principalmente MMP-2, MMP-3 e MMP-9, associadas à degradação da MEC e invasão tumoral (Bourboulia, Stevenson 2010; Ferreira, Rocha 2004).

Fatores como TGF- α (*transforming grow factor- α*), EGF e TGF- β induzem a expressão de diferentes tipos de MMPs – existem mais de 20 tipos diferentes, classificados de acordo com a estrutura que apresentam e o substrato que degradam. A atividade de degradação dessas enzimas é controlada por inibidores teciduais de metaloproteinases endógenos os TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*). Com efeito, o nível de atividade proteolítica no tumor será determinado pelo equilíbrio entre MMPs e TIMPs (Ferreira, Rocha 2004; Chang, Werb 2001).

Durante o processo de invasão, ao degradar a MB, ocorre clivagem da laminina-5 presente na membrana. Esse evento é um marcador importante de EMT, pois, ao ser clivada, a laminina-5 libera uma de suas três subunidades: a laminina 2 γ , que, por sua vez, sofre degradação pela MMP-2 ou MMP-14. Com a quebra da subunidade 2 γ , fragmentos formados são liberados servindo como ligantes de receptor de EGF, promovendo a mobilidade e sobrevivência celular (Xiao, He 2010; Ferreira, Rocha 2004; Chang, Werb 2001).

A metástase tumoral não é somente responsável pela progressão das células cancerígenas, mas se encontra, inclusive, intimamente relacionada ao processo de angiogênese.

Com o desenvolvimento e o crescimento da massa tumoral, as células neoplásicas necessitam de maior aporte de nutrientes e oxigênio, resultando na formação de novos vasos. Com efeito, os tumores são incapazes de aumentar de tamanho sem vascularização, haja vista que a hipóxia induz apoptose por ativação do gene TP53. Esse processo depende a ativação de alguns fatores, como o VEGF, o PDGF, o TGF- α e - β , FGF-2 (*fibroblast grow factor-2*), e citocinas como o TNF- α (tumor necrosis factor- α). Alguns fatores anti-angiogênicos também participam do evento, como os TIMPs, a endostatina, a angiostatina e a vasculostatina. Nesse contexto as MMPs exercem atividades pró-angiogênica, liberando os fatores FGF-2 e TGF- β , que se encontravam na MEC. Contudo, também podem atuar de maneira inibitória, degradando componentes da MEC e formando peptídeos de ação antiangiogênica (Xie, *et al.*, 2013; Ferreira, Rocha 2004; Robbins, Cotran 2000).

Durante a tumorigênese, o desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos favorecem a neovascularização, permitindo o crescimento das células malignas e favorecendo sua expansão através dos novos vasos (Xiao, He 2010).

O processo da EMT está envolvido em diversas vias de sinalização, entre as quais a via do TGF- β tem sido extensivamente pesquisada como potente indutora desse evento.

Essa via tem início através da ativação dos receptores da família serina/treonina quinase do TGF- β . Ativados, esses receptores fosforilam as Smad 2 e Smad 3 (fatores de transcrição), que posteriormente formam um

complexo com a Smad 4. Esse complexo é translocado para o núcleo celular, agindo em conjunto com outros fatores de transcrição como, Snail, ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) e Twist, na expressão de genes-alvo. Essa cooperação resulta na repressão de genes marcadores epiteliais e na consequente superexpressão dos genes marcadores mesenquimais, induzindo a EMT. A via de sinalização TGF- β pode agir em conjunto com outras vias como Wnt, Hedgehog, Notch, Ras-MAPK ativando o processo da EMT (Figura 3) (Zhang, *et al.*, 2011).

Figura 3 – O esquema demonstra as principais vias de sinalização envolvidas no processo de EMT. A perda de marcadores epiteliais como a E-caderina e a aquisição de marcadores mesenquimais como a vimentina são considerados marcos importantes do início da EMT. Em muitos tipos de tumores, a ativação de receptores tirosina-quinases (RTK) induzem a sinalização via PI3K/Akt e MAPK/ERK que estimulam a expressão de fatores de transcrição (ZEB1/2 e Snail1/2) ativando o processo de EMT por meio da repressão do gene da E-caderina. O TGF- β é capaz de induzir a EMT por meio da via de sinalização dependente de Smad2 ou por outra via não-canônica como (PI3K/Akt ou MAPK/ERK). Já ativação da via NF- κ B pode induzir a EMT através da superexpressão de Twist1/2. Outras vias de sinalização também podem estar associadas a progressão da EMT, como via Notch, Wnt/ β -catenina e Hedgehog através da regulação do fator transcrricional Snail1/2. Adaptado do artigo Li, *et al.*, Signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Molecular Cancer* 2017; 16:6

Nos carcinomas pulmonares, devido ao seu espectro diferencial em relação à invasividade do microambiente tumoral, o processo de ativação da EMT e o seu envolvimento na progressão e na metástase permanecem, contudo, pouco elucidados. No entanto, estudos demonstraram que a expressão gênica de fatores promotores da EMT, como Snail/Slug e Twist, associados às vias de sinalização TGF- β e Wnt/ β -catenina, está relacionada à agressividade tumoral, apresentando como consequência pior prognóstico em casos de câncer de mama. Ainda na mesma linha de pesquisa, observou-se a importância da influência da sinalização de TGF- β , como indutor de EMT, nos processos de intravasão, de extravasão e de metástases que ocorrem por via hematogênica. Acredita-se, pois, que o processo da EMT não é apenas um mecanismo de migração que acomete as células neoplásicas do tumor primário, mas sim um complexo programa que compreende diversas propriedades necessárias à progressão tumoral (Micalizzi, *et al.*, 2010).

Em estudo recente, avaliou-se a influência da EMT na carcinogênese de câncer colorretal, analisando-se as características da frente invasiva do tumor. Por meio da histologia e da imuno-histoquímica, para análise de E-caderina e vimentina, pode ser observada a diferença entre as partes distintas do tumor. No centro do tumor primário, a expressão de E-caderina encontra-se presente, porém diminui progressivamente na medida em que se aproxima da borda do tumor, onde a expressão de vimentina encontra-se aumentada. Tais achados indicam a presença da EMT, que ocorre durante a interação das células neoplásicas com o microambiente tumoral, conferindo a essas células

características mesenquimais e permitindo a progressão do tumor (Sato, *et al.*, 2012).

Recentemente, nosso grupo demonstrou em carcinomas não-pequenas células de pulmão que, em relação ao estadiamento, a E-caderina esteve mais expressa nos casos que não tiveram metástases linfonodais. No mesmo estudo, correlações feitas entre as proteínas estudadas mostraram que os tumores que expressaram TGF- β também apresentaram alta expressão de E-caderina no estroma e HAS 2. O mesmo ocorreu entre E-caderina e HAS 2, Hyal 1 e HAS 1 e Hyal 3 e HAS 1 (Goss, *et al.*, 2008; Wistuba, Gazdar 2006; Sá, *et al.*, 2012; Sá, *et al.*, 2013). Os estudos anteriores em câncer de mama, colorretal e de pulmão foram conduzidos com avaliação dos biomarcadores da EMT em bases proteicas utilizando a imuno-histoquímica. No entanto, os novos protocolos terapêuticos personalizados em câncer de pulmão vêm surgindo com o advento das terapias moleculares alvos.

Desta forma, a identificação de biomarcadores preditivos como alvos da terapia molecular representa a mais atual base racional para selecionar uma terapia personalizada para cada paciente.

1.7 O envolvimento da transição epitelial-mesenquimal na resistência às drogas e na aquisição do fenótipo de células-tronco no carcinoma pulmonar

A transição epitelial-mesenquimal tem sido amplamente estudada como fator importante associado a promoção da metástase, da recidiva e da resistência aos tratamentos antineoplásicos em diferentes tipos de tumores.

Durante a reprogramação genética ocorrida na EMT, as células transformadas podem adquirir características específicas de células-tronco, as quais se atribuem a capacidade de autorrenovação e de resistência às terapias.

Atualmente, acredita-se que o grande número de pacientes que apresentam recidivas encontram-se associados ao aumento de células tumorais circulantes, do inglês, “*circulating tumor cells*” (CTCs), e sua consequente transformação em células-tronco cancerígenas, do inglês, “*cancer stem cells*” (CSCs), que promovem a iniciação da recidiva tumoral (Giuliano, *et al.*, 2011; Pierga, *et al.*, 2012; Dahan, *et al.*, 2014; Zhang, *et al.*, 2014). Nesse mesmo contexto, alguns pesquisadores demonstraram que os pacientes que adquiriram resistência à quimioterapia e ou à radioterapia, apresentavam alto índice de células tumorais circulantes que sofreram reprogramação pela ativação da EMT (Mego, *et al.*, 2012; Yokobori, *et al.*, 2013). Alguns estudos clínicos evidenciam a correlação entre a baixa sobrevida dos pacientes com câncer e a presença do fenótipo da EMT nas células tumorais, indicando o

envolvimento da EMT na transformação neoplásica dessas células (Wik, *et al.*, 2013; Oishi, *et al.*, 2012; Taube, *et al.*, 2010). As células malignas transformadas pela ativação da EMT podem ser induzidas a expressar o fenótipo de células-tronco adquirindo a capacidade de perpetuar e sobreviver na circulação periférica de forma quiescente, e/ou causar a recidiva no paciente.

Em alguns tipos de tumores que acometem órgãos, como pulmão, fígado, cérebro e medula possuem o microambiente tumoral propício a induzir quiescência nas células malignas. Essas células encontram-se expostas ao estroma reativo que circunda o tumor e dele recebem estímulos para proliferação ou proteção contra o sistema imunológico para que possam entrar em estado de dormência, permanecendo assim, em período de latência favorecendo as recidivas (Kang e Pentel, 2013). Contudo, acredita-se que o mecanismo pelo qual as células tumorais mantêm o fenótipo da EMT durante a recidiva é diferente entre os diversos tipos de neoplasias em decorrência da plasticidade celular e molecular das células tumorais, e sobretudo, pela interação entre diferentes vias de sinalização e o microambiente tumoral.

Atualmente, a terapia neoadjuvante é recomendada para os pacientes que apresentam risco de recidiva após a ressecção do tumor primário. Todavia, a constante interação entre o microambiente tumoral e as células malignas EMT-positivas, pode originar clones que possuem carga genética aberrante, tornando-se resistente à terapia. Nesse contexto, novas terapias estão sendo testadas, cada vez mais personalizadas, na tentativa de inibir a ação das

células transformadas com o fenótipo “*stem-like*” para que haja a diminuição de recidiva e de metástases tumorais (Mitra, *et al.*; 2015).

1.8. O advento da imunoterapia nos carcinomas pulmonares e a influência da EMT na expressão do PD-L1

O recente sucesso alcançado pela imunoterapia é retratado em inúmeras pesquisas que demonstram sua eficácia através da utilização dos inibidores dos pontos de checagem do sistema imunológico, do inglês, “*immune checkpoints inhibitors*”, como alternativa à terapia convencional na oncologia médica. Em 2011, com a aprovação do Ipilimumab (anti-CTLA-4), pelo FDA (“*US Food and Drug Administration*”), para o tratamento de melanoma metastático, a imunoterapia tornou-se alvo de muitas pesquisas acerca do desenvolvimento de novas drogas destinadas ao recrutamento do sistema imunológico no combate às células do câncer.

Com o advento da imunoterapia, em 2014 o FDA aprovou mais duas novas drogas, o Pembrolizumab (anti-PD-1) e o Nivolumab (anti-PD-1), para o tratamento de melanoma metastático. No ano de 2015, como tratamento de segunda linha para os carcinomas pulmonares de não-pequenas células (CPNPC) foram aprovados o Pembrolizumab (anti-PD-1), o Nivolumab (anti-PD-1) e o Atezolizumab (anti-PD-L1) (Ma, *et al.*, 2016).

Entretanto, apenas o Pembrolizumab foi considerado aprovado para o tratamento de primeira linha, e utilizado em casos de pacientes diagnosticados com CPNPC em estágio avançado e que possuam o nível de expressão de PD-L1 $\geq 50\%$ (Zhou, *et al.*, 2018).

Para alguns pesquisadores, a imunoterapia tem sido considerada como potencial escolha para o tratamento de primeira linha em diferentes tipos de neoplasias, por apresentar vantagens em relação às terapias convencionais.

Um dos fatores que contribuiu para o sucesso da aplicação da imunoterapia foi o fato de que utilizando anticorpos bloqueadores dos “*immune checkpoints*”, capazes de bloquear proteínas, como o CTLA-4 e o PD-1 (ou o seu ligante PD-L1), conseguiu-se aumentar e restaurar a resposta das células-T citotóxicas contra os tumores considerados refratários à quimioterapia, atingindo, dessa forma, melhores resultados em relação ao aumento da sobrevida dos pacientes com menor taxa de toxicidade, tornando o tratamento mais tolerável (Durgeau, *et al.*, 2018).

Os pontos de checagem do sistema imunológico possuem atividade crucial na manutenção da tolerância aos antígenos próprios (“*self*”), bem como na regulação da amplitude e da duração da resposta imune das células-T (Ma, *et al.*, 2016).

O ligante de morte programada-1 (PD-L1) é uma proteína transmembrana que se liga ao receptor de morte programada-1 (PD-1) durante a modulação do sistema imune e atuam como “*immune checkpoints*” que regula negativamente a ação das células-T no microambiente tumoral (Fan, *et*

al., 2016). O receptor PD-1 (CD279) é particularmente expresso em células-T citotóxicas CD8 e em outras células imunes, como as células dendríticas e os linfócitos NK (*"Natural Killer"*), enquanto que o ligante PD-L1 (CD274, B7-H1) é caracteristicamente expresso em células tumorais, porém também pode ser expresso em outros tipos celulares, como em células-tronco mesenquimais e em macrófagos (Sweis e Luke, 2017; Ma, *et al.*, 2016). Células normais utilizam a interface PD-1 / PD-L1 como um mecanismo de defesa contra o reconhecimento imune impedindo a ação das células-T, diminuindo assim, a resposta imune. Uma vez que as células-T inativas estão fatigadas, interrompem a divisão celular e, eventualmente, morrem por apoptose (Disis, 2014).

Estudos recentes demonstraram que diferentes tipos de células tumorais regulam positivamente a expressão de PD-L1 como um mecanismo para evitar a resposta imune. As células-T ativadas identificam o receptor PD-L1 na célula tumoral e promovem a inativação da célula-T citotóxica e, portanto, a célula tumoral se torna capaz de escapar do ciclo imune para eliminação e consegue se proliferar de maneira desordenada (Sweis e Luke, 2017; Disis, 2014).

Apesar das opções notáveis dos imunoterápicos anti-PD-1 e PD-L1, seu papel nos carcinomas pulmonares permanece controverso.

É importante ressaltar que a aplicação da expressão do PD-L1 como biomarcador preditivo no âmbito clínico possui limitações, e que não é absoluta sua eficácia em avaliar a resposta ao tratamento de imunoterápicos (anti-PD-1/ PD-L1), uma vez que tumores PD-L1 negativos podem ser responsivos ao

tratamento, e ainda tumores que possuem alto nível de expressão de PD-L1 podem apresentar-se de maneira não responsiva ao tratamento (Zhou, *et al.*, 2018).

Interessantemente, trabalhos recentes relatam fortes evidências sobre o papel do PD-L1 na promoção da transição epitelial-mesenquimal (EMT), bem como na iniciação e na manutenção de células-tronco cancerígenas (Cao, *et al.*, 2011; Inaguma, *et al.*, 2017; Zhi, *et al.*, 2015; Kim, *et al.*, 2016). Alsuliman e colegas relataram que a indução da EMT em células epiteliais mamárias humanas aumentou a expressão de PD-L1, principalmente através da ativação da via PI3K / AKT (Alsuliman, *et al.*, 2015). Em outro relato, Wang e colaboradores demonstraram que a expressão de PD-L1 poderia induzir a EMT no carcinoma de células renais, ativando o fator de transcrição SREBP-1c (Wang, *et al.*, 2015).

Durante sua pesquisa, Ock e colaboradores observaram que a avaliação da sobrevida dos pacientes através de banco de dados, como o TCGA (“*The Cancer Genome Atlas*”) confirmou melhor prognóstico para pacientes que foram considerados PD-L1pos / EMTneg do que para aqueles que eram PD-L1pos / EMTpos, diagnosticados com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Ock, *et al.*, 2016). Outros estudos identificaram separadamente a expressão de PD-L1 e a EMT como importantes fatores prognósticos no câncer de esôfago (Chen, *et al.*, 2014; Liu, *et al.*, 2014). No entanto, a co-expressão de PD-L1 e dos genes da EMT na progressão e na metástase de carcinomas pulmonares, principalmente nas variantes neuroendócrinas, permanece indefinida.

2. HIPÓTESE

De acordo com o embasamento científico apresentado, os genes envolvidos na EMT têm sido apontados como potentes biomarcadores da progressão e da metástase tumoral em diferentes tipos de neoplasias como, câncer de bexiga, colorretal e de mama. Contudo, até o presente momento, poucos estudos relacionados à EMT elucidaram de forma efetiva seu papel como biomarcador no câncer de pulmão. Por esta razão, postulamos que o desenvolvimento de uma assinatura gênica associada à variabilidade dos mecanismos de invasão e de metástase nos carcinomas pulmonares poderá despontar como potencial marcador preditivo e prognóstico.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

1) Realizar o mapeamento genético da EMT em carcinomas pulmonares estabelecendo uma assinatura gênica capaz de prever o potencial de invasão nos seus diferentes tipos histológicos.

2) Avaliar o impacto desses genes na carcinogênese pulmonar analisando seu potencial como biomarcador molecular tanto para diagnóstico quanto para terapia em pacientes com câncer de pulmão.

3.2. Específicos

1) Mapear a expressão dos principais genes envolvidos no processo de transição epitelial-mesenquimal, verificando quais desses genes participaram ativamente no desenvolvimento e na progressão dos carcinomas pulmonares, analisando: (a) Genes relacionados à migração e motilidade celular; (b) Genes relacionados ao desenvolvimento e à diferenciação celular; (c) Genes envolvidos na morfogênese; (d) Genes que participam dos mecanismos da MEC e da adesão celular, retratando sua colaboração na interação entre os elementos da MEC e as células neoplásicas pulmonares; (e) Genes das principais vias de sinalização envolvidas na EMT, como as vias: Notch, TGF- β /WNT; e (f) Fatores de transcrição relacionados à proliferação celular exacerbada e a sua interação nuclear enquanto fatores de transcrição na repressão de marcadores epiteliais, como a E-caderina.

2) Realizar a associação da expressão gênica e com os dados demográficos, estadiamento, tratamento e sobrevida dos pacientes.

3) Correlacionar a expressão gênica entre os diferentes tipos histológicos – adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e os carcinomas neuroendócrinos (tumores carcinoides típico e atípico, carcinoma neuroendócrino de grandes células e carcinoma de pequenas células).

4. MÉTODOS

4.1. Casuística (Tecidos)

Foram incluídos neste estudo espécimes cirúrgicos de tecidos tumorais de 60 pacientes operados por câncer de pulmão. Esses espécimes de tumores primários pulmonares, apresentando estádios I, II, IIIA, IIIB, metástases ou estágio IV, foram provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), do AC. Camargo Cancer Center (AC. CC) e do Hospital do Câncer de Barretos (HCB), selecionados a partir do banco de tumores. Foram ainda coletados espécimes cirúrgicos a partir da margem de tecido normal de cada paciente para que pudesse ser feito o controle. Dessa forma, a análise da expressão tumoral foi comparada com o tecido normal adjacente de cada paciente. Os prontuários dos pacientes foram revisados para coleta de dados demográficos, incluindo o diagnóstico anatomopatológico estabelecido após ressecção cirúrgica. Os pacientes avaliados fazem acompanhamento laboratorial há, pelo menos, dois anos.

Na Tabela 1 (Anexo 1) são apresentados os 60 pacientes diagnosticados com câncer de pulmão e incluídos no estudo com seus respectivos dados demográficos, incluindo o estadiamento patológico final e tipo histológico inicial (definido no momento da cirurgia).

4.2. Microscopia Óptica

As lâminas e laudos correspondentes aos pacientes foram solicitados ao arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do A. C. Camargo Cancer Center e do Hospital do Câncer de Barretos para análise e revisão da classificação histológica e do estadiamento. As lâminas e os laudos de cada paciente selecionado foram reclassificados (V.L.C e T.G.P.M.R) de acordo com a Classificação da *WHO 2015* e *IASLC/ATS/ERS 2011*. Foram analisados os fragmentos teciduais das áreas neoplásicas e não-neoplásicas em lâminas de hematoxilina-eosina (H&E) para que fossem avaliados seus respectivos percentuais em cada lâmina. A Tabela 2 (Anexo 2) apresenta o resultado dos fragmentos teciduais avaliados e a histologia correspondente de cada amostra, e a Figura 4 ilustra os diferentes tipos histológicos de câncer de pulmão incluídos no estudo.

Figura 4 – Subtipos histológicos dos carcinomas pulmonares coletados para o estudo – A) Adenocarcinoma; B) Carcinoma de células escamosas; C) Tumor carcinoide típico; D) Tumor carcinoide atípico; E) Carcinoma neuroendócrino de grandes células; F) Carcinoma de pequenas células; Segundo a *WHO Classification 2015*.

4.3. Técnica de Imuno-histoquímica (padrão) para análise dos imuno-marcadores PD-1, PD-L1, CD8 e CD45RO

As amostras de tecido neoplásico de tumores neuroendócrinos pulmonares foram submetidas a análise de imuno-histoquímica para avaliação dos seguintes marcadores, PD-L1/PD-1, CD8 e CD45RO. Para que fosse realizada a marcação foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para cada marcador, anti-PD-L1 (clone ABM4E54; Abcam, USA; diluição 1:50, pH 9), anti-PD-1 (clone NAT105; Abcam, USA; diluição 1:50, pH 9), anti-CD8 (clone C8/144B, Dako, USA; diluição 1:400, pH 6) e anti-CD45RO (clone UCHL-1, Dako, USA; diluição 1:200, pH 6).

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada obedecendo o protocolo padrão. As lâminas foram desparafinadas, reidratadas em álcool e então, incubadas em citrato de sódio 10mM seguido de aquecimento, para recuperação antigênica. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio.

Os cortes foram lavados em solução de tampão fosfato (PBS – *Phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween-20 (*Sigma, St.Louis, MO*), bloqueados com solução de albumina sérica bovina a 1% (BSA – *bovine serum albumin*) (*Dako, Carpinteria, CA*), e tratadas de acordo com o método de ABC da Vectastain (*Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA*). Anticorpos para PD-L1 (clone ABM4E54; Abcam, USA; diluição 1:50, pH 9), PD-1 (clone NAT105; Abcam, USA; diluição 1:50, pH 9), CD8 (clone C8/144B, Dako, USA; diluição 1:400, pH 6) e CD45RO (clone UCHL-1, Dako, USA; diluição 1:200, pH 6)

foram utilizados em solução PBS/BSA, *overnight* a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram coradas com 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorato (Vector Laboratories, Inc.), e contracoradas com hematoxilina, seguida de desidratação e montagem com lamínula. Utilizou-se a imunoglobulina G (IgG) como o controle negativo de anticorpo primário para assegurar que não houvesse ligações inespecíficas.

Para determinar os índices de expressão dos antígenos obtidos através da técnica de imuno-histoquímica, para cada amostra foi realizada a análise e o cálculo das porcentagens aproximadas de células tumorais positivas e da intensidade de coloração, que determinaram a pontuação de positividade dos antígenos pesquisados (PD-L1/PD-1, CD8 e CD45RO). Para tanto, foi realizada, por um patologista experiente (VLC), por microscopia óptica, a análise de cinco campos diferentes (HPF, *High-Power Fields*) nas áreas de “*hot-spot*” de cada lâmina no aumento de 400x. A proporção de células coradas em cada campo foi avaliada como se segue: 0 para 5% de células coradas; 1 para 5% a 25% de células coradas; 2 para 26% a 50% de células coradas; e 3 para > 50% de células coradas. A intensidade da coloração global foi classificada da seguinte forma: 0 (negativo, ausência de coloração), 1+ (coloração de intensidade fraca), 2+ (coloração de intensidade moderada) e 3+ (coloração de intensidade forte), multiplicado pela porcentagem de células marcadas obtêm-se o resultado de 0 a 100%, para cada intensidade, sendo o resultado máximo obtido o escore de 0 a 300. A distribuição da intensidade de coloração (SID) para um campo foi obtida pela multiplicação da pontuação da proporção de células coradas pela pontuação da intensidade de coloração.

4.4. Técnicas de Biologia Molecular para análise da expressão dos genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal

Extração de RNA

As 60 amostras dos espécimes coletados foram submetidas às técnicas de biologia molecular para análise da expressão de 84 genes que participam da via da EMT. Tanto os tecidos tumorais quanto os normais foram igualmente testados.

A técnica de extração do RNA do tecido tumoral foi realizada pelos dois centros de pesquisa A. C. Camargo Cancer Center e Hospital do Câncer de Barretos, sendo utilizado o mesmo protocolo *QIAasympphony miRNA CT 400*.

Os tecidos congelados foram submetidos à análise histológica por um patologista qualificado para avaliar a porcentagem do tecido de interesse.

Somente amostras com pelo menos 70% de células malignas foram incluídas no estudo e seguiram para extração do RNA. Foram dissecadas manualmente amostras que continham tecido não-neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes.

O tecido congelado foi processado de acordo com o protocolo operacional padrão do Banco de Macromoléculas. Até 50 mg de tecido foram homogeneizados utilizando o equipamento Precellys® (*Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, França*) com 400 μ l do tampão RLT com β -Mercaptoethanol (β -ME) de acordo com as recomendações do fabricante para o kit de extração QIAasympphony RNA (*Qiagen, CA, EUA*). A extração do RNA foi feita de forma automatizada no equipamento QIASymphony (*Qiagen, CA, EUA*)

utilizando o protocolo miRNA CT 400 V8. Neste protocolo é recuperado o RNA total, inclusive o miRNA, e é feito o tratamento do RNA total com a enzima DNase fornecida pelo kit durante o processo de purificação. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (*Thermo Scientific, DE, EUA*) e a integridade determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (*Agilent Technologies, CA, EUA*). O Bioanalyzer fornece um número de integridade do RNA (*RIN-RNA Integrity Number*) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA íntegro.

Síntese de c-DNA a partir da técnica de transcrição reversa (RT-PCR)

A síntese do c-DNA foi realizada no laboratório de histomorfometria e genômica pulmonar da FMUSP a partir de 2 µg do RNA extraído do tecido tumoral.

Para a realização da técnica foi utilizado o kit para síntese de c-DNA – RT² First Strand Kit (*Qiagen Sample & Assay Technologies*). O protocolo descrito foi seguido de acordo com as especificações do fabricante.

A técnica foi realizada em duas etapas: a primeira consiste em eliminar o DNA genômico residual, e a segunda em realizar a síntese propriamente dita do c-DNA pela técnica de Transcrição Reversa (RT-PCR).

1) Eliminação do DNA genômico:

Foi preparado um mix de eliminação de DNA genômico para cada amostra de RNA de acordo com a Tabela 3 (Anexo 3).

Adicionados os componentes do mix em um microtubo, incubar a reação por 5 minutos à 42 °C no termociclador. Ao final da reação, retirar o microtubo

do termociclador e colocar diretamente no gelo por 1 minuto. Em seguida dar continuidade ao procedimento com a segunda etapa da reação.

2) Síntese de c-DNA pela técnica de Transcrição Reversa (RT-PCR):

Em sequência a etapa anterior, foi preparado um mix de Transcrição Reversa para cada amostra de acordo com a Tabela 4 (Anexo 4).

Adicionados os componentes do mix de Transcrição Reversa em um microtubo, homogeneizar com a pipeta e em seguida transferir os 10 µl desse mix para o microtubo que contém o mix da Eliminação do DNA genômico, preparado e reservado anteriormente. A solução resultante deverá ser homogeneizada lentamente. Após esse procedimento o microtubo foi incubado no termociclador primeiramente à 42 °C por 15 minutos e em seguida, à 95 °C por 5 minutos.

Com o término do procedimento, o microtubo foi retirado do termociclador e foram adicionados à reação 91 µl de *Rnase-free water*, homogeneizando a solução delicadamente. No final dessa última etapa, o microtubo já contém o c-DNA sintetizado e cada reação deverá conter o volume final de 111 µl.

Posteriormente, o volume de 1 µl foi retirado de cada amostra de c-DNA para que fosse feita a análise no aparelho Nanodrop para verificação da concentração (ng/µl) e da integridade do cDNA disponível.

Dessa forma, o microtubo de cada reação contendo o volume final de 110 µl foi armazenado em freezer a temperatura de -20 a -80 °C para aguardar a realização da PCR em tempo real.

Reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizando o kit RT² Profiler PCR Array (Qiagen)

As reações de qPCR foram realizadas no laboratório de histomorfometria e genômica pulmonar da FMUSP com o kit RT² Profiler PCR Array System (Qiagen, Dusseldorf, Germany) para 84 genes, de acordo com a Tabela 4 (anexo 4), que participam da transição epitelial-mesenquimal de acordo com o protocolo do fabricante. Nessa plataforma, todas as placas são constituídas por 96 poços dos quais, 84 contêm os oligonucleotídeos imobilizados específicos para os genes da EMT que serão avaliados pelo estudo, 5 contendo controles endógenos diferentes (*HK-housekeeping genes*), onde a média de expressão desses genes foi utilizada para a normalização dos dados, 1 controle para avaliar a contaminação por DNA genômico (GDC), 3 controles da transcriptase reversa (RTC) que atesta a eficiência da etapa de transcrição reversa e 3 controles positivos para PCR (PPC) constituído de uma sequência de DNA artificial certificando a acurácia do teste, de acordo com a Figura 5. O mix utilizado para as reações de PCR em tempo real foi preparado com 1.350 µl 2x RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen, Dusseldorf, Germany), 102 µl de c-DNA diluído e 1.248 µl em água Rhase-free. Após, o mix foi distribuído aos 96 poços da placa, no volume de 25 µl da solução para cada poço. A Tabela 5 (Anexo 5) apresenta os 84 genes alvos analisados, e estes ainda se encontram listados em: <http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-090Z>, para mais informações.

Figura 5 – Placa do RT²Profiler PCR Array sensibilizada com os 84 genes da EMT utilizada para a realização da análise da expressão gênica através da PCR em tempo real. Os genes de controles endógenos descritos como HK, são respectivamente, HK1 – beta-actina, HK2 – beta-2-microglobulina, HK3 – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, HK4 – hipoxantina fosforibosiltransferase 1, HK5 – proteína ribossomal grande P0.

Cada amostra de paciente é testada por placa, ou seja, foi analisado individualmente os 84 genes de cada paciente, sendo testados, separadamente, tanto o tecido tumoral quanto a área de tecido normal correspondente a cada indivíduo. Dessa forma, o tecido tumoral pôde ser pareado com o tecido normal de cada paciente.

As reações de qPCR foram realizadas no aparelho Applied Biosystems Step One Plus (*Applied Biosystems, California, USA*) e as condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com temperatura de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguido pelo período de dissociação, e os dados foram analisados pelo software StepOne (v. 2.0; Applied Biosystems).

Todas as curvas de dissociação foram conferidas manualmente e as amostras que apresentaram dois picos de amplificação foram excluídas da análise.

Os resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo Real são representados como valores de Ct (*threshold cycle*). Cada amostra, tecido tumoral ou tecido normal (utilizado como controle), possuem um valor de Ct. Para a realizar a quantificação da expressão gênica foi empregado o método Δ Ct comparativo, onde Δ Ct = Ct (gene-alvo) – Ct (gene-controle) e a expressão relativa foi calculada pelo método de $\Delta\Delta$ Ct aplicando-se a equação de $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, onde $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct(gene-alvo) – Δ Ct(controle) (Livak, Schmittgen 2001).

Para o cálculo de Δ Ct, consideram-se “genes-alvo” todos os 84 genes que foram analisados durante a realização da PCR em tempo Real e para o “gene-controle” foi utilizada a média dos valores de Ct dos genes endógenos selecionados pelo fabricante do kit, como descrito anteriormente.

Para o cálculo final da expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}) considerou-se o valor de Δ Ct (gene-alvo) para cada amostra de tecido tumoral e para o valor de Δ Ct (controle) a média do Δ Ct dos tecidos normais utilizados como controle. Dessa forma, cada gene pôde ser testado e sua expressão comparada no tecido tumoral em relação ao tecido normal.

4.5. Tabulação dos dados e análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18 (Inc., Chicago, IL). Os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas (média, desvio

padrão, mínimo, máximo e quartis) para os dados quantitativos e tabelas de frequência para os qualitativos. Quando necessário as variáveis foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação do padrão de normalidade.

A associação entre tipos histológicos, fatores demográficos e perfil molecular foi primeiramente comparada pelo teste exato de Fisher (quando qualquer célula de uma tabela de contingência tinha contagem menor que 5) e teste chi-quadrado de Person (quando nenhuma célula de uma tabela de contingência tinha contagem menor que 5). O impacto das seguintes variáveis sobre a sobrevida global foi avaliado para: gênero, idade, estadiamento, tipos histológicos e expressão dos genes avaliados. Essas variáveis foram incluídas em uma análise univariada para determinação de eventual efeito sobre a sobrevida global. Para a análise da sobrevida as variáveis foram estratificadas pela curva ROC (Receiver Operation Characteristic) para determinação do limite ótimo de cut-off binário e analisadas pelo método de Kaplan–Meier sendo as diferenças examinadas por meio do teste log-rank.

Em todo estudo, foi considerado a significância de 0,05. Nos casos das comparações simultâneas feitas pelo método não paramétrico, a confiança foi corrigida pelo método de Bonferroni quando necessário.

5. RESULTADOS

5.1. Características demográficas dos pacientes selecionados para o estudo

Na Tabela 6 estão descritas as características demográficas dos 60 pacientes, relacionadas à frequência e ao percentual quanto ao sexo, a idade, a localização do tumor, ao estadiamento, ao tabagismo e a sobrevida.

Tabela 6 – Características demográficas dos pacientes avaliados pelo estudo

Características demográficas		
	Frequência	Porcentagem (%)
Total de pacientes	60	100
Sexo		
Homem	35	58,3
Mulher	25	41,7
Idade (anos)	63 (19-87) ^a	
Tabagismo		
Fumante	25	41,7
Ex-fumante	17	28,3
Não Fumante (nega tabagismo)	12	20,0
Não consta	6	10,0
Tipos histológicos		
Carcinoma de células escamosas	10	16,7
Acinar	11	18,3
Lepídico “in situ”	1	1,7
Lepídico minimamente invasivo	2	3,3
Lepídico invasivo	5	8,3
Sólido	4	6,7
Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	11	18,3
Carcinoma neuroendócrino de grandes células	4	6,7
Tumor carcinoide típico	4	6,7
Tumor carcinoide atípico	5	8,3
Outros	3	5,0
Estádio T		
1	20	33,3
2	16	26,7
3	2	3,3
4	9	15,9
Não consta	13	21,7

Estádio N		
0	32	53,3
1	4	6,7
2	7	11,7
3	5	8,3
Não consta	12	20
Estádio M		
0	43	71,7
1	7	11,7
Não consta	10	16,7
Recorrência		
Sim	10	16,7
Não	25	41,7
Não consta	25	41,7
Status		
Morto (MPD)	23	38,3
Vivo	37	61,7
Seguimento (meses)	45 (2 – 168) ^a	
Pacientes censurados para a análise da sobrevida até a última data do seguimento	60 (37 vivos e 23 mortos)	

Foram avaliados 60 pacientes, dos quais 35 homens e 25 mulheres, todos portadores de carcinomas pulmonares primários. A mediana de idade dos pacientes estudados foi de 63 anos (variação 19 a 87 anos).

Quanto ao estadiamento, os pacientes foram classificados como T1 (20 pacientes), T2 (16 pacientes), T3 (2 pacientes), T4 (9 pacientes) e em 13 pacientes não constava o estadiamento em seus prontuários. Em referência ao comprometimento de linfonodos, 32 pacientes estavam em estágio N0, 4 em estágio N1, 7 em estágio N2, 5 em estágio N3 e em 12 pacientes não constava essa informação no prontuário. Em relação a metástases distantes, 7 pacientes apresentaram esse quadro, 43 não possuíam metástases e 10 não tinham essa informação em seu prontuário. Sobre o histórico de tabagismo, consta que 25 pacientes eram tabagistas, 12 não eram tabagistas, 17 eram ex-tabagistas e 6 pacientes não tinham essa informação no prontuário. Quanto ao tipo histológico, de acordo com a nova classificação (WHO 2015 e IALSC 2011), 10

eram carcinomas de células escamosas, 11 adenocarcinomas acinares, 1 era adenocarcinoma lepidico “*in situ*”, 2 eram adenocarcinomas lepidicos minimamente invasivos (MIA), 5 eram adenocarcinomas lepidicos invasivos, 4 eram adenocarcinomas sólidos, 11 eram carcinomas neuroendócrinos de pequenas células, 4 eram carcinomas neuroendócrinos de grandes células, 4 eram tumores carcinoides típicos, 5 eram tumores carcinoides atípicos e 3 eram de tipos histológicos variados, como adenoide cístico e adenoescamoso, e por isso foram considerados do mesmo grupo.

A mediana de sobrevida foi de 45 meses (variação, 2 a 168 meses) e até o momento do último registro em prontuário consultado (fevereiro de 2017), 23 pacientes haviam falecido e 37 estavam vivos.

5.2. Características dos genes altamente expressos nos tecidos tumorais dos pacientes

Durante a análise da expressão gênica no tecido tumoral dos 60 pacientes alvos do estudo foi observada a elevada expressão de 24 genes (*AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*, *TGFβ3*, *VPS13A*, *WNT5A*) que participam do processo da EMT e atuam no desenvolvimento da neoplasia pulmonar. Esses genes foram descritos de acordo com suas características e funções biológicas apresentadas a seguir na Tabela 7 (Anexo 6).

5.3. Associações entre as expressões gênicas e as variáveis clínico-patológicas

Foram realizadas as associações entre a expressão dos 24 genes (*AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*, *TGF β 3*, *VPS13A*, *WNT5A*) que estavam superexpressos nos tecidos tumorais e as características clinicopatológicas tais como, a idade, o sexo, a história de tabagismo, o estadiamento e os tipos histológicos, apresentados na Tabela 8 (Anexo 7).

Não houve associação significativa entre a expressão gênica e a idade dos pacientes. Tumores de pacientes do sexo feminino apresentaram maior expressão de *EGFR* ($p=0,03$), *ILK* ($p=0,05$), *JAG1* ($p=0,01$), *MMP2* ($p=0,04$) e *SNAI2* ($p=0,04$), em relação ao sexo masculino, com significância estatística.

Acerca do histórico de tabagismo, observou-se que os genes *EGFR* ($p=0,008$), *ITGAV* ($p=0,05$), *SPP1* ($p=0,009$) e *WNT5A* ($p=0,027$) estavam superexpressos, de forma significativa, nos pacientes fumantes em comparação com os não-fumantes, com exceção do gene *JAG1* ($p=0,008$), que apresentou elevada expressão nos pacientes não-fumantes.

Em relação ao estadiamento dos tumores, os tumores em estágio avançado quando comparados aos tumores em estágio precoce apresentaram significativa maior expressão dos seguintes genes *COL1A2* ($p=0,04$), *COL5A2* ($p=0,04$), *DSP* ($p=0,04$), *EGFR* ($p=0,03$), *FR11* ($p=0,05$), *GSK3B* ($p=0,012$), *ILK* ($p=0,006$), *ITGAV* ($p=0,02$), *ITGB1* ($p=0,002$), *MAP1B* ($p=0,012$), *SNAI2* ($p=0,04$) e *VPS13A* ($p=0,02$).

Houve significativa associação entre tumores com metástases linfonodais e maior expressão dos seguintes genes *COL1A2* ($p=0,04$), *EGFR* ($p=0,006$), *FR11* ($p=0,03$), *ILK* ($p=0,03$), *COL5A2* ($p=0,05$), *ITGAV* ($p=0,03$), *ITGB1* ($p=0,01$), *MAP1B* ($p=0,01$) e *VPSA13* ($p=0,03$), quando comparados aos tumores não metastáticos.

Constatou-se hiperexpressão do gene *SPP1* nos três tipos histológicos de câncer pulmão. Contudo, a expressão mais relevante e significativa associou-se ao CEC ($p=0,03$) em relação aos AD e CNE.

Os carcinomas neuroendócrinos apresentaram maior expressão, com significância estatística, para os seguintes genes *GSK3B* ($p=0,016$), *ILK* ($p=0,020$), *ITGB1* ($p=0,004$), *JAG1* ($p=0,027$) e *MAP1B* ($p=0,038$). Em contraste, os adenocarcinomas apresentaram o menor valor expressivo para tais genes, embora ainda acima dos valores para o tecido normal. Em particular, tumores carcinoides típico e atípico apresentaram maior expressão do gene *JAG1* quando comparados aos CNE de alto grau ($p=0,029$). Interessantemente, nos tumores carcinoides atípicos a expressão do gene *JAG1* foi 60 vezes maior que o tecido normal.

Agrupando-se os tipos histológicos em carcinomas não-neuroendócrinos (CEC e AD) e carcinomas neuroendócrinos (CT, CA, CPPC, CNEGC), observou-se que os CNE apresentaram maior expressão dos seguintes genes: *FR11* ($p=0,026$), *GSK3B* ($p=0,04$), *ILK* ($p=0,005$), *ITGB1* ($p=0,01$), *JAG1* ($p=0,008$), *MAP1B* ($p=0,011$) e *VPS13A* ($p=0,030$).

5.4. Associação das variáveis clínicas e das expressões gênicas com a sobrevida global

A Tabela 9 apresenta os resultados da análise univariada de sobrevida da doença para os pacientes de acordo com as variáveis clinicopatológicas e biológicas estudadas. Pacientes em estágio avançado (estádios III e IV) apresentaram menor sobrevida em relação aos pacientes portadores de tumores em estágio precoce (estádios I e II), sendo essa diferença significativa estatisticamente ($p < 0,01$). Igualmente significativa foi a diferença de sobrevida dos pacientes portadores de tumores com metástases linfonodais em estágio N3 quando comparados aos pacientes em estágio N0 ($p < 0,01$). Houve significativa diferença no menor tempo de sobrevida para pacientes portadores de CNE em relação aos pacientes portadores de CEC ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre a associação da sobrevida com relação à idade, ao sexo e a história de tabagismo. Com exceção dos genes *COL3A1* e *SPP1*, a hiperexpressão dos demais genes associou-se significativamente com a menor sobrevida dos pacientes ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Análise de sobrevida com estratificação binária em alto e baixo das variáveis pelo método de Kaplan–Meier e as diferenças demonstradas pelo teste de Log-Rank

Variáveis	Sobrevida global (meses)		Chi-Square (Log Rank)	Valor de p
	Média	Erro Padrão		
Idade (anos)				
≤63	99.9	16.6	1.13	0,28
>63	56.2	5.1		
Sexo				
Masculino	120.3	14.0	1.17	0,27
Feminino	46.9	6.4		
Tabagismo				
Não	138.5	18.8	1.90	0,16
Sim	44.8	5.2		
Estádio do Tumor				
Precoce (I e II)	66.4	3.0	25.23	0,000
Avançado (III e IV)	46.5	16.2		
Metástase Linfonodal				
N0	147.6	10.9	32.61	0,000
N1	34.6	10.8		
N2	30.2	9.0		
N3	9.6	3.2		
Tipo Histológico				
AD	43.8	2.7	31.80	0,000
CEC	42.0	5.4		
CNEP	14.8	4.7		
mRNA de AKT1				
≤0.90	158.7	8.8	15.50	0,00
>0.90	27.8	4.3		
mRNA de CDH2				
≤6.30	139.8	18.5	8.21	0,004
>6.30	31.3	7,4		
mRNA de COL1A2				
≤1.46	151.4	11.0	11.44	0,001
>1.46	29.0	4.4		
mRNA de COL3A1				
≤4.71	132.6	13.9	3.02	0,080
>4.71	32.9	4.5		
mRNA de COL5A2				
≤1.27	146.7	11.3	10.96	0,001
>1.27	28.5	4.7		
mRNA de DSP				
≤1.37	152.2	10.4	13.80	0,000
>1.37	27.5	4.5		
mRNA de EGFR				
≤0.42	158.7	8.8	16.77	0,000
>0.42	35.6	6.5		
mRNA de FR11				
≤1.28	160.3	7.4	15.79	0,000
>1.28	28.6	4.4		
mRNA de GSK3B				
≤1.16	148.5	12.6	12.32	0,000
>1.16	36.1	6.9		
mRNA de ILK				
≤1.29	141.7	13.7	6.48	0,010
>1.29	41.8	6.6		

mRNA de ITGA5				
≤0.55	149.4	12.1		
>0.55	29.2	4.8	16.66	0,000
mRNA de ITGAV				
≤1.84	152.2	10.45		
>1.84	36.9	6.7	13.80	0,000
mRNA de ITGB1				
≤1.28	144.9	12.3		
>1.28	42.0	6.4	7.06	0,008
mRNA de JAG				
≤1.00	57.7	1.5		
>1.00	76.5	17.6	12.94	0,000
mRNA de KRT14				
≤9.00	131.9	17.5		
>9.00	18.8	6.3	15.91	0,000
mRNA de MAP1B				
≤0.93	148.5	12.6		
>0.93	35.8	6.8	12.67	0,000
mRNA de MMP2				
≤0.91	140.3	12.6		
>0.91	30.4	4.7	6.96	0,008
mRNA de MMP3				
≤6.48	129.5	16.4		
>6.48	22.3	4.9	11.24	0,001
mRNA de SNAI2				
≤1.05	138.1	13.4		
>1.05	39.4	7.1	6.93	0,008
mRNA de SPARC				
≤0.91	153.7	9.5		
>0.91	28.3	4.4	14,37	0,000
mRNA de SPP1				
≤7.91	107.1	16.0		
>7.91	39.1	3.6	0.55	0,45
mRNA de STAT3				
≤0.75	-	-		
>0.75			18,40	0,000
mRNA de TCF3				
≤1.06	144.0	12.8		
>1.06	32.2	4.3	5.60	0,018
mRNA de TGFβ3				
≤0.97	151.2	11.0		
>0.97	35.4	6.8	14.41	0,000
mRNA de VPS13A				
≤1.85	158.7	8.9		
>1.85	37.6	6.4	14.17	0,000
mRNA de WNT5A				
≤1.08	143.6	12,8		
>1.08	27.8	5,9	14,14	0,000

Vários modelos matemáticos de sobrevida foram construídos por análise multivariada para as variáveis significantes pelas curvas de sobrevida de Kaplan Meier. Verificou-se que quando o modelo matemático construído e

controlado para o tipo histológico e a expressão gênica, pacientes portadores de carcinomas neuroendócrinos com expressão elevada de *MMP2* e *SPARC* apresentaram maior risco de morte (OR 5,41 e 4,94, respectivamente) em relação aos pacientes com menor expressão. Pacientes portadores de CEC ou AD com baixa expressão gênica de *ILK*, *SPP1*, *COL1A2*, *ITGB1* apresentam menor risco de morte (OR -7,02; -0,4, -1,3 e -3,02, respectivamente) quando comparados aos pacientes com maior expressão portadores de CNE (Tabela 10 e Figura 6).

Tabela 10 – Análise multivariada de sobrevida pelo modelo de risco proporcional de Cox (Chi-Square = 57,76, $p < 0,01$)

	Coeficiente β	Erro padrão	Método Wald	Significância
CNE			3,25	0,19
AD	-84,15	592,25	0,02	0,88
CEC	-73,52	40,75	3,25	0,07
<i>ITGB1</i>	-3,02	1,57	3,68	0,05
<i>GSK3B</i>	0,73	0,99	0,54	0,45
<i>ILK</i>	-7,26	3,30	4,83	0,02
<i>JAG1</i>	-0,41	0,67	0,37	0,54
<i>MAP1B</i>	0,53	0,36	2,15	0,14
<i>MMP2</i>	5,41	2,49	4,72	0,03
<i>MMP3</i>	-0,35	0,23	2,32	0,12
<i>SPP1</i>	-0,47	0,27	2,94	0,08
<i>SPARC</i>	4,94	2,27	4,74	0,02
<i>SNAI2</i>	-2,08	1,52	1,86	0,17
<i>DSP</i>	-0,09	0,27	0,11	0,73
<i>COL1A2</i>	-1,3	0,65	4,47	0,03

Gráficos

A

B

Figura 6 - Gráficos de sobrevida pelo método de Kaplan Meier. **A)** Observou-se menor sobrevida para os pacientes com elevada expressão dos genes *MMP2* e *SPARC*; **B)** Os pacientes portadores de CEC ou AD com baixa expressão gênica de *ILK* e *SPP1* apresentaram menor risco de morte (OR -7,02; -0,4, respectivamente) quando comparados aos pacientes portadores de CNE com elevada expressão desses genes; **C)** Os pacientes portadores de CEC ou AD com baixa expressão gênica de *ITGB1* e *COL1A2* apresentaram menor risco de morte (OR -3,02; -1,3, respectivamente) quando comparados aos pacientes portadores de CNE com elevada expressão desses genes. Os valores de significância encontram-se na Tabela 10.

5.5 Associações entre as expressões gênicas da EMT e proteicas dos imuno-marcadores (PD-1/PD-L1, CD8 e CD45RO) com as variáveis clínico-patológicas e com a sobrevida global

A expressão de PD-L1 foi observada no citoplasma e na membrana plasmática das células tumorais e das células imunológicas associadas ao estroma tumoral. Na Tabela 11 são apresentados os resultados da quantificação dos pontos de checagem do sistema imune, (do inglês, “*immune checkpoints*”), estratificados de acordo com os tipos histológicos dos carcinomas pulmonares neuroendócrinos (CNEP).

Tabela 11 – Características demográficas e clinico-patológicas de 24 pacientes diagnosticados com tumor neuroendócrino pulmonar

Características	Categoria	CPPC N= 10	CNEGC N= 4	CA N=5	CT N=5
Sexo	Maculino	6 (25)	1 (4.2)	1 (4.2)	3 (12.5)
	Feminino	4 (16.7)	3 (12.5)	4 (16.7)	2 (8.3)
Idade, anos	Mediana	59	51	40	52
Tabagismo	Não-Fumante	0 (0)	1 (4.2)	4 (16.7)	4 (16.7)
	Fumante	10 (41.7)	3 (12.5)	1 (4.2)	1 (4.2)
Estádio T	T1	0 (0)	1 (6.3)	2 (10)	1 (5)
	T2	1 (5)	2 (10)	0 (0)	1 (5)
	T3	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)
	T4	9 (45)	2 (10)	0 (0)	1 (5)
Estádio N	N0	0 (0)	1 (6.3)	3 (18.8)	2 (12.5)
	N1	0(0)	1 (6.3)	0 (0)	1 (6.3)
	N2	2 (12.5)	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)
	N3	4 (25)	1 (6.3)	0 (0)	0 (0)
Estadiamento Clínico	IA	0 (0)	0 (0)	2 (8.3)	1 (4.2)
	IB	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	0 (0)
	IIB	0 (0)	0 (0)	1 (4.2)	1 (4.2)
	IIIA	1 (4.2)	1 (4.2)	0 (0)	0 (0)
	IIIB	3 (12.5)	1 (4.2)	0 (0)	1 (4.2)
	IV	6 (25)	1 (4.2)	0 (0)	0 (0)
Genes da EMT	Média				
AKT1		16.61 (1.81-59.10)	3.73 (0.23-7.37)	1.04 (0.06-3.65)	3.86 (0.11-14.80)
COL1A2		53.72 (2.58-336.18)	22.30 (0.32-83.71)	0.80 (0.04-2.58)	1.69 (0.64-5.20)
COL3A1		39.36 (4.71-307.94)	40.74 (0.59-152.29)	0.51 (0.02-1.19)	0.95 (0.60-1.20)
COL5A2		46.68 (5.14-337.41)	22.67 (0.64-83.60)	1.47 (0.04-5.26)	1.36 (0.32-2.62)
DSP		67.78 (7.61-248.58)	17.02 (1.98-31.15)	6.93 (0.24-31.02)	9.76 (0.48-30.97)
EGFR		7.95 (0.38-12.52)	6.58 (0.10-12.45)	0.97 (0.05-3.08)	1.79 (0.18-6.24)
FR11		15.58 (3.35-54.41)	5.32 (0.21-13.45)	1.07 (0.11-3.38)	7.05 (0.21-27.19)
GSK3B		21.97 (4.28-70.47)	2.31 (0.55-4.37)	4.69 (0.55-8.86)	11.65 (1.10-35.16)
ILK		10.97 (1.28-41.80)	3.40 (0.65-5.23)	2.46 (0.65-5.16)	6.13 (0.65-20.96)
ITGA5		14.39 (0.77-99.84)	4.89 (0.19-12.41)	0.43 (0.02-1.53)	1.11 (0.19-3.09)
ITGAV		8.3 (1.82-29.85)	3.66 (3.65-3.69)	1.46 (0.46-3.63)	3.80 (0.45-7.45)

ITGB1	9.38 (1.82-29.67)	1.83 (0.91-3.69)	2.05 (0.23-7.27)	5.08 (0.46-14.79)
JAG1	11.73 (3.61-29.37)	6.45 (0.23-14.67)	13.00 (0.12-58.50)	49.96 (1.80-118.98)
MAP1B	108.13 (12.03-391.88)	8.61 (0.77-24.48)	6.36 (0.39-24.13)	31.40 (0.76-99.29)
MMP2	5.64 (0.92-29.76)	4.41 (0.11-14.78)	0.24 (0.06-0.45)	0.84 (0.06-3.71)
MMP3	42.48 (1.61-103.48)	16.40 (1.53-25.70)	1.20 (0.80-1.62)	17.04 (3.25-52.30)
SNAI2	7.76 (1.08-35.20)	3.38 (0.55-8.65)	0.37 (0.14-0.55)	2.74 (0.55-8.81)
SPARC	17.52 (1.80-118.66)	4.36 (0.44-14.74)	0.52 (0.11-1.82)	2.17 (0.23-7.40)
SPP1	35.44 (0.50-256.43)	36.89 (0.98-128.51)	1.34 (0.13-3.96)	1.77 (0.12-4.03)
STAT3	5.05 (0.70-11.41)	1.85 (0.35-2.84)	1.42 (0.09-5.63)	3.60 (0.18-11.42)
TCF3	17.73 (1.84-58.45)	2.87 (0.45-7.38)	0.12 (0.01-0.45)	0.68 (0.06-1.86)
TGFβ3	10.90 (1.98-32.42)	3.56 (0.13-8.12)	0.76 (0.06-2.01)	3.68 (0.50-8.13)
VPS13A	29.59 (7.94-128.40)	4.25 (1.00-8.07)	5.89 (0.50-15.91)	11.91 (1.00-32.43)
WNT5A	15.71 (1.24-41.59)	4.53 (0.30-10.22)	1.17 (0.16-2.59)	1.53 (0.32-5.23)
Imuno-marcadores				
PD-L1 (CT)	136.00 (20.00-280.00)	155.00 (100.00-210.00)	180.00 (180)	130.00 (70.00-180.00)
PD-L1 (TAIC)	111.00 (45.00-200.00)	50.00 (10.00-70.00)	25.00 (10.00-30.00)	41.00 (10.00-75.00)
PD-1	0 (0)	0 (0)	6.00 (0.00-10.00)	6.00 (0.00-10.00)
CD8	34.90 (0.00-150.00)	27.75 (0.00-75.00)	4.50 (0.00-6.00)	21.40 (0.00-75.00)
CD45RO	5.20 (0.00-20.00)	78.75 (0.00-210.00)	7.50 (0.00-30.00)	19.00 (0.00-75.00)

Abreviaturas: CPPC, carcinoma pulmonar de pequenas células; **CNEGC**, carcinoma neuroendócrino de grandes células; **CA**, carcinoide atípico; **CT**, carcinoide típico; PD-L1, Ligante de Morte Programada-1; PD-1, proteína da morte programada-1; **CT**, células tumorais; TAIC, células imunes associadas ao tumor.

† Pelo critério da International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC).

Observou-se que expressão de PD-L1 foi maior em células malignas do que em células imunes associadas ao tumor (TAIC, do inglês, “*tumor-associated immune cells*”), para todos os CNEP (H score mediano, 136 vs 111 para CPPC, 155 vs 150 para CNEGC, 180 vs 25 para CA e 130 vs 41 para CT, respectivamente, $P < 0,01$) (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Expressão de PD-L1 em células tumorais vs PD-L1 em células imunes associadas ao tumor nos subtipos histológicos de CNEPs; Coloração por H & E: A) Tumor carcinoide típico, B) Tumor carcinoide atípico, C) Carcinoma neuroendócrino de grandes células, D) Carcinoma pulmonar de pequenas células; Imuno-histoquímica para PD-L1 em CNEPs: E) TC, PD-L1⁺; F) AC, PD-L1⁺; G) LCNEC, PD-L1⁺; H) SCLC, PD-L1⁺.

Figura 8 – Diferença entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais (TC) vs PD-L1 nas células imunes associadas ao tumor (TAIC) nos carcinomas neuroendócrinos pulmonares.

O histórico de tabagismo foi significativamente correlacionado com a expressão de PD-1 nos linfócitos associados ao infiltrado tumoral, do inglês, “*tumor infiltrating lymphocytes*” (TILs) ($P < 0,01$). Não foi encontrada diferença entre os subtipos histológicos dos CNEP e os linfócitos T CD8⁺.

A análise univariada mostrou que a sobrevida global dos portadores de CPNE foi significativamente correlacionada aos seguintes fatores prognósticos: tabagismo, subtipo histológico, estadiamento tumor TNM, PD-L1 nas células imunes, PD-1 em TILs, expressão dos genes CD8 e EMT (Tabela 12).

Observamos que essas variáveis separaram os pacientes em dois grupos significativamente associados com a expressão de PD-1 em TILs ($P < 0,01$). A expressão de CD45RO⁺ nas células-T foi significativamente maior em CNEGC que nos CPPC (mediana de escore H, 78,75 vs 5,20, $P = 0,03$) (Figura 9).

Tabela 12 – Análise univariada para o prognóstico dos pacientes diagnosticados com CNEP

Análise Univariada			
	HR (95% IC)	χ^2	P
Sobrevida global			
Sexo	0.88 (0.30-2.56)	0.04	0.82
Idade, anos	0.55 (0.18-1.65)	1.16	0.28
Tabagismo	0.19 (0.04-0.86)	6.47	0.01
Subtipo histológico			
CPPC	-		
CNEGC	0.60 (0.16-2.25)	18.04	0.00
CA	0.09 (0.01-0.76)		
CT	0.00 (0.00-1.27)		
Estádio T			
T1	0.00 (0)		
T2	0.55 (0.12-2.53)	11.31	0.01
T3	0.00 (0)		

T4	-		
Estádio N			
N0	0.00 (0.00-1.55)		
N1	0.49 (0.05-4.45)	15.70	0.00
N2	0.71 (0.13-3.75)		
N3	-		
Estadiamento Clínico			
IA	0 (0)		
IB	0 (0)		
IIB	0 (0)	19.22	0.00
IIIA	1.16 (0.23-5.80)		
IIIB	0.25 (0.05-1.27)		
IV	-		
Genes da EMT			
<i>AKT1</i>	0.24 (0.07-0.82)	5.92	0.01
<i>COL1A2</i>	0.14 (0.04-0.55)	10.32	0.00
<i>COL3A1</i>	0.15 (0.04-0.58)	9.68	0.00
<i>COL5A2</i>	0.27 (0.08-0.87)	5.39	0.02
<i>DSP</i>	0.17 (0.04-0.63)	8.75	0.00
<i>EGFR</i>	0.16 (0.04-0.59)	9.45	0.00
<i>FR11</i>	0.23 (0.07-0.78)	6.27	0.01
<i>GSK3B</i>	0.43 (0.14-1.30)	2.31	0.12
<i>ILK</i>	0.72 (0.25-2.09)	0.35	0.55
<i>ITGA5</i>	0.27 (0.08-0.90)	5.14	0.02
<i>ITGAV</i>	0.45 (0.14-1.40)	1.97	0.16
<i>ITGB1</i>	0.27 (0.08-0.89)	5.17	0.02
<i>JAG1</i>	0.22 (0.06-0.74)	6.73	0.00
<i>MAP1B</i>	0.26 (0.08-0.87)	5.42	0.02
<i>MMP2</i>	0.16 (0.04-0.61)	9.13	0.00
<i>MMP3</i>	0.36 (0.11-1.20)	3.00	0.08
<i>SNAI2</i>	0.35 (0.11-1.15)	3.31	0.06
<i>SPARC</i>	0.22 (0.06-0.73)	6.93	0.00
<i>SPP1</i>	0.83 (0.29-2.37)	0.11	0.73
<i>STAT3</i>	0.26 (0.07-0.85)	5.57	0.01

<i>TCF3</i>	0.23 (0.07-0.75)	6.65	0.01
<i>TGFβ3</i>	0.32 (0.09-1.06)	3.85	0.05
<i>VPS13A</i>	0.39 (0.13-1.19)	2.87	0.09
<i>WNT5A</i>	0.33 (0.10-1.07)	3.80	0.05
Imuno-marcadores			
PD-L1 (células tumorais)	0.49 (0.15-1.50)	1.60	0.20
PD-L1 (TAIC)	4.15 (1.13-15.30)	5.53	0.01
PD-1	0.02 (0.00-2.69)	11.43	0.00
CD8	5.01 (1.47-17.00)	7.44	0.00
CD45RO	2.43 (0.78-7.59)	2.43	0.11

Abreviaturas: CPPC, carcinoma pulmonar de pequenas células; CNEGC, carcinoma neuroendócrino de grandes células; CA, carcinoide atípico; CT, carcinoide típico; PD-L1, Ligante de Morte Programada-1; PD-1, proteína da morte programada-1; TAIC, células imunes associadas ao tumor. † Pelo critério da *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*.

Figura 9 – Diferença da expressão de CD45RO entre o Carcinoma pulmonar de pequenas células (do inglês, small cell lung carcinoma – SCLC) e o Carcinoma neuroendócrino de grandes células (do inglês, large cell neuroendocrine carcinoma – LCNEC). A) Expressão de CD45RO em LCNEC, B) Expressão de CD45RO em SCLC

Os tempos de sobrevida média estão ilustrados pelos gráficos de Kaplan-Meier na Figura 10. O grupo com linfócitos T CD8+ que apresentaram expressão < 6% e que tiveram a expressão de *MAP1B* < 18,20, aparecem

descritos na curva superior, apresentaram um tempo médio de sobrevida longo (113,08 e 113,67 meses, respectivamente). Contudo, àqueles pacientes que tiveram a expressão de linfócitos T CD8+ > 6% e a expressão de *MAP1B* > 18,20 (curva inferior) apresentaram um tempo médio de sobrevida de apenas 13,60 e 16 meses após a cirurgia (Log rank 8,19, $P < 0,01$ e Log rank 5,56, $P = 0,01$, respectivamente). Igualmente significativa foi a diminuição da sobrevida para pacientes com baixa expressão do inibidor PD-1 nas células imunes (log rank 7,67; $P < 0,01$).

Figura 10 – Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier para 24 pacientes com CNEPs correlacionadas à expressão de CD8+, PD-1+ e MAP1-B. Notas: **(A)** Expressão de CD8+ em TILs; **(B)** Pacientes com CNEP com maior expressão de linfócitos T CD8+ demonstraram um prognóstico significativamente pior do que aqueles que apresentaram menor expressão ($P = 0,01$); **(C)** Expressão de PD-1+ em TILs; **(D)** Pacientes com CNEP com alta expressão de PD-1 em TILs demonstraram prognóstico significativamente melhor do que os que tiveram menor expressão ($P = 0,01$); **(E)** Pacientes com CNEP com maior expressão gênica de MAP1-B apresentaram pior prognóstico do que os que tiveram menor expressão desse gene ($P=0,01$).

Abreviaturas: PD-1, do inglês, *programmed death 1*; CNEPs, carcinomas neuroendócrinos pulmonares; TILs, do inglês, *tumor-infiltrating lymphocytes*

Para entender a relação entre a célula tumoral PD-L1⁺ e outros reguladores imunológicos dos carcinomas neuroendócrinos pulmonares e a expressão dos genes da EMT, analisamos: *AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*, *TGF3*, *VPS13A*, *WNT5A* em 24 CNEP. Por análise multivariada, observamos que o PD-L1⁺ em células tumorais estava altamente associado à expressão dos genes da EMT (*SPP1* e *MAP1B*, $p < 0,05$), como ilustra a Figura 11.

Figura 11 – Correlação entre a expressão de PD-L1 nas células tumorais e as expressões gênicas de *MAP1B* e *SPP1*. **A)** A expressão de *MAP1B* apresentou-se inversamente correlacionada com a expressão de PD-L1; **B)** A expressão de *SPP1* demonstrou-se diretamente associada a alta expressão de PD-L1.

6. DISCUSSÃO

Recentes investigações têm demonstrado que um subgrupo de tumores abrigam alterações moleculares que são sugestivas de mau prognóstico e baixa sobrevivência, opondo-se à percepção de que o crescimento da metástase tumoral ocorra de forma linear (Ramaswamy, 2003). Esta evidência denota a importância de identificar mudanças moleculares numa fase precoce para orientar o comportamento clínico, uma vez que o sistema TNM não é capaz de identificar tais mudanças. Portanto, há um requisito crucial para desenvolver testes prognósticos que possam prever recorrência e identificar pacientes de alto risco numa fase precoce, quando eles ainda poderiam se beneficiar de terapia adjuvante (Felip *et al.*, 2005; Scagliotti *et al.*, 2003; Arriagada *et al.*, 2010).

Neste contexto, um teste prognóstico contendo uma assinatura gênica de 70-genes foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para pacientes com câncer de mama (Buyse *et al.*, 2006) e, ainda, de maneira semelhante outro estudo apresentou o desenvolvimento de assinatura gênica para câncer de próstata, de cólon e de mama (Paik, 2007). Perfis laboratoriais incluindo expressão de múltiplos genes, proteínas, autoanticorpos e miRNA têm sido propostos na literatura para câncer de pulmão, porém ainda sem aprovação para uso clínico.

No presente trabalho, desenvolvemos uma abordagem para identificar biomarcadores preditivos através do processo molecular de EMT que se

encontra envolvido no mecanismo da metástase tumoral. O objetivo do estudo foi identificar a expressão de genes que promovem, durante o curso do tumor, um fenótipo metastático e, assim, utilizar tais genes como biomarcadores prognósticos robustos e consistentes. Assumindo que a EMT é um evento considerado promotor de metástases, que permite a disseminação de células tumorais, a análise da expressão desses genes nas células malignas do tumor primário, poderá ser de grande importância na prevenção da progressão neoplásica.

Durante a análise da expressão gênica, foi possível avaliar 84 genes que atuam no processo da EMT, de modo que fosse testado, de maneira pareada, o tecido tumoral e o tecido normal de cada paciente, individualmente. Se faz necessário ressaltar a importância de realizar a análise da expressão gênica de forma pareada, pois dessa forma, o paciente possui como controle do tecido tumoral, o próprio parênquima pulmonar livre de área neoplásica, considerado como controle. Assim, por essa técnica podemos analisar com maior segurança e conferir maior robustez ao resultado, uma vez que conseguimos comparar a expressão do mesmo gene, tanto no tecido tumoral quanto no tecido normal. A escolha de realizar a análise de forma pareada foi embasada pelo fato de que pertencendo ao mesmo paciente, o controle seria mais fidedigno em razão de possuir a mesma genética, e assim diminuir as chances de resultados discrepantes.

De acordo com as características funcionais e regulatórias da indução de EMT, dos 84 genes avaliados, identificamos 24 que se encontram envolvidos nos processos de adesão, de migração e de invasão celular, na evasão do

sistema imune e na interação do tumor com as células estromais. Especificamente, detectamos no tecido tumoral dos 60 pacientes alvos do estudo a elevada expressão de *AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*, *TGF β 3*, *VPS13A*, e *WNT5A* que participam do processo da EMT e atuam no desenvolvimento da neoplasia pulmonar.

Em nossa casuística, tumores de pacientes do sexo feminino apresentaram maior expressão de *EGFR*, *ILK*, *JAG1*, *MMP2* e *SNAI2*, em relação ao sexo masculino, sugerindo maior agressividade aos tumores. De fato, muitas observações na literatura sugerem que hormônios, especialmente os estrógenos, podem estar envolvidos na carcinogênese pulmonar em virtude de sua íntima relação com a ativação da proliferação celular através da via indireta de fibroblastos (Stabile *et al.*, 2002). Com relação ao histórico de tabagismo observou-se que os genes *EGFR*, *ITGAV*, *SPP1* e *WNT5A* estiveram significativamente superexpressos nos pacientes fumantes em comparação com os não-fumantes, com exceção do gene *JAG1*, que apresentou elevada expressão nos pacientes não-fumantes. O gene *JAG1* foi associado ao tabaco em um estudo onde Tilley *et al.*, (2009) demonstrou que a expressão de *JAG1* era menor em pacientes tabagistas ou tabagistas com DPOC associada, quando comparado aos pacientes não-tabagistas. Ming *et al.*, (2015) demonstraram em cultura de células que o extrato do cigarro pode induzir a EMT e também contribuir para a aquisição de resistência aos inibidores da EGFR-TKIs. Ainda sobre a ação do cigarro, em um estudo semelhante, Whang *et al.*, (2013) demonstraram que o gene *WNT5A* estava

hiperexpresso no tecido tumoral de câncer de pulmão tabaco-relacionado, e que esse gene encontra-se envolvido no processo de carcinogênese pulmonar.

Durante a nossa análise observamos que tumores em estágio avançado e metastático aos linfonodos apresentaram maior expressão dos genes *COL1A2*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGAV*, *ITGB1*, *MAP1B*, *SNAI2* e *VPS13A*, realçando o impacto clínico da EMT na invasão, na progressão e nas metástases no câncer de pulmão. Resultados similares foram apresentados por Heerboth *et al.*, (2015) onde descrevem a elevada expressão de genes envolvidos na EMT e como esse processo pode estar relacionado com progressão tumoral de diversas neoplasias, como câncer de pâncreas, de fígado e de pulmão.

Constatamos hiperexpressão do gene *SPP1* nos três tipos histológicos de câncer pulmão. Contudo, a expressão mais relevante e significativa associou-se ao CEC, despontando como marcador de agressividade histológica corroborando com resultados similares feitos por Zhang H *et al.*, (2014) que demonstrou a elevada expressão de *SPP1* em CPNPC de pulmão e a sua correlação com a tumorigênese e a metástase pulmonar. Ainda no mesmo contexto, em um estudo recente descrito por Choi *et al.*, (2017) apresentou a relação entre a alta expressão do gene *SPP1* encontrada nas células de carcinoma pulmonar de não-pequenas células (CPNPC) e a ativação da EMT.

A proteína osteopontina, codificada pelo gene *SPP1*, também foi avaliada por Kothari, *et al.*, (2016) que demonstrou a importância dessa proteína na regulação da EMT por meio das interações realizadas com o CD44

e as integrinas, capazes de ativar vias sinalizadoras, como PI3K/AKT, Janus kinase 2 (JAK2) atuando no controle da ativação da EMT. Contudo, não obstante, o elevado nível de osteopontina também tem sido relatado em diferentes tipos de tumor, como fator de pior prognóstico para os pacientes (Zhuo *et al.*, 2016). Diferentes estudos também pontuaram a correlação entre a expressão elevada de osteopontina e a aquisição de características próprias de células-tronco ("*stem cell-like*"), como o potencial de auto-renovação e de imortalidade, além de promover resistência à radiação- γ em glioblastoma e em carcinoma hepatocelular (Cao, *et al.*, 2015; Lamour, *et al.*, 2015).

Durante a nossa análise, carcinomas neuroendócrinos apresentaram maior expressão dos genes *GSK3B*, *ILK*, *ITGB1*, *JAG1* e *MAP1B*. Em particular, tumores carcinoides típico e atípico apresentaram maior expressão do gene *JAG1* quando comparados aos CNE de alto grau. Interessantemente, nos tumores carcinoides atípicos a expressão do gene *JAG1* foi 60 vezes maior que o tecido normal. De acordo com Zheng *et al.*, (2016) durante a análise da expressão dos genes das integrinas em câncer de pulmão, observaram que a alta expressão desses genes, como *ITGB1* e *ILK* estavam relacionados à metástase linfonodal e ao pior prognóstico em pacientes com CPNPC.

Carcinomas neuroendócrinos de pulmão são tumores raros que, apesar de nosso conhecimento sobre sua biologia e genética ter aumentado com o advento da biologia molecular, as vias envolvidas na progressão e na metástase desses tumores permanecem não totalmente elucidadas. Um dos mecanismos mais estudados na disseminação das células tumorais é a EMT, que tem sido observada em modelos de carcinogênese da mama, do ovário, do cólon e do esôfago (Trimboli, *et al.*, 2008; Vergara, *et al.*, 2010; Usami *et al.*,

2008). Muitos estudos acerca do gene *GSK3B* demonstraram que existe associação entre sua elevada expressão e a progressão de diferentes tipos de tumores como, câncer de pâncreas, de fígado e de ovário (Luo, 2009; Shakoori *et al.*, 2005; Ougolkov *et al.*, 2005). Em contraste, os AD apresentaram o menor valor expressivo para tais genes, embora ainda acima dos valores para o tecido normal, sugerindo que a EMT possa ter menor participação na progressão tumoral desse tipo histológico.

Nossos resultados tiveram impacto na história natural do câncer de pulmão. A expressão gênica da EMT em pacientes com estágio avançado (estádios III e IV) apresentaram menor sobrevida em relação aos pacientes portadores de tumores em estágio precoce (estádios I e II), sendo essa diferença significativa estatisticamente ($p < 0,01$). Igualmente significativa foi a diferença entre a sobrevida dos pacientes portadores de tumores com metástases linfonodais em estágio N3 quando comparados aos pacientes em estágio N0 ($p < 0,01$). Houve significativa diferença no menor tempo de sobrevida para pacientes portadores de CNE em relação aos pacientes portadores de CEC ($p < 0,01$). Com exceção dos genes *COL3A1* e *SPP1*, a hiperexpressão dos 24 genes avaliados associou-se significativamente com a menor sobrevida dos pacientes. Cabe ressaltar que quando o modelo matemático construído é controlado para tipo histológico e expressão gênica, pacientes portadores de carcinomas neuroendócrinos com expressão elevada de *MMP2* e *SPARC* apresentaram maior risco de morte (OR 5,41 e 4,94, respectivamente), enquanto que pacientes portadores de CEC ou AD com baixa expressão gênica de *ILK*, *SPP1*, *COL1A2* e *ITGB1* apresentam menor

risco de morte (OR -7,02; -0,4, -1,3 e -3,02) quando comparados aos pacientes com maior expressão portadores de CNE.

Embora existam muitos estudos acerca do mecanismo molecular que rege a EMT, em câncer de pulmão ainda não foi possível desenvolver e validar um marcador prognóstico eficaz, tendo em vista a complexidade que envolve o desenvolvimento desses tumores. Ainda assim, a elevada expressão dos genes que participam do processo da EMT obtidas em nosso estudo, demonstra a importância desse evento na progressão tumoral e apresenta esses genes como possíveis candidatos a serem biomarcadores de invasão e de metástase nos carcinomas pulmonares. Contudo, vale ressaltar que estudos prospectivos se fazem necessários para que haja a validação desta assinatura gênica como biomarcador preditivo e prognóstico em câncer de pulmão.

Durante a nossa pesquisa, realizamos a análise dos imuno-marcadores (PD-1/PD-L1, CD8, CD45RO) como possíveis alvos terapêuticos nos carcinomas neuroendócrinos pulmonares.

Nesse contexto, observou-se que a expressão de PD-L1 foi maior em células malignas do que em células imunes associadas ao tumor, em todos os subtipos histológicos de CNEPs. O Histórico de tabagismo foi significativamente correlacionado com a expressão de PD-1 em linfócitos presentes no infiltrado tumoral (TILs). A expressão de células-T CD45RO⁺ foi significativamente maior em CNEGC do que em CPPC. De fato, há evidências convincentes de que a imunogenicidade do CPPC é resultado da relação entre a atividade imunológica e o prognóstico. De acordo com o trabalho de Horn *et al.*, (2016), a alta expressão de células-T CD45RO⁺ presentes no infiltrado

tumoral de CPPC foi correlacionada com a melhora na sobrevida dos pacientes, independente do estágio da doença. Em nosso estudo, não foi encontrada diferença entre os subtipos histológicos dos CNEPs e os linfócitos T CD8⁺. Alguns grupos como, Walsh *et al.*, (2016) demonstraram a supremacia de células-T CD8⁺ sobre inibidores imunológicos (como células-T reguladoras e imunócitos “exauridos” pelo constante bloqueio mediante PD-1) presentes no infiltrado de carcinomas de células de Merkel.

Em outros estudos, os autores como, Uruga, *et al.*, (2016) demonstraram que a presença abundante de linfócitos T CD8⁺ estava associada à alta expressão de PD-L1 em células tumorais. Em uma abordagem diferente, o mesmo grupo demonstrou a correlação entre as células-T CD8⁺ no infiltrado intra-epitelial e a expressão de PD-L1 no adenocarcinoma pulmonar. No estudo recente de Kasajima *et al.*, (2018) foi feita a correlação entre a inflamação associada ao tumor e a expressão de PD-L1 em tumores neuroendócrinos pulmonares. Os autores observaram que a associação entre a resposta inflamatória anti-tumoral e a expressão de PD-L1 nos carcinomas neuroendócrinos apresentou um impacto positivo na sobrevida dos pacientes. Em contra partida, Ohigashi *et al.*, (2005) e Thompson *et al.*, (2005) relataram que a alta expressão de PD-L1 em células tumorais foi associada à baixa sobrevida em pacientes com carcinoma de células renais, neoplasias gástricas e esofágicas. No câncer de pulmão, todavia, a função preditiva da hiperexpressão de PD-L1 permanece controversa e associações de prognóstico negativas ou positivas têm sido relatadas continuamente. No entanto, os resultados dos ensaios clínicos levaram à aprovação da imunoterapia através dos inibidores dos “*immune checkpoints*” (PD-1 / PD-L1)

para o tratamento de CPNPC em estágio avançado (Herbest *et al.*, 2016; Brahmer *et al.*, 2012; Rizvi *et al.*, 2015; Reck *et al.*, 2016). Ademais, em câncer de pulmão, as pesquisas realizadas acerca da expressão de PD-L1 são aplicadas, de maneira predominante, aos subtipos escamoso e adenocarcinoma, contrastando com o conhecimento escasso sobre tumores neuroendócrinos, especialmente CNEGC. Em estudo recente, Tsuruoka *et al.*, (2017) examinaram 227 amostras de tumores neuroendócrinos pulmonares (CT, CA, CPPC e CPNEGC) e demonstraram que a expressão de PD-L1 era positiva em 10,4% dos casos de CNEGC. Em nosso estudo, foi utilizado o mesmo cut-off (H-score > 1 contado como “positivo”) e observamos que a expressão de PD-L1 foi positiva nas células tumorais de todos os subtipos de CNEP. Esta variação na expressão de PD-L1 pode ser esclarecida pela acessibilidade de diferentes ensaios de coloração. Kerr *et al.*, (2015) reportou esta problemática sobre a variabilidade dos ensaios de coloração, contabilizando pelo menos 5 anticorpos diferentes usados, até mesmo nos ensaios atuais, aplicados às imunoterapias.

De fato, não há consenso sobre a expressão do PD-L1 e de outros marcadores imunológicos no câncer de pulmão, principalmente em tumores neuroendócrinos pulmonares. A razão por haver tanta divergência entre os autores talvez esteja atribuída ao fato de que o PD-L1 pode não ser suficientemente específico como biomarcador prognóstico no câncer de pulmão.

Em nossa pesquisa, a expressão de PD-L1 foi um fator independente significativo associado às características da EMT. Correlações semelhantes entre PD-L1 e EMT também foram validadas como fatores independentes em

bancos de dados públicos como, o TCGA (do inglês, “*The Cancer Genome Atlas*”) e o CCLE (do inglês, “*The Cancer Cell Line Encyclopedia*”) utilizando assinatura gênica relacionada aos genes da EMT em outros tumores (Mak, *et al.*, 2016). Ainda no mesmo contexto, em nosso estudo, demonstramos que os pacientes cujos tumores eram PD-L1pos / EMTpos apresentaram um prognóstico significativamente pior do que àqueles cujos tumores eram PD-L1pos / EMTneg. Esse achado foi convergente ao trabalho de Mak *et al.* que propuseram que a positividade de PD-L1 pode ser dividida em duas categorias por marcadores EMT em CNEP. De fato, combinada à carga mutacional do tumor e a profusão de linfócitos presentes no infiltrado tumoral, a expressão de PD-L1 em tecidos tumorais ou microambiente tumoral correlaciona-se fortemente com as taxas de resposta às terapias anti-PD-1 / PD-L1 (Rizvi, *et al.*, 2015; Tumei, *et al.*, 2014; Garon *et al.*, 2015; Herbst *et al.*, 2014). Entretanto, os fatores clínico-patológicos específicos associados à expressão de PD-L1 no câncer de pulmão ainda não são claros. Jiang *et al.*, (2013) demonstraram a existência de influências multifatoriais na expressão de PD-L1, incluindo o remodelamento da EMT, e os danos induzidos pela quimioterapia citotóxica que ocorrem via MAPK ou JAK / STAT.

No presente estudo observou-se que a expressão de PD-L1 foi correlacionada de forma mais significativa com a EMT do que com as células imunes em relação ao impacto no prognóstico dos pacientes, em concordância com outros autores (Cao, *et al.*, 2011; Movva, *et al.*, 2015; Velcheti, *et al.*, 2013; Rekhtman, *et al.*, 2016).

Baseando-se nas pesquisas da literatura, nosso estudo é o primeiro

relatório a demonstrar uma correlação entre PD-L1 e EMT nos carcinomas pulmonares oriundos de células endócrinas. Apesar de ser um fator limitante para a nossa pesquisa, o pequeno número de pacientes diagnosticados com CNEP avaliados pelo estudo, pode contribuir para o maior entendimento acerca do comportamento desses tumores, uma vez que são considerados raros, admitindo-se que a sua incidência é de aproximadamente 25% (CT, 2%; CA, <1%; CNEGC, 3% e CPPC, 20%) de todas as neoplasias pulmonares primárias (Hendifar, *et al.*, 2016).

A expressão de PD-L1 pode ser induzida por citocinas, como interferon-gama, produzidas pelas células inflamatórias do estroma reativo tumoral, em resposta ao antígeno viral ou ao processamento de neo-antígenos (Dong, *et al.*, 2002; Schumacher, *et al.*, 2015). A expressão de PD-L1 também pode ser promovida pela ativação de vias oncogênicas intrínsecas como, a via STAT3, por uma mutação ativante de EGFR ou por translocação de ALK. Ademais, as consequências clínicas da hiperexpressão de PD-L1 diferem de acordo com as vias de indução intrínseca e extrínseca. Nesse contexto, seus valores preditivos com inibidores anti-PD-1 / PD-L1 devem ser investigados, particularmente os valores preditivos dos status PDL-1pos / EMTneg e PD-L1pos / EMTpos (Ock, *et al.*, 2017; Azuma, *et al.*, 2014; Ota, *et al.*, 2015).

Nosso estudo também avaliou a correlação entre PD-L1 e dois genes da EMT, *MAP1B* e *SPP1*. O gene *MAP1B* codifica a proteína 1 B associada aos microtúbulos, que pertence à família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Essa proteína está envolvida na estruturação dos microtúbulos e é uma das mais importantes relacionadas à estabilidade do citoesqueleto e no desenvolvimento do sistema nervoso (Lee, *et al.*, 2008).

Em um estudo recente, Gadoth, *et al.*, (2017) identificaram o gene *MAP1B* como o antígeno de um anticorpo neuronal (PCA-2) que é um robusto preditor de CPPC e um potencial biomarcador para distúrbios neurológicos paraneoplásicos. Em nossa investigação, a expressão gênica de *MAP1B* foi inversamente correlacionada com a expressão de PD-L1, os pacientes que apresentaram alta expressão de *MAP1B* apresentaram menor expressão de PD-L1. Curiosamente, *MAP1B* também foi correlacionado com a pior sobrevida global dos pacientes.

O gene *SPP1* codifica a fosfoproteína 1 secretada, também conhecida como osteopontina (OPN), é uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz óssea extracelular. No osso é produzida por osteoclastos e osteoblastos, envolvidos na mineralização da matriz óssea. Os níveis plasmáticos de OPN têm se mostrado positivos para câncer de cólon e de pulmão, bem como para as metástases. A presença marcante de OPN em vários tumores está fortemente relacionada ao estágio patológico, sugerindo um papel significativo na agressividade, na progressão e na metástase tumoral (Zhuo, *et al.*, 2016).

Em nossos casos, observamos que a expressão gênica de *SPP1* estava diretamente correlacionada com a expressão de PD-L1, os pacientes que apresentaram alta expressão de *SPP1*, também tiveram alta expressão de PD-L1.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foi realizado o mapeamento genético da EMT em carcinomas pulmonares neuroendócrinos e não-neuroendócrinos, estabelecendo uma assinatura gênica de 24 genes candidatos a serem biomarcadores preditivos de agressividade histológica, de invasão e de metástase.

Durante a análise da expressão dos genes que participam da EMT, constatou-se que existe diferença de expressão de acordo com os tipos histológicos, que poderia explicar a diversidade existente no comportamento desses tumores.

A hiperexpressão dos genes da EMT (*FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B* e *VPS13A*) nos carcinomas neuroendócrinos, demonstrou que essa via pode conter elementos-chave que contribuem de maneira importante para o espectro diferencial de invasividade do microambiente nos carcinomas pulmonares.

Da assinatura gênica resultante, 6 genes, *MMP2*, *SPARC*, *ILK*, *SPP1*, *COL1A2* e *ITGB1* apresentaram impacto na sobrevida dos pacientes quando hiperexpressos. Os genes *COL1A2*, *ILK*, *ITGB1* e *MMP2* exercem funções que podem estar agindo de forma integrada na progressão tumoral dos pacientes envolvidos no estudo, uma vez que atuam na sinalização e adesão celular (*ITGB1* e *ILK*), na homeostase tecidual (*COL1A2*) e na degradação de componentes da matriz extracelular e de moléculas transdutoras de sinal

(*MMP2*), contribuindo para a regulação da vascularização e da metástase das células tumorais.

De maneira similar, os genes *SPARC* e *SPP1* encontram-se relacionados na progressão tumoral sendo capazes de promover modificações no formato celular corroborando para a invasão das células malignas (*SPARC*), bem como, associando-se ao estágio patológico do tumor, sugerindo importante papel na agressividade e na metástase tumoral (*SPP1*).

Ao longo do trabalho, também foi analisada a correlação entre a expressão dos genes da EMT e a expressão dos imuno-marcadores (PD-1, PD-L1, CD8 e CD45RO) para os 24 casos de carcinomas neuroendócrinos pulmonares.

Analizando os resultados obtidos das correlações entre a EMT e a expressão dos imuno-marcadores, conclui-se que a expressão de PD-L1 está associada à EMT em uma via independente e que promove um prognóstico significativamente pior quando comparada a expressão de PD-L1 não associada à EMT.

Observou-se que a alta expressão de *MAP1-B* e de linfócitos T CD8 tiveram impacto negativo no prognóstico e na taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com CNEPs. Em contrapartida, a alta expressão de PD-1 foi associada à melhora do prognóstico com aumento da taxa de sobrevida dos pacientes.

Decerto as investigações clínicas acerca dos inibidores anti-PD-1 / PD-L1 em pacientes que apresentam alta expressão de PD-L1 associado à EMT são promissoras. No entanto, para que seja possível a aplicação da

imunoterapia em carcinomas neuroendócrinos pulmonares é necessário ampliar o conhecimento acerca desses tumores, uma vez que os estudos nesse âmbito expõem muita controvérsia acerca dos resultados e ainda há falta de consenso entre os pesquisadores.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – TABELA 1

Tabela 1 – Características demográficas dos 60 pacientes em relação ao tipo histológico do tumor e ao estadiamento, – A. C. Camargo Cancer Center, HC – FMUSP e Hospital do Câncer de Barretos.

(ID Tubo)	Idade	Sexo	Tipo Histológico	Estadiamento	Recidiva	Data da cirurgia	Status
PU 156 T-2	79	M	CEC Queratinizante	T2 N0 M0	NI	08/02/10	Vivo
PU 182 T	67	M	CEC Queratinizante	T2 N2 M0	NÃO	04/2010	Vivo
PU 183 T-A	50	M	CEC Queratinizante	T2 N2 M0	SIM	12/03/10	MPD
PU 185 T	76	M	Adenocarcinoma Acinar	T1 N0 M0	NI	13/09/2010	MPD
PU 186 T	70	M	Adenocarcinoma Lepídico (MIA)	T4 N0 M0	NI	11/11/2010	MPD
PU 187 T	69	F	Adenocarcinoma Lepídico invasivo	T1 N0 M0	NI	20/01/2011	Vivo
PU 188 T	62	M	Adenocarcinoma sólido	T1 N0 M0	NI	21/01/2011	Vivo
PU 189 T	76	M	Adenocarcinoma Lepídico "in situ "	T1 N0 M0	NÃO	31/01/2011	Vivo
PU 190 T-2	70	M	Adenocarcinoma Acinar invasivo	T1 N1 M0	NÃO	07/02/2011	Vivo
PU 191 T	66	F	Adenocarcinoma Lepídico mucinoso invasivo	T2 N0 M0	NI	10/03/2011	Vivo
PU 192 T	80	F	CEC Queratinizante	T1 N0 M0	SIM	11/07/2011	Vivo
PU 193 T	60	M	CEC Queratinizante	IV	SIM	04/08/2011	MPD
PU 194 T-2	80	M	Adenocarcinoma Lepídico invasivo	T1 N0 M0	NÃO	26/09/2011	Vivo
PU 195 T	79	M	Adenoescamoso	Tx N2	NI	01/11/2011	Vivo
PU 196 T	76	M	CEC Queratinizante	T1N0M0	SIM	12/11/2011	Vivo
PU 197 T	48	M	Carcinoma Adenoide cístico	T3N0M0	SIM	21/12/2011	MPD

PU 198 T	60	M	Adenocarcinoma Acinar	T2N0M0	SIM	30/11/2011	Vivo
PU 199 T	87	M	Adenocarcinoma Acinar	T1N1M0	NÃO	05/03/2012	MPD
PU 200 T	78	M	CEC Queratinizante	NI	NÃO	10/03/2012	MPD
PU 201 T	60	M	Adenocarcinoma Acinar	T1N0M0	NI	31/05/2012	MPD
PU 202 T-2	82	F	Adenocarcinoma sólido	T2N0M0	NI	04/06/2012	Vivo
PU 203 T	63	M	CEC Queratinizante	T1N0M0	NÃO	06/07/2012	Vivo
PU 204 T	67	F	CEC Queratinizante	T2N0M0	NI	14/07/2012	Vivo
PU 205 T	82	M	Adenocarcinoma Acinar	T1N1M0	NI	25/06/2012	Vivo
PU 206 T	62	F	Adenocarcinoma Acinar	T1N0M0	NÃO	20/08/2012	Vivo
PU 207 T	55	M	Adenocarcinoma Lepídico invasivo	T1N0M0	SIM	06/09/2012	Vivo
PU 208 T	61	M	Adenocarcinoma Acinar	T1N0M0	NÃO	10/09/2012	Vivo
PU 209 T	63	F	Adenocarcinoma sólido	T2N0M0	NÃO	01/11/2012	Vivo
PU 210 T	53	F	Adenocarcinoma sólido	T2N2M0	NÃO	03/12/2012	Vivo
PU 211 T	58	F	Adenocarcinoma Acinar	IV	NÃO	17/12/2012	MPD
PU 213 T-2	64	M	Adenocarcinoma Lepídico (MIA)	T1N0M0	NÃO	07/01/2013	Vivo
PU 214 T	75	M	Adenocarcinoma Lepídico (MIA)	T1N0Mx	NÃO	22/02/2013	Vivo
PU 216 T	58	F	Adenocarcinoma Acinar	T1N0Mx	NÃO	04/03/2013	Vivo
PU 220 T	69	M	Adenocarcinoma Mucinoso	T2N0M0	SIM	18/04/2013	Vivo
PU 223 T	71	F	Adenocarcinoma Acinar	T2N0M0	NÃO	27/05/2013	Vivo
PU 226 T	72	F	CEC Queratinizante	T2N0M0	NÃO	16/08/2013	Vivo
PU 232 T	62	M	Tumor carcinoide típico	T1N0M0	NÃO	05/01/2012	Vivo
PU 234 T	51	H	Tumor carcinoide típico	T4N0M0	SIM	23/05/2003	Vivo
PU 235 T	56	H	Tumor carcinoide típico	T1N0M0	NÃO	12/11/2012	Vivo
PU 236 T	25	M	Tumor carcinoide típico	T3N0M0	NÃO	25/05/2014	Vivo
PU 237 T	54	M	Tumor carcinoide típico	NI	NI	22/12/2014	Vivo
PU 238 T	19	M	Tumor carcinoide típico	T1bN0M0	NÃO	01/03/2011	Vivo

PU 239 T	50	H	Tumor carcinoide atípico	NI	NÃO	05/08/2013	Vivo
PU 240 T	63	H	Carcinoma neuroendócrino de grandes células	T2bN0Mx	NÃO	28/06/2014	Vivo
PU 242 T	74	H	Carcinoma neuroendócrino de grandes células	NI	NÃO	29/12/2011	Vivo
NE 01	51	M	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	T4N2M0	NI	18/09/2010	MPD
NE 02	44	M	Tumor carcinoide atípico	NI	NI	13/07/2009	MPD
NE 03	29	M	Tumor carcinoide atípico	T2N1M0	NI	24/06/2016	Vivo
NE 04	25	M	Tumor carcinoide atípico	T4N3M1	NI	08/01/2015	MPD
NE 05	64	H	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	TxNxM1	NI	03/03/2011	MPD
NE 06	55	H	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	TxNxM1	NI	26/02/2009	MPD
NE 10	57	H	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	TxNxM1	NI	01/10/2009	MPD
NE 11	65	M	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	T4N3M0	NI	18/03/2010	MPD
NE 12	56	M	Carcinoma neuroendócrino de grandes células	T2N1M0	SIM	25/05/2010	MPD
NE 13	63	M	Carcinoma neuroendócrino de grandes células	T4N2M0	NI	14/04/2010	MPD
NE 14	70	H	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	T2N2M0	NI	17/03/2010	MPD
NE 15	58	H	Carcinoma neuroendócrino de	T4N3M1	NI	25/06/2010	MPD

			pequenas células				
NE 17	39	M	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	T4N3M0	NI	22/07/2010	MPD
NE 18	70	M	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	T4N3M1	NI	27/01/2011	MPD
NE 19	63	H	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células	TxNxM1	NI	19/08/2011	MPD

NOTA: * NI – Não informado; **MPD – Morto pela doença

ANEXO 2 – TABELA 2

Tabela 2 – Resultados obtidos das porcentagens de área neoplásica e não-neoplásica encontradas nas amostras de tecidos dos pacientes pela análise das lâminas de H&E

(ID Tubo)	AVALIAÇÃO DO H&E	
	Tecido neoplásico	Tecido normal
PU 156 T-2	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 182 T	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 183 T-A	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 185 T	Adenocarcinoma Acinar em 90% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 10% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 186 T	Adenocarcinoma Lepídico minimamente invasivo em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 187 T	Adenocarcinoma Lepídico invasivo em 75% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 15% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 188 T	Adenocarcinoma sólido em 90% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 10% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 189 T	Adenocarcinoma Lepídico "in situ" em 75% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 15% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 190 T-2	Adenocarcinoma Acinar invasivo em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 191 T	Adenocarcinoma Lepídico mucinoso invasivo em 90% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 10% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra

PU 192 T	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 193 T	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 194 T-2	Adenocarcinoma Lepídico invasivo em 90% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 10% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 195 T	Adenoescamoso em 80% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 20% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 196 T	CEC Queratinizante em 75% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 15% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 197 T	Carcinoma Adenoide cístico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 198 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 199 T	Adenocarcinoma Acinar em 80% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 20% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 200 T	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 201 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 202 T-2	Adenocarcinoma sólido em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 203 T	CEC Queratinizante em 90% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 10% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 204 T	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 205 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra

PU 206 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 207 T	Adenocarcinoma Lepídico invasivo	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 208 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 209 T	Adenocarcinoma sólido em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 210 T	Adenocarcinoma sólido em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 211 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 213 T-2	Adenocarcinoma Lepídico (MIA) em 90% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 10% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 214 T	Adenocarcinoma Lepídico (MIA) em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 216 T	Adenocarcinoma Acinar em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 220 T	Adenocarcinoma Mucinoso em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 223 T	Adenocarcinoma Acinar em 75% da amostra. O parênquima pulmonar não-neoplásico em 15% da amostra foi retirado por dissecação manual	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 226 T	CEC Queratinizante em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 232 T	Tumor carcinoide típico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 234 T	Tumor carcinoide típico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 235 T	Tumor carcinoide típico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 236 T	Tumor carcinoide típico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra

	amostra	amostra
PU 237 T	Tumor carcinoide típico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 238 T	Tumor carcinoide típico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 239 T	Tumor carcinoide atípico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 240 T	Carcinoma neuroendócrino de grandes células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
PU 242 T	Carcinoma neuroendócrino de grandes células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 01	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 02	Tumor carcinoide atípico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 03	Tumor carcinoide atípico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 04	Tumor carcinoide atípico em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 05	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 06	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 10	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 11	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 12	Carcinoma neuroendócrino de grandes células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 13	Carcinoma neuroendócrino de grandes células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 14	Carcinoma neuroendócrino de pequenas	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da

	células em 100% da amostra	amostra
NE 15	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 17	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 18	Carcinoma neuroendócrino de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra
NE 19	Tumor carcinoide de pequenas células em 100% da amostra	Parênquima pulmonar não-neoplásico em 100% da amostra

ANEXO 3 – TABELA 3**Tabela 3** – Mix de eliminação de DNA genômico para a síntese de c-DNA

Componentes	Quantidade	Para uma reação
RNA	2µg	1µl
Buffer GE	2µl	2µl
Rnase-free water	Δ q.s.p. Vf 10 µl	7µl
Volume final (Vf)	10 µl	10µl

ANEXO 4 – TABELA 4

Tabela 4 – Mix para realização da Transcrição Reversa
(2ª etapa da técnica para síntese de c-DNA)

Componentes	Volume para 1 Reação
5 X Buffer BC3	4µl
RE3 Mix Transcriptase Reversa	2µl
Controle P2	1µl
Rnase-free water	3µl
Volume final (Vf)	10µl

ANEXO 5 – TABELA 5

Tabela 5 – Apresentação dos 84 genes da EMT que tiveram sua expressão analisada durante o estudo

Fatores envolvidos nas vias de sinalização celular durante a EMT	Genes envolvidos no processo da EMT
Envolvidos no desenvolvimento e diferenciação celular	<i>AKT1, BMP1, BMP2, BMP7, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, DSP, ERBB3, F11R, FOXC2, FZD7, GSC, JAG1, KRT14, MST1R, NODAL, NOTCH1, PTP4A1, SMAD2, SNAI1, SNAI2, SOX10, TGFB2, TGFB3, TMEFF1, TWIST1, VCAN, WNT11, WNT5A, WNT5B.</i>
Envolvidos na morfogênese	<i>CTNNB1, FOXC2, JAG1, RAC1, SMAD2, SNAI1, SOX10, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TWIST1, WNT11, WNT5A.</i>
Crescimento e proliferação celular	<i>AKT1, BMP1, BMP7, CAV2, CTNNB1, EGFR, ERBB3, FGFBP1, FOXC2, IGFBP4, ILK, JAG1, MST1R, NODAL, PDGFRB, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIMP1, VCAN, ZEB1.</i>
Migração e motilidade	<i>CALD1, CAV2, EGFR, FN1, ITGB1, JAG1, MSN, MST1R, NODAL, PDGFRB, RAC1, STAT3, TGFB1, VIM.</i>
Citoesqueleto	<i>CAV2, KRT7, MAP1B, PLEK2, RAC1, VIM.</i>
MEC e adesão celular	<i>BMP1, BMP7, CDH1 (E-cadherin), CDH2 (N-cadherin), COL1A2, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, DSC2, EGFR, ERBB3, F11R, FN1, FOXC2, ILK, ITGA5, ITGAV, ITGB1, MMP2, MMP3, MMP9, PTK2, RAC1, SERPINE1 (PAI-1), SPP1 (Osteopontin), TGFB1, TGFB2, TIMP1,</i>

	<i>VCAN.</i>
Receptores acoplados a proteína-G	<i>AKT1, FZD7, GNG11, RAC1, RGS2.</i>
Mediação por integrina	<i>COL3A1, ILK, ITGA5, ITGAV, ITGB1, PTK2.</i>
Via Notch	<i>FOXC2, JAG1, NOTCH1.</i>
Receptores tirosina-quinase (TKR)	<i>EGFR, ERBB3, PDGFRB, RGS2, SPARC.</i>
Via TGF-β/BMT	<i>BMP1, BMP2, BMP7, COL3A1, SMAD2, TGFB1, TGFB2, TGFB3.</i>
Via WNT	<i>CTNNB1, FZD7, GSK3B, WNT11, WNT5A, WNT5B.</i>
Fatores de transcrição	<i>CTNNB1, ESR1 (ERα), FOXC2, GSC, NOTCH1, SIP1, SMAD2, SNAI2, SNAI3, SOX10, STAT3, TCF3, TCF4, TWIST1, ZEB1, ZEB2.</i>

ANEXO 6 – TABELA 7

Tabela 7 – Genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal significativamente expressos nos tecidos tumorais dos 60 pacientes avaliados

Identificação do gene	Característica
AKT1 – serine/threonine kinase 1 (serina/treonina quinase 1)	Esse gene codifica a proteína akt, também conhecida como PKB (protein kinase B). As proteínas quinases são enzimas que catalizam a fosforilação de proteínas, no caso da treonina/serina, através de um grupo fosforila de GTP. A fosforilação desses resíduos é responsável por diversos estímulos intra e extracelulares envolvidos no controle celular e transdução de sinais. A enzima Akt/PKB por possuir funções proliferativas, encontra-se superexpressa em alguns tumores como, carcinoma de cólon e linfomas (Franks, et al., 2015)
COL1A2 – Collagen type I Alpha 2 (Colágeno tipo I alfa 2)	Esse gene codifica o colágeno tipo 1 cadeia alfa 2, encontrado no tecido conjuntivo é um componente muito abundante dos ossos, derme e tendões. Possui papel importante na homeostase tecidual e sua superexpressão já foi encontrada em alguns tumores como, câncer gástrico e câncer de mama (Zhuo et al., 2016)
COL3A1 – Collagen type III Alpha 1 (Colágeno tipo III alfa 1)	Esse gene codifica a proteína colágeno 3, fundamental na constituição da matriz extracelular, participa do mecanismo de adesão celular e encontra-se igualmente envolvido no desenvolvimento e diferenciação celular. Esse gene encontra-se superexpresso em alguns tumores, como câncer colorretal (Wang et al., 2015)
COL5A2 – Collagen type V Alpha 2 (Colágeno tipo V alfa 2)	Esse gene codifica o colágeno tipo v. Esse tipo de colágeno pertence a família dos colágenos que formam fibrilas e entre todos os tipos é encontrado em menor quantidade nos tecidos como, derme, tendões e ossos. Esse colágeno interage com o tipo I e tem característica imunogênica (Weng et al., 2016).
DSP – Desmoplakin (Desmoplaquina)	Esse gene codifica a proteína desmoplaquina que compõe, junto as placoglobinas, os desmossomos, atribuídos a junção célula-célula. A desmoplaquina está associada ao desenvolvimento e a diferenciação celular. Nos tumores, com a perda das junções celulares, pode estar envolvida na motilidade e invasão das células neoplásicas (Yang et al., 2012).
EGFR – Epidermal growth factor receptor (Receptor do fator de crescimento epidérmico)	Esse gene codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico, uma glicoproteína transmembrânica que faz parte da superfamília das proteínas quinases. Uma de suas funções é, através do seu ligante EGF, promover a proliferação celular. Mutações e superexpressões desse gene

	estão associadas a diversos tipos de tumores como, câncer de pulmão, câncer colorretal e carcinoma adenoide cístico (Liu et al., 2016).
F11R – F11 receptor	Esse gene codifica o receptor que é um importante regulador para as junções oclusivas, e que pode atuar como receptor para reovírus, como ligante para integrina LFA1 envolvido na transmigração leucocitária e como receptor de plaquetas. A superexpressão desse receptor foi encontrada em alguns tipos de tumores como, câncer de pâncreas e de mama (Zhao et al., 2014).
GSK3B – Glycogen synthase kinase 3 beta (Glicogênio sintase quinase 3 beta)	Esse gene codifica a proteína serina/treonina glicogênio sintase quinase 3 beta, relacionada ao metabolismo energético celular, encontra-se envolvida na proliferação celular via Wnt durante o processo de EMT (McCubrey et al., 2014).
ILK – Integrin linked kinase (Quinase acoplada a integrina)	Esse gene codifica uma proteína quinase ligada a integrina. Essa proteína se liga a membrana celular através do seu domínio citoplasmático de beta – integrinas, onde é regulada a transdução de sinal mediada por integrinas. Sua atividade é importante na EMT e a superexpressão desse gene está relacionada ao crescimento tumoral e a metástase (Shen et al., 2016).
ITGA5 – Integrin subunit alpha 5 (Integrina subunidade alfa 5)	Esse gene codifica a integrina subunidade alfa 5. As integrinas são proteínas (transmembrânicas) da superfície celular e têm função de adesão e sinalização celular. Essa integrina se associa a subunidade beta 1 formando o receptor de fibronectina. Essa integrina subunidade alfa 5 pode promover invasão tumoral (Zheng et al., 2016).
ITGAV – Integrin subunit alpha V (Integrina subunidade alfa V)	Esse gene codifica a integrina subunidade alfa V. As integrinas são proteínas (transmembrânicas) da superfície celular e têm função de adesão e sinalização celular. Essa integrina se associa a subunidade beta 3 formando o receptor de vitronectina. Essa integrina pode estar envolvida na angiogênese e na progressão do câncer (Linhares et al., 2015).
ITGB1 – Integrin subunit beta 1 (Integrina subunidade beta 1)	Esse gene codifica a integrina subunidade beta. As integrinas são proteínas (transmembrânicas) da superfície celular e têm função de adesão e sinalização celular. A integrina subunidade beta 1 pode estar envolvida na difusão metastática das células tumorais (Zheng et al., 2016).
JAG1 – Jagged 1	Esse gene codifica a proteína jagged-1 que é ligante do receptor notch 1. Ativada, a via notch pode induzir a EMT e promover a motilidade e migração celular (Sugiyama et al., 2016).
MAP1B – Microtubule associated protein 1B (Proteína associada a microtubulo 1B)	Esse gene codifica a proteína que pertence a família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Encontra-se envolvida na estruturação dos microtúbulos e é uma das proteínas mais importantes do citoesqueleto no desenvolvimento

	do sistema nervoso (Lee et al., 2008).
MMP2 – Matrix metalloproteinase 2 (Metaloproteinase de matriz 2)	Esse gene codifica a proteína gelatinase-A, collagenase tipo IV, uma metaloproteinase de matriz capaz de degradar os componentes da matriz extracelular e moléculas envolvidas na transdução de sinal. Pode estar envolvida em muitas vias como, regulação da vascularização e metástase (Zhang et al., 2015).
MMP3 – Matrix metalloproteinase 3 (Metaloproteinases de matriz 3)	Esse gene codifica a proteína estromelina-1, uma metaloproteinase que é capaz de degradar fibronectina, laminina, colágenos tipo III, IV, IX, e X, e proteoglicanos de cartilagem. Pode estar envolvida nos processos de reparo tecidual bem como na iniciação tumoral (Zhang et al., 2015).
SNAI2 – Snail family transcriptional repressor 2 (Repressor transcricional 2 da família Snail)	Esse gene codifica o fator de transcrição snail2, que age como repressor da transcrição de E-caderina em câncer de mama, está envolvido no processo da EMT e possui atividade anti-apoptótica (Katafiasz et al., 2011).
SPARC – Secreted protein acidic and cysteine rich (Proteína secretada ácida rica em cisteína)	Esse gene codifica a proteína secretada ácida rica em cisteína associada a matriz. Está relacionada a calcificação óssea, síntese de matriz extracelular, promove modificações no formato celular podendo estar envolvida com a invasão tumoral e metástases (Chen et al., 2012).
SPP1 – Secreted phosphoprotein 1 SPP1 – Secreted phosphoprotein 1 (Fosfoproteína-1 secretada)	Esse gene codifica a fosfoproteína-1 secretada, também conhecida como osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz extracelular óssea. Nos ossos é produzida pelos osteoclastos e osteoblastos, envolvida na mineralização da matriz óssea. OPN plasmática tem demonstrado indicação positiva para câncer de cólon e pulmão assim como em metástase. A presença notável de OPN em vários tumores está fortemente relacionada ao estágio patológico, sugerindo papel importante na agressividade, progressão e metástase do tumor (Zhuo et al., 2016).
STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3 (Sinal transdutor e ativador de transcrição 3)	Esse gene codifica a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3. Essa proteína é um fator de transcrição ativado por fosforilação de tirosina-quinases em resposta ao estímulo de citocinas e fatores de crescimento. Uma vez ativada ocorre a sua translocação para o núcleo onde possui atividade de fator de transcrição podendo estar relacionada com proliferação e sobrevivência celular (Wu et al., 2015).
TCF3 – Transcription factor 3 (Fator de transcrição 3)	Esse gene atua como fator de transcrição e codifica para 2 fatores de transcrição (E12 e E47) mediando a via de sinalização Wnt. Atuam na regulação da proliferação celular e podem estar envolvidos na repressão de marcadores epiteliais como, a E-caderina (Meera et al., 2015).
TGFB3 – Transforming growth factor beta 3	Esse gene codifica o fator de crescimento

(Fator de crescimento transformante beta 3)	transformante beta 3 que está associado a diferenciação e proliferação celular. A via TGF- β também encontra-se envolvida na ativação da EMT (Gao et al., 2014).
VPS13A – Vacuolar protein sorting 13 homolog A (Proteína vacuolar triagem 13 homólogo A)	Esse gene codifica a proteína coreína que está associada ao controle da ciclagem das proteínas através da rede trans-Golgi do Complexo de Golgi para os endossomos, lisossomos e membrana plasmática. Esse gene apresenta-se altamente expresso em alguns tumores como, câncer gástrico e rabinomiossarcoma (Morisaki et al., 2014).
WNT5A – Wnt family member 5A (Membro 5A da família Wnt)	Esse gene codifica a proteína Wnt-5a. Essa proteína é um ligante para sete receptores transmembrânicos frizzled-5 e para o receptor tirosina-quinase órfão 2 (ROR2). Pode estar relacionada a oncogênese e possui papel essencial na regulação das vias de desenvolvimento durante a embriogênese. A via Wnt também encontra-se envolvida na EMT (Yao et al., 2014).

ANEXO 7 – TABELA 8

Tabela 8 – Análise da expressão gênica do tecido tumoral e a correlação com as variáveis mensuradas pela média, erro padrão e valor de significância *p*

Variáveis Clínico-patológicas													
Genes	Idade		Sexo		Tabagismo		Estádio do Tumor Precoce(I e II) Avançado (III e IV)		Metástase Linfonodal		Tipo Histológico		
	≤63	>63	Masculino	Feminino	Sim	Não	Precoce	Avançado	Sim	Não	CEC	AD	Neuro
AKT1	5.4±2.5	7.5±3.3	3.9±2.0	10.5±4.6	9.5±3.5	2.3±1.0	5.0±3.6	10.8±3.5	8.4±2.4	5.3±3.6	2.2±2.0	6.5±4.9	8.5±2.8
COL1A2	28.4±21	7.9±2.0	4.3±1.5	26.3±14.0	18.1±9.7	8.0±6.0	3.3±1.6	35.0±18.7*	35.2±21.2*	3.3 ±1.5*	2.2±1.3	3.8±2.2	26.6±14.3
COL3A1	32.3±20	7.2±1.2	6.3±1.4	24.9±13.0	16.9±8.0	13.4±12	6.4±1.4	31.6±18.0	33.4±20.4	6.2±1.4	15.8±4.5	4.9±0.8	23.4±13.8
COL5A2	28.8±21	4.4±0.9	4.0±1.0	21.2±14.0	15.0±9.0	7.7±6.0	1.7±0.3	31.1±18.5*	31.9±20.9*	1.8±0.4*	3.7±1.3	1.2±0.2	23.8±14.0
DSP	23.6±15.0	20.5±7.7	11.9±5.0	32.9±14.0	29.0±10	9.4±3.0	10.3±8.3	42.3±14.2*	36.3±15.0	10.9±8.3	36.9±35.7	2.2±0.9	34.5±11.0
EGFR	2.8±1.2	3.7±0.9	2.0±0.7	5.0 ± 1.3*	4.6 ± 1.0*	1.3±0.5	1.7±0.9	6.6 ±1.3*	6.6±1.3*	1.9±0.9*	3.8±3.4	1.6±0.7	4.9±1.0
FR11	4.0±1.7	6.4±1.9	5.0±2.0	6.6±1.0	7.2±1.9	3.5±2.0	2.3±1.0	10.7±3.2*	8.4±2.1*	3.0±1.3*	4.7±3.7	2.0±0.7	9.0±2.6
GSK3B	8.0±4.3	6.4±2.2	5.0±2.4	9.2±3.4	8.0±2.8	6.4±2.9	2.2±0.8	13.1±5.0*	10.0±4.2	3.2±1.3	3.6±2.3	0.9±0.2	12.9±3.9*
ILK	5.8±2.7	3.1±0.8	2.2±0.7	6.1 ± 2.0*	4.5±1.3	3.7±1.3	1.4±0.2	7.2 ±2.5*	6.9±2.6*	2.1±0.7*	1.0±0.3	1.5±0.3	6.9±2.0*
ITGA5	7.2±6.1	2.3±0.5	1.5±0.5	7.0±4.6	5.1±2.9	1.2±0.6	0.6±0.2	9.2 ±5.4*	9.3±6.0	0.7±0.2	0.6±0.4	0.7±0.3	7.7±4.4
ITGAV	4.5±1.9	3.6±0.6	2.9±0.6	5.0±1.3	4.8 ± 1.0*	2.3±0.7	2.5±0.6	6.2 ±1.7*	5.9 ±1.8*	2.5±0.6*	4.3±1.7	2.3±0.8	5.1±1.2
ITGB1	4.5±1.9	2.5±0.5	2.0±0.5	4.5±1.0	3.6±0.9	3.1±1.3	1.2±0.2	5.7 ±1.7*	5.4 ±1.8*	1.6±0.4	1.2±0.4	1.0±0.1	*5.7±1.4
JAG	15.5±7.9	7.0±3.2	2.3±0.6	18.4±6.8*	5.1±1.2	27.1±13*	5.9±4.0	7.5±1.7	15.2±7.0	6.1±3.9	4.8±4.0	0.8±0.3	19.0±6.7

<u>MAPIB</u>	41.0±24.0	23.6±8.0	14.6±7.3	46.7±18.4	36.4±13	18.8±9.0	9.8±4.9	62.7±24.0*	60.6±25.8*	8.3±3.9	14.5±14.0	3.9±2.0	54.3±18.0
<u>MMPI2</u>	3.8±2.0	2.8±1.0	1.3±0.2	5.4±2.2*	3.8±1.4	1.8±1.3	2.5±1.4	4.6±1.7	4.7±1.9	2.6±1.4	1.5±0.4	3.3±1.9	3.4±1.3
<u>MMPI3</u>	18.1±14.0	51.0±25.0	24.2±8.9	62.4±39.9	54.7±25	9.7±5.0	44.2±33	39.7±12.0	40.1±13.7	48.2±35.0	33.1±13.1	59.0±45.0	28.0±6.8
<u>SNAI2</u>	3.7±2.2	2.6±0.6	1.6±0.3	4.8±1.8*	3.6±1.1	1.9±1.0	1.5±0.7	5.1±1.8*	5.2±2.1	1.9±0.7	3.7±2.2	0.8±0.4	4.6±1.5
<u>SPARC</u>	9.8±7.0	2.3±0.5	1.7±0.5	8.1±4.9	6.1±3.3	2.3±1.2	1.3±0.5	10.8±6.4	10.9±7.2	1.5±0.5	1.0±0.2	1.5±0.7	8.5±4.8
<u>SPII</u>	64.5±36.1	30.7±9.0	57.2±21.8	21.2±7.6	58.6±18.3	6.8±3.4	51.8±20.1	26.6±14.3	13.6±5.3	50.9±20.2	120.8±66.8	36.6±16.0	21.5±11.7
<u>STAT3</u>	2.4±0.8	2.5±0.7	1.5±0.4	3.7±1.1	2.9±0.8	2.3±1.0	1.6±0.8	3.5±0.8	3.4±0.7	1.8±0.8	0.7±0.3	2.0±1.1	3.4±0.7
<u>TCF3</u>	3.9±1.9	12.7±7.3	5.3±2.2	15.7±11.1	14.0±7.8	1.1±0.5	11.2±8.9	10.9±3.5	6.0±1.9	10.8±8.9	0.9±0.4	15.2±12.0	8.0±2.8
<u>TGFB3</u>	3.8±2.0	10.1±6.8	2.6±1.1	14.7±10.2	11.2±7.0	2.2±0.9	9.7±8.4	7.1±2.2	5.6±1.9	10.4±8.4	0.7±0.2	12.6±11.1	6.1±1.8
<u>VPS13A</u>	15.3±8.0	7.5±2.3	6.6±2.4	13.8±5.6	12.4±4.2	6.8±2.8	4.3±2.1	19.2±7.3*	18.1±7.7*	4.2±1.9	1.1±0.4	5.2±2.9	16.7±5.5
<u>WNT5A</u>	7.6±3.7	10.5±5.1	5.5±2.2	14.9±7.9	13.5±5.2*	1.3±0.4	9.1±6.4	12.0±3.5	12.6±3.9	9.6±6.6	9.5±6.0	11.5±9.2	8.1±2.5

NOTA: Significância estatística de p (p≤0.05)

(*) - A presença deste sinal indica que houve significância estatística apresentada pelo dado e demonstrada pelo valor de “p” descrito no texto acima.

ANEXO 8 – TABELA 13

Tabela 13 – Resultado dos RNAs extraídos do tecido tumoral dos pacientes em estudo portadores de carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC)

RNA (ID Tubo)	R 260/280	R 260/230	Tipo Histológico	Conc. (ug/ul)	Vol. (ul)	Quantidade (ug)	Integridade
PU 156 T-2	1,98	1,55	CEC	0,313	6,4	2,0	Ótimo (2:1)
PU 182 T	2,03	1,80	CEC	0,358	5,6	2,0	Ótimo (2:1)
PU 183 T-A	2,03	1,74	Adenocarcinoma	0,284	7,0	2,0	Bom (1:1)
PU 185 T	1,99	1,85	Adenocarcinoma	0,296	6,8	2,0	Ótimo (2:1)
PU 186 T	2,01	1,65	Adenocarcinoma	0,274	7,3	2,0	Bom (1:1)
PU 187 T	1,94	1,09	Adenocarcinoma	0,114	17,6	2,0	Ótimo (2:1)
PU 188 T	1,97	1,62	Adenocarcinoma	0,152	13,2	2,0	Ótimo (2:1)
PU 189 T	2,00	1,27	Adenocarcinoma	0,257	7,8	2,0	Ótimo (2:1)
PU 190 T-2	2,06	1,73	Adenocarcinoma	0,212	9,4	2,0	Regular (1:2)
PU 191 T	2,05	1,65	Adenocarcinoma	0,305	6,6	2,0	Ótimo (2:1)
PU 192 T	2,02	1,91	CEC	0,379	5,3	2,0	Ótimo (2:1)
PU 193 T	2,03	1,55	Adenocarcinoma	0,137	14,6	2,0	Ótimo (2:1)
PU 194 T-2	2,03	1,63	Adenocarcinoma	0,138	14,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 195 T	2,08	1,76	Adenocarcinoma	0,566	3,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 196 T	2,02	1,70	CEC	0,161	12,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 197 T	2,00	1,84	Adenoide cístico	0,365	5,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 198 T	2,00	1,75	Adenocarcinoma	0,279	7,2	2,0	Ótimo (2:1)
PU 199 T	2,00	1,36	Adenoescamoso	0,160	12,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 200 T	2,06	1,71	CEC	0,181	11,0	2,0	Ótimo (2:1)

PU 201 T	2,05	1,61	Adenocarcinoma	0,2006	9,7	2,0	Ótimo (2:1)
PU 202 T-2	1,98	1,70	Adenocarcinoma	0,444	4,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 203 T	2,06	1,86	CEC	0,267	7,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 204 T	2,06	1,68	CEC	0,177	11,3	2,0	Ótimo (2:1)
PU 205 T	2,04	1,74	Adenocarcinoma	0,226	8,9	2,0	Ótimo (2:1)
PU 206 T	2,01	1,70	Adenocarcinoma	0,221	9,1	2,0	Ótimo (2:1)
PU 207 T	2,00	1,86	Adenocarcinoma	0,301	6,7	2,0	Ótimo (2:1)
PU 208 T	1,99	1,64	Adenocarcinoma	0,390	5,1	2,0	Ótimo (2:1)
PU 209 T	2,02	1,61	Adenocarcinoma	0,181	11,1	2,0	Bom (1:1)
PU 210 T	2,06	1,75	Adenocarcinoma	0,195	10,3	2,0	Ótimo (2:1)
PU 211 T	2,07	1,73	Adenocarcinoma	0,203	9,9	2,0	Ótimo (2:1)
PU 213 T-2	2,04	1,69	Adenocarcinoma	0,226	8,9	2,0	Ótimo (2:1)
PU 214 T	2,00	1,73	Adenocarcinoma	0,361	5,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 216 T	2,00	1,49	Adenocarcinoma	0,236	8,5	2,0	Ótimo (2:1)
PU 220 T	2,07	1,81	Adenocarcinoma	0,170	11,8	2,0	Ótimo (2:1)
PU 223 T	2,03	1,89	Adenocarcinoma	0,380	5,3	2,0	Ótimo (2:1)
PU 226 T	2,04	1,81	CEC	0,344	5,8	2,0	Ótimo (2:1)

ANEXO 9 – TABELA 14

Tabela 14 – Resultados dos c-DNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos do tecido tumoral dos pacientes portadores de CPNPC

c-DNA (ID Tubo)	R 260/280	R 260/230	Tipo Histológico	Conc. (ng/μl)	Integridade
PU 156 T-2	1,72	1,93	CEC	212,9	Ótimo (2:1)
PU 182 T	1,73	1,94	CEC	198,7	Ótimo (2:1)
PU 183 T-A	1,74	2,10	Adenocarcinoma	203,5	Ótimo (2:1)
PU 185 T	1,73	1,93	Adenocarcinoma	186,9	Ótimo (2:1)
PU 186 T	1,75	2,00	Adenocarcinoma	209,6	Ótimo (2:1)
PU 187 T	1,73	2,04	Adenocarcinoma	193,1	Ótimo (2:1)
PU 188 T	1,73	2,09	Adenocarcinoma	195,3	Ótimo (2:1)
PU 189 T	1,73	1,98	Adenocarcinoma	281,6	Ótimo (2:1)
PU 190 T-2	1,73	2,02	Adenocarcinoma	273,3	Ótimo (2:1)
PU 191 T	1,73	1,99	Adenocarcinoma	279,6	Ótimo (2:1)
PU 192 T	1,73	2,02	CEC	322,2	Ótimo (2:1)
PU 193 T	1,72	1,97	Adenocarcinoma	195,1	Ótimo (2:1)
PU 194 T-2	1,72	1,99	Adenocarcinoma	196,3	Ótimo (2:1)
PU 195 T	1,73	1,99	Adenocarcinoma	207,0	Ótimo (2:1)
PU 196 T	1,72	2,01	CEC	195,6	Ótimo (2:1)
PU 197 T	1,72	1,93	Adenoide cístico	158,8	Ótimo (2:1)
PU 198 T	1,71	1,97	Adenocarcinoma	204,1	Ótimo (2:1)
PU 199 T	1,70	1,90	Adenoescamoso	195,5	Ótimo (2:1)
PU 200 T	1,70	1,88	CEC	94,0	Ótimo (2:1)
PU 201 T	1,71	1,97	Adenocarcinoma	202,0	Ótimo (2:1)
PU 202 T-2	1,70	1,83	Adenocarcinoma	158,1	Ótimo (2:1)

PU 203 T	1,71	1,92	CEC	220,9	Ótimo (2:1)
PU 204 T	1,71	1,95	CEC	163,9	Ótimo (2:1)
PU 205 T	1,79	2,19	Adenocarcinoma	121,3	Ótimo (2:1)
PU 206 T	1,75	1,97	Adenocarcinoma	214,0	Ótimo (2:1)
PU 207 T	1,76	2,07	Adenocarcinoma	252,0	Ótimo (2:1)
PU 208 T	1,75	2,03	Adenocarcinoma	246,0	Ótimo (2:1)
PU 209 T	1,75	2,06	Adenocarcinoma	252,7	Ótimo (2:1)
PU 210 T	1,75	2,07	Adenocarcinoma	251,1	Ótimo (2:1)
PU 211 T	1,74	1,94	Adenocarcinoma	208,1	Ótimo (2:1)
PU 213 T-2	1,75	2,04	Adenocarcinoma	242,2	Ótimo (2:1)
PU 214 T	1,75	1,89	Adenocarcinoma	131,6	Ótimo (2:1)
PU 216 T	1,75	1,62	Adenocarcinoma	90,9	Bom (1:1)
PU 220 T	1,73	2,02	Adenocarcinoma	225,1	Ótimo (2:1)
PU 223 T	1,73	2,07	Adenocarcinoma	83,4	Ótimo (2:1)
PU 226 T	1,73	2,07	CEC	279,2	Ótimo (2:1)

ANEXO 10 – TABELA 15

Tabela 15 – Resultado dos RNAs extraídos do tecido tumoral dos pacientes em estudo portadores de carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC)

RNA (ID Tubo)	R 260/280	R 260/230	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	Quantidade (ug)	Integridade
NE01	2,02	2,02	905,3	22	2,0	Ótimo (2:2)
NE02	2,06	1,86	432,7	4,6	2,0	Ótimo (2:1)
NE03	2,00	1,94	594,4	3,3	2,0	Ótimo (2:1)
NE04	2,07	1,05	83,8	24	2,0	Ótimo (2:1)
NE05	2,07	1,79	358,5	5,5	2,0	Ótimo (2:1)
NE06	1,99	1,45	156,9	13	2,0	Ótimo (2:1)
NE10	2,07	1,35	121,1	16	2,0	Ótimo (2:1)
NE11	2,03	1,48	140,5	14,2	2,0	Bom (1:1)
NE12	2,04	1,40	109,7	18	2,0	Ótimo (2:1)
NE13	2,01	0,44	18,5	50	1,0	Ótimo (2:1)
NE14	2,07	1,03	68,2	30	2,0	Ótimo (2:1)
NE15	2,05	1,59	187,7	10,6	2,0	Ótimo (2:1)
NE17	2,06	1,26	112,0	17,8	2,0	Ótimo (2:1)
NE18	2,09	1,41	133,7	14,9	2,0	Ótimo (2:1)
NE19	2,15	0,97	56,4	35	2,0	Ótimo (2:1)
PU 232T	2,10	1,5	128,0	23,5	3,0	Ótimo (2:1)
PU 234T	2,10	1,1	85,0	35,1	3,0	Bom (1:1)
PU 235T	2,1	1,4	131,0	22,9	3,0	Ótimo (2:1)
PU 236T	2,1	1,2	95,0	32,0	3,0	Ótimo (2:1)
PU 237T	2,1	1,7	597,0	5,0	3,0	Ótimo (2:1)

PU 238T	2,1	1,5	71,0	38,0	2,7	Ótimo (2:1)
PU 239T	2,1	1,6	120,0	25	3,0	Ótimo (2:1)
PU 240T	2,0	1,4	161,0	18,6	3,0	Ótimo (2:1)
PU 242T	2,1	1,7	147,0	20,4	3,0	Ótimo (2:1)

ANEXO 11 – TABELA 16

Tabela 16 – Resultados dos c-DNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos dos pacientes portadores de CPPC

cDNA (ID Tubo)	R 260/280	R 260/230	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	Quantidade (ug)	Integridade
NE 01	1,78	1,99	281,7	110	1,9	Ótimo (2:2)
NE02	1,75	2,07	329,5	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE03	1,75	2,00	258	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE04	1,73	2,05	177,8	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE05	1,74	1,82	232,9	110	2,0	Bom (1:1)
NE06	1,74	2,0	210,1	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE10	1,75	2,11	288,2	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE11	1,69	1,73	196,4	110	2,0	Bom (1:1)
NE12	1,73	1,94	207,8	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE13	1,71	1,76	159,7	110	2,0	Bom (1:1)
NE14	1,74	2,03	205,3	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE15	1,74	2,04	205,2	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE17	1,74	1,92	237,5	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE18	1,74	2,05	289,0	110	2,0	Ótimo (2:1)
NE19	1,72	1,96	214,5	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 232T	1,75	1,95	201,5	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 234T	1,74	1,95	204,6	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 235T	1,75	2,06	269,9	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 236T	1,74	1,91	226,4	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 237T	1,75	1,96	280,9	110	2,0	Ótimo (2:1)

PU 238T	1,74	2,07	248,8	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 239T	1,75	2,05	220,0	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 240T	1,75	2,03	232,1	110	2,0	Ótimo (2:1)
PU 242T	1,76	1,98	170,8	110	2,0	Ótimo (2:1)

9. REFERÊNCIAS

Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, Fitwi H, Tulbah A, Al-Tweigeri T, *et al.* Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Molecular Cancer* 2015; 14: 149

Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, Kozlowski M, Le Péchoux C, Pirker R, Pinel MI, Tarayre M, Le Chevalier T. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28 (1): 35–42

Asmis TR, Ding K, Seymour L, Shepherd FA, Leighl NB, Winton TL, Whitehead M, Spaans JN, Graham BC, Goss GD; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Age and comorbidity as independent prognostic factors in the treatment of non small-cell lung cancer: a review of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trials. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26 (1): 54-59

Azuma K, Ota K, Kawahara A, *et al.* Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2014; 25(10): 1935–1940

Bourboulia D, Stevenson WGS. Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010; 20 (30): 161-168

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal Medicine* 2012; 366(26): 2455–2465

Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ, TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *Journal of National Cancer Institute* 2006; 98(17):1183-1192

Cao L, Fan X, Jing W, Liang Y, Chen R, Liu Y, Zhu M, Jia R, Wang H, Zhang X, Zhang Y, Zhou X, Zhao J, *et al.* Osteopontin promotes a cancer stem cell-like phenotype in hepatocellular carcinoma cells via an integrin-NF- κ B/HIF-1 α pathway. *Oncotarget* 2015; 6:6627–6640

Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, Ritprajak P, Hashiguchi M, Hirose S, *et al.* B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Research* 2011; 71: 1235-1243

Cao Y, Zhang L, Ritprajak P, Tsushima F, Youngnak-Piboonratanakit P, Kamimura Y, *et al.* Immunoregulatory molecule B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis. *Cancer Research* 2011; 71: 4737-4741

Chammas R, Brentani RR. Cell-matrix Interactions. *Encyclopedia of Cancer*. 2 ed. Elsevier Science (USA). p. 405-413, 2002

Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001; 11 (11): S37-S40

Chen J, Wang M, Xi B, Xue J, He D, Zhang J, Zhao Y. SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer. *Plos One* 2012; 7(8)

Chen L, Deng H, Lu M, Xu B, Wang Q, Jiang J, *et al.* B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human

esophageal cancer. *International Journal Clinical Experimental Pathology* 2014; 7(9): 6015-6023

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Research* 2006; 66 (17): 8319-8326

Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death & Disease* 2014; 5(11):e1543

Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. *Seminars in Oncology* 2014; 41(Suppl 5): S3-S13

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 2002; 8(8): 793–800

Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 2018; 9:14

Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, D'Amico TA, *et al.* Non-small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2012; 10: 1236-1271

Fan Y, Ma K, Wang C, Ning J, Hu Y, Dong D, Dong X, Geng Q, Li E, Wu Y. Prognostic value of PD-L1 and PD-1 expression in pulmonary neuroendocrine tumors. *Ocotarget and Therapy* 2016; 9: 6075-6082

Felip E, Stahel RA, Pavlidis N. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of nonsmall-cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology* 2005; 16 (suppl. 1): i28–i29

Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 1 ed. Atheneu, p. 145-151, 2004

Franks SE, Ritesh B, Jones RA, Moorehead RA. Unique roles of Akt1 and Akt2 in IGF-IR mediated lung tumorigenesis. *Oncotarget* 2015; 7 (3): 3297-3316

Gadoth A, Kryzer TJ, Fryer J, McKeon A, Lennon VA, Pittock SJ. Microtubule-associated protein 1B: Novel paraneoplastic biomarker. *Annals Neurology* 2017; 81(2): 266-277

Garg M. Epithelial plasticity and cancer stem cells: Major mechanisms of cancer pathogenesis and therapy resistance. *World Journal of Stem Cells* 2017; 9(8): 118-126

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2015; 372: 2018–2028

Gao J, Zu Y, Nilsson M, Sundfeldt K. TGF- β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell International* 2014; 14(72)

Giuliano M, Giordano A, Jackson S, Hess KR, De Giorgi U, Mego M, Handy BC, Ueno NT, Alvarez RH, De Laurentiis M, De Placido S, Valero V, Hortobagyi GN, Reuben JM, Cristofanilli M. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Research* 2011;13:R67

Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S. EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine* 2015; 4:6

Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine tumors of the lung: Current challenges and advances in the diagnosis and management of well-differentiated disease. *Journal of Thoracic Oncology* 2016; 12(3): 425-436

Herbst RS, Baas P, Perez-Gracia JL, Felip E, Kim DW, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, Majem M, Fidler MJ, Surmont V, De Castro G Jr, Garrido M, Shentu Y, Dolled-Filhart M, Im E, Garon EB. P2.41 (also presented as PD-1.06): pembrolizumab vs docetaxel for previously treated NSCLC (KEYNOTE-010): archival vs new tumor samples for PD-L1 assessment: track: immunotherapy. *Journal of Thoracic Oncology* 2016; 11(Suppl10): S242-S243

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): 563–567

Horn L, Reck M, Spigel D R. The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* 2016; 21(8): 910–921

Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Felisiak-Golabek A, Ikeda H, Miettinen M. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas. *Modern Pathology* 2017; 30(2): 278-285

Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in Oncology* 2017; 7: 193

International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [acesso em 14 jan 2017]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>

Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that

is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clinical Cancer Research* 2013; 19(3): 598–609

Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 2013; 23(5): 573–581

Katafiasz D, Smith LM, Wahl KJ. Slug (SNAI2) expression in oral SCC cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility. *Cell Adhesion & Migration* 2011; 5 (4): 315-322

Kasajima A, Ishikawa Y, Iwata A, Steiger K, Oka N, Ishida H, Sakurada A, Suzuki H, Kameya T, Konukiewitz B, Klöppel G, Okada Y, Sasano H, Weichert W. Inflammation and PD-L1 expression in pulmonary neuroendocrine tumors. *Endocrine-Related Cancer* 2018; 25(3): 339-350

Kim S, Koh J, Kim MY, Kwon D, Go H, Kim YA, *et al.* PD-L1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung. *Human Pathology* 2016; 58: 7-14

Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba I I, Hirsch FR. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *Journal of Thoracic Oncology* 2015; 10: 985–989

Kothari AN, Arffa ML, Chang V, Blackwell RH, Syn WK, Zhang J, Mi Z, Kuo PC. Osteopontin-A master regulator of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Medicine* 2016; 5(4): 39

Lamour V, Henry A, Kroonen J, Nokin MJ, von Marschall Z, Fisher LW, Chau TL, Chariot A, Sanson M, Delattre JY, Turtoi A, Peulen O, Rogister B, *et al.* Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *International Journal of Cancer*. 2015; 137:1047–1057

Lee SY, Kim JW, Jeong MH, An JH, Jang SM, Song KH, Choi KH. Microtubule-associated protein 1B light chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. *FEBS Letters* 2008; 582 (19): 2826–2832

Li H, Batth IS, Qu X, Xu L, Song N, Wang R, Liu Y. IGF-IR signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-IR therapy: overview and new insights. *Molecular Cancer* 2017; 16:6

Linhares MM, Affonso RJ, Viana LS, Silva, SRM, Dendai MVA, Toledo SRC, Matos D. Genetic and immunohistochemical expression of integrins ITGAV, ITGA6, and ITGA3 as prognostic factor for colorectal cancer: Models for global and disease-free survival. *Plos One* 2015; 16(12)

Liu J, Chen L, Deng H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in human esophageal cancer associates with tumor progression and patient's survival. *International Journal Clinical Experimental Pathology* 2014; 7(10): 6943-6949

Liu S, YeD, Xu D, Liao Y, Zhang L, Liu L, Yu W, Wang Y, HeY, Hu Y, Guo W, Wang T, Sun B, Song H, Yin H, Liu J, Wu Y, Zhu H, Zhou BP, Deng J, Zhang Z. Autocrine epiregulin activates EGFR pathway for lung metastasis via EMT in salivary adenoid cystic carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7 (18): 25251-25263

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Elsevier* 2001; 25 (4): 402-408

Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Letters* 2009; 273: 194–200

Ma W, Gilligan BM, Yuan J, Li T. Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2016; 9: 47

Mak MP, Tong P, Diao L, Cardnell RJ, Gibbons DL, William WN, *et al.* A patient-derived, pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial to mesenchymal transition. *Clinical Cancer Research* 2016; 22(3): 609-620

McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Skolosky M, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Rakus D, Gizak A, Demidenko Z, Cocco L, Martelli AM, Cervello M. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* 2014; 5 (10): 2881-2911

Meera S, Rennoll SA, Raup-Konsavage WM, Yochum GS. A dynamic exchange of TCF3 and TCF4 transcription factors controls Myc expression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 2015; 14 (3): 323-332

Mego M, Mani SA, Lee BN, Li C, Evans KW, Cohen EN, Gao H, Jackson SA, Giordano A, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Lucci A, Reuben JM. Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy. *International Journal of Cancer* 2012; 130: 808–816.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2010; 15 (2): 117-134

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA)[online]. Estimativa 2018-2019: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2018 [acesso em 20 jul 2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>

Ming L, Chenzhi Z, Zheng J. Cigarette smoking impairs the response of EGFR-TKIs therapy in lung adenocarcinoma patients by promoting EGFR signaling

and epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Translational Research* 2015; 7(10): 2026–2035

Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget* 2015; 6(13): 10697-10711

Morisaki T, Yashiro M, Kakehashi A, Inagaki A, Kinoshita H, Fukuoka T, Kasashima H, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Muguruma K, Ohira M, Wanibuchi H, Hirakawa K. Comparative proteomics analysis of gastric cancer stem cells. *Plos One* 2014; 9(11)

Movva S, Wen W, Chen W, et al. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget* 2015; 6(14): 12234–12247

Ock CY, Kim S, Keam B, Kim M, Kim TM, Kim JH, *et al.* PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(13): 15901-15914

Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(8): 2947-2953

Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, Zhao X, Andersen JB, Ye QH, Jia HL, Qin LX, Yamashita T, Woo HG, Kim YJ, Kaneko S, Tang ZY, *et al.* Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012; 56(5): 1792–1803

Ota K, Azuma K, Kawahara A, et al. Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 2015; 21(17): 4014–4021

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3 β participates in nuclear factor κ B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Research* 2005; 65: 2076-2081

Paik S. Development and clinical utility of a 21-gene recurrence score prognostic assay in patients with early breast cancer treated with tamoxifen. *Oncologist* 2007; 12 (6): 631–635

Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Dieras V, Rolland E, Mignot L, Mathiot C, Bidard FC. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2012; 23: 618–624

Qiao M, Jiang T, Zhou C. Shining light on advanced NSCLC in 2017: combining immune checkpoint inhibitors. *Journal of Thoracic Disease* 2018; 10 (Suppl 13): S1534-S1546

Ramaswamy, S. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics* 2003; 33: 49-54

Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, *et al.* Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1 positive non-small cell lung cancer. *New England Journal Medicine* 2016; 375(19): 1823–1833

Rekhtman, N. Neuroendocrine Tumors of the Lung: An Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2010; 134 (11): 1628-1638

Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, Naidoo J, Arora A, Won H, *et al.* Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma-like and Non-Small Cell Carcinoma-like Subsets. *Clinical Cancer Research* 2016; 22(14): 3618–3629

Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348(6230): 124–128

Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, Horn L, Lena H, Minenza E, *et al.* Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncology* 2015; 16(3): 257–265

Robbins SL, Cotran RS. *Patologia funcional e estrutural*. 6 ed. Guanabara Koogan. p.271 e pp. 666-673, 2000

Saad ED, Maluf FC, Hoff PM – *Oncologia em Evidência*. 3 ed. Dendrix, pp. 43-45, 2009

Sá VK, Carvalho L, Gomes A, Alarcão A, Silva MR, Couceiro P, Sousa V, Soares FA, Capelozzi VL. Role of the extracellular matrix in variations of invasive pathways in lung cancers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2013; 46: 21-31

Sá VK, Olivieri E, Parra E, Ab'saber AM, Takagaki T, Soares FA, Carraro D, Carvalho L, Capelozzi VL. Hyaluronidase splice variants are associated with histology and outcome in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Human Pathology* 2012; 43 (5): 675-683

Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. *Respirology* 2012; 17: 1048-1059

Scagliotti GV, Fossati R, Torri V, Crinó L, Giaccone G, Silvano G, Martelli M, Clerici M, Gognetti F, Tonato M, Adjuvant Lung Project Italy/European Organisation for Research Treatment of Cancer-Lung Cancer Cooperative Group Investigators. Randomized study of adjuvant chemotherapy for completely resected stage I, II, or IIIA non-small-cell lung cancer. *Journal of National Cancer Institute* 2003; 95: 1453–1461

Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; 348(6230): 69–74

Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T. Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 334: 1365-1373

Shen H, Ma J, Zhang J, Deng G, Qu Y, Wu X, He J, Zhang S, Zeng S. Integrin-linked kinase overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition via nuclear factor- κ B signaling in colorectal cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 2016; 22(15): 3969-3977

Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor α and β and show biological responses to estrogen. *Cancer Research* 2002; 62 (7): 2141–2150

Sugiyama M, Oki E, Nakaji Y, Tsutsumi S, Ono N, Nakanishi R, Sugiyama M, Nakashima Y, Sonoda H, Ohgaki K, Yamashita N, Saeki H, Okano S, Kitao H, Morita M, Oda H, Maehara H. High expression of the Notch ligand Jagged-1 is

associated with poor prognosis after surgery for colorectal cancer. *Cancer Science* 2016; 107: 1705–1716

Sweis RF, Luke JJ. Mechanistic and pharmacologic insights on immune checkpoint inhibitors. *Pharmacology Research* 2017; 120: 1-9

Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA, Mani SA. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2010; 107(35): 15449–15454

Tilley AE, Harvey BG, Heguy A, Hackett NR, Wang R, O'Connor TP, Crystal RG. Down-regulation of the Notch Pathway in Human Airway Epithelium in Association with Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2009; 179: 457-466

Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Chen L, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104(10): 2084-2091

Travis WD, Brambilla E, Hermelink-Muller HK, Harris CC (eds). *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. IARC Press, Lyon 2004

Travis WD, Brambilla E, Noguch M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, *et al*. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: International Multidisciplinary Classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2011; 8: 381-385

Trimboli AJ, K Fukino, A Bruin, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Research* 2008; 68(3): 937–945

Tsuruoka K, Horinouchi H, Goto Y, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Asakura K, Nakagawa K, Sakurai H, *et al.* PD-L1 expression in neuroendocrine tumors of the lung, *Lung Cancer* 2017; 108: 115–120

Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515(7528): 568–571

Uruga H, Bozkurtlar E, Huynh TG, Muzikansky A, Goto Y, Gomez-Caraballo M, *et al.* Programmed cell death ligand (PD-L1) expression in stage II and III lung adenocarcinomas and nodal metastases. *Journal of Thoracic Oncology* 2016;12: 458-466

Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes esophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *The Journal of Pathology* 2008; 215(3):330–339

Velcheti V, Rimm DL, Schalper KA. Sarcomatoid lung carcinomas show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1). *Journal of Thoracic Oncology* 2013; 8(6): 803–805

Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, Salzet M. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Letters* 2010; 291(1): 59–66

Walsh NM, Fleming KE, Hanly JG, Dakin Hache K, Doucette S, Ferrara G, Cerroni L. A morphological and immunophenotypic map of the immune response in Merkel cell carcinoma. *Human Pathology* 2016; 52: 190-196

Wang X, Tang Z, Yu D, Cui S, Jiang Y, Zhang Q, Wang J, Yang P, Liu F. Epithelial but not stromal expression of collagen alpha-1(III) is a diagnostic and prognostic indicator of colorectal carcinoma. *Oncotarget* 2015; 7(8): 8823-8838

Wang Y, Wang H, Zhao Q, Xia Y, Hu X, Guo J. PD-L1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating SREBP-1c in renal cell carcinoma. *Medical Oncology* 2015; 32(8): 212

Weng T, Wang C, Hung Y, Chen W, Chen Y, Lai M. Differential expression pattern of THBS1 and THBS2 in lung cancer: Clinical outcome and a systematic-analysis of microarray databases. *Plos One* 2016; 11(8)

Wistuba I, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2006; 1: 331-348

Wik E, Raeder MB, Krakstad C, Trovik J, Birkeland E, Hoivik EA, Mjos S, Werner HM, Mannelqvist M, Stefansson IM, Oyan AM, Kalland KH, Akslen LA, Salvesen HB. Lack of estrogen receptor-alpha is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2013; 19(5): 1094–1105

World Health Organization. Cancer epidemiology. WHO. [acesso em 14/01/2017]. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>

Wu P, Wu D, Zhao L, Huang L, Shen G, Huang J, Chai Y. Prognostic role of STAT3 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2015; 7 (15): 19863-19863

Wu Y, Zhou BP. New Insights of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis. *Acta biochimica et biophysica Sinica (Shanghai)* 2008; 40(7): 643-650

Xiao D, HE J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. Journal of Thoracic Disease 2010; 2 (3): 154-159

Xie M, He CS, Wei SH, Zhang L. Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. European Journal of Cancer 2013; 49 (16): 3559-3572

Yang L, ChenY, Cui T, Knösel T, Zhang Q, Albring F, Huber O, Petersen I. Desmoplakin acts as a tumor suppressor by inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human lung cancer. Carcinogenesis 2012; 33(10): 1863–1870

Yao L, Sun B, Zhao X, Gu Q, Dong X, Zheng Y, Sun J, Cheng R, Qi H, An J. Overexpression of Wnt5a promotes angiogenesis in NSCLC. BioMed Research International 2014; 2014

Yokobori T, linuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, *et al*. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. Cancer research 2013; 73(7): 2059–2069

Zhang H, Liu H, Yuan D, Wang Z, Wang Y, Song Y. Prognostic value of secreted phosphoprotein 1 in pleural effusion associated with non-small cell lung cancer. Biomed Central 2014; 14: 280

Zhang HJ, Wang HY, Zhang HT, Su JM, Zhu J, Wang HB, *et al*. Transforming growth factor- β 1 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition. Molecular and Cellular Biochemistry 2011; 1-2: 309-314

Zhang L, Xi RX, Zhang XZ. Matrix metalloproteinase variants associated with risk and clinical outcome of esophageal cancer. *Genetics and Molecular Research* 2015; 14(2):4616-4624

Zhang S, Cui B, Lai H, Liu G, Ghia EM, Widhopf GF, Zhang Z, Wu CC, Chen L, Wu R, Schwab R, Carson DA, Kipps TJ. Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy. *proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2014; 111(48): 17266-17271

Zhao C, Lu F, Chen H, Zhao X, Sun J, Chen H. Dysregulation of JAM-A plays an important role in human tumor progression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014; 7(10): 7242-7248

Zheng W, Jiang C, Li R. Integrin and gene network analysis reveals that ITGA5 and ITGB1 are prognostic in non-small-cell lung cancer. *Oncotargets and Therapy* 2016; 9: 2317-2327

Zhi Y, Mou Z, Chen J, He Y, Dong H, Fu X, *et al.* B7H1 Expression and Epithelial-To-Mesenchymal Transition Phenotypes on Colorectal Cancer Stem-Like Cells. *PLoS One* 2015; 10(8)

Zhuo C, Lid X, Zhuangd H, Tiane S, Cuif H, Jiangg R, Liub C, Taoh R, Lina X. Elevated THBS2, COL1A2, and SPP1 Expression Levels as Predictors of Gastric Cancer Prognosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2016; 40: 1316-1324

10. APÊNDICE

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para realização do trabalho em questão

HC
FMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT) E SUA RELAÇÃO COM A PROGRESSÃO E INVASÃO TUMORAL EM CÂNCER DE PULMÃO
Pesquisador Responsável: Vera Luiza Capelozzi **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Tabatha Gutierrez Prieto Martins **CAAE:** 17436113.9.0000.0068
Rocha
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Vera Luiza Capelozzi
Instituição: HCFMUSP
Departamento: PATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10901
Número do Parecer: 488.522
Data da Relatoria: 11/12/13
Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto para uso de amostras já coletadas de RNA de tumores pulmonares, agora visando o estudo dos genes "ativos" nos tumores, baseando-se em arranjos sólidos.
Objetivo da Pesquisa: O objetivo é a busca de marcadores pulmonares prognósticos no tecido de ressecção pulmonar.
Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto traz benefícios diretos de determinação de marcadores prognósticos em tumores malignos pulmonares, através de estudo em material já disponível.
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Adequada.
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Concordamos com a sugestão de que não há necessidade de novo TCLE já que o material foi retirado para esta finalidade na sua coleta original.
Recomendações: Nenhuma.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Projeto aprovado.
Situação do Parecer: Aprovado.
Necessita Apreciação da CONEP: Não.
Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 11 de Dezembro de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Artigo submetido para a revista Human Pathology, aguardando correção.

Epithelial to mesenchymal transition genes drive PD-L1/PD-1, CD8 and CD45RO immune checkpoints in pulmonary neuroendocrine tumors

Tabatha Gutierrez Prieto ^a, Eduardo Caetano Albino da Silva MD ^b, Vanessa Martins PhD ^a, Cecília Farhat ^a, Vanessa Karen de Sá PhD ^c, Eloisa Helena Ribeiro Olivieri ^c, Dirce Maria Carraro PhD ^c, Teresa Takagaki MD, PhD ^d, Vera Luiza Capelozzi MD, PhD ^{a,*}.

^a *Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*

^b *Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil*

^c *International Center of Research/CIPE, AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil*

^d *Division of Pneumology, Instituto do Coração (Incor), Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.*

Summary PD-1/PD-L1 expression in cancer cells is well known to inhibit the T cell mediated anti-tumor response, emerging as targeted for cancer immunotherapy. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is involved in the progression and immune evasion of cancers. Therefore, we investigated the association between PD-L1 expression and EMT genotype in pNETs. We examined EMT signature and PD-L1/PD-1, CD8 and CD45RO immune markers in fresh frozen tumor-normal pairs from 24 patients with surgically excised pNETs. We used qRT-PCR with a PCR Array System for the EMT pathway with 84 target genes. Immunohistochemistry and H-score was performed to evaluate the amount of tumor staining for PD-L1/PD-1, CD8 and CD45RO, and the outcome for our study was survival time until death from recurrent lung cancer. PD-L1 expression was significant higher in malignant cells than in tumor-associated immune cells for all lung NETs. Smoking status was significantly correlated with PD-1 in TILs expression. Lymphocytes naïve/memory T cells CD45RO was significantly higher in LCNEC than SCLC. No difference was found between the four pNETs subtypes and lymphocytes T cells CD8⁺. By multivariate analysis, we found that the PD-L1 in tumor cells was highly associated with *SPPI* and *MAP1B*. Poor overall survival was significantly associated with higher expression of lymphocytes T cells CD8⁺ and *MAP1B*, and low expression of inhibitor PD-1 in immune cells. These findings highlighting the importance of comprehensive assessment of both tumor and immune cells. Our results may support the use of quantitative immune profiling to study response and resistance to immunotherapy in pulmonary neuroendocrine tumors.

Keywords: Pulmonary neuroendocrine tumors, Epithelial to mesenchymal transition, Immune checkpoints, PD-1, PD-L1, prognosis

Mini oral presentation at 18th World Conference on Lung Cancer 2017; Poster presentation at 107th annual meeting USCAP 2018.

☆ **Competing interests:** All authors declare no conflicts of interest.

☆☆ **Funding/Support:** This work was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) 2013/10113-7; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) 471939/2010-2; CNPq 483005/2012-6.

***Corresponding authors:** Department of Pathology, Faculty of Medicine of University of Sao Paulo, Av Dr Arnaldo 455, Room 1143, CEP 01246-903, Sao Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: vera.capelozzi@fm.usp.br (V. L. Capelozzi).

E-mail address: tabathaprieto@yahoo.com.br (T. G. Prieto).

1. Introduction

Many studies have demonstrated the success of immune checkpoint inhibitors in medical immune oncology. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) is a transmembrane protein that binds to the programmed death-1 receptor (PD-1) during immune system modulation. The PD-1 receptor is particularly expressed on CD8 cytotoxic T-cells and other immune cells while PD-L1 ligand is characteristically expressed on normal cells [1]. Normal cells use the PD-1/PD-L1 interface as a mechanism of defense against immune recognition impeding the action of T-cells thus downregulating the immune response. Since those inactive T-cells are fatigued, stop cellular division, and eventually die by apoptosis [2]. Recent studies have shown that different tumor cells types upregulate the expression of PD-L1 as a mechanism to evade the immune response. Triggered T-cells identify the PD-L1 receptor on the tumor cell and promote the cytotoxic T-cell inactive and thus the tumor cell escapes the immune cycle for elimination and is capable to proliferate [1,2]. Despite of remarkable options of anti PD-1 and PD-L1 agents, their role in neuroendocrine tumors (NETs) remains controversial. Interestingly, recent papers report strong evidences concerning the role of PD-L1 in promoting epithelial to mesenchymal transition (EMT) as well as initiation and maintenance of cancer stem cells [3,4,5,6,7]. Alsuliman and colleagues reported that induction of epithelial to mesenchymal transition in human mammary epithelial cells up-regulated PD-L1 expression mainly through activation of the PI3K/AKT pathway [8]. In another report, Wang and colleagues reported that PD-L1 expression could induce epithelial to mesenchymal transition in renal cell carcinoma by activating the transcription factor SREBP-1c [9]. Particularly, the survival evaluation in the TCGA (The Cancer Genome Atlas) database confirmed better prognosis for patients with PD-L1pos/EMTneg than for PD-L1pos/EMTpos with squamous cell carcinoma of head and neck [10]. Other studies have separately identified PD-L1 expression and EMT as important prognostic factors in human esophageal cancer [11,12]. Nevertheless, the co-expression of PD-L1 and EMT genes status in the progression and metastasis of pNETs still remains elusive.

Therefore, in the current study, we have specifically focused on establishing the correlation between PD-L1 expression and EMT gene status in pNETs. We evaluated the correlations between PD-L1/PD-1, tumor-associated immune cells (TAIC) (CD8 and CD45RO) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with the clinicopathological features of pNETs in 24 patients.

2. Materials and Methods

2.1 Patients and samples

We analyze fresh frozen tumor-normal pairs from 24 patients with pNETs (10 SCLC, 4 LCNEC, 5 AC and 5 TC) at the A. C. Camargo Cancer Center and Barretos Cancer Hospital, who underwent surgical resection from January 1, 1995, to December 31, 2015, and had not received neoadjuvant therapy. The histologic diagnosis and immunohistochemistry were reviewed and confirmed by an experienced lung pathologist (VLC) according to the current World Health Organization classification [13]. The patients' demographic data and clinicopathological characteristics were obtained from medical records and included age, sex, smoking history, tumor size, tumor stage (according to the International Association for the Study of Lung Cancer classification system – 8th edition) and follow-up information for overall survival (OS) rates. Internal ethics committees for the participating institutions approved this study protocol. The demographic characteristics are summarized in Table 1.

2.2 RNA extraction and qRT-PCR Array

Total RNA was extracted from fresh frozen tumor and normal tissues of all patients using *QIAasympyphony miRNA CT 400 kit* (Qiagen, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. RNA integrity and quality were determined by Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the c-DNA – RT² First Strand Kit (Qiagen Sample & Assay Technologies) according to the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR was carried out using *RT² Profiler PCR Array System (PAHS-090Z)*; Qiagen, Dusseldorf, Germany) kit. The samples were amplified in Applied Biosystems Step One Plus (Applied Biosystems, California, USA) and the cycling conditions were: 95°C for 10 minutes and 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, followed by the dissociation period. The data were analyzed by the StepOne software (v. 2.0, Applied Biosystems) using the $\Delta\Delta CT$ method. All the dissociation curves were manually checked and the samples showing two amplification peaks were excluded from the analysis.

2.3 Immunohistochemical staining and scoring

To detect PD-L1, PD-1, CD8 and CD45RO expression, immunostaining was performed in FFPE sections of pulmonary neuroendocrine tumors samples. All samples underwent IHC procedures as follows: a) pressure cooking antigen retrieval; b) overnight incubation with: mice monoclonal anti-PD-L1 antibody (clone ABM4E54; Abcam, USA; diluted 1:50, pH 9), mice monoclonal anti-PD-1 antibody (clone NAT105; Abcam, USA; diluted 1:50, pH 9), mice monoclonal anti-CD8 antibody (clone C8/144B, Dako, USA; diluted 1:400, pH 6) and mice monoclonal anti-CD45RO antibody (clone UCHL-1, Dako, USA; diluted 1:200, pH 6); c) incubation with polymer and post-primary antibody during 30 min at 37 °C according to the manufacturer's instructions (Novolink Max Polymer Detection System, Novocastra Laboratory, UK); d) visualization of peroxidase activity through incubation with chromogenic diaminobenzidine (Sigma, USA) and 0.03% hydrogen peroxidase.

Immune markers staining were scored using a membrane and a cytoplasmic algorithm to analyze. Staining intensity, scored as 0 (no staining), 1+ (weak staining), 2+ (moderate staining), or 3+ (strong staining), was multiplied by the percentage of positive cells (0-100%) for each intensity for a final H-score of 0-300.

2.4 Statistical analysis

The chi-square test or Fisher exact test was used to examine differences in categorical variables, and the Wilcoxon rank-sum test and Kruskal-Wallis test were used to detect differences in continuous variables between groups of patients. The overall survival (OS) distributions for the patients were estimated using the Kaplan-Meier method. OS was defined as the interval from surgery to death or last contact. A log-rank test was performed to determine the difference in survival between the groups. Regression analysis of the OS data was performed using the Cox proportional hazards model. The statistical software programs IBM SPSS (version 22; Armonk, NY, USA) and S-Plus (version 8.04; TIBCO, Palo Alto, CA, USA) were used to perform the computations for all analyses. P value < 0.05 was taken to indicate a significant difference.

3. Results

PD-L1 immunostaining was observed in the cytoplasm and on the plasma membrane of tumor cells, and stromal tumor-associated immune cells. In Table 1 are shown the results of immune checkpoints quantification stratified according to pNETs histological types. PD-L1 was higher in malignant cells than in tumor-associated immune cells (TAIC), for all lung NETs (median H score, 136 vs 111 for SCLC, 155 vs 150 for LCNEC, 180 vs 25 for AC and 130 vs 41 for TC, respectively; P<0.01) (Figures 1 and 2). Smoking status was significantly correlated

with PD-1 in TILs expression ($P<0.01$). No difference was found between the pNETs histological subtypes and lymphocytes T cells CD8⁺.

Univariate analysis showed that overall survival of patients with pNETs was significantly associated with the following prognostic factors: smoking status, histological subtype, tumor TNM stage, PD-L1 in immune cells, PD-1 in TILs, CD8 and EMT gene expressions (Table 2). We found that these variables separated patients into two groups significantly correlated with PD-1 in TILs expression ($P<0.01$). Lymphocytes naïve/memory T cells CD45RO was significantly higher in LCNEC than SCLC (median H score, 78.75 vs 5.20, $P=0.03$) (Figure 3). Distinctly average survival times are illustrated by Kaplan-Meier plots in Figure 4. The group with $<6\%$ lymphocytes T cells CD8⁺ and <18.20 EMT gene expression for *MAP1B* appears as the top curve, and their median survival time was quite long (113.08 and 113.67 months, respectively). By contrast, those with $>6\%$ lymphocytes T cells CD8⁺ and >18.20 EMT gene expression for *MAP1B* (bottom curve) had a median survival time respectively of just 13.60 and 16 months after surgery (Log rank 8.19, $P<0.01$ and Log rank 5.56, $P=0.01$; respectively). Equally significant was the poor survival for patients with low expression of inhibitor PD-1 in immune cells (Log rank 7.67; $P<0.01$).

To understand the relationship between tumor cell PD-L1⁺ and other neuroendocrine lung tumor immune regulators and expression of EMT genes, we profiled *AKT1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *DSP*, *EGFR*, *FR11*, *GSK3B*, *ILK*, *ITGA5*, *ITGAV*, *ITGB1*, *JAG1*, *MAP1B*, *MMP2*, *MMP3*, *SNAI2*, *SPARC*, *SPP1*, *STAT3*, *TCF3*, *TGFβ3*, *VPS13A*, *WNT5A* in 24 lung pNETs. By multivariate analysis, we found that the PD-L1⁺ in tumor cells was highly associated with EMT gene expression (*SPP1* and *MAP1B*, $p<0.05$) (Figure 5).

4. Discussion

We examined the clinical significance of EMT on immune checkpoints expression in pNETs. We found that PD-L1 was higher in malignant cells than in tumor-associated immune cells for all lung NETs. Smoking status was significantly correlated with PD-1 in TILs expression. Lymphocytes naïve/memory T cells CD45RO was significantly higher in LCNEC than SCLC. In fact, there is convincing evidence that the immunogenicity of SCLC comes from the relationship between immune activity and prognosis. For instance, more CD45RO⁺ T cells infiltrating SCLC tumors were found to be predictive of better OS, independent of stage and performance status [14]. No difference was found between the pNETs histological subtypes and lymphocytes T cells CD8⁺. Some groups have shown supremacy of CD8⁺ cells over immune inhibitors (such as T regulatory cells and PD-1 “exhausted” immunocytes) within the global infiltrate in Merkel cell carcinoma samples [14]. Other authors showed that abundant CD8⁺ TILs were associated with high PD-L1 expression in tumor cells. In a different approach, recent report shown the correlation between the CD8⁺ T cells in intra-epithelial infiltration and PD-L1 expression in lung adenocarcinoma [15]. Kasajima et al. evaluated 57 resected carcinoids and 185 resected neuroendocrine carcinomas of the lung (58 large cell carcinomas and 127 small cell carcinomas) for tumor-associated inflammation, CD8⁺ cell infiltration and PD-L1 status. They found moderate or high tumor-associated inflammation in 4 carcinoids and in 37 neuroendocrine carcinomas. The same authors also found PD-L1 expression in inflammatory cells of 73 neuroendocrine carcinomas, whereas in only 21 cases, tumor cells were stained. They suggested that the anti-tumor inflammatory response and PD-L1 stain are predominant in neuroendocrine carcinomas, with positive correlation to patient survival [16]. Ohigashi et al. and Thompson et al. reported that high tumor-cell expression of PD-L1 was associated with poor survival in patients with renal-cell carcinoma, gastric and esophageal malignancies. In contrast, the predictive function for PD-L1 hyper expression in lung cancer is controversial and negative or positive prognosis associations have been reported continually [17,18]. Nevertheless, clinical trial results have led to the approval of PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors for the treatment of advanced NSCLC [19,20,21,22]. In addition, PD-L1 expression is predominant reported in squamous and adenocarcinoma subtypes of lung cancers contrasting

with the scarce knowledge about neuroendocrine tumors, especially LCNEC. Tsuruoka et al. examined 227 neuroendocrine lung tumors (AC, TC, SCLC and LCNEC) reporting a positive PD-L1 status in 10.4% of 106 LCNEC [23]. We used the same cut-off score (H-score > 1 counted as “positive”) and observed that PD-L1 expression was positive in all lung NETs on the tumor cells. This variance in PD-L1 expression might be clarified by the accessibility of different staining assays. Kerr et al. report this problematic about the staining assays variability. They found at least 5 different antibodies used even in current therapeutic checkpoint inhibitor trials [24]. Actually, there is no agreement about the PD-L1 and other immune markers expression in lung cancer, mainly in pulmonary neuroendocrine tumors. Those conclusions maybe are controversial because the PD-L1, probably, is not specific enough as prognostic biomarker in lung cancer.

Our study shown that PD-L1 expression was a significant independent factor associated with EMT features. Similar correlations between PD-L1 and EMT were also validated as independent factors in public TCGA (The Cancer Genome Atlas) and CCLE (The Cancer Cell Line Encyclopedia) databases using an EMT gene expression signature in other tumors [25]. We found that patients whose tumors were PD-L1pos/EMTpos showed a significantly poorer prognosis than those whose tumors were PD-L1pos/EMTneg. This finding support the work of Mak et al. who proposed that PD-L1 positivity can be divided into two categories by EMT markers in pNETs. In fact, combined to tumor mutational burden and profusion of TILs, PD-L1 expression in tumor tissues or microenvironment strongly correlates with response rates to anti-PD-1/PD-L1 [26,27,28,29]. However, the specific clinicopathologic factors associated with PD-L1 expression in cancer are unclear. Jiang and colleagues shown that multi-factorial influences on PD-L1 expression exist including EMT remodeling and damage induced by cytotoxic chemotherapy occur via MAPK or JAK/STAT [30]. In the current study, we found that PD-L1 expression was significantly correlated with EMT rather than immune cells with impact on patients prognosis in agreement with other works in the literature [3,31,32,33]. To our knowledge, this is the first report to show a correlation between PD-L1 and EMT in lung cancer that originate from lung endocrine cells.

The clinical impact of PD-L1 upregulation is stimulating. PD-L1 expression can be induced by cytokines, such as interferon-gamma, produced by the milieu inflammatory cells involving tumors, response to viral antigen or neo-antigen processing [34,35]. PD-L1 expression is also promoted by the activation of intrinsic oncogenic pathways, for example, STAT3, an activating EGFR mutation or ALK translocation. Additionally, clinical consequences of PD-L1 up-regulation differ according to intrinsic and extrinsic induction pathways. In this context, their predictive values with anti-PD-1/PD-L1 inhibitors should be investigated, particularly the predictive values of PDL-1pos/EMTneg and PD-L1pos/EMTpos statuses [10,36,37].

Our study also evaluated the correlation between PDL-1 and two EMT genes, *MAP1B* and *SPPI*. *MAP1B* encodes the microtubule-associated protein 1 B, that belongs to the family of proteins associated with microtubules (MAPs). It is involved in the structuring of the microtubules and is one of the most important proteins of the cytoskeleton stability in the development of the nervous system [38]. In a recent study, Gadoth and colleagues identified *MAP1B* as the antigen of a neuronal antibody (PCA-2) that is a robust predictor of SCLC and a potential biomarker for paraneoplastic neurological disorders [39]. In our investigation, the gene expression of *MAP1B* was inversely correlated with the PDL-1 expression; patients that had high expression of *MAP1B* presented lower expression of PDL-1. Interestingly, *MAP1B* was also correlated to the worse overall survival of patients.

SPPI encodes the secreted phosphoprotein-1, also known as osteopontin (OPN), is a phosphorylated glycoprotein secreted in the extracellular bone matrix. In bone is produced by osteoclasts and osteoblasts, involved in bone matrix mineralization. Plasmatic levels of OPN has been shown to be positive for colon and lung cancer as well as for metastasis. The

remarkable presence of OPN in several tumors is strongly related to the pathological stage, suggesting a significant role in the aggressiveness, progression and tumor metastasis [40]. In our cohort, we found that gene expression of *SPPI* was directly correlated with PD-L1 expression; tumor from patients that had high expression of *SPPI* presented high expression of PD-L1.

The present study has limitations. The relatively small number of samples used in the current study could have biased results. Nevertheless, the incidence of pNETs is approximately 25% (TC, 2%; AC, <1%; LCNEC, 3% and SCLC, 20%) of primary lung neoplasms, they are considered rare tumors [41]. Since we aimed to find an association between PD-L1 and EMT in a clinical setting, patients with typical carcinoid (N=5) and atypical carcinoid (N=5) were included. Therefore, carefulness is recommended in the direct application of the current results to further clinical studies. The clinical significance of anti-PD-1/PD-L1 inhibitor therapy in our study is missing, although overall prognosis according to PD-L1 expression and its up-stream mechanism should be assumed before investigating clinical outcomes of the target agent. Clearly, we showed PD-L1 up-regulation according to two distinct up-stream pathways, EMT influenced the prognosis. The association of EMT with PD-L1 in pNETs is a novel finding in this study.

In conclusion, PD-L1 expression is associated with EMT in an independent up-stream pathway. EMT – associated PD-L1 expression promotes a significantly poorer prognosis compared to PD-L1 expression not associated with EMT. Clinical investigations using anti-PD-1/PD-L1 inhibitors in patients with EMT – associated PD-L1 up-regulation are warranted.

Acknowledgements

Thanks to Sandra Fernezlian and Esmeralda Ehler for the technical assistance.

References

- [1] Sweis RF, Luke JJ. Mechanistic and pharmacologic insights on immune checkpoint inhibitors. *Pharmacol Res.* 2017;120:1-9.
- [2] Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. *Semin Oncol* 2014;41(Suppl 5):S3-S13.
- [3] Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, et al. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Res* 2011;71:1235-1243.
- [4] Cao Y, Zhang L, Ritprajak P, et al. Immunoregulatory molecule B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2011;71:4737-4741.
- [5] Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Felisiak-Golabek A, Ikeda H, Miettinen M. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas. *Mod Pathol* 2017;30(2):278-285.
- [6] Zhi Y, Mou Z, Chen J, et al. B7H1 Expression and Epithelial-To-Mesenchymal Transition Phenotypes on Colorectal Cancer Stem-Like Cells. *PLoS One* 2015;10(8).
- [7] Kim S, Koh J, Kim MY, et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2016;58:7-14.
- [8] Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, et al. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol Cancer* 2015;14:149.
- [9] Wang Y, Wang H, Zhao Q, Xia Y, Hu X, Guo J. PD-L1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating SREBP-1c in renal cell carcinoma. *Med Oncol* 2015;32:212.
- [10] Ock CY, Kim S, Keam B, et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(13):15901-15914.
- [11] Chen L, Deng H, Lu M, et al. B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(9):6015-6023.

- [12] Liu J, Chen L, Deng H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in human esophageal cancer associates with tumor progression and patient's survival. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(10):6943-6949.
- [13] Li J, Zhao Y, Li C, Zhu L, Liu C, Liu L. The revision of 8th edition TNM stage criteria is more accurate in prediction postoperative survival for SCLC patients. *Int J Surg*. 2017; 48:83-85.
- [14] Horn L, Reck M, Spigel D R. The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* 2016;21(8):910–921.
- [15] Walsh NM, Fleming KE, Hanly JG, Dakin Hache K, Doucette S, Ferrara G, Cerroni L. A morphological and immunophenotypic map of the immune response in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol* 2016;52:190-196.
- [16] Uruga H, Bozkurtlar E, Huynh TG et al. Programmed cell death ligand (PD-L1) expression in stage II and III lung adenocarcinomas and nodal metastases. *J Thorac Oncol* 2016;12:458-466.
- [17] Kasajima A, Ishikawa Y, Iwata A, Steiger K, Oka N, Ishida H, Sakurada A, Suzuki H, Kameya T, Konukiewicz B, Klöppel G, Okada Y, Sasano H, Weichert W. Inflammation and PD-L1 expression in pulmonary neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2018;25(3):339-350.
- [18] Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2947-2953.
- [19] Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Chen L, Zincke H, Blute ML, Leibovich BC, Kwon ED. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;104(10):2084-2091.
- [20] Herbst RS, Baas P, Perez-Gracia JL, Felip E, Kim DW, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, Majem M, Fidler MJ, Surmont V, De Castro G Jr, Garrido M, Shentu Y, Dolled-Filhart M, Im E, Garon EB. P2.41 (also presented as PD-1. 06): pembrolizumab vs docetaxel for previously treated NSCLC (KEYNOTE-010): archival vs new tumor samples for PD-L1 assessment: track: immunotherapy. *J Thorac Oncol* 2016;11(10S):S242-S243.
- [21] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455–2465.
- [22] Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, Horn L, Lena H, Minenza E, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015;16(3):257–265.
- [23] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csösz T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1 positive non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823–1833.
- [24] Tsuruoka K, Horinouchi H, Goto Y, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Asakura K, Nakagawa K, Sakurai H, et al. PD-L1 expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Lung Cancer* 2017;108:115–120.
- [25] Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba I I, Hirsch FR. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol* 2015; 10: 985–989.
- [26] Mak MP, Tong P, Diao L, et al. A patient-derived, pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial to mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2016;22(3):609-620.
- [27] Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348(6230):124–128.
- [28] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515(7528):568–571.
- [29] Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372:2018–2028.

- [30] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515(7528):563–567.
- [31] Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19(3):598–609.
- [32] Movva S, Wen W, Chen W, et al. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget* 2015;6(14):12234–12247.
- [33] Velcheti V, Rimm DL, Schalper KA. Sarcomatoid lung carcinomas show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1). *J Thorac Oncol* 2013;8(6):803–805.
- [34] Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma-like and Non-Small Cell Carcinoma-like Subsets. *Clin Cancer Res* 2016;22(14):3618–3629.
- [35] Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793–800.
- [36] Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015;348(6230):69–74.
- [37] Azuma K, Ota K, Kawahara A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014;25(10):1935–1940.
- [38] Ota K, Azuma K, Kawahara A, et al. Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(17):4014–4021.
- [39] Lee SY, Kim JW, Jeong MH, An JH, Jang SM, Song KH, Choi KH. Microtubule-associated protein 1B light chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. *FEBS Letters* 2008;582(19):2826–2832.
- [40] Gadoth A, Kryzer TJ, Fryer J, McKeon A, Lennon VA, Pittock SJ. Microtubule-associated protein 1B: Novel paraneoplastic biomarker. *Ann Neurol* 2017;81(2):266–277.
- [41] Zhuo C, Lid X, Zhuangd H, Tiane S, Cuif H, Jiangg R, Liub C, Taoh R, Lina X. Elevated THBS2, COL1A2, and SPP1 Expression Levels as Predictors of Gastric Cancer Prognosis. *Cell Physiol Biochem* 2016;40:1316–1324.
- [42] Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine tumors of the lung: Current challenges and advances in the diagnosis and management of well-differentiated disease. *J Thorac Oncol* 2016;12(3):425–436.