JULIANA FLORINDA DE MENDONÇA RÊGO

Análise e comparação da expressão imunoistoquímica de marcadores moleculares (ERCC1, Bcl-2, Lin28a e Ki67) potencialmente preditores de resposta à quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos extra-pulmonares e carcinoma de pequenas células de pulmão

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rêgo, Juliana Florinda de Mendonça

Análise e comparação da expressão imunoistoquímica de marcadores moleculares (ERCC1, Bcl-2, Lin28a e Ki67) potencialmente preditores de resposta à quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos extra-pulmonares e carcinoma de pequenas células de pulmão / Juliana Florinda de Mendonça Rêgo. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Rachel Simões Pimenta Riechelmann.

Descritores: 1.Carcinoma neuroendócrino 2.Carcinoma de pequenas células do pulmão 3.Biomarcadores tumorais 4.Prognóstico 5.Sobrevida 6.ERCC1 9.Bcl-2 10.Lin28a 11.Ki67 12.Estudos retrospectivos

USP/FM/DBD-364/16

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) com apoio do Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês e do Instituto do Câncer do Ceará.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processo número 473833/2011-5)

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA E A CADA UM DOS MEUS PACIENTES.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann, médica oncologista e Chefe da Pesquisa Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), minha orientadora neste projeto. Obrigada pela confiança em mim depositada, pelos inúmeros e valiosos ensinamentos, pela compreensão quando esta se fez necessária e pela amizade construída. Tem sido um grande exemplo de oncologista e de pesquisadora para mim.

Ao Dr. Raphael Salles Scortegagna de Medeiros, médico patologista da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelas análises imunoistoquímicas deste trabalho.

Ao Dr. Breno Victor Tomaz Galvão, médico radiologista do Departamento de Radiologia do ICESSP, pelas avaliações radiológicas deste trabalho.

Ao Dr. Duílio Reis da Rocha Filho, médico oncologista do Instituto do Câncer do Ceará, por contribuir com o desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Maria Ignez Freitas Melro Braghiroli, médica oncologista do Grupo de Tumores Gastrointestinais do ICESSP, por toda a sua contribuição e pela sincera amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff, Professor Titular da Disciplina de Oncologia da FMUSP, por incentivar e possibilitar o desenvolvimento da

pesquisa clínica no ICESP, bem como pelos comentários e sugestões ao longo deste trabalho.

Aos demais co-autores da publicação que este projeto resultou: Dr. João Evangelista Bezerra Neto, Dr. Rodrigo Ramella Munhoz, Dr. Túlio Eduardo Flesh Pfiffer, Dr. Gilberto de Castro Junior, Dr. Frederico Perego Costa, Juliana Guerra, Suely Nonogaki e Lidia Kimura, pelas valiosas contribuições.

Aos meus colegas e amigos de residência médica: Ana Carolina Ribeiro Chaves de Gouveia, Anezka Rubim Celis Ferrari, Camila Motta Venchiarutti Moniz, Carlos Henrique dos Anjos, Caroline Chaul de Lima Barbosa, Diego de Araújo Toloi, Denyei Nakazato, Giovanni Mendonça Bariani e Maria Ignez Freitas Melro Braghiroli, pelo intenso convívio durante os três anos da residência de Oncologia Clínica no ICESP. Tornaram-se bem mais que colegas de profissão, são amigos que levarei para toda a vida.

Ao Dr. Daniel Fernandes Saragiotto, médico oncologista do Grupo de Tumores Gastrointestinais do ICESP e coordenador da Residência Médica em Cancerologia Clínica do ICESP-FMUSP, pelo incansável esforço em formar oncologistas bem qualificados e, particularmente, pelo apoio e incentivo a mim oferecidos.

Ao corpo clínico do Serviço de Oncologia do ICESP, por todo o conhecimento compartilhado e pelos ensinamentos fundamentais para a minha formação como oncologista.

Aos demais profissionais do ICESP, por contribuírem para que este instituto seja ímpar no tratamento do câncer.

Ao Dr. Ricardo José Marques, médico oncologista do Grupo Oncoclínicas, pelo prazer do convívio e aprendizado quase diários que ajudaram a moldar a profissional que sou hoje.

Aos meus pais Rita de Cássia e José Rêgo, meus primeiros professores e maiores incentivadores, pelo estímulo constante ao estudo, por torcerem e vibrarem comigo em cada conquista, e por terem me ensinado desde cedo que através do esforço pessoal e da dedicação é possível realizar cada um dos nossos sonhos. Eis mais um sonho realizado.

Aos meus irmãos Alexandre e Marília, pela compreensão, pela paciência e pelo apoio por toda a vida.

Aos meus amigos, pela torcida constante e por compreenderem que a distância física, tantas vezes necessária, não é fator limitante para uma amizade verdadeira.

Aos meus pacientes, inspiração maior para a minha dedicação à oncologia, por confiarem em mim durante o seu tratamento oncológico.

E, por fim, a Deus, por ter me guiado neste caminho e por ter me escolhido para ser médica oncologista.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia 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.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Epidemiologia e Classificação	2
1.2 Tratamento	5
1.3 Justificativa do Estudo	6
1.4 Biomarcadores Selecionados para Análise	7
1.4.1 ERCC1 (Excision repair cross-complementation group 1):	8
1.4.2 Lin28a:	14
1.4.3 Bcl-2	17
1.4.4 Ki67	19
2 HIPÓTESES	22
3 OBJETIVOS	24
4 DESFECHOS	26
5 MÉTODOS.....	28
5.1 Desenho do Estudo:	28
5.2 Seleção de Pacientes:	29
5.3 Critérios de Elegibilidade:	29
5.4 Tecido Tumoral	30
5.5 Metodologia das Análises de Biomarcadores:	30
5.5.1 Micromatriz Tecidual (TMA):.....	30
5.5.2 Imunoistoquímica:	31
5.6 Dados Clínicos	34
5.7 Avaliação de Resposta a Quimioterapia	35
5.8 Considerações Estatísticas	36
5.8.1 Plano de Análise	36

5.8.2 Tamanho da Amostra	37
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:.....	40
7 RESULTADOS	42
7.1 Características Clínicas	46
7.2 Características do Tratamento	48
7.3 Toxicidade ao Tratamento	51
7.4 Análises dos Biomarcadores	53
7.4.1 Expressão do <i>ERCC1</i>	53
7.4.2 Expressão do Bcl-2	55
7.4.3 Expressão do Lin28a.....	57
7.4.4 Expressão de Ki67	58
7.5 Análise de Taxa de Resposta nas Duas Populações Estudadas	60
7.6 Associação entre expressão dos biomarcadores (<i>ERCC1</i> , Lin28a, Bcl2 e Ki67) e taxa de resposta: desfecho primário do estudo	61
7.6.1 Biomarcadores como Variável Categórica.....	62
7.6.2 Biomarcadores como Variável Contínua.....	64
7.7 Análise de Sobrevida nas duas populações estudadas	66
7.8 Associação entre expressão dos biomarcadores (<i>ERCC1</i> , Lin28a, Bcl2 e Ki67) e desfechos de sobrevida (prognóstico).....	67
7.8.1 Biomarcadores Prognósticos como Variável Categórica.....	67
7.8.2 Biomarcadores Prognósticos analisados como Variável Contínua	76
7.9 Expressão dos Biomarcadores e Análise de Sobrevida Global nos pacientes com CNE extra-pulmonares bem diferenciados e pouco diferenciados.....	77
7.10 Análise de Taxa de Resposta nos Pacientes com CNE extra- pulmonares bem diferenciados e pouco diferenciados	79
7.11 Correlação entre os biomarcadores ki-67 e Lin 28.....	79
8 DISCUSSÃO	81
9 CONCLUSÃO.....	92
10 ANEXOS.....	95
10.1 ANEXO A: Escala de Capacidade Funcional (ECOG – PS).....	95
10.2 ANEXO B: Taxa de Resposta conforme RECIST 1.1	95
10.3 ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	98

10.4 ANEXO D: Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa	100
10.5 ANEXO E: Características clínicas e histopatológicos de 60 pacientes com CNE Extra-pulmonar (paciente 01 a 20).....	101
10.6 ANEXO F: Características clínicas e histopatológicos de 82 pacientes com CPPC (paciente 01 a 20).....	104
10.7 ANEXO G: Fotomicroscopia da expressão dos biomarcadores analisados	108
11 REFERÊNCIAS	113

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
/	por
:	para
'	linha
<	menor
=	igual
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
μm	micrometro
m ²	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
°C	grau centígrado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
APAF-1	<i>Apoptotic peptidase activating fator 1</i>
ASCL1	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATP7B	<i>ATPase copper transporting beta</i>
Bad	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist protein</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1 gene</i>
CD56	<i>Cluster of differentiation 56</i>
CGA	Campos de grande aumento
Ciclina D1	Membro da família das ciclinas
C-MYC	Protooncogene da família Myc
CNE	Carcinoma neuroendócrino
CNPD	Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado
CPNPC	Carcinoma de pulmão não pequenas células
CPPC	Carcinoma de pulmão de pequenas células
DE	Doença estável
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EP	Etoposídeo e platina
ERCC1 8F1	Clone de anticorpo de ERCC1
ERCC1 Ab-2	Clone de anticorpo de ERCC1
ERCC1 SP68	Clone de anticorpo de ERCC1

ERCC1	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
ERCC1-201	Isoforma 201 do ERCC1
ERCC1-202	Isoforma 202 do ERCC1
ERCC1-203	Isoforma 203 do ERCC1
ERCC1-204	Isoforma 204 do ERCC1
et al.	E colaboradores
G	Guanina
G0	Fase do ciclo celular
G1	Fase do ciclo celular ou grau histológico 1
G2	Fase do ciclo celular ou grau histológico 2
G3	Grau histológico 3
HE	Hematoxilina-eosina
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HR	<i>Hazard radio</i>
HSL	Hospital Sírio Libanês
I2	Índice de heterogeneidade
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IH	Imunoistoquímica
IP	Irinotecano e platina
Ki67	Marcador de proliferação celular
K-Ras	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Let-7	microRNA let-7
Let-7a	microRNA let-7a
Lin28	Proteína Lin28
Lin28a	Gene do homólogo A da proteína Lin28
MIB-1	<i>Monoclonal mouse anti-human Ki67 antigen, clone</i>
Min	Minutos
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro

N	Número de pacientes
NER	Nucleotide excision repair
NOTCH	<i>Neurogenic locus notch homolog</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Nível de significancia
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PD	Progressão de doença
PDK1	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase 1</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PKM2	<i>Pyruvate kinase 2</i>
PS	<i>Performance status</i>
QT	Quimioterapia
RB1	<i>Retinoblastoma protein</i>
RECIST	<i>International Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Resposta parcial
RR	Risco Relativo
S	Fase do ciclo celular
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
T	Timina
TNE	Tumores neuroendócrinos
TOPOI	Gene topoisomerase I
TOPOIIA	Gene topoisomerase IIA
TOPOIIB	Gene topoisomerase IIB
TP53	Proteína tumoral 53
TR	Taxa de resposta
Vs	<i>Versus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seleção de Pacientes com CPPC	43
Figura 2	Seleção de Pacientes com CNE extra-pulmonar	45
Figura 3	Diagnóstico Anátomo Patológico.....	46
Figura 4	CNE Extra Pulmonar – Sítio Primário.....	48
Figura 5	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de ERCC1 nos pacientes com CNE extra-pulmonar	54
Figura 6	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de ERCC1 nos pacientes com CPPC	55
Figura 7	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Bcl-2 nos pacientes com CNE extra pulmonar.....	56
Figura 8	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Bcl-2 nos pacientes com CPPC	56
Figura 9	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Lin28a nos pacientes com CNE extra pulmonar.....	57
Figura 10	Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Lin28a nos pacientes com CPPC.....	58
Figura 11	Histograma de distribuição da expressão imunoistoquímica de Ki67 nos pacientes com CNE extra pulmonar.....	59
Figura 12	Histograma de distribuição da expressão imunoistoquímica de Ki67 nos pacientes com CPPC.	60
Figura 13	Gráfico de SG (HR 0,69; 95%CI 0,46 – 1,03; p=0,069) de 132 pacientes incluídos no estudo (56 com CNE extra-pulmonares estágio IV ao diagnóstico e 76 com CPPC doença extensa ao diagnóstico), estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com o diagnóstico (CPPC vs CNE extra-pulmonar). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo método de log-rank.....	67

Figura 14	Gráfico de SG (HR=1,00; 95%CI 0,45 – 2,19, p=0,999) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de ERCC1 (escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.	69
Figura 15	Gráfico de SG (HR=0,47, 95% CI 0,24 – 0,91; p=0,025) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Bcl-2 (escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.	70
Figura 16	Gráfico de SG (HR 1,26; 95% CI 0,64 – 2,45; p=0,506) De 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudos, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Lin28a (escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.	71
Figura 17	Gráfico de SG (HR=0,68; 95%CI 0,35 – 1,29; p=0,235) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Ki67 (<55% vs $\geq 55\%$). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste o de log-rank.	72
Figura 18	Gráfico de SG (HR 0,86; 95%CI 0,42 – 1,74; p=0,674) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunohistoquímica de ERCC1 (Escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.	73
Figura 19	Gráfico de SG (HR=0,145; 95%CI 0,89 – 2,36; p=0,133) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Bcl-2 (Escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.	74
Figura 20	Gráfico de SG (HR=1,24; 95%CI 0,76-2,02; p=0,395) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Lin28a (Escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.	75

- Figura 21** Gráfico de SG (HR=1,15; 95%CI 0,70 – 1,88; p=0,573) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Ki67 (<55% vs ≥ 55%). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank. 76
- Figura 22** Gráfico de SG (HR 0,64; 95% CI 0,30 – 1,34; p = 0,231) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar estágio IV incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com o grau de diferenciação (CNE bem diferenciado e CNE pouco diferenciado). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo método de log-rank. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características da População e do Tratamento	50
Tabela 2	Toxicidades à quimioterapia.....	53
Tabela 3	Associação entre expressão dos marcadores moleculares e a taxa de resposta à quimioterapia com platina.	63
Tabela 4	Análise descritiva dos biomarcadores ERCC1, Bcl-2, Lin28a e ki67 para pacientes com CPPC.....	64
Tabela 5	Associação entre resposta e a expressão dos biomarcadores ERCC1, Bcl-2 Lin28a e ki67 para pacientes com CPPC (Resultado do modelo de regressão logística simples).	64
Tabela 6	Análise descritiva dos biomarcadores <i>ERCC1</i> , Bcl-2, Lin28a e ki67 para pacientes com CNE extra-pulmonares.	65
Tabela 7	Associação entre resposta e a expressão dos biomarcadores <i>ERCC1</i> , Bcl-2, Lin28a e ki67 para pacientes com CNE extra-pulmonares (Resultado do modelo de regressão logística simples).	65
Tabela 8	Associação entre status de sobrevida global e a expressão dos biomarcadores <i>ERCC1</i> , Lin28a, ki-67 e Bcl-2 para pacientes com CPPC (Resultados dos modelos de Cox univariados).....	76
Tabela 9	Associação entre status de sobrevida global e a expressão dos biomarcadores <i>ERCC1</i> , Lin28a, ki-67 e Bcl-2 para pacientes com CNE extra-pulmonares de alto grau (Resultados dos modelos de Cox univariados).....	77
Tabela 10	Correlação entre os biomarcadores ki-67 e Lin 28 (tanto para pacientes com CPPC quanto para pacientes com CNE extra-pulmonares).....	79

RESUMO

Rego JFM. *Análise e comparação da expressão imunoistoquímica de marcadores moleculares (ERCC1, BCL-2, Lin28a e ki67) potencialmente preditores de resposta à quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos extra-pulmonares e carcinoma de pequenas células de pulmão* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC) e o carcinoma neuroendócrino (CNE) extra-pulmonar apresentam características histopatológicas e tratamentos similares, porém os desfechos encontrados nos dois grupos podem ser diferentes. Avaliamos a expressão de alguns biomarcadores e a associação destes com taxa de resposta (TR) à quimioterapia baseada em platina e sobrevida global (SG) nos dois grupos.

MÉTODOS: Realizamos estudo retrospectivo de pacientes com CPPC e CNE extra-pulmonares tratados com quimioterapia baseada em platina. Todas as amostras tumorais foram revisadas pelo mesmo patologista (R.S.S.M.) e analisadas quanto a expressão imunoistoquímica de Ki-67, ERCC1, Bcl-2 e Lin28a, a qual foi determinada através do H-escore (calculado multiplicando o produto da intensidade da coloração - 0 a 3 - com a porcentagem de células positivas - 0 a 100 -, podendo variar de 0 a 300 - positivo quando ≥ 200). Os biomarcadores foram analisados tanto como variáveis contínuas quanto categóricas e a TR foi determinada por RECIST 1.1. A associação entre a expressão de cada biomarcador e a TR foi avaliada através do teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas e regressão logística simples para variáveis contínuas. Sobrevida global foi estimada por Kaplan-Meier e as curvas foram comparadas por log-rank. O modelo de regressão de cox foi utilizado para avaliar associação entre SG e a expressão de biomarcadores como variável contínua. **RESULTADOS:** Entre Julho de 2006 e Julho de 2014, 142 pacientes foram identificados: N=82 (57,7%) com CPPC e N=60 (42,3%) com CNE extra-pulmonar. As características clínicas eram semelhantes em ambos os grupos. Mediana de ki67 foi de 60% (7-100) no CPPC e de 50% (20-95%) no segundo grupo ($p=0,858$). Com uma mediana de 5 ciclos por paciente (N=123 elegíveis para análise de TR), a TR foi de 86,8% no CPPC, enquanto nos com CNE extra-pulmonar, foi de 44,6% ($p<0.001$). A mediana de SG (N=132 elegíveis para análise da SG) foi similar entre os grupos (10,3 meses em CPPC e 11,1 meses em CNE extra-pulmonar; $p=0,069$). Não houve diferença no padrão de expressão do ERCC1 ($p=0,277$) e do Lin28a ($p=0,051$) entre os grupos. Bcl2 foi expresso em 38 pacientes (46,3%) com CPPC e em 17 pacientes (28,3%) com CNE extra-pulmonar ($p=0,030$). Apenas no grupo com CNE extra-pulmonar, a alta expressão do Bcl2 foi associada com pior prognóstico (8,0 meses vs 14,7 meses; $p=0,025$). A expressão dos demais marcadores em CNE extra-pulmonar e dos quatro em

CPPC não apresentou influência sobre a SG, não havendo também associação entre estes e a taxa de resposta à quimioterapia. Dentre os pacientes com CNE extra-pulmonar, não houve diferença na SG ou na TR entre os pacientes com carcinoma bem diferenciado (N=13;) e com carcinoma pouco diferenciado (N=47). **CONCLUSÃO:** Apesar do CPPC e do CNE extra-pulmonar serem tratados de forma semelhante, nesta coorte a taxa de resposta entre os grupos foi significativamente diferente. Quando comparado com CPPC, os pacientes com CNE extra-pulmonar apresentam uma menor responsividade à quimioterapia baseada em platina, mas com tendência a maior SG. Dentre os CNE extra-pulmonares, a alta expressão de Bcl-2 foi associada a pior prognóstico. Os demais biomarcadores não apresentaram papel preditor de resposta ou prognóstico.

Descritores: carcinoma neuroendócrino; carcinoma de pequenas células do pulmão; biomarcadores tumorais; prognóstico; sobrevida; ERCC1; Bcl-2; Lin28a; Ki67; estudos retrospectivos.

ABSTRACT

Rego JFM. *Evaluation of biomarkers (ERCC1, BCL-2, Lin28a e Ki67) potentially predictive of response and prognosis in patients with high-grade extrapulmonary neuroendocrine carcinomas or small cell lung cancer treated with platin-based chemotherapy* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: Small cell lung cancer (SCLC) and high-grade extrapulmonary neuroendocrine carcinomas (EPNEC) share similar histopathological features and treatment, but outcomes may differ. We evaluated the expression of biomarkers and their association with response rate (RR) to platin-based chemotherapy and overall survival (OS) in these entities. **METHODS:** We conducted a retrospective analysis of patients with advanced EPNEC and SCLC treated with platinum-based chemotherapy. A single pathologist (R.S.S.M.) revised all samples. Paraffin-embedded tumor samples were tested for Ki-67, ERCC1, Bcl-2 and Lin28a expression by immunohistochemistry (IHC). Final IHC score (H-score) was calculated multiplying the intensity of staining by grading (0-300, with ≥ 200 considered positive). Biomarkers were analyzed as both categorical and continuous variables. RR was determined by RECIST 1.1. Associations between each biomarkers expression and RR were assessed using Chi-square or Fisher's exact test for categorical variables and univariate logistic regression for continuous variables. OS was estimated by the Kaplan-Meier method and curves were compared by log-rank. Cox regression analysis was used to evaluate any association between biomarkers expression (continuous variables) and OS. **RESULTS:** From July 2006 to July 2014, 142 patients were identified: N=82 (57,7%) with SCLC and N=60 (42,3%) with EPNEC. Baseline clinical characteristics were similar. Median Ki67 was 60% (7-100) among SCLC patients and 50% (20-95%) in EPNEC ($p=0,858$). With a median of 5 cycles per patient in both groups (N=123 evaluable patients), the RR was significantly higher in the SCLC group (86,8% vs 44.6%; $p<0.001$). Median OS (N=132 evaluable patients) was similar between the groups (10.3 months in SCLC and 11.1 months in EPNEC; $p=0,069$). In the EPNEC group, there wasn't any difference in OS or RR between the patients with well-differentiated (N=13) and poorly differentiated carcinoma (N=47). ERCC1 ($p=0.277$) and Lin28a ($p=0.051$) were similarly expressed between the groups. Bcl2 was expressed in 38 SCLC patients (46.3%) and in 17 EPNEC patients (28.3%; $p=0.030$). Only in the EPNEC group, Bcl2 high expression was associated with worse survival (8.0 months vs 14.7 months; $p = 0.025$). RR to chemotherapy was not influenced by the expression of the ERCC1, Lin28a, Bcl-2, Ki-67 in either EPNEC or SCLC groups. **CONCLUSION:** Even though SCLC and EPNEC are treated similarly, in this cohort, the rate response differed significantly. When compared with SCLC, patients with

EPNEC apparently had tumors less responsive to platin-based chemotherapy, but tended to live longer. In EPNEC treated with platin, high expression of Bcl2 was associated with poor prognosis. We could not identify additional predictive or prognostic biomarkers.

Descriptors: neuroendocrine carcinoma; small cell lung carcinoma; biomarkers, tumor; prognosis; survivorship; ERCC1; Bcl-2; Lin28a; Ki67; retrospective studies.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Classificação

Os tumores neuroendócrinos (TNE) abrangem um vasto grupo de neoplasias definidas pela presença de células que tem a capacidade de produzir hormônios polipeptídicos e agentes biologicamente ativos¹. As células neuroendócrinas são amplamente distribuídas nos tecidos e, por esse motivo, neoplasias dessas células podem surgir nas mais variadas topografias e apresentar características heterogêneas. O tratamento e o prognóstico de pacientes com TNE são determinados por uma série de fatores, incluindo o sítio primário do tumor, o grau de diferenciação e o estadiamento.

Apesar de ser considerada uma neoplasia rara, a incidência de TNE vem aumentando nos últimos anos, como demonstrado por Yao J *et al.* em um estudo retrospectivo que mostrou que de 1973 (1,09/100.000 habitantes) a 2004 (5,25/100.000 habitantes) houve um aumento em 5 vezes da incidência desta neoplasia na população americana². De forma semelhante, a incidência de TNE na população de Ontário (Canadá) aumentou de 2,48 (1994) para 5,86 (2009) casos por 100mil habitantes³.

Embora outros sítios primários sejam relatados, 35-55% de todos os TNE extra-pulmonares tem como sítio primário o trato gastrointestinal e em torno de metade dos casos apresentam-se como metastáticos ao diagnóstico^{2,4,5}.

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) atualizada em 2010, os TNE são divididos em:¹ neoplasia neuroendócrina, que pode ser grau 1 ou grau 2 (G1/ G2), e² carcinoma neuroendócrino (CNE) ou grau 3 (G3), de pequenas células ou de grandes células⁶. O grau histológico refere-se à agressividade biológica inerente do tumor, enquanto a diferenciação refere-se à semelhança ou não das células

neoplásicas com células neuroendócrinas não tumorais, ou seja, quanto mais indiferenciado o tumor, menor será sua semelhança com sua célula homóloga não neoplásica. Os tumores com mais de 20 mitoses por 10 campos de grande aumento ou um índice de proliferação Ki-67 superior a 20% representam os carcinomas neuroendócrinos de alto grau (G3), que como regra geral são pouco diferenciados e altamente agressivos. Já os tumores neuroendócrinos G1 e G2 apresentam até 20 mitoses por 10 campos de grande aumento e índice de proliferação Ki67 até 20%, sendo bem diferenciados e habitualmente manifestam-se com uma evolução clínica mais indolente⁷⁻⁹. Contudo, existe o conceito de que alguns tumores bem diferenciados poderiam ser biologicamente de alto grau, ou seja, dentre os carcinomas neuroendócrinos ou G3, apesar da grande maioria ser formada por carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado (CNPd), existem alguns tumores bem diferenciados¹⁰. Não há dados prospectivos que mostrem se há alguma diferença no comportamento dos CNPD em relação aos CNE bem diferenciados, sendo ambos classificados como G3 e tratados da mesma maneira. Porém, estudo retrospectivo apresentado em junho de 2015 no Congresso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) avaliou, de forma retrospectiva, 45 pacientes com CNE de pâncreas, onde 16 eram bem diferenciados e 29 pouco diferenciados. Foi observada uma maior taxa de resposta (37%) à quimioterapia baseada em platina dentre os CNPD, porém com uma menor sobrevida global (10,1 meses), quando comparado com os CNE bem diferenciados (taxa de resposta = 10%; sobrevida global mediana de 52 meses)¹¹. Dado semelhante também foi mostrado por Basturk et al.¹², onde houve maior SG mediana nos CNE bem diferenciados em relação aos CNPD (respectivamente, 54,1 vs 11 meses; $p=0,002$). Klimstra et al.¹³ mostrou que os TNE bem diferenciados podem apresentar componente de alto grau e que isso influencia no prognóstico da doença; neste estudo, comparando apenas tumores primários de pâncreas, 21 pacientes com TNE bem diferenciados G1/G2 com componente de alto grau apresentaram SG mediana de 55 meses, enquanto os que não possuíam este componente tiveram SG de 162 meses e os CNPD de 16

meses ($p < 0,001$). Esses resultados sugerem que o grupo de tumores classificados como G3 é heterogêneo e pode ser composto por carcinomas bem diferenciados com alta taxa de proliferação e carcinomas pouco diferenciados. Os CNE apresentam uma incidência de aproximadamente 1.000 novos casos por ano nos Estados Unidos e, apesar dos avanços recentes, ainda são associados a um prognóstico limitado e a taxas de cura extremamente baixas^{4,14}.

Os tumores neuroendócrinos de pulmão incluem o carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC), carcinoma neuroendócrino de grandes células, tumor carcinoide típico e tumor carcinoide atípico. O CPPC é classificado como carcinoma neuroendócrino de alto grau, com alto índice mitótico (maior que 10 mitoses em 10 campos de grande aumento), habitualmente apresentando um comportamento clínico agressivo e representando aproximadamente 15% de todas as neoplasias pulmonares^{15,16}. Este carcinoma geralmente apresenta extensa necrose e é composto por células neoplásicas pequenas que, por definição, não podem ser maiores do que três vezes o tamanho de um linfócito. Os tumores carcinoides apresentam morfologia carcinoide, sendo o índice mitótico nos típicos inferior a 2 mitoses por 10 campos de grande aumento (CGA) e entre 2 e 10 mitoses por 10 CGA nos atípicos, podendo estes últimos apresentarem necrose. Já o termo carcinoma neuroendócrino de grandes células refere-se ao grupo de tumores pulmonares que, apesar de apresentarem fenótipo neuroendócrino, não preenchem critérios para serem classificados em um dos outros três tipos bem reconhecidos (CPPC, tumor carcinoide típico e tumor carcinoide atípico). As células tumorais tendem a ser poligonais, com uma baixa relação núcleo: citoplasma, geralmente com tamanho maior do que as células encontradas nos CPPC e, por definição, devem ser três vezes maiores que o tamanho de um linfócito. Segundo os critérios da OMS, o índice mitótico deve ser superior a 10 em 10 CGA^{16,17}.

Segundo a classificação do VALG (*Veterans Administration Lung Study Group*), os CPPC podem ser subdivididos em doença limitada e doença extensa. Os pacientes com doença limitada são aqueles que apresentam,

além do tumor primário, envolvimento ganglionar regional limitado a um hemitórax, os quais podem ser envolvidos em um só campo de radioterapia. Já os pacientes com doença extensa apresentam neoplasia além de um único campo de radioterapia, estando incluído o derrame pleural maligno, linfonodos hilares contralaterais, linfonodos supraclaviculares contralaterais e qualquer outro sítio de metástase à distância¹⁵. Dois terços dos casos apresentam-se com doença extensa ao diagnóstico, com a SG mediana em torno de 7 a 11 meses, enquanto a mediana de sobrevida global dos pacientes com doença limitada pode ultrapassar os 20 meses^{16,18}.

1.2 Tratamento

A ressecção cirúrgica completa é a única modalidade terapêutica curativa para os tumores neuroendócrinos em geral, reservada para estágios precoces da doença¹⁹. A terapia local definitiva com radioterapia associada à quimioterapia sistêmica também pode ser utilizada em pacientes com doença localizada, porém não elegíveis à cirurgia²⁰. Contudo, como a maior parte dos pacientes já apresenta doença à distância no momento do diagnóstico, o uso de modalidades curativas de tratamento é limitado.

Em contraste com os tumores neuroendócrinos G1 e G2, os pacientes com CNE avançados frequentemente respondem à quimioterapia citotóxica, alcançando taxas de resposta entre 40 e 80%, porém com mediana de sobrevida raramente excedendo 1 ano^{21,22}. No entanto, devido à sua raridade, a falta de estudos prospectivos controlados tem limitado a definição de um regime de quimioterapia padrão. Com base na semelhança no comportamento e nas características histopatológicas, os regimes de quimioterapia originalmente desenvolvidos para CPPC foram testadas e revelaram diferentes graus de atividade. Estudos com cisplatina ou carboplatina associado a etoposídeo (EP) mostraram taxa de resposta em até 86% dos casos de CPPC²³. Esta combinação também resultou em atividade antitumoral elevada em pacientes com CNE extra-pulmonar, com

taxa de resposta de 30 a 67%, duração de resposta mediana variando entre 8 a 11 meses e sobrevida global mediana (SG) entre 10 e 19 meses^{14,22,24,25}.

Outro esquema ativo em CPPC é a combinação de irinotecano e cisplatina (IP), a qual mostrou taxa de resposta, sobrevida livre de progressão (SLP) e SG semelhantes a EP, porém com menor toxicidade hematológica^{26,27}. Com base nestes resultados, esse esquema também foi testado em pacientes com CNE extra-pulmonar. Estudos retrospectivos, entre eles um estudo conduzido pelo nosso grupo, avaliaram a atividade de IP neste cenário, com taxa de resposta variando entre 36,4 e 75%, SLP entre 3,4 e 7,3 meses e SG entre 10 e 13 meses^{1,28-32}.

Apesar do tratamento sistêmico baseado em platina utilizado em CNE extra-pulmonar originar-se a partir dos dados de tratamento dos CPPC, não sabemos se as duas doenças respondem de forma semelhante. Terashima *et al.* mostraram, em estudo retrospectivo com 136 pacientes (41 com CNE extra-pulmonar e 95 com CPPC), que os resultados da quimioterapia baseada em platina são superiores para CPPC quando comparado ao mesmo tratamento utilizado em CNE extra-pulmonares: taxa de resposta 77,8% e 30,8%, respectivamente ($p < 0,001$) e SG mediana 13,6 e 9,2 meses, respectivamente ($p = 0,067$)³³. Possivelmente, tal diferença seja decorrente de distintas biológicas. Por exemplo, um estudo retrospectivo verificou que o Bcl-2 está hiperexpresso em aproximadamente 33% dos CNE extra-pulmonares versus 75-95% dos casos de CPPC^{5,34}, o que poderia contribuir para as diferentes taxas de resposta observadas no estudo anterior. Outra limitação é a heterogeneidade do grupo G3, que, no estudo de Terashima *et al.*, pode ter subestimado a TR caso o grupo G3 fosse enriquecido com pacientes com tumores bem diferenciados.

1.3 Justificativa do Estudo

Com o aumento das opções terapêuticas, estudos que orientem a escolha do melhor tratamento inicial para cada paciente são de fundamental

importância. O desenvolvimento de terapias individualizadas com base nas características específicas do paciente e da neoplasia deve ser o objetivo do tratamento oncológico. Para isso, é de grande importância reconhecer biomarcadores preditivos e prognósticos relacionados ao tumor e a implicação destes na terapia oferecida e, assim, individualizar e guiar a escolha do tratamento. No caso dos CNE, a literatura sobre tratamento sistêmico não só é escassa, como a evidência científica sobre biomarcadores preditivos de resposta é inexistente.

Como mostrado acima, aproximadamente 30 a 75% dos pacientes expostos à quimioterapia baseada em platina (IP e EP) respondem ao tratamento, ou seja, entre 25% a 70% dos casos, a depender do estudo, não apresentam resposta tumoral objetiva quando expostos a este esquema em primeira linha. Sendo assim, o uso de fatores preditivos de resposta à quimioterapia baseada em platina pode auxiliar na seleção de pacientes que melhor se beneficiarão desta terapia.

Este estudo busca descrever e comparar, de forma retrospectiva, a frequência da expressão de biomarcadores em carcinomas neuroendócrinos e carcinomas de pulmão de pequenas células avançados tratados com quimioterapia baseada em platina e correlacioná-los com a resposta ao tratamento. Ou seja, determinar se os biomarcadores estudados têm papel preditivo de resposta a platina e/ou prognóstico para SG, bem como analisar se a possível diferença na expressão destes biomarcadores nos CPPC e CNE extra-pulmonares pode ser uma das justificativas para a diferença de quimiossensibilidade sugerida na literatura.

1.4 Biomarcadores Selecionados para Análise

Foram escolhidos quatro possíveis biomarcadores para análise: *ERCC1* (*Excision repair cross-complementation group 1*), *Lin28a*, *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*) e *Ki67*. O primeiro foi escolhido por ter se relacionado à resistência à platina em estudos de outras neoplasias. O segundo e o

terceiro, devido sua maior expressão em tumores pouco diferenciados, o que poderia influenciar tanto no prognóstico quanto na resposta à quimioterapia. Além disso, a diferença na hiperexpressão do Bcl-2 nos CPPC e nos CNE mostrada anteriormente influenciou na sua escolha. Já o Ki67 foi escolhido por desempenhar importante papel na classificação, história natural e escolha do tratamento nos tumores neuroendócrinos. A seguir, detalharemos cada um dos quatro biomarcadores.

1.4.1 ERCC1 (Excision repair cross-complementation group 1):

Os quimioterápicos derivados da platina atuam promovendo a formação de pontes estáveis nas fitas de DNA, levando secundariamente a alteração da molécula de DNA e morte celular³⁵. Em algumas situações, entretanto, a ativação de mecanismos de reparação do DNA lesado pode corrigir os defeitos gerados pela platina, mantendo a viabilidade da célula. A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é uma das cinco vias de reparo do DNA conhecidas (as demais são: reparo de pareamentos errados, reparo por excisão de bases, reversão direta do dano e reparo da quebra em fita dupla), sendo considerada a mais importante na correção das alterações geradas pela platina e, por isso, tem sido reconhecida como uma das vias de resistência tumoral a esse agente^{36,37}. Os passos fundamentais dessa via incluem o reconhecimento e demarcação da região do DNA que foi lesada, seguida pela formação de um complexo que expõe e retira essa região com a síntese de uma nova sequência e ligação desta na fita de DNA. A proteína “*excision repair cross-complementation group 1*” (*ERCC1*) tem uma função essencial na via NER, sendo responsável, conjuntamente com a proteína complementar F do Xeroderma pigmentoso (*Xeroderma pigmentosum complementation group F – XPF*), pela excisão da região de DNA a ser reparada.

É possível avaliar a expressão do *ERCC1* através do estudo do DNA, do RNA ou do produto final que é a proteína formada. Desta forma, existem

três maneiras para determinar sua expressão: imunoistoquímica, que avalia a expressão da proteína; reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), que observa a expressão do RNA; e o sequenciamento genômico, que analisa os polimorfismos do DNA associados a maior expressão da proteína (o mais conhecido polimorfismo de ERCC1 situa-se no códon 118 e está relacionado ao nível de expressão da proteína)³⁷.

A alta expressão de *ERCC1* determinada por PCR foi associada a menor sobrevida global em pacientes com câncer colorretal tratados com 5-FU e oxaliplatina³⁸. Revisão publicada em 2011 que avaliou o papel do *ERCC1* neste tipo de neoplasia mostrou que apenas os estudos que utilizaram o método de PCR conseguiram demonstrar o papel deste biomarcador como preditor de resistência à quimioterapia com oxaliplatina³⁷. A maior expressão de mRNA do gene *ERCC1* também foi marcador de mau prognóstico em pacientes portadores de câncer de esôfago tratados com quimiorradioterapia (5-FU + cisplatina concomitante a radioterapia), seguida por cirurgia³⁹, e em pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico tratados com 5-FU e cisplatina⁴⁰.

Lord *et al.*⁴¹ demonstraram que a baixa expressão de mRNA do gene *ERCC1* analisada em 56 pacientes portadores de câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC) avançado tratados com gencitabina e cisplatina foi preditiva de ganho de sobrevida. Em 2006, a expressão de *ERCC1*, avaliada através de imunoistoquímica, foi analisada em 761 pacientes com CPNPC localizados e ressecados que foram randomizados entre tratamento com quimioterapia adjuvante baseada em platina ou observação. A sobrevida global da população do estudo em 5 anos foi de 43% (95% IC 39% - 47%). Observou-se maior SLP (risco relativo 0,65; 95% CI, 0,50 a 0,85; P = 0,001) e maior sobrevida global (risco relativo 0,65; 95% CI, 0,50 a 0,86; P = 0,002) no grupo com baixa expressão de *ERCC1* tratados com quimioterapia quando comparado ao grupo controle. Entretanto, nos pacientes com tumores com elevada expressão da *ERCC1*, não houve diferença de sobrevida quando comparado o grupo tratado com

quimioterapia com o grupo controle (risco relativo 1,14; 95% CI, 0,84 a 1,55; $p = 0,40$). Contudo, a análise somente dos pacientes não tratados com quimioterapia revelou maior sobrevida global em 5 anos no grupo com maior expressão da *ERCC1* quando comparado com o grupo de baixa expressão (risco relativo ajustado 0,66; 95% CI, 0,49 a 0,90; $P = 0,009$)⁴². Esses dados mostram que o *ERCC1* tanto pode ser preditor de resistência a platinas como a sua alta expressão, em um cenário onde não há exposição a este quimioterápico, pode estar relacionada a melhor prognóstico. Desde então, vários estudos analisaram a relevância clínica da expressão *ERCC1* por imunohistoquímica como fator prognóstico e preditivo de resposta em neoplasias de esôfago, estômago, cabeça e pescoço, colorretal e ovário⁴³⁻⁴⁷. Um novo estudo publicado em 2013⁴⁸ tentou validar os dados publicados por Olausson *et al.*⁴² em 2006 através de nova análise da expressão do *ERCC1* em 77,3% dos pacientes que participaram deste estudo e de outros 494 pacientes dos estudos JBR.10⁴⁹ (314 pacientes) e CALGB 9633⁵⁰ (180 pacientes). Houve uma discordância de 36% entre a análise da expressão vista em 2006 e a nova avaliação feita em 2013, com um maior número de pacientes apresentando hiperexpressão de *ERCC1* neste segundo estudo (44% vs 78%). Uma possível explicação para isso é que, apesar de ter sido utilizado o mesmo anticorpo para realização de imunohistoquímica, o lote utilizado foi diferente, podendo o segundo lote ser mais sensível que o primeiro. O mesmo estudo avaliou 123 amostras de tumor por PCR e observou que existem 4 isoformas de *ERCC1* (*ERCC1-201*; *ERCC1-202*; *ERCC1-203* e *ERCC1-204*), as quais estão expressas de forma heterogênea entre as linhagens celulares e amostras tumorais e, destas, apenas a isoforma *ERCC1-202* tem funcionalidade no reparo das alterações causadas pela platina no DNA. Não é possível identificar quais das isoformas estão mais expressas no tumor através de imunohistoquímica.

O impacto da expressão do *ERCC1* em CPPC também vem sendo estudado por alguns autores. Lee *et al.*⁵¹ avaliaram 77 pacientes com CPPC (40 com doença limitada e 37 com doença extensa) e observaram, através de imunohistoquímica (anticorpo *ERCC1* Ab-2), uma hiperexpressão de

ERCC1 em 17% deles, a qual foi associada com pior prognóstico nos pacientes tratados com quimioterapia baseada em platina com ou sem radioterapia, tendo a análise multivariada mostrado significância estatística apenas nos casos estadiados como doença limitada ($p=0,046$). Resultado semelhante foi visto por Ceppi *et al.*⁵², porém neste estudo a expressão de *ERCC1* foi avaliada através de PCR. Rossi *et al.*⁵³ investigaram o papel da expressão de *ERCC1* avaliada por imunoistoquímica (anticorpo *ERCC1* 8F1), em 105 pacientes com CPPC, observando que o grupo (33 pacientes) com doença limitada apresentava uma menor expressão de *ERCC1* quando comparado ao grupo (72 pacientes) com doença extensa (30% e 50% com hiperexpressão de *ERCC1*, respectivamente – $p = 0,046$). Pacientes com doença limitada e *ERCC1* negativo tiveram melhor SG, porém sem alteração na taxa de resposta quando comparado com os *ERCC1* positivos, sugerindo que o *ERCC1* pareça ter mais um papel prognóstico nos CPPC com doença limitada do que um papel preditor de resposta à quimioterapia. Diferente desses três estudos, Kim *et al.*⁵⁴ e Sodja *et al.*⁵⁵, que estudaram de forma retrospectiva e através de imunoistoquímica (anticorpo *ERCC1* 8F1), respectivamente, 130 pacientes (112 com doença extensa e 18 com doença limitada) e 77 pacientes com CPPC (51,9% com hiperexpressão de *ERCC1*; 32 pacientes com doença limitada e 45 com doença extensa), não encontraram associação entre expressão imunoistoquímica de *ERCC1* e sobrevida ou resposta à quimioterapia.

Uma coorte retrospectiva publicada recentemente comparando dois anticorpos que avaliaram a expressão de *ERCC1* (clones 8F1 e SP68) em carcinoma de pulmão não pequenas células (adenocarcinoma e carcinoma epidermóide) mostrou que houve diferença no padrão de expressão destes na imunoistoquímica, tendo o clone SP68 um padrão mais nuclear, enquanto o 8F1 apresentou um padrão citoplasmático e nuclear. Não houve diferença nos resultados obtidos quando avaliado o papel prognóstico da expressão de *ERCC1* em pacientes não submetidos à quimioterapia adjuvante, independente do anticorpo utilizado. Porém, no subgrupo com carcinoma epidermóide de pulmão que recebeu quimioterapia baseada em platina, o

uso do clone SP68 mostrou que os indivíduos com baixa expressão de *ERCC1* apresentaram maior SG em relação aqueles com alta expressão, o que não foi visto quando utilizado o clone 8F1.⁵⁶

Certos polimorfismos do *ERCC1* também parecem influenciar o prognóstico e a resposta à quimioterapia em pacientes com CPPC tratados com platina. Yu *et al.*⁵⁷ identificaram dois polimorfismos funcionais -433T>C e 262G>T - e estudaram seu impacto nos desfechos de 162 pacientes com CPPC expostos à quimioterapia com platina (devido à raridade, o polimorfismo -433T>C foi excluído da análise), sendo observada uma associação entre o 262G>T e a taxa de resposta à quimioterapia (dentre os respondedores, 42,7% apresentavam o genótipo 262GG, enquanto nenhum dos não-respondedores carregavam esse genótipo; $p=0,005$). Além disso, os pacientes com genótipo 262GG (menor expressão de *ERCC1*) apresentaram maior SG que os com 262GT (30 vs 19 meses; $p=0,025$) ou os com 262TT (30 vs 17 meses; $p=0,005$).

Mais recentemente, estudo retrospectivo analisou, através de PCR, o valor preditivo do *ERCC1*, *BRCA1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPOI*, *TOPOIIA*, *TOPOIIB* e *C-MYC* em 184 pacientes com CPPC (65% com doença extensa) que receberam cisplatina e etoposídeo como primeira linha de tratamento. Observou-se que, nos pacientes com doença limitada, a alta expressão de *ERCC1* ($p=0,028$), *PKM2* ($p=0,046$), *TOPOI* ($p=0,008$), *TOPOIIA* ($p=0,002$) e *TOPOIIB* ($p<0,001$) foi associada com uma menor SLP, enquanto menor SG foi vista nos pacientes com hiperexpressão de *ERCC1* ($p=0,014$), *PKM2* ($p=0,026$), *TOPOIIA* ($p=0,021$) e *TOPOIIB* ($p=0,019$). Já nos pacientes com doença extensa, apenas a alta expressão de *TOPOIIB* teve impacto negativo na SG ($p=0,035$). Por outro lado, no momento em que foi analisada a presença do grupo de alterações favoráveis conjuntamente (baixa expressão de *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* e *TOPOIIB*), houve correlação com aumento de SLP e SG tanto nos tumores com doença limitada ($p<0,001$ e $p=0,007$, respectivamente) quanto naqueles com doença extensa ($p=0,007$ e $p=0,011$, respectivamente). A assinatura genética desfavorável foi um preditor independente de pior SLP (HR: 3,18;

$p=0,002$ e HR: 3,14; $p=0,021$) e SG (HR: 4,35; $p=0,001$ e HR: 3,32; $p=0,019$) em ambas doenças limitada e extensa, respectivamente⁵⁸.

Devido a esses resultados conflitantes e variados, uma metanálise de 23 estudos retrospectivos (dados extraídos de estudos publicados) avaliou a expressão de *ERCC1* (através de imunoistoquímica em 15 estudos e por PCR nos demais) como fator prognóstico e/ou preditivo em câncer de pulmão⁵⁹. Três dos estudos eram em CPPC e o restante, em CPNPC. Nestes, houve correlação entre a alta expressão de *ERCC1* e pior sobrevida global, bem como menor resposta à quimioterapia baseada em platina. Porém, nos pacientes com diagnóstico de CPPC (292 pacientes, sendo 32% com alta expressão de *ERCC1*), não houve associação significativa entre alta expressão de *ERCC1* e sobrevida global, ainda que pareça haver uma tendência para maior taxa de resposta à quimioterapia baseada em platina (RR=1,14, IC 95%: 0,99-1,31, $p=0,08$; $I^2=0\%$). Na análise exploratória, a alta expressão de *ERCC1* nos CPPC foi associada à pior sobrevida global nos pacientes com doença limitada, entretanto estes dados provêm somente de dois dos estudos com número limitado de pacientes (já descritos previamente)⁵⁹.

Sobre os tumores neuroendócrinos, apenas um estudo avaliou a expressão do *ERCC1* como fator preditivo nos neuroendócrinos de pulmão não pequenas células. Skov BG *et al.*⁶⁰ estudaram a expressão do *ERCC1* por imunoistoquímica em 186 pacientes com CPPC tratados com quimioterapia baseada em platina e 90 pacientes com outros TNE pulmonares (carcinoide típico, carcinoide atípico e carcinoma neuroendócrino de grandes células) tratados cirurgicamente. Não foi observada associação entre a expressão de *ERCC1* e SG nos casos de CPPC, porém apenas 10% desses tumores expressavam o *ERCC1*. Nos pacientes com carcinoide típico (*ERCC1* hiperexpresso em 79% casos) e atípico (67% de hiperexpressão de *ERCC1*) submetidos à cirurgia como único tratamento, foi observada maior sobrevida global nos que tinham expressão aumentada deste biomarcador ($p=0,001$ e $p=0,008$, respectivamente), enquanto nos casos de carcinoma neuroendócrino de

grandes células (hiperexpressão em 19% dos pacientes) esta diferença em sobrevida não foi observada ($p=0,51$). Porém, é difícil interpretar esses dados, visto que pacientes com TNE pulmonares bem diferenciados tendem a viver por vários anos, e por isso, os estudos tem poucos eventos de morte para análises, e geralmente não respondem à quimioterapia com platinas.

Não há dados na literatura que avaliem o papel do *ERCC1* em CNE extra-pulmonares expostos à platina ou mostrem se há diferença na expressão do *ERCC1* entre estes e os CPPC, o que, caso comprovado, formularia uma hipótese de ser essa uma das causas de diferença de quimiossensibilidade entre as duas patologias. Além disso, diante do exposto, o estudo da expressão de *ERCC1* nestas populações poderia auxiliar na seleção de pacientes com maior chance de resposta à quimioterapia baseada em platina. O melhor método para avaliar a expressão de *ERCC1* ainda não está definido, visto os resultados variados reportados com as técnicas de imunoistoquímica, PCR e polimorfismos de DNA. Desta forma, optamos por utilizar a técnica de imunoistoquímica devido sua menor complexidade, menor custo e mais fácil aplicabilidade prática.

1.4.2 Lin28a

O Lin28 (também conhecido como Lin28a), uma proteína ligadora do RNA altamente conservado entre as espécies, é reconhecida como um dos reguladores da diferenciação tecidual, sendo associado a outros fatores de transcrição, capaz de promover a reprogramação celular de fibroblastos humanos adultos em células-tronco pluripotentes⁶¹. Mais recentemente, o Lin28a foi identificado como um importante modulador do processamento da família de microRNAs let-7.⁶² No processo de reprogramação celular, o Lin28a restabelece funcionalmente o c-MYC, um alvo conhecido do let-7, sugerindo que o Lin28a promove a reprogramação por meio da inibição da produção do let-7 maduro^{63,64}. Adicionalmente ao c-MYC, diversos outros

oncogenes são alvos conhecidos do let-7, incluindo o K-Ras e a ciclina D1⁶⁵. Desta forma, a alta expressão de Lin28a inibiria o microRNA let-7, o qual tem ação como supressor tumoral; assim, os oncogenes que em células não cancerígenas são suprimidos pelo let-7, com sua inibição seriam agora estimulados. O papel do Lin28a como repressor do processamento da família de microRNAs let-7 sugere que a repressão do let-7 seja importante também no estabelecimento do estado pluripotencialidade, com maior proliferação e menor diferenciação celular⁶² miRNAs maduros da família do let-7 são pouco expressos em células-tronco embrionárias, mas seus precursores primários são facilmente detectados⁶⁶. Isso mostra que o Lin28a age como um regulador pós-transcricional do miRNA let-7.

Viswanathan e cols.⁶⁷ demonstraram que o Lin28a pode promover transformação maligna e que a ativação deste gene ocorre em diversos tumores humanos, em uma frequência aproximada de 15%. Além disso, a expressão do Lin28a foi recentemente correlacionada com prognósticos nesses tumores^{67,68}. Notavelmente, o Lin28a é especificamente hiperexpresso nos subgrupos de neoplasias pouco diferenciadas e que carregam um pior prognóstico⁶⁷.

Apesar do seu já sabido papel na carcinogênese, os mecanismos de regulação e de ação do Lin28a e do Let-7 ainda não estão totalmente esclarecidos. Em estudo recente, Xiaoyu Ma *et al.*⁶⁹ mostraram que o Lin28a estimula, enquanto let-7 suprime, a glicólise aeróbica via PDK1 (*piruvato desidrogenase quinase 1*) nas células cancerígenas, desviando o metabolismo da célula para a via glicolítica ao invés da fosforilação oxidativa (efeito Warburg⁷⁰). Até então já era conhecido que o PDK1 era um alvo direto de HIF-1 (*hipoxia-inducible factor-1*), o qual é produzido em situações de hipóxia. Os resultados deste estudo demonstraram que o eixo Lin28a/let-7 regula PDK1 de uma forma que é independente de oxigênio ou de HIF-1, ou seja, o PDK1 pode estar estimulado na célula cancerígena tanto em situações aeróbicas (via Lin28a/let-7) quanto em hipóxia (via HIF-1), alterando o metabolismo das células à glicose e promovendo a proliferação

celular. Diante deste achado, o PDK1 pode vir a ser um alvo terapêutico nas células com hiperexpressão de Lin28a.

Através do seu papel no controle do processamento do let-7, o Lin28a parece ter papel, também, na predição de resposta ao tratamento antineoplásico. A redução da expressão do let-7, e consequente maior atividade do Lin28a, foi relacionado à radiorresistência de linhagens celulares em estudos *in vitro*⁷¹. De modo inverso, o bloqueio da expressão do Lin28a em uma linhagem de células de câncer de pulmão radiorresistentes levou ao aumento dos níveis de let-7 e expressão diminuída do K-RAS, resultando em maior radiosensibilidade⁷². Do mesmo modo, a família let-7 tem sido relacionada à resposta a diversos quimioterápicos. A menor expressão de let-7 foi associada a quimiorresistência em linhagens celulares de neoplasia de ovário⁷³, pâncreas⁷⁴ e cabeça-pescoço⁷⁴. Nakajima *et al.*⁷⁵ estudaram 46 amostras de pacientes com câncer colo-retal, relacionando a expressão de let-7g com resposta ao tratamento quimioterápico com S-1, um antineoplásico baseado em fluoruracil. Yang *et al.*⁷⁶ estudaram amostras de 72 neoplasias de ovário avançadas e relacionaram o menor nível de let-7i tanto a menor resposta a esquemas baseados em platina, como a menor tempo para progressão e sobrevida. Mais recentemente, Lu *et al.*⁷⁷ estudaram amostras de 178 pacientes com neoplasia de ovário. Nesse estudo, não considerando o tratamento oferecido, a menor expressão de let-7 foi relacionado a pior sobrevida. Analisando o grupo de pacientes tratados com esquema baseado em platina, mas sem uso de taxano, a maior expressão de let-7a foi relacionada à menor chance de progressão de doença e morte. Entretanto, no grupo de pacientes tratados com a combinação de platina e taxanos, a maior expressão de let-7 foi associada a maior risco de morte, sugerindo que o nível de expressão de let-7 possa ser útil para definição da terapia a ser oferecida.

Ainda que a baixa atividade de let7, e consequente aumento da expressão de Lin28a, seja frequente em neoplasias pouco diferenciadas, não sabemos qual sua frequência nos CNE extra-pulmonares ou nos CPPC,

tumores sabidamente pouco diferenciados e agressivos. Assim, baseado na relação inversa da expressão de Lin28a e let-7, e na facilidade da avaliação do Lin28a por imunoistoquímica, é justificável a avaliação deste como possível preditor de resposta ao tratamento quimioterápico baseado em platina e também como prognóstico em pacientes com carcinomas neuroendócrinos e CPPC.

1.4.3 Bcl-2

A família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) constitui-se de proteínas que desempenham função na regulação da apoptose celular por meio do controle da permeabilidade mitocondrial, subdividindo-se em proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas⁷⁸. As proteínas pro-apoptóticas Bad, Bid, Bax e Bim residem no citosol, onde promovem a liberação de citocromo C, que se liga e ativa uma proteína adaptadora chamada de Apaf-1, que, por sua vez, ativa pró-caspases, levando à morte celular^{79,80}. Já a proteína Bcl-2 propriamente dita e a Bcl-xl têm função anti-apoptótica, residem na parede externa da mitocôndria e inibem a liberação do citocromo C⁸¹. Alguns estudos mostraram que a degradação de Bcl-2 está associada com a geração de espécies reativas de oxigênio. Em células de câncer de pulmão, a formação destas é induzida por alguns agentes pró-apoptóticos, como a cisplatina, o cromo e o ácido lipóico^{82,83}. A apoptose induzida por cisplatina é mediada através da morte mitocondrial, que é regulada pelo Bcl-2⁷⁵. Este quimioterápico, assim como os taxanos, induz a regulação negativa da expressão de Bcl-2 por meio de um processo que envolve a desfosforilação e ubiquitinação das proteínas, o que facilita a sua degradação pelo proteassoma, e assim levam à morte celular^{84,85}.

O valor prognóstico da super-expressão do Bcl-2 já foi estudado em alguns tipos de tumores sólidos, com resultados variados. No câncer colorretal, observa-se maior expressão do Bcl-2 em tumores em estádios precoces quando comparados com estádios mais avançados, o que sugere

um melhor prognóstico para os pacientes que apresentam essa proteína super-expressa^{86,87}. Nos carcinomas de Merkel, que são tumores agressivos de origem neuroendócrina, também foi identificada maior expressão do Bcl-2 nos estadios mais precoces e houve uma associação positiva desta com o prognóstico (SG nos Bcl-2 positivos: 5 anos; SG nos Bcl-2 negativos: 2,1 anos; $p=0.01$)⁸⁸. Esta associação positiva também foi encontrada nos tumores gástricos avançados⁸⁹, carcinomas de laringe⁹⁰, e no câncer de mama⁹¹. Porém, nos linfomas de grandes células B⁹² e no glioblastoma multiforme⁹³, a hiperexpressão do Bcl-2 foi associado a pior prognóstico.

Halasova *et al.*⁹⁴ estudaram amostras tumorais de 76 pacientes com diagnóstico de CPPC ou CPNPC e mostraram uma super-expressão por imunoistoquímica de Bcl-2 de 92% e 75%, respectivamente ($p=0,15$). Como citado anteriormente, apesar desta proteína estar super-expressa nos CPPC, isso não ocorre nos CNE extra-pulmonares de origem gastrointestinal, onde a expressão foi encontrada em 33% dos casos^{5,34}. Sua elevada expressão nos CPPC sugere que esta proteína desempenhe papel importante na inibição da apoptose nesses tumores. No entanto, no estudo de Pal'tsevet *al.*⁹⁵, foi observado que a maior expressão de Bcl-2 ocorreu em tumores não metastáticos; porém, o maior acúmulo do Bcl-2 nestes casos foi nuclear, onde proteína está na sua forma fosforilada (inativa) e assim seu efeito anti-apoptótico é prejudicado. Coppola *et al.*⁹⁶ mostraram que, dentre os tumores neuroendócrinos de pulmão, a super-expressão de Bcl-2 está associada com tipos histológicos mais agressivos. Neste estudo, a expressão de Bcl-2 foi fortemente positiva em todos os pacientes com CPPC estudados (N=8) e em 91% dos carcinoides atípicos (N=11), enquanto nos carcinoides típicos (N=14) foi observada apenas fraca expressão em 21%⁹⁶. De forma semelhante, um outro estudo publicado no mesmo ano avaliou a expressão de Bcl-2 em 121 pacientes com tumores neuroendócrinos de pulmão (16 com carcinóide típico; 5, carcinóide atípico; 29, carcinoma de grande células; e 71, carcinoma de pequenas células) e a alta expressão de Bcl-2 por imunoistoquímica foi vista, respectivamente, em 18,7% (N=3), 0% (N=0), 89,6% (N=26) e 90,1% (N=64). A alta expressão de Bcl-2 (definida

por uma expressão ≥ 50 em um escore de 0-300) foi associada a menor sobrevida global no grupo que incluía carcinoide típico, carcinoide atípico e carcinoma de grandes células ($p=0,004$). O estudo não conseguiu demonstrar influência da expressão do Bcl-2 nos desfechos de taxa de resposta e sobrevida nos pacientes com CPPC⁹⁷.

A susceptibilidade para apoptose é pré-requisito essencial para que haja resposta à quimioterapia; portanto, a resistência à apoptose que pode ser resultado da alta expressão de proteínas anti-apoptóticas (ex: Bcl-2) é um dos prováveis mecanismos responsáveis pela carcinogênese e pela falha terapêutica em alguns tipos de tumores.

Dessa forma, nós formulamos a hipótese de que os CPPC podem apresentar uma diferença na resposta ao tratamento citotóxico quando comparados com os CNE extra-pulmonares devido à maior expressão de Bcl-2, o qual, nesse contexto, se comportaria como biomarcador prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento.

1.4.4 Ki67

O antígeno Ki67 é um importante marcador de proliferação celular e está presente em quase todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2, mitose); apenas as células quiescentes (que estão na fase G0) não expressam esta proteína. Particularmente nos tumores neuroendócrinos, tem singular importância devido ao seu papel na subclassificação diagnóstica, influenciando na história natural da doença e na escolha terapêutica⁹⁸.

Apesar de todos os pacientes com ki67 superior a 20% serem classificados como CNE (G3), Sorbye *et al.*⁹ mostraram, em estudo retrospectivo com pacientes com CNE extra-pulmonares (N=252 tratados com quimioterapia paliativa), que aqueles que apresentavam Ki67 $<55\%$ tinham menor taxa de resposta à quimioterapia baseada em platina (15% vs 42%, $p<0,001$), porém maior sobrevida global em relação ao grupo com Ki67 $> 55\%$ (14 meses vs 10 meses; $p<0,001$). O esquema quimioterápico

recebido (cisplatina + etoposídeo, carboplatina + etoposídeo ou carboplatina + etoposídeo + vincristina) não teve influência na SG e na taxa de resposta. Os principais fatores de pior prognóstico encontrados foram baixo *performance status*, sítio primário em cólon e desidrogenase láctica (DHL) aumentada.

De forma semelhante, porém com resultados diferentes, estudo⁹⁹ apresentado na ASCO 2015 avaliou o papel prognóstico do Ki67 em 294 pacientes, tendo 202 deles recebido quimioterapia baseada em platina (principal esquema aplicado foi a combinação com etoposídeo). Este estudo não conseguiu mostrar diferença em sobrevida global entre os grupos com $ki67 > 55\%$ e $Ki67 \leq 55\%$; além disso, também não houve influência do sítio primário na SG. Os fatores associados a pior prognóstico na análise multivariada foram pior *performance status* (ECOG-PS > 1), doença metastática, e DHL e enolase neurônio específica elevados mais que duas vezes o limite superior da normalidade.

Diante da hipótese gerada por Sorbye *et al.*⁹, consideramos importante a avaliação do Ki67 como fator prognóstico e preditivo de resposta em nossos pacientes.

2 HIPÓTESES

2 HIPÓTESES

- I. A expressão protéica, avaliada através de imunoistoquímica, de ERCC1, lin28a, Bcl2 ou ki67 tem influência preditiva de resposta e/ou prognóstica nos pacientes com CPPC e CNE extra-pulmonares tratados com quimioterapia baseada em platina.
- II. Na análise comparativa entre os pacientes com CPPC e CNE expostos a esquemas que contenham platina, pode haver uma diferença na expressão destes marcadores e nos desfechos clínicos (taxa de resposta e sobrevida global).
- III. Dentre os CNE extra-pulmonares, o grau de diferenciação e índice proliferativo ki67 pode ser fator prognóstico e preditivo de resposta à quimioterapia.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- I. Descrever e comparar, de forma retrospectiva, a frequência da hiperexpressão dos biomarcadores ERCC1, BCL2, Lin28a e Ki67 em CNE extra-pulmonar e CPPC avançados tratados com quimioterapia baseada em platina.
- II. Avaliar a influência da expressão destes marcadores na taxa de resposta à quimioterapia e sobrevida global nos dois grupos de pacientes.
- III. Comparar os desfechos (taxa de resposta e sobrevida global) entre os grupos de CNE extra-pulmonar e CPPC.
- IV. No grupo dos pacientes com CNE extra-pulmonares, comparar estes desfechos clínicos entre os carcinomas bem diferenciados e os pouco diferenciados.

4 DESFECHOS

O desfecho primário do estudo foi a taxa de resposta por RECIST - versão 1.1 (Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos - Anexo B)¹⁰⁰ após pelo menos um ciclo de tratamento com quimioterapia baseada em platina.

O desfecho secundário foi a sobrevida global mediana de cada grupo, a qual foi definida como intervalo de tempo entre a primeira dose recebida do tratamento em análise (quimioterapia baseada em platina) até o óbito por qualquer causa. Caso nenhum evento tenha ocorrido, a data da última avaliação foi usada como censura. Perda de seguimento também foi determinada como censura na análise dos eventos de sobrevida.

5 MÉTODOS

5.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo e exploratório de marcadores imunoistoquímicos preditivos de resposta a quimioterapia e/ou prognósticos em pacientes com carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado extra-pulmonar ou carcinoma de pulmão de pequenas células avançados tratados com quimioterapia baseada em platina.

Os desfechos de sobrevida e taxa de resposta foram comparados entre as populações compostas por indivíduos com alta expressão versus baixa expressão dos marcadores caracterizados anteriormente, assim como entre os pacientes com diagnóstico de CNE extra-pulmonar e CPPC. Dentre os com CNE extra-pulmonar, estes desfechos também foram comparados entre os grupos de tumores bem diferenciados e pouco diferenciados. As análises foram realizadas individualmente, para cada marcador considerado.

Todas as avaliações de resposta ou progressão neste estudo foram feitas pelo mesmo radiologista, utilizando os novos critérios internacionais propostos pelo comitê RECIST1.1¹⁰⁰.

O estadiamento através de exames de imagem, seguimento e tratamento dos pacientes foram realizados conforme protocolo institucional, com tomografias computadorizadas de tórax, abdome e pelve. Em relação ao esquema quimioterápico selecionado, a maior parte dos pacientes, conforme literatura apresentada acima e os protocolos das instituições, recebeu quimioterapia com cisplatina 25mg/m² (nos dias 1, 2 e 3) e etoposídeo 100mg/m² (nos dias 1, 2 e 3) ou com cisplatina 30mg/m² (nos dias 1 e 8) e irinotecano 60mg/m² (no dias 1 e 8) a cada 21 dias. Esquema alternativo com oxaliplatina 130mg/m² (no dia 1) e capecitabina 1000mg/m² de 12/12horas (do dia 01 ao dia 14) a cada 21 dias também foi aceito nos casos de CNE extra-pulmonares¹⁰¹.

5.2 Seleção de Pacientes

Os pacientes incluídos no estudo foram selecionados através de lista administrativa. Objetivando ampliar a procura e evitar possível falha de identificação destes pacientes, também foram feitas buscas através do banco de dados da farmácia clínica, onde todos os pacientes que receberam os esquemas quimioterápicos citados acima foram avaliados quanto ao seu tipo histológico e sítio primário e, caso confirmado como CPPC ou CNE extra-pulmonar, analisados os demais critérios de elegibilidade. Todas as análises foram feitas retrospectivamente.

Os pacientes foram recrutados de três centros: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês (HSL) e Instituto do Câncer do Ceará (ICC).

Todos os pacientes que estavam vivos no período de execução do estudo receberam, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o resgate e estudo dos blocos do tumor. (Anexo C)

5.3 Critérios de Elegibilidade

Foram elegíveis todos os pacientes que preencheram os critérios abaixo:

- 1 Diagnóstico histológico de carcinoma neuroendócrino G3 (ki67 > 20% ou índice mitótico > 20 mitoses/10 cga) de origem extra-pulmonar ou de carcinoma de pulmão de pequenas células;
- 2 Presença de material anatomopatológico adequado disponível para análise dos biomarcadores por imunoistoquímica;
- 3 Doença mensurável
- 4 Presença de exames radiológicos antes e após pelo menos um ciclo do tratamento para análise comparativa de resposta ou progressão por RECIST 1.1⁽¹⁰⁰⁾

- 5 Exposição a, no mínimo, um ciclo de quimioterapia baseada em platina;
- 6 TCLE preenchido e assinado pelos pacientes vivos no momento da pesquisa.

5.4 Tecido Tumoral

Foram aceitos materiais de biópsia em parafina de metástase à distância, linfonodos, ou sítio primário da neoplasia. A aquisição deste material foi proveniente de ressecção cirúrgica, biópsias por agulha grossa, *cell-block* de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou amostras com baixa representação tumoral, porém satisfatórios para avaliação por método tradicional de cortes inteiros. Okimoto et al. mostraram que há correlação entre a expressão de *ERCC1* avaliada em amostras coletadas por biópsia por agulha e aquelas coletadas através de ressecção cirúrgica¹⁰².

Todas as biópsias foram revisadas pelo mesmo patologista quanto a seu diagnóstico histopatológico (incluindo diferenciação celular) através de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e marcadores de origem celular neuroendócrinas (cromogranina e/ou sinaptofisina e/ou CD56), além da análise de ki-67 e índice mitótico.

5.5 Metodologia das Análises de Biomarcadores:

5.5.1 Micromatriz Tecidual (TMA):

Os estudos de imunoistoquímica dos biomarcadores ERCC1, Bcl2 e Lin28a foram realizados em Micromatriz Tecidual (*tissue macro array* – TMA) em alguns pacientes. Cortes histológicos representativos dos casos, corados pela Hematoxilina e Eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos

respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um bloco de parafina receptor através de um sistema mecanizado de precisão (*Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA*), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro foi alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, com o conjunto das amostras constituindo uma micromatriz tecidual (TMA) com 15 linhas e 10 colunas. Foram utilizados três fragmentos de cada amostra do bloco doador originadas de regiões diferentes para melhorar a amostragem do material durante a leitura. O bloco de TMA foi então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 µm (*Leica Instruments, Singapore*).

5.5.2 Imunoistoquímica:

Para a imunoistoquímica foi utilizado um conjunto de três lâminas para cada um dos marcadores examinados, seguindo-se o procedimento operacional padrão utilizado pela Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As lâminas contendo as amostras tumorais foram desparafinizadas em xilol em estufa aquecida a 60°C por 24 horas, seguido por hidratação sequencial com etanol (álcool absoluto – 02 vezes, álcool 95% - 02 vezes, álcool 75% - 01 vez, lavagens em água corrente e destilada). A recuperação antigênica foi feita por calor úmido sob pressão seguida por bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 6%, 20 volumes) em 5 banhos de 5 minutos cada, a temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-*phosphatebuffered saline*) 10 mM, pH 7.4, por 5 minutos e incubadas com os anticorpos primários (anti-ERCC1, anti-Bcl2, anti-Lin28a) diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e

ácidosódico (NaN₃) 0,1% por 30 min, a 37°C, e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Foram testados dois sistemas de detecção:

- REVEAL Polyvalent HRP cat# SPB-125, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA
- UltraVision LP Value Large Volume Detection System HRP Polymer, cat# TL-125-HLS, Thermo Scientific, Fremont, CA, EUA.

Três anticorpos foram avaliados, conforme diluições demonstradas nas tabelas abaixo:

I – REVEAL. Conforme protocolo da bula: Incubar por 10 min a temperatura ambiente com complemento. Escorrer o excesso e incubar com Conjugado – HRP mouse/rabbit por 15 min a temperatura ambiente.

Amostra controle	Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Tonsila	BCI2	124	1:200 1:400 1:800	Cell Marque, cat# 226M-96, Rockin, CA, EUA
Tonsila	ERCC1	SP68	1:100 1:200 1:400	Spring, cat# M3684 Pleasanton, CA, EUA
Testículo/seminoma	LIN28A	EPR4640	1:100 1:200 1:400	Epitomics, cat# 3533-1, Burligame, CA, EUA

II – ULTRAVISION. Conforme protocolo da bula: Incubar com o Value Primary Antibody Enhancer por 20 min a 37°C. Lavar em tampão PBS e incubar com Value HRP Polymer por 30 min a 37°C.

Amostra controle	Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Tonsila	BCI2	124	1:400 1:800	Cell Marque, cat# 226M-96, Rockin, CA, EUA
Cólon Carcinoma	ERCC1	SP68	1:100 1:200	Spring, cat# M3684 Pleasanton, CA, EUA
Testículo	LIN28A	EPR4640	1:50 1:100	Epitomics, cat# 3533-1, Burligame, CA, EUA

As lâminas foram lavadas em tampão PBS e incubada em solução com substrato cromogênico: 100 mg de 3, 3' DiaminobenzidineTetrahydrochloride (Sigma, D-5637, St Louis, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido; 1 mL de H₂O₂ 6%; 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

O precipitado castanho dourado indicou a presença do produto final da reação. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas em etanol seriado e xilol e montadas com lamínula e Entellanneu (Merck, 1.07961, Alemanha).

O cromógeno foi neutralizado com hipoclorito de sódio e descartado em frasco adequadamente identificado, conforme norma de biossegurança do IAL.

As análises da imunocoloração indicaram quais as diluições para execução das reações de imunoistoquímica:

Amostra controle	Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Tonsila	BCI2	124	1:400	Cell Marque, cat# 226M-96, Rockin, CA, EUA
Cólon Carcinoma	ERCC1	SP68	1:200	Spring, cat# M3684 Pleasanton, CA, EUA
Testículo	LIN28A	EPR4640	1:50	Epitomics, cat# 3533-1, Burligame, CA, EUA

Foram considerados controles positivos os tecidos sabidamente positivos para o anticorpo específico ou lisados de células transfectados que são comercialmente vendidos para este propósito e o controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário. Os compartimentos citoplasmáticos e nucleares foram avaliados dependendo da expressão do marcador de interesse para cada caso.

A intensidade da coloração do anticorpo na neoplasia foi graduada numa escala de 0 (zero) a 3 (três). Através de microscopia óptica convencional numa magnificação de 400 vezes, foi feita avaliação da porcentagem de células coradas em cerca de 1000 células neoplásicas e um escore contínuo foi atribuído à porcentagem estimada de núcleos corados: 0 a 100. O produto da intensidade da coloração (0 a 3) com a porcentagem de

células positivas (0 a 100) resulta no escore semiquantitativo H (H-escore), o qual varia de 0 a 300, sendo considerado positivo quando maior ou igual a 200^{97,103}. O valor de corte foi determinado de forma arbitrária, uma vez que os estudos mostrados acima variaram bastante na escolha deste valor, principalmente na definição entre baixa e alta expressão de ERCC1. Por exemplo, em um dos estudos⁶⁰ o ERCC1 foi definido como “positivo” se houvesse qualquer tipo de expressão, independente da porcentagem de células e da intensidade, enquanto em outro⁵⁵ a definição de positivo exigia pelo menos uma intensidade de 2 (em um escore de 0-2) e uma expressão em pelo menos 50% das células. Da mesma forma, não há uniformidade na escolha do valor de corte para definir alta expressão de Bcl-2, e, como não há dados na literatura sobre o valor de H-escore considerado como alta expressão para Lin28a, optamos por seguir o valor de corte utilizado para ERCC1 para estes dois biomarcadores (alta expressão = H-escore $\geq$ 200) e assim manter o mesmo padrão. Também fizemos uma segunda análise exploratória considerando o valor de corte do Bcl-2 como 50 (alta expressão = H-escore $\geq$ 50), baseando-se no estudo de Branbilla *et al.*⁹⁷, que incluiu apenas pacientes com tumores neuroendócrinos de pulmão em sua análise. Por não haver um valor de corte padrão para estes biomarcadores, realizamos também análise da expressão dos mesmos como variáveis contínuas.

A análise categórica do papel do Ki67 (determinado por imunoistoquímica através do anticorpo anti-antígeno Ki-67, clone MIB-1, conforme rotina da instituição) foi feita a partir da divisão dos pacientes em dois grupos, sendo 55% o valor de corte ($Ki67 < 55\%$ e $Ki67 \geq 55\%$), assim como variável contínua⁹.

5.6 Dados Clínicos

Além das análises da expressão dos biomarcadores, sobrevida global e taxa de resposta por RECIST, foram coletados dos prontuários os seguintes

dados de cada um dos pacientes: sexo; idade ao diagnóstico; ECOG-PS (0 a 4) (Anexo A); presença de comorbidades associadas; história de tabagismo; localização do tumor primário; localização das metástases ao diagnóstico; qual esquema de quimioterapia aplicado e número de ciclos recebidos; concomitância ou não com radioterapia; qual o motivo da descontinuação da quimioterapia; se houve redução de dose e por qual motivo (baixo performance status [PS] pelo tumor (Anexo A) ou comorbidades/idade avançada ou toxicidades); se ocorreu atraso nos ciclos de quimioterapia por toxicidade; e se recebeu quimioterapia de segunda linha.

5.7 Avaliação de Resposta a Quimioterapia

Todos os pacientes elegíveis e que apresentavam avaliação adequada por imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética) através dos critérios de RECIST 1.1 antes do início do tratamento e após pelo menos 01 ciclo deste foram incluídos na análise da taxa de resposta. Estes pacientes foram categorizados em uma das seguintes categorias de resposta: resposta completa (RC), resposta parcial (RP), doença estável (DE) e progressão de doença [PD]; ver Anexo B). Todos os casos foram avaliados pelo mesmo radiologista.

Os exames para avaliação de resposta foram realizados com periodicidade variável, porém com intervalo mínimo de 3 semanas entre o primeiro dia do ciclo 1 da quimioterapia e o exame radiológico. Na maioria dos casos, estes exames foram solicitados a cada 3 ciclos (9 semanas) de quimioterapia.

Para avaliação da progressão da doença, além dos exames de imagem citados acima, foram considerados os dados clínicos registrados no prontuário. Desta forma, aqueles pacientes que, apesar de não terem realizado o reestadiamento por imagem, apresentaram sintomas sugestivos de progressão de doença oncológica foram classificados como doença em

progressão. Nos casos em que os sintomas de piora foram registrados antes da realização do exame de imagem que confirmasse progressão, foi considerada como data de progressão o dia em que houve o registro da progressão clínica.

5.8 Considerações Estatísticas

5.8.1 Plano de Análise

Os dados demográficos da população estudada e demais variáveis categóricas foram analisados através do uso de técnicas de estatística descritiva, com cálculo de medidas como média, mediana e desvios padrão. Estas variáveis foram comparadas nos dois grupos avaliados (CPPC e CNE extra-pulmonar) através do teste T de amostras independentes para variáveis contínuas e teste chi-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher para variáveis categóricas, conforme apropriado.

As curvas de SG foram estimadas através do método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de *log-rank* entre os grupos de alta expressão versus baixa expressão de cada um dos marcadores por imunoistoquímica, bem como entre os pacientes com diagnóstico de CPPC e os com CNE extra-pulmonar, e entre os CNE extra-pulmonares pouco diferenciados e bem diferenciados.

A expressão dos biomarcadores foi analisada tanto como variável categórica como contínua. A associação da expressão de cada biomarcador com a taxa de resposta foi avaliada usando o teste Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas e regressão logística simples para variáveis contínuas. Para realizar associação entre sobrevida global e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, *Lin28*, *ki-67* e *Bcl-2* como variáveis contínuas, foi utilizado o modelo de regressão de cox univariado.

Como a literatura mostra que a maior expressão de Lin28a parece estar associado a tumores mais indiferenciados⁶², utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman para verificar se havia correlação entre os biomarcadores ki-67 e o Lin28a.

Os graus de toxicidade ao tratamento quimioterápico foram coletados e tabulados através da análise individual de cada prontuário. O número de pacientes que descontinuaram o tratamento devido a efeitos colaterais foi apresentado.

Todos os pacientes do estudo foram incluídos na análise dos dados descritivos. Alguns pacientes não apresentavam avaliação adequada de resposta radiológica (como, por exemplo, os que utilizaram radiografia de tórax ou ultrassonografia de abdome como método de imagem), sendo por isso excluídos do cálculo da taxa de resposta. Para avaliação dos desfechos de sobrevida global, os pacientes com CPPC inicialmente classificados como doença limitada (seis pacientes) e os com CNE extra-pulmonar que inicialmente foram estadiados como estadio III (quatro pacientes) foram excluídos, objetivando uniformizar a análise e evitar possível viés.

A depender das frequências e resultados que seriam encontrados, foram planejadas análises multivariadas de regressão logística para avaliar o impacto preditivos em resposta tumoral, bem como análises multivariadas de Cox para avaliar a influência prognóstica dos biomarcadores em sobrevida global.

Para todas as análises, consideramos o nível de significância estatística de 5% (valor de p bicaudado $<0,05$).

5.8.2 Tamanho da Amostra

Considerando que a relação entre a expressão dos biomarcadores descritos e a resposta à quimioterapia não foi avaliada em nenhum outro estudo com CNE extra-pulmonares e que, portanto, trata-se de um estudo exploratório, a magnitude do impacto esperado em função das variáveis

citadas é incerta. Além disso, à época do início do protocolo (2011), ainda não havia dados na literatura quanto a avaliação de desfechos entre os pacientes com CPPC e os CNE extra-pulmonar. Somando-se ao fato de estarmos diante de uma doença de diagnóstico raro, foi escolhida, de forma arbitrária, uma amostra de 100 pacientes (50 pacientes com diagnóstico de CNE extra-pulmonar e 50 com diagnóstico de CPPC). Além disso, acreditamos que com este número houvesse poder suficiente para realizar as análises de associação entre expressão de biomarcador e resposta.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:

Este estudo foi realizado de acordo com o protocolo, as diretrizes de Boas Práticas Clínicas da Conferência Internacional de Harmonização (ICH GCP) e as leis e requisitos regulatórios locais aplicáveis. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) está de acordo com as diretrizes de ICH GCP, regulamentos regulatórios locais e requerimentos legais. Ver Anexo C para TCLE.

Todos os pacientes que estavam vivos no momento da pesquisa receberam o TCLE e foram informados sobre a natureza e objetivos do estudo, bem como a ausência de riscos à sua saúde associados à participação. Após leitura pelo paciente e sancionada as possíveis dúvidas, o investigador obteve o TCLE assinado de cada um desses pacientes antes que as atividades específicas do estudo fossem realizadas. Foi enfatizado que a participação é voluntária e que a recusa não traria prejuízo ao cuidado com o paciente. Além disso, foi dada ênfase que o paciente não teria nenhum custo adicional por participar da pesquisa, bem como não receberia financiamento relacionado a sua participação. A identificação e os dados individuais de cada paciente são de caráter confidencial.

O primeiro protocolo, escrito para análise de CNE extra-pulmonares, foi aprovado pelo Comitê de Ética Local em 14 de novembro de 2011, protocolo de pesquisa nº 483/11 (ver Anexo D). Sua complementação, escrita para incluir a análise dos CPPEC avançados, foi aprovada pelo mesmo comitê em 12 de junho de 2013, protocolo de pesquisa nº 227/13 (ver Anexo D).

7 RESULTADOS

7 RESULTADOS

No período de julho de 2006 a julho de 2014, identificamos 201 pacientes com diagnóstico de CPPC tratados com quimioterapia baseada em platina no ICESP. Neste mesmo período, um total de 125 pacientes com carcinomas neuroendócrinos extra-pulmonares tratados com esquema quimioterápico baseado em platina foram identificados no ICESP, HSL e ICC. Todos esses pacientes foram avaliados para elegibilidade. O fato dos pacientes com CPPC terem sido recrutados apenas do ICESP é devido a maior incidência desta doença em relação ao CNE extra-pulmonar, o que permite que o número de pacientes deste grupo tenha sido mais facilmente alcançado.

Dos 201 pacientes com CPPC, 90 apresentavam biópsias disponíveis em nossos serviço, porém oito delas estavam inadequadas para realização de imunoistoquímica e outros catorze não tinham avaliação adequada por imagem que permitisse análise da taxa de resposta por RECIST (13 pacientes sem avaliação de resposta adequada após quimioterapia e 01 paciente sem exames de imagem pré-tratamento, o que impedia a comparação com o exame pós-tratamento); além disso, seis dos 82 pacientes que apresentavam biópsia disponível e adequada foram inicialmente estadiados como doença limitada e, mesmo tendo todos evoluído para doença extensa, foram excluídos do cálculo da SG. Sendo assim, N=82 pacientes foram incluídos nas análises de expressão de biomarcadores, enquanto N=76 nas análises de sobrevida e N=68 avaliados quanto a taxa de resposta. (Figura 1)

* QT: quimioterapia; IH: imunoistoquímica; TR: taxa de resposta; SG: sobrevida global

Figura 1 - Seleção de Pacientes com CPPC

Dentre os 125 pacientes com CNE extra-pulmonar (8 pacientes do ICC, 32 pacientes do HSL e 85 pacientes do ICESP), apenas 88 apresentavam biópsias disponíveis. Destes, 19 foram re-classificados histologicamente como moderadamente diferenciados (G2), sendo por isso, excluídos. Dos 69 restantes, nove deles não apresentavam material anatomopatológico adequado e outros quatro não apresentavam avaliação de resposta por imagem adequada. Desta forma, N=60 pacientes foram incluídos nas análises de expressão dos biomarcadores e 56 deles na análise de taxa de resposta. Como quatro dos 60 pacientes inicialmente eram estadio III, foram excluídos das análises de sobrevida, de forma semelhante ao que foi feito para os pacientes com CPPC doença localizada. (figura 2)

*QT: quimioterapia; IH: imunoistoquímica; TR: taxa de resposta; SG: sobrevida global.

Figura 2 – Seleção de Pacientes com CNE extra-pulmonar

Sendo assim, esta coorte é composta por 142 pacientes, sendo 58% (N=82) deles com diagnóstico de CPPC e 42% (N=60) com CNE extra-pulmonar (Figura 3).

Figura 3 – Diagnóstico Anátomo Patológico

7.1 Características Clínicas

A idade mediana dos pacientes com CPPC foi 59 anos (35-81) e dos com CNE extra-pulmonar, 55,5 anos (23-81). No primeiro grupo, 58,5% (N=48) dos pacientes eram do sexo masculino e 67,1% (N=55) apresentavam ECOG-PS 0 ou 1 ao início do tratamento. Seis (7,3%) foram inicialmente classificados como doença limitada, porém todos vieram a apresentar progressão sistêmica. Quase a totalidade dos pacientes era tabagista (N=81/ 98,8%). Os sítios de metástases encontrados foram: linfonodal (N=75/ 91,5%), pulmonar (N=25/ 30,5%), óssea (N=21/ 25,6%), pleural (N=20/ 24,4%), cerebral (N=20/ 24,4%), hepática (N=19/ 23,2%) e adrenal (N=15/ 18,3%). As principais comorbidades descritas no prontuário foram hipertensão arterial sistêmica (N=27/ 32,9%), diabetes mellitus (N=17/ 20,7%) e doença pulmonar obstrutiva crônica (N=8/ 9,7%).

No segundo grupo (CNE extra-pulmonar), o sexo masculino representava 56,7% (N=34) da população. Quarenta e cinco (75%) pacientes foram classificados como ECOG-PS 0 ou 1 e quatro (6,7%) pacientes foram estadiados como estadio III ao início do tratamento, sendo os demais estadio IV. História de tabagismo foi encontrada em 28 pacientes (46,7%). O principal sítio primário foi o pâncreas (N=16/ 26,7%), seguido por cólon/reto (N=7/ 11,7%), estômago (N=5/ 8,3%), esôfago (N=4/ 6,7%), colo de útero (N=4/ 6,7%), bexiga/vias urinárias (N=3/ 5%), nasofaringe (N=3/ 5%), fossa nasal (N=2/ 3,3%), duodeno (N=2/ 3,3%), hipofaringe (N=1/ 1,7%), vesícula biliar (N=1/ 1,7%) e próstata (N=1/ 1,7%) – Figura 4. Onze (18,3%) pacientes apresentavam sítio primário desconhecido. Os sítios de metástases estavam distribuídos da seguinte forma: linfonodal (N=42/ 70%), hepático (N=33/ 55%), ósseo (N=10/ 16,7%), pulmonar (N=8/ 13,3%), peritoneal (N=6/ 10%), renal (N=2/ 3,3%) e cerebral (N=1/ 1,7%).

Os valores medianos de Ki67 foram semelhante entre os grupos (CNE: 50% [20-95%]; CPPC 60% [7-100%]; $p=0,858$), bem como a frequência do sexo masculino e feminino, ECOG-PS e estadio clínico. No entanto, houve diferença significativa entre as medianas das idades ($p=0,034$) e na história atual ou pregressa de tabagismo ($p<0,001$), conforme mostrado na Tabela 1.

Figura 4 – CNE Extra Pulmonar – Sítio Primário

7.2 Características do Tratamento

Todos os pacientes incluídos no estudo receberam quimioterapia baseada em platina, porém houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os esquemas quimioterápicos dos pacientes com CPPC e dos pacientes com CNE extra-pulmonar. Os pacientes com CNE receberam a associação de cisplatina ou carboplatina com irinotecano ($N=52$; 53,3%), cisplatina ou carboplatina com etoposídeo ($N=20$; 33,4%), ou oxaliplatina e capecitabina ($N=8$; 13,3%); já os com CPPC receberam cisplatina ou carboplatina associada a etoposídeo ($N=80$; 97,4%), cisplatina e gencitabina ($N=1$; 1,2%), ou carboplatina e paclitaxel ($N=1$; 1,2%). Quase a totalidade dos pacientes estavam na primeira linha de tratamento (CNE: $N=58$ [98%]; CPPC: $N=82$ [100%]; $p=0,096$), e a mediana do número de ciclos de quimioterapia foi semelhante entre os grupos (CNE: 5 [1-10]; CPPC 5 [1-6]; $p=0,764$). Apenas quatro pacientes do grupo CPPC e três do grupo CNE extra-pulmonar receberam somente 1 ciclo de quimioterapia, tendo os

demais recebido dois ou mais ciclos. Estes pacientes foram aceitos para análise, pois foi observada resposta por RECIST em três daqueles com CPPC mesmo após um ciclo de tratamento, ou seja, mesmo que a avaliação fosse feita após um segundo ciclo, a resposta seria a mesma (o quarto paciente evoluiu à óbito por toxicidade - descrito no item específico); já no grupo de CNE extra-pulmonar, os três que receberam somente um ciclo de quimioterapia estão no grupo que não tiveram avaliação adequada por imagem, tendo sido, assim, excluídos do cálculo da taxa de resposta e incluídos apenas na análise da SG e toxicidades. Estes três pacientes com CNE extra-pulmonar receberam apenas um ciclo de quimioterapia pelos seguintes motivos: perda de seguimento; abdome agudo perfurativo, o qual não é possível associar à resposta ou a progressão clínica uma vez que o tumor era primário de intestino; e complicação infecciosa. Não houve diferença significativa entre a porcentagem de pacientes que recebeu quimioterapia subsequente após a progressão da doença (CNE: N=32 [53,3%]; CPPC: N=46 [56,1%]; $p=0,702$). (tabela 1)

Dos 60 pacientes com CNE extra-pulmonar, três (5%) receberam radioterapia concomitante à quimioterapia. O primeiro tinha como sítio primário o esôfago e foi inicialmente classificado como estadio III, recebeu cisplatina e irinotecano por 3 ciclos isoladamente e foi associada radioterapia nos dois ciclos subsequentes. Os outros dois eram primários de nasofaringe, ambos estadios III e ambos receberam quimioterapia com platina e etoposídeo por 3 ciclos, sendo associada radioterapia nos ciclos seguintes. Um quarto paciente, também com diagnóstico de carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado de nasofaringe estadio III, recebeu radioterapia após seis ciclos de quimioterapia baseada em platina (os dois primeiros ciclos com etoposídeo e cisplatina; os últimos com irinotecano e cisplatina, trocado devido perfil de toxicidade) (Tabela 1). Todos os quatro pacientes foram reestadiados antes do início da radioterapia, ou seja, houve avaliação de resposta por imagem após o período de quimioterapia isolada.

Dentre os 82 pacientes com CPPC, seis (7,3%) apresentavam doença limitada, tendo todos recebido inicialmente tratamento com radioterapia combinada à quimioterapia com cisplatina e etoposídeo (quatro iniciaram radioterapia após 2 a 4 ciclos de quimioterapia; e em dois a radioterapia foi iniciada após o término da quimioterapia – 6 ciclos; desta forma, foi possível avaliar a taxa de resposta exclusivamente à quimioterapia, uma vez que foram realizados exames de imagem para reestadiamento após o período de quimioterapia isolada). Apesar de serem classificados inicialmente como doença limitada, todos estes pacientes progrediram para doença metastática.

O principal motivo para descontinuação de quimioterapia entre os pacientes com CPPC foi por benefício máximo do tratamento (N=34/ 41,5%), seguido por progressão de doença (N=20/ 24,4%) e toxicidades limitantes (N=18/ 21,9%). Já entre os com CNE extra-pulmonar, o primeiro motivo que levou a pausa do tratamento foi a progressão da doença (N=22/ 36,7%), seguido por benefício máximo do tratamento após uma mediana de 5 ciclos por paciente (N=20/ 33,3%) e toxicidades limitantes (N=18/ 30%). Apesar de numericamente diferente, não houve diferença estatisticamente significativa das razões que levaram à interrupção da quimioterapia entre os grupos ($p=0,446$).

Tabela 1 – Características da População e do Tratamento

	CNE – N=60	CPPC – N=82	p
Idade mediana	55,5 (23 a 81a)	59 (35 a 81a)	0,034
Sexo			
Masculino	34 (56,7%)	48 (58,5%)	0,824
Feminino	26 (43,3%)	34 (41,5%)	
ECOG – PS			
0 e 1	45 (75%)	55 (67,1%)	0,307
2 e 3	15 (25%)	27 (32,9%)	
Tabagismo*	28 (46,7%)	81 (98,8%)	<0,001
Estadio			
III	4 (6,7%)	6 (7,3%)	0,881
IV	96 (93,3%)	94 (92,7%)	
Mediana de Ki67%	50% (20-95%)	60% (7-100%)	0,858
Esquemas de QT baseado em platina de 1ª linha**			
- Platina + Etoposídeo	32 (53,3%)	80 (97,4%)	<0,001
- Platina + Irinotecano	20 (33,4%)	---	
- Capecitabina + Oxaliplatina	8 (13,3%)	---	
- Cisplatina + Gencitabina	---	1 (1,2%)	
- Carboplatina + Paclitaxel	---	1 (1,2%)	
Mediana do número de ciclos	5 ciclos (1-10)	5 ciclos (1-6)	0,764
Número de pacientes expostos a QT de 2ª linha**	32 (53,3%)	46 (56,1%)	0,702
RDT** concomitante a QT	3 (5%)	4 (4,9%)	0,973
RDT após QT	1 (1,7%)	2 (2,4%)	0,752

* Definido como qualquer historia de tabagismo ou tabagismo atual

**QT: quimioterapia; 1ª: primeira; 2ª: segunda; RDT: radioterapia

7.3 Toxicidade ao Tratamento

O perfil de toxicidade encontrado em cada um dos grupos distinguiu-se em alguns pontos, provavelmente devido a diferenças no esquema quimioterápico escolhido (alguns pacientes com CNE extra-pulmonar receberam cisplatina e irinotecano ou oxaliplatina associada a capecitabina, enquanto quase a totalidade dos CPPC receberam apenas cisplatina associada a etoposídeo).

As toxicidades ao tratamento quimioterápico encontradas no grupo de CNE extra-pulmonar, considerando-se todos os graus e descritas em ordem decrescente de incidência, foram: anemia (N=50/ 83,3%), náuseas (N=39/ 65%), neutropenia (N=29/ 48,3%), diarreia (N=22/ 36,7%), vômitos (N=21/ 35%), plaquetopenia (N=18/ 30%), fadiga (N=12/ 20%), neuropatia periférica (N=5/ 8,3%), síndrome mão-pé (N=4/ 6,7%), alteração da função renal (N=2/ 3,3%), ototoxicidade (N=2/ 3,3%) e mucosite (N=1/ 1,7%). Dentre estas, as seguintes apresentaram-se como graus III e IV: neutropenia (N=21/ 35%), plaquetopenia (N=9/ 15%), anemia (N=8/ 13,3%), diarreia (N=8/ 13,3%), náuseas (N=6/ 10%), vômitos (N=2/ 3,3%), síndrome mão-pé (N=2/ 3,3%), fadiga (N=1/ 1,7%) e alteração da função renal (N=1/ 1,7%). Devido a algumas destas toxicidades, houve necessidade de atrasar a quimioterapia em 16 pacientes (26,7%), sendo suspenso o tratamento em quatro (6,7%) deles. A dose de algum dos quimioterápicos ou de ambos foi reduzida em 13 pacientes (21,7%), sendo em 12 (20%) devido a toxicidade e em um (1,7%) devido baixo performance status ao início do tratamento.

Já em relação ao perfil de toxicidade dos pacientes com CPPC, foram encontrados os seguintes efeitos colaterais, em ordem decrescente de incidência e considerando-se todos os graus: anemia (N=74/ 90,2%), neutropenia (N=61/ 74,4%), plaquetopenia (N=45/ 54,9%), náuseas (N=41/ 50%), vômitos (N=29/ 35,4%), fadiga (N=20/ 24,4%), diarreia (N=12/ 14,6%), mucosite (N=6/ 7,3%), alteração da função renal (N=5/ 6,1%), neuropatia periférica (N=3/ 3,6%), ototoxicidade (N=1/ 1,2%) e elevação das transaminases (N=1/ 1,2%). Dentre estas, as seguintes apresentaram-se como graus III e IV: neutropenia (N=46/ 56,1%), anemia (N=10/ 12,2%), plaquetopenia (N=5/ 6,1%), diarreia (N=2/ 2,4%), náuseas (N=10/ 12,2%), vômitos (N=4/ 4,9%), fadiga (N=8/ 9,7%), alteração da função renal (N=1/ 1,2%) e elevação das transaminases (N=1/ 1,2%). Houve atraso na administração da quimioterapia devido a toxicidades em 25 (30,5%) pacientes, com necessidade de uma interrupção do tratamento. Dezesesseis pacientes (19,5%) precisaram ter a dose de um dos quimioterápicos ou ambos reduzidas, sendo 14 devido toxicidades e 02 (3,3%) por baixo

performance ao início do tratamento. Um paciente foi a óbito devido choque séptico secundário a neutropenia febril (neutropenia grau V). Outros dois faleceram durante a quimioterapia, porém as causas do óbito não estavam relacionadas a toxicidade nem a doença oncológica, sendo elas: insuficiência hepática em paciente previamente cirrótico e pneumonia bacteriana em paciente que não estava neutropênico.

Tabela 2 – Toxicidades à quimioterapia

Toxicidades	CNE Extra-Pulmonar		CPPC	
	Todas	Graus III e IV	Todas	Graus III e IV
Anemia	50 (83,3%)	8 (13,3%)	74 (90,2%)	10 (12,2%)
Neutropenia	29 (48,3%)	21 (35%)	61 (74,4%)	46 (56,1%)
Plaquetopenia	18 (30%)	9 (15%)	45 (54,9%)	5 (6,1%)
Náuseas	39 (65%)	6 (10%)	41 (50%)	10 (12,2%)
Vômitos	21 (35%)	2 (3,3%)	29 (35,4%)	4 (4,9%)
Diarréia	22 (36,7%)	8 (13,3%)	12 (14,6%)	2 (2,4%)
Fadiga	12 (20%)	1 (1,7%)	20 (24,4%)	8 (9,7%)
Neuropatia	5 (8,3%)	-	3 (3,6%)	-
Síndrome Mão-pé	4 (6,7%)	2 (3,3%)	-	-
Ototoxicidade	2 (3,3%)	1 (1,7%)	1 (1,2%)	-
Elevação de Cr*	2 (3,3%)	1 (1,7%)	5 (6,1%)	1 (1,2%)
Mucosite	1 (1,7%)	-	6 (7,3%)	-
Elevação ASL/ALT*	-	-	1 (1,2%)	1 (1,2%)

*Cr=creatinina; AST = aspartatoaminotransferase; ALT = alanina aminotransferase

7.4 Análises dos Biomarcadores

7.4.1 Expressão do *ERCC1*

Na população com CNE extra-pulmonar (N=60), 47 pacientes (78,3%) apresentaram o H-escore maior ou igual a 200, sendo assim considerados

como portadores de tumor com alta expressão de *ERCC1*. Dentre os treze pacientes restantes, sete (11,7%) apresentavam H-escore ≥ 100 e < 200 , quatro (6,7%) ≥ 1 e < 100 e dois (3,3%) apresentaram valor nulo de H-escore (demonstrado no histograma de distribuição dos escores – FIGURA 5). Escore H mediano da expressão de *ERCC1* foi 300 (média $239,58 \pm 88,65$; intervalo 0-300).

No grupo de pacientes com CPPC (N=82), 70 pacientes (85,4%) apresentaram alta expressão de *ERCC1* (H-escore ≥ 200). A distribuição dos escores está demonstrado no histograma da FIGURA 6. Semelhante ao CNE extra-pulmonar, a mediana do escore H foi de 300 (média $260,24 \pm 68,313$; intervalo 0-300).

Não há diferença significativa entre a porcentagem de pacientes classificados como alta expressão de *ERCC1* (H-escore ≥ 200) entre os dois grupos estudados ($p=0,277$), bem como não há diferença entre as médias do escore H ($p=0,135$).

Figura 5 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunohistoquímica de *ERCC1* nos pacientes com CNE extra-pulmonar. O traço vermelho separa os pacientes classificados como alta expressão dos com baixa expressão (alta expressão: H-escore ≥ 200)

Figura 6 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de ERCC1 nos pacientes com CPPC. O traçado vermelho separa os pacientes classificados como alta expressão dos com baixa expressão (alta expressão: H-escore ≥ 200).

7.4.2 Expressão do Bcl-2

O H-escore mediano nos pacientes com CNE extra-pulmonar (N=60) e nos com CPPC (N=82) foi, respectivamente, 31,25 (média 98,04 $\pm$ 119,09; intervalo 0 a 300) e 180 (média 165,91 $\pm$ 110,1; intervalo 0 a 300) ($p < 0,001$). No grupo de pequenas células de pulmão houve um maior número de pacientes com tumores apresentando alta expressão de Bcl-2 (N=38/ 46,3%) quando comparado ao grupo de CNE (N=17/ 28,3%), o que foi estatisticamente significativo ($p=0,030$). As figuras 7 e 8 mostram a distribuição do H-escore nesses dois grupos de pacientes e deixam clara, de forma gráfica, a maior hiperexpressão de Bcl-2 nos pacientes com CPPC.

Considerando um valor de corte de 50 (alta expressão ≥ 50), 79,4% (N=54) dos pacientes com CPPC e 46,5% (N=26) no grupo CNE extra-pulmonar apresentavam alta expressão de Bcl2, respectivamente ($p<0,001$).

Figura 7 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Bcl-2 nos pacientes com CNE extra pulmonar. O traçado vermelho separa os pacientes classificados como alta expressão dos com baixa expressão (alta expressão: H-escore ≥ 200).

Figura 8 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Bcl-2 nos pacientes com CPPC. O traçado vermelho separa os pacientes classificados como alta expressão dos com baixa expressão (alta expressão: H-escore ≥ 200).

7.4.3 Expressão do Lin28a

Não foi possível realizar imunoistoquímica para Lin28a em um paciente do grupo CNE devido ao desgaste do material anatomopatológico. Os valores da mediana do H-escore em CNE extra-pulmonar (N=59) e CPPC (N=82) foram, respectivamente, 200 (média $190,51 \pm 102,44$; intervalo 0 a 300) e 155 (média $155,55 \pm 112,59$; intervalo de 0 a 300) ($p=0,061$). Foi observado um maior número de tumores com alta expressão de Lin28a no grupo dos CNE (N=35/ 59,3%) em relação ao grupo dos CPPC (N=35; 42,7%), porém sem significância estatística ($p=0,051$). As figuras 9 e 10 mostram a distribuição do H-escore nesses dois grupos de pacientes.

Figura 9 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunoistoquímica de Lin28a nos pacientes com CNE extra pulmonar. O traçado vermelho separa os pacientes classificados como alta expressão dos com baixa expressão (alta expressão: H-escore ≥ 200).

Figura 10 – Histograma de distribuição dos escores H da expressão imunohistoquímica de Lin28a nos pacientes com CPPC. O traçado vermelho separa os pacientes classificados como alta expressão dos com baixa expressão (alta expressão: H-escore ≥ 200).

7.4.4 Expressão de Ki67

Não foi possível determinar o Ki67 em um paciente do grupo CNE nem em um do grupo CPPC devido ao desgaste do material anatomopatológico. Três pacientes do grupo CPPC apresentaram Ki67 inferior a 20%, porém tinham histologia de carcinoma de pequenas células de pulmão e comportamento clínico de tumores de alto grau. Além disso, na definição de carcinoma de pulmão de pequenas células não há necessidade da presença de ki67 elevado, apesar de ser um achado comum. Por este motivo, estes três pacientes com CPPC e Ki67 inferior a 20% foram mantidos no estudo.

Não houve diferença estatística entre o número de pacientes com CNE extra-pulmonar (N=30/ 50,8%) e os com CPPC (N=46/ 56,8%) que apresentavam Ki67 superior ou igual a 55% ($p=0,486$). Tanto a mediana de Ki67 (CNE: 50%; CPPC 60%) quanto as médias (CNE: $57,12\% \pm 25,05$,

intervalo 20 a 95; CPPC: $57,89 \pm 25,12$, intervalo 7 a 100) foram semelhantes entre os grupos ($p=0,858$). A distribuição dos pacientes de acordo com o valor de Ki67 está demonstrado nas figuras 11 e 12.

Figura 11 – Histograma de distribuição da expressão imunoistoquímica de Ki67 nos pacientes com CNE extra pulmonar.

Figura 12 – Histograma de distribuição da expressão imunoistoquímica de Ki67 nos pacientes com CPPC.

7.5 Análise de Taxa de Resposta nas Duas Populações Estudadas

Como já citado anteriormente, dos 60 pacientes com CNE extra-pulmonar, 56 foram incluídos no cálculo da taxa de resposta; dos 82 com diagnóstico de CPPC, 68 entraram nesta análise. Dos 56 pacientes do primeiro grupo, 25 (44,6%) apresentaram resposta conforme os critérios de RECIST após quimioterapia baseada em platina; no segundo grupo, dos 68 avaliados, 59 (86,8%) tiveram critério de resposta ($p < 0,001$).

Objetivando uniformizar o tratamento realizado em primeira linha, analisamos apenas os pacientes que receberam quimioterapia com platina e etoposídeo e que foram avaliáveis para taxa de resposta ($N=30$ no grupo CNE extra-pulmonar e $N=67$ no grupo CPPC) e observamos que a taxa de resposta no primeiro grupo continua significativamente inferior ao segundo (46,7% vs 88,1% respectivamente; $p < 0,001$). Com o mesmo intuito, fizemos uma outra análise de subgrupo onde apenas os pacientes com sítio primário em trato gastrointestinal foram incluídos no grupo de CNE extra-pulmonar

(N=35/ 58,3%; N=33 elegíveis para cálculo de taxa de resposta) e comparamos a taxa de resposta à quimioterapia com platina neste grupo vs nos pacientes com CPPC. De maneira semelhante ao que foi visto na primeira análise, a taxa de resposta encontrada em CPPC (86,8%) foi significativamente superior do que aquela vista em CNE com sítio primário no trato gastrointestinal (45,5%, – $p<0,001$).

Duas análises adicionais foram feitas: uma apenas com pacientes com CNE extra-pulmonar de pequenas células e a outra com pacientes com CNE extra-pulmonar pouco diferenciados, cada um comparando com os CPPC. Do total de pacientes com CNE extra-pulmonar, 49 (81,7%) apresentavam histologia de pequenas células, enquanto 11 (18,3%) apresentavam histologia de grandes células. Dos 56 elegíveis para análise de taxa de resposta, 46 (82,1%) eram pequenas células. A taxa de resposta observada neste grupo específico (CNE extra-pulmonar com histologia de pequenas células) foi de 43,5% (20 de 46 pacientes responderam), que é inferior à taxa de resposta de 86,8% observadas nos CPPC ($p < 0,001$). Em relação à diferenciação celular, dos 56 pacientes com CNE extra-pulmonar elegíveis para análise da taxa de resposta, 43 (76,8%) eram pouco diferenciados. A taxa de resposta neste grupo (CNE extra-pulmonar pouco diferenciado) foi de 48,9% (21 de 43 responderam), mantendo-se também inferior à taxa de resposta nos CPPC ($p < 0,001$).

7.6 Associação entre expressão dos biomarcadores (ERCC1, Lin28a, Bcl2 e Ki67) e taxa de resposta: desfecho primário do estudo

A primeira análise da associação entre a expressão de cada um dos marcadores e a taxa de resposta à quimioterapia baseada em platina foi feita considerando a expressão como variável categórica (baixa expressão vs alta expressão). Posteriormente, fizemos uma segunda análise onde a expressão do biomarcador foi considerada variável contínua. Dos 60 pacientes com diagnósticos de CNE extra-pulmonar, 56 (93,3%) foram elegíveis para avaliação de resposta por RECIST; já no grupo dos CPPC, 68

pacientes do total de 82 (82,9%) preenchiam os critérios necessários para esta avaliação.

7.6.1 Biomarcadores como Variável Categórica

No grupo de pacientes com CNE extra-pulmonar, observamos as seguintes respostas de acordo com a expressão dos marcadores (Tabela 3):

- ERCC1: dentre os pacientes que apresentavam alta expressão de ERCC1 (N=43/ 76,8%), 19 (44%) responderam à quimioterapia com platina enquanto 24 (56%) não responderam (Chi2; p=0,900);
- Bcl-2: no grupo com alta expressão de Bcl-2 definida como H-escore ≥ 200 , (N=16/ 28,6%), seis (37,5%) apresentaram resposta e dez (62,5%) não (Chi2; p=0,496); quando usamos o valor de corte de 50 (alta expressão: H-escore ≥ 50), a taxa de resposta no grupo com alta expressão de Bcl-2 é de 46,2%, enquanto no de baixa expressão é de 43,2% (Chi2; p=0,832).
- Lin28a: naqueles com hiperexpressão de Lin28a (N=32/ 58,2%), quinze (46,9%) responderam enquanto os outros 17 (53,1%) não obtiveram resposta (Chi2; p=0,803);
- Ki67: em relação à expressão do Ki67, os pacientes do grupo Ki67 $\geq 55\%$ não apresentaram diferença significativa na taxa de resposta em relação aqueles com Ki67 $< 55\%$ (respectivamente, 44,4% versus 46,4%; Chi2; p=0,803).

Dentro do grupo de pacientes com diagnóstico de CPPC, também não foi observada associação entre a expressão dos marcadores em análise e a taxa de resposta por RECIST (tabela 3):

- ERCC1: dentre os que apresentavam alta expressão de *ERCC1* (N=57/ 83,8%), 86% (N=49) deles responderam a quimioterapia e,

da mesma forma, 90,9% (N=10) dos com baixa expressão (N=11/16,2%) também responderam (Fisher; $p=1,000$);

- Bcl-2: dentre os 33 pacientes que apresentavam alta expressão de Bcl2 (H-escore ≤ 200), 28 responderam (TR = 84,8%); nos com baixa expressão (N = 35), 31 apresentaram resposta radiológica (TR = 88,6%) (Fisher; $p=0,730$). Quando usamos o valor de corte de 50 (alta expressão: H-escore ≥ 50), a taxa de resposta no grupo com alta expressão de Bcl-2 é de 83,3%, enquanto no de baixa expressão é de 100% (Fisher; $p=0,187$).
- Lin28a: dentre os 29 pacientes com alta expressão de Lin28a, 24 apresentaram resposta radiológica (TR = 82,8%); no grupo com baixa expressão (N = 39), 35 pacientes responderam à quimioterapia (TR = 89,7%) (Fisher; $p=0,481$).
- Ki67: Nos pacientes com Ki67 $\geq 55\%$ (N = 39), 34 responderam à quimioterapia (TR = 87,2%); naqueles com Ki67 $< 55\%$ (N = 28), 24 apresentaram resposta radiológica (TR = 85,7%) (Fisher; $p=1,000$).

Tabela 3 – Associação entre expressão dos marcadores moleculares e a taxa de resposta à quimioterapia com platina.

Biomarcadores	CNE – 56 pacientes avaliados para taxa de resposta P-value (X2/Fisher)	CPPC – 68 pacientes avaliados para taxa de resposta P-value (X2/Fisher)
ERCC1 (alta vs baixa expressão)*	44,2% vs 46,2% (P = 0,900)	86% vs 90,9% (P = 1,000)
BCL2 (alta vs baixa expressão)*	37,5% vs 47,5% (P = 0,496)	84,8% vs 88,6% (P = 0,730)
Lin28a (alta vs baixa expressão)*	46,9% vs 43,5% (P = 0,803)	82,8% vs 89,7% (P = 0,481)
Ki67 (>55% vs <55%)	46,4% vs 44,4% (P = 0,883)	87,2% vs 85,7% (P = 1,000)

*Alta expressão = H-escore ≥ 200 ; baixa expressão = H-escore < 200

7.6.2 Biomarcadores como Variável Contínua

Nos pacientes com carcinoma de pulmão de pequenas células, as seguintes análises abaixo foram feitas, considerando os biomarcadores como variável contínua.

Tabela 4 - Análise descritiva dos biomarcadores ERCC1, Bcl-2, Lin28a e ki67 para pacientes com CPPC.

Variáveis por resposta objetiva RECIST 1.1	Não Resposta	Resposta	Total
ERCC1			
Média (Desvio padrão)	274,4 (66,2)	252,5 (72,9)	255,4 (71,9)
Mediana (Mínimo - Máximo)	300 (100 - 300)	300 (0 - 300)	300 (0 - 300)
Total	9	59	68
Bcl-2			
Média (Desvio padrão)	203,3 (100)	159,3 (111,3)	165,1 (110,2)
Mediana (Mínimo - Máximo)	200 (60 - 300)	180 (0 - 300)	183,5 (0 - 300)
Total	9	59	68
Lin28a			
Média (Desvio padrão)	144,4 (123,6)	151,6 (117,6)	150,7 (117,5)
Mediana (Mínimo - Máximo)	200 (0 - 300)	100 (0 - 300)	125 (0 - 300)
Total	9	59	68
Ki-67			
Média (Desvio padrão)	53,3 (22,9)	60,1 (25,3)	59,2 (25)
Mediana (Mínimo - Máximo)	60 (10 - 80)	60 (10 - 100)	60 (10 - 100)
Total	9	58	67

Tabela 5 - Associação entre resposta e a expressão dos biomarcadores ERCC1, Bcl-2 Lin28a e ki67 para pacientes com CPPC (Resultado do modelo de regressão logística simples).

Fator	Estimativa	Odds Ratio	IC (95%)	p-valor
ERCC1	-0,006	0,994	[0,982; 1,008]	0,403
Bcl-2	-0,004	0,996	[0,989; 1,003]	0,269
Lin28a	0,001	1,001	[0,995; 1,007]	0,864
Ki-67	0,011	1,011	[0,983; 1,04]	0,450

De acordo com os resultados da Tabela 5, ao nível de significância de 5%, não há associação significativa entre resposta e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, *Bcl-2*, *Lin28a* e *ki67* para pacientes com tumores de pequenas células de pulmão.

Em relação aos CNE extra-pulmonares, as seguintes análises dos biomarcadores como variáveis contínuas foram feitas, conforme abaixo:

Tabela 6 - Análise descritiva dos biomarcadores *ERCC1*, *Bcl-2*, *Lin28a* e *ki67* para pacientes com CNE extra-pulmonares.

Variáveis por resposta objetiva RECIST 1.1	Não Resposta	Resposta	Total
<i>ERCC1</i>			
Média (Desvio padrão)	230,3 (92,5)	242,6 (89,5)	235,8 (90,6)
Mediana (Mínimo - Máximo)	300 (0 - 300)	300 (0 - 300)	300 (0 - 300)
Total	31	25	56
<i>Bcl2</i>			
Média (Desvio padrão)	105,2 (120,1)	93,2 (120,2)	99,9 (119,2)
Mediana (Mínimo - Máximo)	40 (0 - 300)	20 (0 - 300)	38,75 (0 - 300)
Total	31	25	56
<i>Lin28a</i>			
Média (Desvio padrão)	185 (106,6)	190 (104,8)	187,3 (104,8)
Mediana (Mínimo - Máximo)	200 (0 - 300)	200 (0 - 300)	200 (0 - 300)
Total	30	25	55
<i>Ki-67</i>			
Média (Desvio padrão)	56 (25,5)	57,2 (25,9)	56,5 (25,5)
Mediana (Mínimo - Máximo)	55 (20 - 90)	60 (20 - 95)	60 (20 - 95)
Total	30	25	55

Tabela 7 - Associação entre resposta e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, *Bcl-2*, *Lin28a* e *ki67* para pacientes com CNE extra-pulmonares (Resultado do modelo de regressão logística simples).

Fator	Estimativa	OR	IC (95%)	p-valor
ERCC1	0,002	1,002	[0,996; 1,008]	0,612
Bcl-2	-0,001	0,999	[0,995; 1,004]	0,705

Lin28a	0,000	1,0005	[0,995; 1,006]	0,859
Ki-67	0,002	1,002	[0,981; 1,023]	0,861

De acordo com os resultados da Tabela 7, ao nível de significância de 5%, não há associação significativa entre resposta e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, Bcl-2, Lin28a e ki67 para pacientes com CNE extra-pulmonares.

Portanto, a análise dos biomarcadores como variável contínua confirma o que a análise como variável categórica já havia mostrado: os biomarcadores estudados não tiveram papel como preditores de resposta à quimioterapia baseada em platina nos pacientes com CPPC ou com CNE extra-pulmonar.

7.7 Análise de Sobrevida nas Duas Populações Estudadas

Para as análises de sobrevida, excluímos os pacientes que inicialmente foram estadiados como estadio III, evitando assim possível viés de seleção. Desta forma, 76 pacientes dos 82 com CPPC e 56 pacientes dos 60 com CNE extra-pulmonar foram incluídos nos cálculos de sobrevida.

O tempo de seguimento mediano dos pacientes com CNE extra pulmonar foi de 10,5 meses (1,2 – 60 meses) e dos pacientes com CPPC foi de 10,3 meses (1,7 – 39,1 meses). No momento da análise de SG, 12 pacientes (20%) com CNE extra-pulmonar e 7 (8,5%) com CPPC estavam vivos.

A sobrevida mediana no grupo CPPC (N=76) foi de 10,3 meses, enquanto no grupo de CNE extra-pulmonares (N=56) foi de 11,1 meses, porém esta diferença numérica não apresentou significância estatística (HR 0,69; 95%CI 0,46 – 1,03; p=0,069) – Figura 13.

Figura 13 – Gráfico de SG (HR 0,69; 95%CI 0,46 – 1,03; $p=0,069$) de 132 pacientes incluídos no estudo (56 com CNE extra-pulmonares estágio IV ao diagnóstico e 76 com CPPC doença extensa ao diagnóstico), estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com o diagnóstico (CPPC vs CNE extra-pulmonar). Diferenças entre as curvas foram avaliadas pelo método de log-rank.

7.8 Associação entre expressão dos biomarcadores (*ERCC1*, *Lin28a*, *Bcl2* e *Ki67*) e desfechos de sobrevida (prognóstico)

7.8.1 Biomarcadores Prognósticos como Variável Categórica

Na população composta por CNE extra-pulmonar, os pacientes que apresentaram baixa expressão de *ERCC1* tiveram SG mediana numericamente inferior (10,3 meses) em relação aos que apresentaram alta expressão (12,5 meses), porém sem significância estatística (HR=1,001; 95% CI 0,458 – 2,185, $p=0,999$) - Figura 14. Os pacientes com baixa expressão de *Bcl-2* apresentaram sobrevida global significativamente

superior, com uma diferença de 6,7 meses em relação aos de alta expressão (14,7 meses vs 8,0 meses, respectivamente; HR=0,47, 95% CI 0,24 – 0,91; p=0,025) – Figura 15; Quando usamos o valor de corte de 50 para a análise do Bcl-2 (alta expressão = H-escore ≥ 50), também observamos o ganho numérico a favor dos pacientes com baixa expressão, porém sem significância estatística (9,2 meses vs 12,5 meses; p=0,120). Da mesma forma, em relação ao biomarcador Lin28a, houve uma diferença apenas numérica na SG entre os grupos com baixa e alta expressão (10,6 meses vs 14,2 meses, respectivamente; HR 1,26; 95% CI 0,64 – 2,45; p=0,506) - Figura 16. Na avaliação do desfecho de sobrevida de acordo com a expressão de Ki67, a SG foi numericamente superior no grupo com Ki67 < 55% (14,2 meses) em relação ao grupo com Ki67 $\geq 55\%$ (10,3 meses), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (HR=0,68; 95%CI 0,35 – 1,29; p=0,235) - Figura 17.

Na população com diagnóstico de CPPC, da mesma forma que no grupo acima, os pacientes que apresentaram baixa expressão de *ERCC1* tiveram uma SG mediana (9,6 meses) numericamente inferior em relação aqueles com alta expressão (11,1 meses), porém sem significância estatística (HR 0,86; 95%CI 0,42 – 1,74; p=0,674) – Figura 18. Já a análise do Bcl-2 mostrou tendência contrária ao que foi visto nos pacientes com CNE extra-pulmonar, com uma SG numericamente menor nos pacientes que apresentavam baixa expressão (9,3 meses) *versus* alta expressão (13,5 meses) (HR=1,45; 95% CI 0,89 – 2,36; p=0,135) – Figura 19. Quando usamos o valor de corte de 50 para a análise do Bcl-2 (alta expressão = H-escore ≥ 50), mantém-se a propensão a maior SG nos que apresentavam alta expressão (12,2 meses) em relação aos de baixa expressão (8,0 meses), porém sem significância estatística (p=0,135). Em relação ao biomarcador Lin28a, o grupo de baixa expressão apresentou SG mediana de 10,1 meses, enquanto o de alta expressão, 12,2 meses (HR=1,24; 95%CI 0,76 – 2,02; p=0,395) – Figura 20. Também não se observou diferença na SG entre os pacientes com Ki67 < 55% e aqueles com Ki67 $\geq 55\%$

(respectivamente, SG 13,5 meses vs 10,1 meses [HR=1,15; 95%CI 0,70 – 1,88; p=0,573]) – Figura 21.

Os dados acima mostram que a alta expressão de Bcl-2 (H-escore ≥ 200) nos pacientes com CNE extra-pulmonares tratados com quimioterapia baseada em platina foi relacionada a pior prognóstico quando comparado ao grupo com baixa expressão de Bcl-2 (H-escore <200). Os demais biomarcadores estudados não influenciaram na sobrevida global em ambos os grupos.

Figura 14 – Gráfico de SG (HR=1,00; 95%CI 0,45 – 2,19, p=0,999) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de ERCC1 (escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

Figura 15 – Gráfico de SG (HR=0,47, 95% CI 0,24 – 0,91; $p=0,025$) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Bcl-2 (escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

Sobrevida Global de Acordo com Expressão de Lin28a – CNE extra-pulmonares

Figura 16 – Gráfico de SG (HR 1,26; 95% CI 0,64 – 2,45; $p=0,506$) De 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudos, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Lin28a (escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

Sobrevida Global de Acordo com Expressão de Ki67 – CNE extra-pulmonares

Figura 17 – Gráfico de SG (HR=0,68; 95%CI 0,35 – 1,29; p=0,235) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Ki67 (<55% vs ≥ 55%). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste o de log-rank.

Figura 18 – Gráfico de SG (HR 0,86; 95%CI 0,42 – 1,74; $p=0,674$) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunohistoquímica de ERCC1 (Escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

Figura 19 – Gráfico de SG (HR=0,1,45; 95%CI 0,89 – 2,36; p=0,133) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Bcl-2 (Escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

Figura 20 – Gráfico de SG (HR=1,24; 95%CI 0,76-2,02; $p=0,395$) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Lin28a (Escore H; alta expressão ≥ 200). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

Figura 21 – Gráfico de SG (HR=1,15; 95%CI 0,70 – 1,88; p=0,573) de 76 pacientes com CPPC incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com expressão imunoistoquímica de Ki67 (<55% vs ≥ 55%). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank.

7.8.2 Biomarcadores Prognósticos analisados como Variável Contínua

Considerando os biomarcadores como variável contínua (H-escore de 0 a 300), as seguintes análises foram feitas:

Tabela 8 - Associação entre status de sobrevida global e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, *Lin28a*, *ki-67* e *Bcl-2* para pacientes com CPPC (Resultados dos modelos de Cox univariados).

Fator	Estimativa	HR	IC (95%)	p-valor
Bcl-2	-0,002	0,998	[0,996; 1,001]	0,051
ERCC1	0,002	1,002	[0,998; 1,005]	0,345
Lin28a	-0,001	0,999	[0,997; 1,001]	0,268
Ki-67	-0,006	0,994	[0,984; 1,003]	0,183

De acordo com os resultados da Tabela 8, ao nível de significância de 5%, não há associação significativa entre sobrevida global e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, *Lin28a*, *ki-67* e *Bcl-2* para pacientes com carcinoma de pequenas células de pulmão.

De forma semelhante, análises semelhantes foram realizadas para os pacientes com CNE extra-pulmonar elegíveis para avaliação de sobrevida global:

Tabela 9 - Associação entre status de sobrevida global e a expressão dos biomarcadores *ERCC1*, *Lin28a*, *ki-67* e *Bcl-2* para pacientes com CNE extra-pulmonares de alto grau (Resultados dos modelos de Cox univariados).

Fator	Estimativa	HR	IC (95%)	p-valor
Bcl-2	0,003	1,003	[1,0005; 1,006]	0,020
ERCC1	0,003	1,003	[0,998; 1,007]	0,241
Lin28a	0,001	1,001	[0,998; 1,004]	0,565
Ki-67	0,011	1,011	[0,998; 1,024]	0,108

De acordo com os resultados da Tabela 9, ao nível de significância de 5%, houve associação positiva significativa, mas de baixa magnitude, entre sobrevida global e a expressão do biomarcador *Bcl-2* para pacientes com CNE extra-pulmonares. Isto significa que ao aumentar o valor de *Bcl-2* em uma unidade, a taxa com que os óbitos ocorrem aumenta em 0,3%.

Os demais biomarcadores não apresentam associação significativa com sobrevida global.

7.9 Expressão dos Biomarcadores e Análise de Sobrevida Global nos Pacientes com CNE Extra-Pulmonares bem Diferenciados e Pouco Diferenciados

Dentre os 60 pacientes com CNE extra-pulmonar incluídos no estudo, 13 (21,7%) foram classificados, conforme o grau histológico, como carcinomas bem diferenciados e 47 (78,3%) como pouco diferenciados.

A alta expressão de *ERCC1*, *Bcl-2* e *Lin28a* foi semelhante tanto nos pacientes com CNE extra-pulmonar bem diferenciados quanto nos pouco

diferenciados, respectivamente: nove (69,2%) e 38 (80%) pacientes ($p=0,368$); três (23,1%) e 14 (29,8%) pacientes ($p=0,635$); e seis (46,1%) e 29 (61,7%) pacientes ($p=0,461$). No entanto, o índice de ki67 foi superior a 55% em 28 (59,6%) pacientes com carcinoma pouco diferenciado e em apenas dois (15,4%) bem diferenciados ($p=0,048$).

Para análise de sobrevida, incluindo apenas os pacientes inicialmente estadiados como estadios IV ($N = 56$) ao diagnóstico, 43 pacientes (76,8%) foram classificados como pouco diferenciados e 13 (23,2%) como bem diferenciados. A SG no grupo dos carcinomas bem diferenciados foi de 24,5 meses, enquanto nos pouco diferenciados de 9,2 meses, porém sem significância estatística (HR 0,64; 95% CI 0,30 – 1,34; $p = 0,231$) – Figura 22.

Figura 22 – Gráfico de SG (HR 0,64; 95% CI 0,30 – 1,34; $p = 0,231$) de 56 pacientes com CNE extra-pulmonar estágio IV incluídos no estudo, estimados pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com o grau de diferenciação (CNE bem diferenciado e CNE pouco diferenciado). Diferença entre as curvas foram avaliadas pelo método de log-rank.

7.10 Análise de Taxa de Resposta nos Pacientes com CNE extra-pulmonares bem diferenciados e pouco diferenciados

Dos 56 pacientes com CNE extra-pulmonar elegíveis para análise da taxa de resposta, 13 (23,7%) foram classificados como carcinomas bem diferenciados e 43 (76,8%) como pouco diferenciados. As taxas de resposta foram semelhantes nos dois grupos: cinco pacientes com carcinomas extra-pulmonares bem diferenciados (taxa de resposta de 38,5%) e dezessete pouco diferenciados (taxa de resposta de 39,5%) apresentaram resposta radiológica parcial à quimioterapia baseada em platina ($p = 0,945$).

7.11 Correlação entre os biomarcadores ki-67 e Lin28a

Devido a dados da literatura sugerirem que há maior expressão de Lin28a em carcinomas pouco diferenciados⁶², realizamos análise exploratória de correlação entre este biomarcador e a expressão de Ki67:

Tabela 10 - Correlação entre os biomarcadores ki-67 e Lin28a (tanto para pacientes com CPPC quanto para pacientes com CNE extra-pulmonares).

Correlação	Coeficiente	p-valor
Pacientes com carcinoma de pequenas células de pulmão		
Ki-67 x Lin 28	0,125	0,266
Ki-67 x Lin 28 (excluindo o valor 0 de Lin 28)	-0,018	0,883
Pacientes com carcinoma neuroendócrino extra-pulmonares		
Ki-67 x Lin 28	0,166	0,212
Ki-67 x Lin 28 (excluindo o valor 0 de Lin 28)	0,149	0,286

De acordo com os resultados da Tabela 10, ao nível de significância de 5%, não observamos correlação significativa entre os biomarcadores ki-67 e Lin28a para pacientes com CPPC. De forma semelhante, também nos CNE extra-pulmonares, observamos ausência de correlação entre a expressão do ki-67 e do Lin28a.

8 DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

Nesta coorte retrospectiva, avaliamos a expressão imunoistoquímica do *ERCC1*, Bcl-2, Lin28a e Ki67 como marcadores prognósticos e/ou preditores de resposta à quimioterapia baseada em platina em pacientes com carcinoma neuroendócrino G3 extra pulmonar e em pacientes com carcinoma de pequenas células de pulmão. Nosso estudo não observou associação entre a taxa de resposta à quimioterapia e a expressão desses marcadores moleculares. Além disso, quando avaliamos a influência da expressão destes marcadores na sobrevida global, observamos que apenas a expressão do Bcl-2 mostrou ter papel prognóstico significativo, ainda que modesto, especificamente no grupo de pacientes com CNE extra-pulmonar. Observamos ainda que, enquanto a sobrevida foi semelhante, a taxa de resposta à quimioterapia foi duas vezes maior entre os pacientes com CPPC em comparação aos portadores de CNE extra-pulmonar, mesmo após analisarmos separadamente aqueles com tumores bem ou pouco diferenciados. Análise dos subgrupos de CNE extrapulmonar de acordo com diferenciação celular mostrou tendência a pior sobrevida no subgrupo de tumores pouco diferenciados, mas sem diferença na taxa de resposta entre os pouco diferenciados e os bem diferenciados.

As características clínicas foram semelhantes nos dois grupos de pacientes, exceto pela idade mediana e história de tabagismo, as quais foram maiores no grupo com CPPC. A incidência dos CNE extra-pulmonares que originaram-se do trato gastrointestinal (N=35/ 58,3%) foi semelhante a descrita na literatura^{2,4,5}.

Na nossa população, ERCC1 estava hiperexpresso na grande maioria dos pacientes com CPPC e CNE extra-pulmonares. Ainda não há consenso na literatura quanto a melhor forma de avaliar a expressão do ERCC1 (se por imunoistoquímica ou por PCR) e sobre qual anticorpo deve ser utilizado na imunoistoquímica, bem como não está claro o seu papel prognóstico e/ou

preditivo de resposta. O estudo publicado por Fiboulet *et al.*⁴⁸, onde foi tentado, sem sucesso, revalidar os dados do estudo publicado em 2006⁴², mostrou uma discordância de 36% entre a análise do ERCC1 de 2006 e a de 2013 (mesmas amostras tumorais); através de técnica de PCR, esses autores também mostraram que existem 4 isoformas conhecidas de ERCC1, sendo porém apenas uma delas funcionante e por isso, não sendo possível determinar qual das isoformas está hiperexpressa através da imunoistoquímica. A hiperexpressão de isoformas não funcionantes pode resultar em resultados “falso-positivos” e dificultar o estudo do papel do *ERCC1* como fator prognóstico ou preditivo quando avaliado por imunoistoquímica. Este achado pode ser uma das hipóteses para explicar o insucesso do estudo em validar, através de imunoistoquímica, o papel do *ERCC1* como marcador preditivo de resposta à quimioterapia baseada em platina em pacientes com CPNPC. Este estudo foi publicado em 2013 e o nosso protocolo foi escrito em 2011, quando, até então, não havia dados que colocassem em questão o uso de imunoistoquímica para análise da expressão do *ERCC1*. Talvez esta seja uma explicação para a alta expressão de *ERCC1* (78,3% nos CNE extra-pulmonares e 85,4% em CPPC) vista em nossos pacientes, a qual foi superior a mostrada em todos os estudos com CPPC descritos anteriormente, nos quais a alta expressão nestes pacientes variou de 10 a 52% (não há dado na literatura quanto a expressão nos CNE extra-pulmonares).

Apesar da coorte que avaliou o uso dos clones de ERCC1 8F1 e SP68 sugerir que o uso de diferentes anticorpos pode influenciar nos resultados sobre o papel do *ERCC1* como preditor de resposta à quimioterapia baseada em platina⁵⁶, isso não se confirmou com nosso estudo. Utilizamos o clone SP68 e, assim como Kim *et al.*⁵⁴ e Sodja *et al.*⁵⁵ que utilizaram o clone 8F1, não encontramos associação entre expressão imunoistoquímica de *ERCC1* e sobrevida ou resposta à quimioterapia baseada em platina.

Os resultados do estudo de Karachaliou N. *et al.*⁵⁸ onde a baixa expressão de ERCC1 analisado isoladamente não apresentou papel prognóstico nos pacientes com CPPC com doença extensa, mas quando

analisado conjuntamente com outras alterações favoráveis (baixa expressão de *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* e *TOPOIIB*) o resultado foi diferente, mostra que talvez existam assinaturas genéticas favoráveis e desfavoráveis, bem como influência da expressão de um biomarcador sobre o outro. Desta forma, a análise de um biomarcador isoladamente algumas vezes pode não conseguir detectar seu papel prognóstico. Essa influência de outros biomarcadores não estudados e algumas vezes até não conhecidos poderia explicar os resultados divergentes entre os estudos, alguns conseguindo detectar papel prognóstico e preditivo de resposta à quimioterapia baseada em platina, enquanto outros, incluindo o nosso, apresentam resultados negativos.

Nos nossos pacientes, a alta expressão do Bcl-2 foi maior nos tumores do grupo CPPC em relação aos do grupo CNE extra-pulmonar (46,3% vs 28,3%, respectivamente; $p = 0,03$) quando optado por um valor de corte de 200 (H-escore ≥ 200 = alta expressão). Esta diferença de expressão se manteve ao utilizarmos o valor de corte de 50 (H-escore ≥ 50 = alta expressão): 79,4% (N=54) dos pacientes com CPPC e 46,5% (N=26) no grupo CNE extra-pulmonar ($p < 0,001$). Com o valor de corte mais baixo, a porcentagem de pacientes com CPPC que apresentam alta expressão de Bcl2-1 (79,4%) assemelha-se a mostrada por Brambilla *et al.*⁹⁷, que utilizou este mesmo ponto de corte e encontrou alta expressão em 91% (N=64/71) dos pacientes com CPPC. Nossos resultados também estão condizentes com os dados mostrados por Brenner B *et al.*¹¹ no qual a alta expressão de Bcl-2 também foi maior no grupo com CPPC (75 a 95%) quando comparado ao grupo com CNE extra-pulmonar (hiperexpressão em 33% dos casos).

O fato de haver uma maior expressão de Bcl-2 nos pacientes com pequenas células de pulmão favorece um racional de que esta expressão aumentada pode contribuir para sua maior agressividade, uma vez que resulta em mecanismos de resistência à apoptose e, conseqüentemente, menor morte celular. No entanto, não conseguimos demonstrar associação entre a expressão do Bcl-2 e os desfechos de sobrevida nos pacientes com CPPC do nosso estudo. Já nos pacientes com CNE extra-pulmonar tratados

com quimioterapia baseada em platina, a baixa expressão de Bcl-2 (H-score < 200) foi associada a uma melhor sobrevida global, com uma diferença numérica de 6,7 meses em relação a alta expressão, com significância estatística. Este dado não se mostrou significativo quando utilizado o ponto de corte de 50 para definir baixa vs alta expressão. Essa possível associação da hiperexpressão de Bcl-2 com pior prognóstico nos pacientes com CNE extra-pulmonar tratados com platina foi semelhante ao que já havia sido mostrado na literatura nos linfomas de grandes células B⁹², no glioblastoma multiforme⁹³ e no grupo de tumores neuroendócrinos de pulmão que incluíam carcinoide típico, carcinoide atípico e carcinoma de grandes células⁹⁷. Este dado sugere um racional de se testar futuramente agentes anti-apoptóticos em monoterapia ou combinados a platina em CNE extra-pulmonares.

Estudos em outros tumores sólidos mostraram associação entre a baixa expressão de let 7 e a consequente alta expressão do Lin28a com uma menor taxa de resposta e pior sobrevida global nos pacientes submetidos a quimioterapia baseada em platina⁷⁶. Lin28a é um regulador do microRNA let 7 e está implicado em diferenciação, proliferação e reprogramação celular. No nosso estudo, a alta expressão do Lin28a foi semelhante em ambos os grupos; porém, quando analisamos isoladamente apenas os pacientes com CNE extra-pulmonares, observamos que a alta expressão de Lin28a foi maior nos pouco diferenciados quando comparados com os bem diferenciados (61,7% vs 46,1%), apesar deste dado não ter apresentado significância estatística. De forma oposta aos dados da literatura em outros tipos de tumores, tanto os pacientes com CNE extra-pulmonares quanto os com CPPC com alta expressão de Lin28a apresentaram sobrevida global numericamente maior quando comparados com os de baixa expressão, porém este dado não foi estatisticamente significativo e por isso não é possível determinar sua relevância. Este biomarcador não apresentou papel preditor de resposta à quimioterapia baseada em platina em ambos os grupos.

Séries retrospectivas mostraram que os pacientes com CNE com ki67 $\geq 55\%$ apresentam maior taxa de resposta, mas pior prognóstico em relação aos com ki67 $< 55\%$. Mesmo sem haver significância estatística, o grupo de pacientes com CNE que apresentavam Ki67 $< 55\%$ apresentou SG mediana numericamente maior (4 meses) em relação ao grupo com ki67 $\geq 55\%$. Em contrapartida, tanto nos pacientes com CPPC quanto nos com CNE extra-pulmonares e em ambas análises como variável categórica e contínua, a expressão de Ki67 não teve papel preditivo de resposta à quimioterapia com platina. Os nossos dados vão de encontro aos dados apresentados recentemente na ASCO por Walter et al.⁹⁹ que, em uma série de 294 pacientes com carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado extra-pulmonar, também não encontraram associação entre pior SG com o valor de ki67 superior a 55%. Já a maior série da literatura, o estudo Nordic,⁹ identificou associação entre maior Ki67 e maior taxa de resposta. A discrepância entre nosso resultado e a literatura pode ser devido a proporções distintas de pacientes com tumores G3 bem diferenciados, variabilidade dos sítios primários incluídos, heterogeneidade molecular desconhecida ou simplesmente por chance.

Um ponto bastante interessante para se destacar é a análise da sobrevida global e da taxa de resposta entre os pacientes com CPPC e os com CNE extra-pulmonar. Os dados obtidos em nosso estudo em relação a taxa de resposta estão de acordo com os dados publicados por Terashima *et al.*²⁷, que mostrou que os pacientes com CPPC apresentam taxa de resposta à quimioterapia com platina significativamente superior em relação aos com CNE, porém sem diferença significativa na sobrevida global. Os pacientes com CNE extra-pulmonar apresentaram uma SG numericamente superior ao grupo com CPPC, porém este dado não apresentou significância estatística. Isso demonstra que, apesar de ser mais sensível e responsivo à quimioterapia, o grupo de CPPC apresenta SG semelhante ao grupo com CNE extra-pulmonar, embora haja uma tendência a uma menor sobrevida global nesses pacientes com pequenas células de pulmão. Na tentativa de evitar vieses de seleção que justificassem a diferença de taxa

de resposta entre os grupos de CNE extra pulmonar e CPPC, analisamos separadamente os pacientes tratados com regimes diferentes de quimioterapia e também os grupos de acordo com sítio primário. No nosso estudo, a quase totalidade dos pacientes com CPPC (N=80/82; 97,4%) recebeu associação de cisplatina ou carboplatina com etoposídeo, enquanto este esquema foi administrado apenas a 53,3% (N=32/60) dos pacientes com CNE extra-pulmonar, tendo os demais recebido associação de platina com irinotecano ou combinação de capecitabina com oxaliplatina. Existe diferença na dose de platina entre estes esquemas: na combinação de etoposídeo com cisplatina, o paciente recebe 75mg/m² de cisplatina por ciclo, enquanto no esquema irinotecano e cisplatina, a dose da cisplatina recebida por ciclo é de 60mg/m². Desta forma, é possível que o grupo com CPPC tenha recebido uma maior dose de cisplatina por paciente, o que poderia ser um fator confundidor ao comparar a taxa de resposta nestes pacientes com os com CNE extra-pulmonar. Porém, quando analisamos a taxa de resposta entre os dois grupos considerando apenas os pacientes que receberam a combinação de platina e etoposídeo, o grupo com CPPC mantém taxa de resposta superior em relação aos CNE extra-pulmonar (88,1% vs 46,7%, respectivamente; $p < 0,001$), o que vai contra a hipótese de que a heterogeneidade da quimioterapia no grupo dos CNE extra-pulmonar seja um fator que superestime os pacientes com CPPC. Análises de subgrupos de CNE extra-pulmonares incluindo na primeira apenas pacientes com CNE extra-pulmonar que apresentem sítio primário gastrointestinal, uma outra apenas com o subgrupo de CNE extra-pulmonares que apresentavam histologia de pequenas células e a terceira apenas com CNE extra-pulmonares pouco diferenciados também mostraram que a taxa de resposta nos CPPC mantém-se aproximadamente duas vezes maior do que nestes subgrupos. Especulamos também que, apesar de dividirem certas semelhanças, as duas doenças tenham vias de carcinogênese distintas, e portanto, vias de sinalização e *drivers* moleculares específicos, como por exemplo, o fato de que apenas menos da metade dos pacientes com CNE extra-pulmonares ter história de tabagismo em comparação com a quase

totalidade dos CPPC. Seguindo esta hipótese, um estudo retrospectivo¹⁰⁴ recente mostrou que alterações genéticas mútuas na proteína do retinoblastoma (RB1) e na proteína tumoral 53 (TP53) são mais comuns em CPPC do que em CNE extra-pulmonar e que a frequência destas alterações também difere de acordo com o sítio primário extra-pulmonar. Além disso, outro estudo¹⁰⁵ sugere que há uma via alternativa para os CPPC, os quais também podem se originar de uma célula tronco tumoral não neuroendócrina que adquire diferenciação neuroendócrina através da inativação do NOTCH (*neurogenic locus notch homolog*), hiperexpressão do ASCL1 (*Achaete-scute homolog 1*), e adicional perda bialélica de TP53 e RB1. Um estudo recente mostrou que carcinomas neuroendócrinos de alto grau de cólon estão frequentemente associados a mutação no oncogene BRAF e proficiência de enzimas de reparo por IH¹⁰⁶. Portanto, podemos inferir que os carcinomas neuroendócrinos são tumores bastante heterogêneos, e que existam diferentes expressões dos biomarcadores a depender do sítio do tumor primário.. É possível também encontrar histologia ou de pequenas ou grandes células, bem como CNE bem diferenciados ou pouco diferenciados, o que poderia influenciar na sensibilidade à quimioterapia.

Quando estudamos apenas o grupo de pacientes com CNE extra-pulmonar e o subdividimos em carcinomas neuroendócrino bem diferenciados e carcinomas neuroendócrino pouco diferenciados, os nossos resultados vão de encontro com os dados da literatura. Os dois estudos apresentados acima^{11,12} mostraram uma SG significativamente superior nos pacientes com CNE bem diferenciados. Da mesma forma, os pacientes do nosso estudo com CNPD apresentaram uma SG mediana numericamente bastante inferior a SG dos CNE bem diferenciados (9,2 meses vs 24,5 meses, respectivamente), porém este dado não teve significância estatística ($p=0,231$). Em relação a taxa de resposta, o estudo apresentando na ASCO 2015¹¹ mostrou uma maior taxa de resposta nos CNPD, enquanto os nossos dados mostraram taxas de resposta semelhantes entre os pouco diferenciados e os bem diferenciados (39,5% vs 38,5%, respectivamente).

Uma explicação possível para que alguns estudos mostrem diferenças com significância estatística enquanto em outros, apesar da diferença numérica, essa significância não seja atingida, é a baixa quantidade de pacientes incluídos nesses estudos; nesses casos, aumentando-se o número de pacientes, os resultados poderiam tornarem-se significativos. No nosso estudo temos 60 pacientes com CNE extra-pulmonar, sendo 56 deles elegíveis para análise de resposta e análise de SG. Os demais estudos descritos apresentavam 45 pacientes (16 bem diferenciados e 29 pouco diferenciados)¹¹ e 62 pacientes (19 bem diferenciados e 43 pouco diferenciados)¹². Quando comparado com os CNPD, os pacientes com CNE bem diferenciados apresentaram expressão por IH de ERCC1, Bcl-2 e Lin28a semelhantes, porém o índice de Ki67 neste subgrupo foi significativamente inferior do que no subgrupo de CNPD.

Algumas limitações do nosso estudo devem ser destacadas. Os CNE extra-pulmonares são tumores sabidamente heterogêneos, além de originarem-se de diferentes sítios primários. Apesar do grupo com CPPC ser mais homogêneo, na nossa análise foram incluídos seis pacientes que inicialmente apresentavam doença limitada, tratadas inicialmente com a combinação de quimioterapia com radioterapia. De forma semelhante, no grupo com CNE extra-pulmonar, quatro pacientes foram inicialmente estadiados como estadio III e também tratados com quimiorradioterapia. Isso contribui para aumentar a heterogeneidade dos pacientes estudados e pode causar um viés ao incluir pacientes inicialmente com melhor prognóstico do que aqueles que já apresentam-se como estadio IV ao diagnóstico. Como todos eles tinham uma avaliação de resposta realizada após início da quimioterapia e antes de iniciar a radioterapia, acreditamos que este fator não tenha impactado na análise do nosso desfecho primário (taxa de resposta), porém poderia superestimar a sobrevida global. Por este motivo, realizamos as análises de sobrevida excluindo estes pacientes inicialmente com doença limitada (CPPC) e estadio III (CNE extra-pulmonares). Além disso, por tratar-se de um estudo retrospectivo, alguns casos são perdidos e algumas avaliações ficam prejudicadas (como por exemplo a avaliação da

taxa de resposta por RECIST em 14 pacientes do grupo CPPC e 4 do grupo CNE extra-pulmonar). Uma outra limitação é a falta de padrão quanto a melhor forma de se determinar a expressão de ERCC1, bem como nos escores de imunoistoquímica (H-escore) que classificam se a expressão do biomarcador é alta ou baixa. Isso resulta em diferentes classificações, podendo um valor de H-escore ser considerado como alta expressão em um estudo enquanto em outro é classificado como baixa expressão. Consequentemente, dificulta a comparação com os estudos já realizados e a interpretação dos resultados, além de diminuir a validade externa dos dados encontrados. Por último, por tratar-se de um estudo retrospectivo onde houve variabilidade dos intervalos de realização dos exames de estadiamento, não foi possível calcular a sobrevida livre de progressão mediana dos grupos estudados, sob risco de gerar um viés nos resultados.

Apesar desses fatores limitantes, todos os pacientes analisados tiveram seu material anatomopatológico avaliados com revisão central por um único patologista experiente na área. Além disso, todas as imagens dos pacientes elegíveis para o cálculo da taxa de resposta foram analisadas através de RECIST pelo mesmo radiologista, também experiente neste tema.

Até então, a maior série que comparava os desfechos clínicos e a expressão de biomarcadores nos pacientes com carcinoma de pequenas células de pulmão e nos com carcinomas neuroendócrino extra-pulmonares era esta citada anteriormente e da autoria de Terashima *et al.*²⁷, o qual recrutou 136 pacientes. Na nossa série, temos uma avaliação da expressão dos biomarcadores em 142 pacientes ao todo, com avaliação do desfecho de taxa de resposta em 124 deles e do desfecho de sobrevida global em 132 pacientes, o que faz dela uma das maiores séries disponíveis na literatura. Além disso, trata-se de um estudo inédito ao avaliar alguns marcadores nunca antes estudados em CNE extra-pulmonar (ERCC1 e o Lin28a) e em CPPC (Lin28a). Os resultados mostram que, apesar do mesmo tratamento oferecido, existe maior taxa de resposta e uma tendência a menor sobrevida global nos pacientes com CPPC em relação aos CNE extra-pulmonares, o

que traz a hipótese de que não é correto considerar as duas patologias como sendo a mesma doença, devendo-se, desta forma, buscar outros tipos de tratamento para os pacientes com CNE extra-pulmonar.

Os CNE extra-pulmonares são extremamente raros e, por isso, o conhecimento sobre sua carcinogênese, fatores de risco, estratégia terapêutica e prognóstico é escasso. Faz-se necessário estudos prospectivos colaborativos e multicêntricos para compreendermos a epidemiologia, o perfil molecular e definir tratamentos para esses pacientes.

9 CONCLUSÃO

9 CONCLUSÃO

- O padrão de expressão de ERCC1 e Lin28a foi semelhante entre os grupos. A mediana de expressão do ki67 também foi similar entre os grupos. A hiperexpressão do biomarcador Bcl-2 (H-score > 200) foi significativamente maior nos pacientes com CPPC em relação a observada nos CNE extra-pulmonares, não havendo diferenças nas frequências de expressão dos demais biomarcadores.
- A alta expressão de Bcl-2 apresentou papel prognóstico nos pacientes com CNE extra-pulmonares tratados com quimioterapia baseada em platina, conferindo uma menor SG quando comparados com os de baixa expressão. A expressão dos demais biomarcadores (ERCC1, Lin28a e Ki67) em CNE extra-pulmonar e dos quatro (ERCC1, Bcl-2, Lin28a e Ki67) em CPPC não apresentaram influência sobre a sobrevida global.
- Não houve associação entre estes biomarcadores e a taxa de resposta à quimioterapia baseada em platina em CPPC ou CNE extra pulmonar.
- Apesar de terem recebido tratamento similar, as taxas de resposta à quimioterapia baseada em platina são diferentes entre os pacientes com CNE extra-pulmonar e os pacientes com CPPC, porém com sobrevida global semelhante. Os CPPC apresentaram uma maior taxa de resposta à quimioterapia baseada em platina, enquanto os CNE extra-pulmonares apresentam uma menor taxa de resposta com tendência a uma maior sobrevida global.
- Dentre os pacientes com CNE extra-pulmonares, não houve diferença na taxa de resposta à quimioterapia baseada em platina entre os carcinomas bem diferenciados e os pouco diferenciados,

com um maior índice de Ki67 e uma tendência a menor sobrevida global no subgrupo pouco diferenciado.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO A: Escala de Capacidade Funcional (ECOG – PS)

Escala de Zubrod (ECOG):(107)

ECOG-PS 0 – totalmente ativo; sem restrições de desempenho

ECOG-PS 1 – atividade física extenuante restrita; totalmente ambulatorial e capaz de realizar trabalhos leves

ECOG-PS 2 – capaz de cuidar de si mesmo, mas sem condições de trabalhar; permanece fora do leito mais de 50% do tempo

ECOG-PS 3 – capacidade limitada de cuidar de si mesmo; confinado ao leito ou cadeira mais de 50% do tempo

ECOG-PS 4 – completamente inativo, sem condições de autocuidados; totalmente confinado ao leito ou cadeira

10.2 ANEXO B: Taxa de Resposta conforme RECIST 1.1

A avaliação de resposta ou progressão neste estudo foi feita utilizando os novos critérios internacionais propostos pelo comitê RECIST¹⁰⁰ (Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos). RECIST foi criado para padronizar a avaliação de resposta tumoral por métodos de imagem, afim de homogeneizar a metodologia e resultados de estudos clínicos. Alterações apenas no diâmetro maior (medição unidimensional) de lesões tumorais são utilizadas nos critérios RECIST. Este sistema utiliza os seguintes conceitos:

Doença Mensurável: Lesões mensuráveis são definidas como aquelas que podem ser precisamente medidas em ao menos uma dimensão (diâmetro mais longo a ser registrado) com um tamanho mínimo de 20mm em radiografia de tórax, 10mm em técnicas convencionais (exames físicos, TC, RNM) ou > 5 mm com TC de cortes finos. Todas as medições dos tumores devem ser registradas em milímetros (ou frações decimais de centímetros). No caso de linfonodos, é considerado lesão mensurável quando maior que 15mm. Em relação a lesões ósseas, serão consideradas mensuráveis quando o componente de partes moles preenche os critérios de doença mensurável descritos acima. O mesmo método de avaliação e a mesma técnica devem ser utilizados para caracterizar cada lesão identificada e relatada no exame basal e durante o acompanhamento. Tomografia e ressonância são os melhores métodos reprodutíveis e atualmente disponíveis para medir as lesões alvo selecionadas para avaliação de resposta. TC convencional e RNM devem ser realizadas com cortes de 10 mm ou menos de espessura no corte transversal, de forma contígua. TC espiral deve ser realizada utilizando um algoritmo de reconstrução contígua de 5 mm. Isto se aplica ao tórax e abdome.

Lesões clínicas: As lesões clínicas apenas são consideradas mensuráveis quando forem superficiais (por exemplo, nódulos cutâneos, linfonodos palpáveis). Para o caso de lesões cutâneas, é recomendada a documentação por meio de fotografia colorida, incluindo uma régua para estimar o tamanho da lesão.

Doença não mensurável: Todas as outras lesões (ou locais de doença), incluindo lesões pequenas (diâmetro menores que < 10 mm com técnicas convencionais ou < 5 mm com TC espiral; linfonodos patológicos entre 10 e 15mm) são consideradas doenças não mensuráveis. Lesões ósseas líticas sem componentes de partes moles que preencham os critérios para doença mensurável ou lesões blásticas, doença leptomeníngea, ascite, derrames pleural/pericárdico, linfagite e lesões císticas são todas não mensuráveis.

Lesões Alvo: Todas as lesões mensuráveis, até no máximo 02 lesões por órgão, e 05 lesões na representação total de todos os órgãos envolvidos devem ser identificadas como lesões alvo e ser registradas e medidas nos exames basais. Lesões alvo devem ser selecionadas com base em seu tamanho (lesões com os diâmetros mais longos) e sua adequação para medições repetidas precisas (por técnicas por imagem ou clinicamente). Linfonodos são considerados lesões-alvos quando tem tamanho superior a 15mm. A soma dos maiores diâmetros (MD) de todas as lesões alvo é calculada e relatada nos exames basais. Esta é utilizada como referência para caracterização da resposta tumoral objetiva. Caso exista mais que 05 lesões mensuráveis, aquelas não selecionadas como lesões alvo são consideradas, juntamente com doenças não mensuráveis, como lesões não alvo.

Lesões não alvo: Todas as lesões não mensuráveis (ou locais da doença) além de quaisquer lesões mensuráveis e acima das 05 listadas como lesões alvo. As medições não são exigidas, porém essas lesões devem ser especificadas no exame basal e acompanhadas como “presentes” ou “ausentes”.

Todos os pacientes tiveram sua melhor resposta no estudo classificado conforme resumido abaixo:

Resposta Completa (RC): desaparecimento de todas as evidências clínicas e radiológicas de tumor (alvo ou não alvo)

Resposta Parcial (RP): uma redução de ao menos 30% na soma de MD de lesões alvo, tendo como referência o exame basal

Doença Estável (DE): estado de equilíbrio da doença. Nem redução suficiente para qualificar como RP nem aumento suficiente para qualificar como PD.

Progressão de Doença (PD): um aumento de ao menos 20% na soma do MD das lesões medidas tendo como referência a menor soma dos MD registrada desde o início do tratamento. É necessário que o aumento observado seja de pelo menos 5mm. O aparecimento de novas lesões também constitui doença progressiva. Em circunstâncias excepcionais, progressão evidente de lesões não alvo pode ser aceita como evidência de progressão da doença.

10.3 ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **ANÁLISE E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES MOLECULARES POTENCIALMENTE PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM CARCINOMAS NEUROENDÓCRINOS EXTRA-PULMONARES DE ALTO GRAU E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL : RACHEL S. PIMENTA RIECHELMANN

PESQUISADOR EXECUTANTE: JULIANA FLORINDA DE MENDONÇA REGO

CARGO/FUNÇÃO: MEDICO ONCOLOGISTA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 131601

UNIDADE: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira" - ICESP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 MESES

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

– Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar se existe alguma relação entre as alterações encontradas no seu tipo de tumor e a resposta ao tratamento (quimioterapia), ou seja, queremos saber se há uma forma de identificar quais pacientes mais se beneficiarão de um determinado medicamento no tratamento contra o câncer. Dessa forma, poderemos saber se um tratamento tem maior chance de funcionar antes de começá-lo, baseado na biópsia do seu tumor.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Se você concordar em participar do estudo, você não será submetido a nenhum tipo de procedimento nem será necessário colher nenhum novo exame. Apenas avaliaremos, somente após a sua autorização, o material da biópsia já colhido previamente do seu tumor e os dados do seu prontuário.

3 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Como iremos estudar apenas o material da biópsia, o qual já foi coletado previamente, não há riscos para o paciente ao participar deste estudo.

4 – Benefícios para o participante:

A sua participação nesta pesquisa não lhe trará benefício direto, porém poderá ajudar pacientes futuros. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

5 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A investigadora Dra Juliana Florinda de Mendonça Rêgo que pode ser encontrado no endereço Av. Dr Arnaldo, 251 – tel 3893-3525. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar – tel: 30618004– E-mail: cep.fm@usp.br**

6 – Cancelamento deste Consentimento e Autorização:

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Você pode retirar o consentimento de participação neste estudo a qualquer momento, sem causar comprometimento ao seu atendimento médico. Você pode inclusive impedir que os pesquisadores divulguem qualquer informação coletada ao seu respeito. Caso isso ocorra, os médicos irão parar de coletar seus dados, mas poderão publicar as informações não-pessoais coletadas antes do seu cancelamento.

7 – Direito de confidencialidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente

8 – Atualização sobre resultados parciais da pesquisa:

O participante tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e materiais coletados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ANÁLISE E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES MOLECULARES POTENCIALMENTE PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM CARCINOMAS NEUROENDÓCRINOS EXTRA-PULMONARES DE ALTO GRAU E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO". Eu discuti com a Dra Juliana Florinda de Mendonça Rêgo sobre a

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

10.4 ANEXO D: Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **14/12/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **483/11** intitulado: **“ESTUDO DE MARCADORES MOLECULARES PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM CARCINOMAS NEUROENDÓCRINOS EXTRA-PULMONARES”** apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira”

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Paulo Marcelo Gehm Hoff

Pesquisador (a) Executante: Juliana Florinda de Mendonça Rêgo

CEP-FMUSP, 15 de Dezembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **12/06/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **227/13** intitulado: **“ANÁLISE E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES MOLECULARES POTENCIALMENTE PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM CARCINOMAS NEUROENDÓCRINOS EXTRA-PULMONARES DE ALTO GRAU E CARCINOMA DE PEQUENAS CÉLULAS DE PULMÃO.”** apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira.”

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Rachel Simões Pimenta Riechelmann

Pesquisador (a) Executante: Juliana Florinda de Mendonça Rêgo

CEP-FMUSP, 14 de Junho de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 10 de Maio de 2012

REFERENTE PROTOCOLO CEPesq: **HSL 2012/11**

Ilmo(as). Sr(as).
Pesquisador(as) Tulio Eduardo Fleisch Pfiffer.

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Institucional

Título do Projeto: *“Estudo de Marcadores moleculares preditores de resposta à quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos extra-pulmonares”*

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo retrospectivo

OBJETIVOS DO PROJETO: Relacionar a expressão dos marcadores moleculares *ERCC1* e timidilato sintase com resposta ou resistência ao tratamento com quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos G2 e G3 extra-pulmonares de pacientes tratados na nossa instituição. Relacionar a expressão novos marcadores – Lin28, let-7 – com resposta ou resistência ao tratamento com quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos G2 e G3 extra-pulmonares de pacientes tratados na nossa instituição.

SUMÁRIO DO PROJETO: A quimioterapia citotóxica representa o tratamento padrão para carcinomas neuroendócrinos pouco diferenciados (CNPd) e para os carcinomas neuroendócrinos bem diferenciados em franca progressão clínica. As taxas de resposta a quimioterapia variam de acordo com as características histológicas e sítio de origem do TNE. De forma semelhante ao câncer de pulmão de pequenas células, os regimes de quimioterapia incluem um agente platinante combinado ao irinotecano ou etoposídeo, com taxas de resposta de 55 a 80% e sobrevida global (SG) mediana de 11 a 14 meses. Um regime alternativo consiste na combinação de capecitabina e oxaliplatina (CapOx), associado a taxa de resposta de 29% e mediana de sobrevida livre de progressão de 9,8 meses em pacientes com CNPD. Contudo, ainda que uma proporção significativa dos pacientes responda a quimioterapia baseada em platina, faz-se necessário a avaliação de indicadores que orientem a escolha do melhor tratamento inicial para cada paciente. A caracterização de biomarcadores preditivos e prognósticos relacionados ao tumor pode viabilizar a individualização do tratamento e a seleção de indivíduos que derivem maior benefício de uma terapia associada a significativos efeitos adversos. Neste contexto, tumores neuroendócrinos carecem de estudos moleculares que identifiquem fatores preditivos de melhor resposta a quimioterapia baseada em platinas.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Com o aumento das opções terapêuticas, estudos que orientem a escolha do melhor tratamento inicial para cada paciente são de fundamental importância. O desenvolvimento de terapias individualizadas com base nas características específicas do paciente e da neoplasia deve ser o objetivo do tratamento oncológico. Para isso, é imperativo reconhecer biomarcadores preditivos e prognósticos relacionados ao tumor e a implicação destes na terapia oferecida e, assim, individualizar e guiar a escolha do tratamento através da definição de quem pode mais se beneficiar com base no nível do marcador medido. Neste contexto, TNE G2 e G3 carecem de estudos exploratórios que visem selecionar os pacientes que melhor se beneficiam de terapia sistêmica baseada em platina. Portanto, faz-se necessário estudos moleculares que identifiquem fatores preditivos de melhor resposta a quimioterapia baseada em platinas. Os resultados deste estudo podem ajudar no desenho de novos tratamentos para pacientes com estes tumores.

Comitê de Ética em Pesquisa

MATERIAL E MÉTODO: Serão avaliados pacientes adultos, de ambos os sexos, com diagnóstico histológico confirmado de carcinoma neuroendócrino (G2 e G3) de origem extrapulmonar classificados como grau moderado ou alto (grau II e III) de acordo com a Organização Mundial da Saúde,⁶ acompanhados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e Centro de Oncologia do Hospital Sírio Libanês, e com indicação de tratamento com quimioterapia sistêmica. Todos os pacientes foram tratados conforme protocolo institucional padrão, determinado de acordo com o grau histológico, que orienta: (1) combinação de cisplatina e irinotecano para os CNPD (G3); (2) combinação de oxaliplatina e capecitabina para os carcinomas neuroendócrinos bem diferenciados (G2). Demais condutas clínicas e de seguimento dos pacientes foram de decisão exclusiva do médico assistente do caso, não tendo havido modificações de tratamento devido ao estudo. Os pacientes serão selecionados através de lista administrativa e todas as análises serão feitas retrospectivamente. Os pacientes que se encontrarem vivos na época do estudo serão convidados a assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o resgate e estudo dos blocos do tumor. Serão elegíveis todos os pacientes que preencherem os seguintes critérios: 1) Diagnóstico histológico de carcinoma neuroendócrino G2 e G3 de origem extrapulmonar; 2) Presença de material anatomopatológico adequado disponível para análise dos biomarcadores por imunohistoquímica; 3) Presença de exames radiológicos antes e após pelo menos dois ciclos do tratamento para análise comparativa de resposta ou progressão por RECIST 1.1⁷⁰ 4) Exposição a, no mínimo, dois ciclos de quimioterapia baseada em capecitabina + oxaliplatina ou irinotecano + cisplatina; 5) TCLE preenchido e assinado pelos pacientes vivos no momento da pesquisa.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não existem riscos para os sujeitos de pesquisa, por se tratar de estudo retrospectivo e observacional.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: de responsabilidade do Instituto do Câncer de São Paulo com financiamento do CNPQ

CRONOGRAMA: início após a aprovação do CEP e término em julho/2013

TCLE: adequado, de acordo com as resoluções vigentes.

OBJETIVO ACADÊMICO: não aplicável

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: a cada 6 meses a contar da data de aprovação deste CEP. 1º data: 10 de novembro de 2012.

Considerações Finais:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês analisou a documentação apresentada e de acordo com as discussões em reunião entende que o projeto está bem descrito e com a metodologia adequada dentro dos padrões éticos.

“PROJETO APROVADO”

Dr. Daniel Deheinzelin

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEPesq

Hospital Sírio-Libanês

HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEPesq HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS

Registro no CEPesq: HSL 2012-11

PESQUISADOR PRINCIPAL : Tulio Eduardo Fleisch Pfiffer.

PROJETO DE PESQUISA: *“Estudo de Marcadores moleculares preditores de resposta à quimioterapia em carcinomas neuroendócrinos extra-pulmonares”*

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio-Libanês analisou a documentação entregue ao CEPesq referente ao protocolo supracitado e APROVA os seguintes documentos:

- Protocolo de pesquisa, em sua primeira versão apresentada no CEPesq
- TCLE

INFORMAÇÕES IMPORTANTES:

- a) De acordo com o cumprimento da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEPesq), deverá receber relatórios parciais e final sobre a pesquisa;
- b) Informar imediatamente sobre qualquer evento adverso ocorrido;
Comunicar quaisquer alterações no projeto e possíveis publicações antecipadamente

São Paulo, 10 de Maio de 2012.

Dr. Daniel Deheinzelin
Vice- coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEPesq
Hospital Sírio-Libanês

10.5 ANEXO E: Características clínicas e histopatológicos de 60 pacientes com CNE Extra-pulmonar (paciente 01 a 20)

Anexo 5 – Características clínicas e histopatológicos de 60 pacientes com CNE Extra-pulmonar (paciente 01 a 20)

Paciente	Idade	Sexo	Estadio Inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)	Óbito (S/N)	SG (meses)	Pequenas ou Grandes Células	Diferenciação celular	Ki67 (%)	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
1	45	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	N/A	SIM	12,4	Grandes Células	Pouco diferenciado	90	300	0	200
2	63	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	N/A	SIM	7,7	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	300	0	200
3	70	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	SIM	8,6	Pequenas células	Bem diferenciado	25	300	0	Material gasto
4	35	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	33,4	Grandes Células	Bem diferenciado	20***	300	300	200
5	64	Masculino	IV	Metástase	CDDP + IRINO	NAO	SIM	7,3	Pequenas células	Pouco diferenciado	20***	300	45	300
6	72	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	SIM	16,8	Pequenas células	Pouco diferenciado	80	300	180	300
7	53	Masculino	III	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	NAO	30,6	Pequenas células	Pouco diferenciado	80	300	75	300
8	46	Feminino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	9,1	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	10	200
9	41	Feminino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	1,9	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	300	300
10	56	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	5,7	Pequenas células	Pouco diferenciado	30	300	0	180
11	40	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	NAO	60,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	40	200	0	200
12	71	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	NAO	17,9	Grandes Células	Pouco diferenciado	90	300	10	300
13	47	Masculino	III	Metástase	CDDP + IRINO	SIM	SIM	9,1	Pequenas células	Pouco diferenciado	40	150	140	150
14	53	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	14,2	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	300	300	300
15	33	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	40,7	Grandes Células	Pouco diferenciado	60	200	0	210
16	76	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	SIM	4,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	60	200	300	50
17	77	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	SIM	SIM	2,2	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	300	300
18	71	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	SIM	5,5	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	200	300
19	81	Masculino	IV	Sítio primário	Carbo + IRINO	NAO	SIM	8,4	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	300	150	180
20	54	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	NAO	20,8	Grandes Células	Bem diferenciado	20***	200	0	0

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, N/A = não avaliada

** Expressão do biomarcador de acordo com H-escore (0 a 300)

*** Índice mitótico > 20 mitoses/ 10cga

(CONTINUA)

Anexo 5 – Características clínicas e histopatológicas de 60 pacientes com CNE Extra-pulmonar (paciente 21 a 40)

Paciente	Idade	Sexo	Estádio inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)*	Óbito (S/N)	SG (meses)	Pequenas ou Grandes Células	Diferenciação celular	Ki67 (%)	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
21	48	Masculino	IV	Metástase	XELOX	NAO	NAO	20,6	Pequenas células	Bem diferenciado	20***	200	0	100
22	69	Feminino	IV	Metástase	CDDP + IRINO	SIM	SIM	5,5	Grandes Células	Pouco diferenciado	80	300	20	150
23	68	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	NAO	12,9	Pequenas células	Pouco diferenciado	80	300	300	100
24	69	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	NAO	SIM	6,9	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	200	300
25	46	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	42,3	Pequenas células	Pouco diferenciado	40	300	100	200
26	75	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	9,2	Pequenas células	Pouco diferenciado	80	300	300	300
27	44	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	8,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	95	105	300	150
28	47	Feminino	III	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	30,6	Pequenas células	Pouco diferenciado	20***	300	300	300
29	36	Feminino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	6,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	70	50	0	10
30	63	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	5,3	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	270	50	200
31	51	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	9,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	300	0	210
32	45	Feminino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	8,3	Pequenas células	Bem diferenciado	90	300	200	0
33	43	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	12,5	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	10	25	120
34	61	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	24,8	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	0	80
35	63	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	10,3	Pequenas células	Pouco diferenciado	65	300	60	300
36	63	Feminino	IV	Metástase	Carbo + VP	NAO	SIM	12,3	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	200	0	0
37	65	Feminino	III	Metástase	Carbo + VP	SIM	SIM	12,1	Pequenas células	Pouco diferenciado	30	300	0	0
38	70	Masculino	IV	Sítio primário	Carbo + VP	N/A	SIM	1,5	Pequenas células	Pouco diferenciado	70	300	270	300
39	61	Masculino	IV	Sítio primário	Carbo + VP	N/A	SIM	0,8	Pequenas células	Pouco diferenciado	50	270	20	240
40	57	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	1,2	Grandes Células	Pouco diferenciado	60	200	0	90

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, Xelox = xeloda + oxaliplatina, N/A = não avaliada

** Expressão do biomarcador de acordo com H-escore (0 a 300)

*** Índice mitótico > 20 mitoses/ 10cga

(CONTINUA)

Anexo 5 – Características clínicas e histopatológicas de 60 pacientes com CNE Extra-pulmonar (paciente 41 a 60)

Paciente	Idade	Sexo	Estadio Inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)*	Obito (S/N)	SG (meses)	Pequenas ou Grandes Células	Diferenciação celular	Ki67 (%)	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
41	50	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	SIM	SIM	18,9	Pequenas células	Pouco diferenciado	60	140	140	0
42	63	Masculino	IV	Metástase	XELOX	NAO	NAO	17,8	Pequenas células	Pouco diferenciado	30	300	0	250
43	23	Masculino	IV	Sítio primário	XELOX	NAO	SIM	10,6	Pequenas células	Pouco diferenciado	80	170	0	100
44	77	Masculino	IV	Metástase	XELOX	SIM	SIM	37,6	Grandes Células	Bem diferenciado	25	180	0	200
45	32	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	4,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	60	300	300	300
46	51	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	16,5	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	0	250
47	64	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	23,0	Pequenas células	Pouco diferenciado	90	300	200	300
48	72	Masculino	IV	Metástase	XELOX	SIM	SIM	24,5	Grandes Células	Bem diferenciado	30	300	0	200
49	56	Feminino	IV	Sítio primário	XELOX	SIM	SIM	43,3	Grandes Células	Pouco diferenciado	30	200	50	300
50	47	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + IRINO	SIM	SIM	3,5	Pequenas células	Pouco diferenciado	40	270	0	100
51	43	Feminino	IV	Metástase	XELOX	SIM	SIM	28,3	Pequenas células	Bem diferenciado	25	300	0	250
52	71	Masculino	IV	Metástase	CDDP + IRINO	SIM	SIM	14,7	Pequenas células	Bem diferenciado	30	300	160	300
53	62	Masculino	IV	Metástase	CDDP + IRINO	SIM	SIM	16,5	Pequenas células	Pouco diferenciado	80	300	300	300
54	45	Feminino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	8,9	Pequenas células	Pouco diferenciado	70	0	0	20
55	56	Feminino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	7,6	Pequenas células	Pouco diferenciado	65	140	37,5	300
56	57	Masculino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	10,6	Pequenas células	Bem diferenciado	50	80	200	150
57	23	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	NAO	9,9	Grandes Células	Bem diferenciado	N/C*	0	0	300
58	55	Masculino	IV	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	16,5	Pequenas células	Bem diferenciado	75	60	0	100
59	51	Feminino	IV	Metástase	CDDP + VP	NAO	NAO	8,1	Pequenas células	Bem diferenciado	20***	200	0	100
60	37	Feminino	IV	Sítio primário	XELOX	NAO	NAO	4,2	Pequenas células	Pouco diferenciado	25	180	40	100

(CONTINUA)

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, XeloX = xeloda + oxaliplatina, N/A = não avaliada, N/C = não conclusivo

** Expressão do biomarcador de acordo com H-escore (0 a 300)

*** Índice mitótico > 20 mitoses/ 10cga

10.6 ANEXO F: Características clínicas e histopatológicos de 82 pacientes com CPPC (paciente 01 a 20)

Anexo 6 – Características clínicas e histopatológicos de 82 pacientes com CPPC (paciente 01 a 20)

Paciente	Idade	Sexo	Estadio Inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)*	Óbito (S/N)	SG (meses)	Diferenciação celular	Ki67 (%)	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
1	68	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + VP	SIM	SIM	8,0	Pouco diferenciado	60	300	10	0
2	54	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + Gemzar	N/A	SIM	13,7	Bem diferenciado	7	270	300	160
3	61	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	N/A	SIM	10,1	Pouco diferenciado	75	250	300	180
4	72	Feminino	Limitada	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	9,8	Pouco diferenciado	90	300	0	100
5	69	Masculino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	10,3	Pouco diferenciado	95	300	15	50
6	59	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	15,0	Pouco diferenciado	7	300	0	200
7	43	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	23,7	Pouco diferenciado	95	300	300	60
8	53	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	8,9	Pouco diferenciado	60	125	142,5	200
9	50	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	7,3	Pouco diferenciado	90	200	100	90
10	47	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	2,2	Pouco diferenciado	70	300	300	0
11	54	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	5,3	Pouco diferenciado	30	235	300	70
12	57	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	16,1	Pouco diferenciado	80	300	200	70
13	62	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	26,6	Pouco diferenciado	90	300	160	90
14	71	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + VP	NAO	SIM	7,5	Pouco diferenciado	70	300	300	200
15	59	Masculino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	5,7	Pouco diferenciado	60	300	0	0
16	71	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	6,5	Pouco diferenciado	20	0	100	0
17	60	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	18,0	Pouco diferenciado	60	200	300	60
18	59	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	13,3	Pouco diferenciado	50	300	300	40
19	67	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + VP	SIM	SIM	5,4	Pouco diferenciado	90	150	250	300
20	57	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	15,8	Pouco diferenciado	25	270	300	150

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, Gemzar = gencitabina, N/A = não avaliada

** Expressão do biomarcador de acordo com H-escore (0 a 300)

(CONTINUA)

Anexo 6 – Características clínicas e histopatológicas de 82 pacientes com CPPC (paciente 21 a 40)

Paciente	Idade	Sexo	Estadio inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)*	Obito (S/N)	SG (meses)	Diferenciação celular	Ki67 (%)	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
21	54	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	6,0	Pouco diferenciado	30	300	60	0
22	57	Feminino	Limitada	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	12,4	Pouco diferenciado	90	300	100	100
23	60	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	NAO	SIM	3,6	Pouco diferenciado	10	270	140	200
24	69	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	15,9	Pouco diferenciado	40	235	180	300
25	72	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	N/A	SIM	14,2	Bem diferenciado	50	300	100	200
26	49	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	31,1	Pouco diferenciado	90	300	250	300
27	50	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	15,3	Pouco diferenciado	70	300	80	300
28	35	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	3,5	Pouco diferenciado	75	300	135	150
29	56	Masculino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	21,0	Pouco diferenciado	25	150	200	100
30	67	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	7,3	Pouco diferenciado	50	270	0	210
31	68	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	10,2	Pouco diferenciado	80	300	75	300
32	54	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	13,7	Pouco diferenciado	80	300	200	80
33	73	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	1,7	Pouco diferenciado	50	300	300	300
34	56	Feminino	Limitada	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	38,6	Pouco diferenciado	20	235	180	180
35	53	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	N/A	SIM	3,1	Pouco diferenciado	70	300	0	100
36	72	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + VP	N/A	NAO	8,5	Pouco diferenciado	60	300	180	100
37	51	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	5,8	Pouco diferenciado	60	300	200	0
38	49	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	1,8	Pouco diferenciado	90	160	50	20
39	70	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	15,1	Pouco diferenciado	50	150	0	0
40	72	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	14,7	Pouco diferenciado	45	300	10	90

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, N/A = não avaliada

** Expressão do biomarcador de acordo com H-score (0 a 300)

(CONTINUA)

Anexo 6 – Características clínicas e histopatológicas de 82 pacientes com CPPC (paciente 41 a 60)

Paciente	Idade	Sexo	Estadio inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)*	Obito (S/N)	SG (meses)	Diferenciação celular	Ki67 (%)*	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
41	57	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	13,5	Pouco diferenciado	30	300	250	270
42	60	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	0,8	Pouco diferenciado	80	300	0	100
43	63	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	2,2	Pouco diferenciado	40	300	235	300
44	71	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	5,0	Pouco diferenciado	N/C	300	0	0
45	50	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	7,3	Pouco diferenciado	75	300	75	300
46	52	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	4,7	Pouco diferenciado	30	300	160	140
47	51	Feminino	Limitada	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	28,2	Pouco diferenciado	40	300	30	210
48	59	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	18,7	Pouco diferenciado	40	300	0	160
49	69	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	11,1	Pouco diferenciado	30	270	0	0
50	76	Feminino	Limitada	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	7,3	Pouco diferenciado	50	180	100	80
51	66	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	20,0	Pouco diferenciado	50	300	300	200
52	70	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	5,4	Pouco diferenciado	70	210	200	80
53	52	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	3,0	Pouco diferenciado	40	150	150	0
54	62	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	11,5	Pouco diferenciado	30	270	240	160
55	52	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	17,1	Pouco diferenciado	10	300	200	0
56	81	Masculino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	13,6	Pouco diferenciado	40	270	180	100
57	55	Feminino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	5,7	Pouco diferenciado	10	300	100	255
58	71	Feminino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	10,3	Pouco diferenciado	40	300	187	270
59	55	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	39,1	Pouco diferenciado	70	300	300	300
60	46	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	13,3	Pouco diferenciado	50	300	300	300

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, N/A = não avaliada, N/C = não conclusivo

** Expressão do biomarcador de acordo com H-escore (0 a 300)

(CONTINUA)

Anexo 6 – Características clínicas e histopatológicos de 82 pacientes com CPPC (paciente 61 a 82)

Paciente	Idade	Sexo	Estadio Inicial	Local da Biópsia	Quimioterapia*	Resposta (S/N)*	Óbito (S/N)	SG (meses)	Diferenciação celular	Ki67 (%)	ERCC1**	Bcl2**	Lin28a**
61	62	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	8,7	Pouco diferenciado	70	300	300	300
62	72	Masculino	Extensa	Sítio primário	Carbo + VP	SIM	SIM	12,2	Pouco diferenciado	70	300	300	300
63	62	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	6,1	Pouco diferenciado	60	300	0	210
64	59	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	37,5	Pouco diferenciado	90	300	50	300
65	47	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	7,2	Pouco diferenciado	70	300	300	300
66	61	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	9,7	Pouco diferenciado	20	270	0	0
67	54	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	8,0	Pouco diferenciado	80	100	300	40
68	58	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + Taxol	NAO	SIM	34,3	Pouco diferenciado	40	100	200	0
69	57	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	NAO	SIM	14,2	Pouco diferenciado	80	300	300	100
70	63	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	9,6	Pouco diferenciado	80	100	250	0
71	54	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	12,0	Pouco diferenciado	80	300	250	300
72	56	Feminino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	NAO	29,2	Pouco diferenciado	40	200	180	300
73	47	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	16,9	Pouco diferenciado	90	200	150	300
74	62	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + VP	NAO	SIM	9,3	Pouco diferenciado	60	300	150	300
75	60	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	15,2	Pouco diferenciado	60	300	200	300
76	63	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	SIM	21,7	Pouco diferenciado	85	300	300	300
77	70	Masculino	Extensa	Metástase	Carbo + VP	N/A	SIM	3,9	Pouco diferenciado	70	300	50	200
78	75	Masculino	Extensa	Sítio primário	CDDP + VP	N/A	SIM	2,2	Pouco diferenciado	90	300	300	300
79	74	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	21,8	Pouco diferenciado	90	50	300	0
80	57	Feminino	Limitada	Sítio primário	CDDP + VP	SIM	SIM	16,1	Pouco diferenciado	50	200	200	150
81	57	Feminino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	SIM	NAO	8,5	Pouco diferenciado	100	300	300	300
82	41	Masculino	Extensa	Metástase	CDDP + VP	N/A	SIM	4,3	Pouco diferenciado	30	300	100	180

* CDDP = cisplatina, VP = etoposídeo, Carbo = carboplatina, Taxol = paclitaxel, N/A = não avaliada,

** Expressão do biomarcador de acordo com H-escore (0 a 300)

10.7 ANEXO G: Fotomicroscopia da expressão dos biomarcadores analisados

Figura 1: Fotomicrografia dos controles positivos pelo método imunoistoquímico para os marcadores ERCC1, Lin28a, Bcl-2 e Ki67, respectivamente (A, B, C, D). A representa amostra tecidual de adenocarcinoma de cólon, que mostra expressão forte e difusa nos núcleos das células neoplásicas e nos fibroblastos em torno dos blocos tumorais. B representa amostra tecidual de testículo normal, que mostra expressão forte e difusa no citoplasma das células dos túbulos seminíferos. Ausência de marcação nuclear. C representa amostra tecidual de tonsila palatina, que mostra expressão forte e difusa no citoplasma e membrana dos linfócitos das zonas marginal e paracortical. Nota-se a marcação negativa do centro germinativo. D representa amostra tecidual de tonsila palatina, que mostra expressão forte e restrita nos núcleos dos linfócitos do centro germinativo e histiócitos. Nota-se marcação negativa nas zonas marginal e paracortical (coloração azulada).

Figura 2: Fotomicrografia de um caso de carcinoma neuroendócrino extrapulmonar, bem diferenciado, grau 3 histológico com baixa expressão dos marcadores ERCC1, Lin28a e Bcl-2. A representa cortes histológicos com a coloração de hematoxilina e eosina que mostram neoplasia com arquitetura sólida e nodular composta de células com núcleos redondos, citoplasma acidófilo e formação acinar focal. B representa exame imunoistoquímico com ERCC1 que mostra expressão fraca nuclear nas células neoplásicas. Nota-se que os linfócitos de permeio apresentam marcação nuclear mais intensa que as células neoplásicas (seta). C representa exame imunoistoquímico com Lin28a que mostra expressão fraca e difusa citoplasmática nas células neoplásicas. D representa exame imunoistoquímico com Bcl-2 que mostra expressão fraca a moderada e focal citoplasmática nas células neoplásicas. E mostra alto índice proliferativo com o marcador Ki-67, representado por expressão nuclear em cerca de 55% das células neoplásicas.

Figura 3: Fotomicrografia de um caso de carcinoma de pequenas células de pulmão, pouco diferenciado, grau 3 histológico com alta expressão dos marcadores ERCC1, Lin28a e Bcl-2. A representa cortes histológicos com a coloração de hematoxilina e eosina que mostram neoplasia com arquitetura sólida e indiferenciada, composta de células com núcleos redondos polimórficos, escasso citoplasma e frequente artefato de esmagamento. B representa exame imunoistoquímico com ERCC1 que mostra expressão forte e difusa nuclear nas células neoplásicas. C representa exame imunoistoquímico com Lin28a que mostra expressão forte e difusa citoplasmática nas células neoplásicas. D representa exame imunoistoquímico com Bcl-2 que mostra expressão forte e difusa citoplasmática nas células neoplásicas. E mostra alto índice proliferativo com o marcador Ki-67, representado por expressão nuclear em cerca de 80% das células neoplásicas.

Figura 4: Fotomicrografia de um caso de carcinoma neuroendócrino extrapulmonar, pouco diferenciado, grau 3 histológico com alta expressão dos marcadores ERCC1, Lin28a e Bcl-2. A representa cortes histológicos com a coloração de hematoxilina e eosina que mostram neoplasia com arquitetura sólida e sincicial, composta de células com núcleos redondos polimórficos, escasso citoplasma acidófilo e frequente artefato de esmagamento. B representa exame imunoistoquímico com ERCC1 que mostra expressão forte e difusa nuclear nas células neoplásicas. C representa exame imunoistoquímico com Lin28a que mostra expressão forte e difusa citoplasmática nas células neoplásicas. D representa exame imunoistoquímico com Bcl-2 que mostra expressão forte e difusa citoplasmática nas células neoplásicas. E mostra alto índice proliferativo com o marcador Ki-67, representado por expressão nuclear em cerca de 50% das células neoplásicas.

11 REFERÊNCIAS

1. Ramella Munhoz R, de Mendonca Rego JF, de Celis Ferrari AR, Ignez Braghiroli M, Mendonca Bariani G, Marcelo Hoff P, et al. Combination of irinotecan and a platinum agent for poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Rare tumors*. 2013;5(3):e39.
2. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(18):3063-72.
3. Hallet J, Law CH, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer*. 2015;121(4):589-97.
4. Remick SC, Ruckdeschel JC. Extrapulmonary and pulmonary small-cell carcinoma: tumor biology, therapy, and outcome. *Med Pediatr Oncol*. 1992;20(2):89-99.
5. Brenner B, Tang LH, Klimstra DS, Kelsen DP. Small-cell carcinomas of the gastrointestinal tract: a review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(13):2730-9.
6. Bosman F CF, Hruban R, et al. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press. 2010 (In press).
7. Ferrone CR, Tang LH, Tomlinson J, Gonen M, Hochwald SN, Brennan MF, et al. Determining prognosis in patients with pancreatic endocrine neoplasms: can the WHO classification system be simplified? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(35):5609-15.
8. Hochwald SN, Zee S, Conlon KC, Colleoni R, Louie O, Brennan MF, et al. Prognostic factors in pancreatic endocrine neoplasms: an analysis of 136 cases with a proposal for low-grade and intermediate-grade groups. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(11):2633-42.

9. Strosberg J, Nasir A, Coppola D, Wick M, Kvols L. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Human pathology*. 2009;40(9):1262-8.
10. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*. 2010;39(6):707-12.
11. Nitya Prabhakar Raj EV, Laura H. Tang, et al. Treatment response and outcomes of grade 3 (G3) pancreatic neuroendocrine carcinomas (HGNEC) based on pathologic differentiation. *J Clin Oncology*. 2015;33(No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: e15185).
12. Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban RH, Adsay V, McCall CM, et al. The high-grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogeneous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms. *The American journal of surgical pathology*. 2015;39(5):683-90.
13. Tang LH, Untch BR, Reidy DL, O'Reilly E, Dhall D, Jih L, et al. Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors with a Morphologically Apparent High-Grade Component: A Pathway Distinct from Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(4):1011-7.
14. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol*. 2013;24(1):152-60.
15. Micke P, Faldum A, Metz T, Beeh KM, Bittinger F, Hengstler JG, et al. Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer--what limits limited disease? *Lung cancer*. 2002;37(3):271-6.
16. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(9):1243-60.

17. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, Hitchcock CL, Cutler GB, Jr., Nieman L, et al. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. *The American journal of surgical pathology*. 1991;15(6):529-53.
18. Murray N, Turrisi AT, 3rd. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2006;1(3):270-8.
19. Norton JA, Fraker DL, Alexander HR, Venzon DJ, Doppman JL, Serrano J, et al. Surgery to cure the Zollinger-Ellison syndrome. *The New England journal of medicine*. 1999;341(9):635-44.
20. Takada M, Fukuoka M, Kawahara M, Sugiura T, Yokoyama A, Yokota S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(14):3054-60.
21. Morant R, Bruckner HW. Complete remission of refractory small cell carcinoma of the pancreas with cisplatin and etoposide. *Cancer*. 1989;64(10):2007-9.
22. Fjallskog ML, Granberg DP, Welin SL, Eriksson C, Oberg KE, Janson ET, et al. Treatment with cisplatin and etoposide in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2001;92(5):1101-7.
23. Mascaux C, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lafitte JJ, Lemaitre F, et al. A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. *Lung cancer*. 2000;30(1):23-36.
24. Nilsson O, Van Cutsem E, Delle Fave G, Yao JC, Pavel ME, McNicol AM, et al. Poorly differentiated carcinomas of the foregut (gastric, duodenal and pancreatic). *Neuroendocrinology*. 2006;84(3):212-5.
25. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. 1991;68(2):227-32.

26. Hanna N, Bunn PA, Jr., Langer C, Einhorn L, Guthrie T, Jr., Beck T, et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(13):2038-43.
27. Lara PN, Jr., Natale R, Crowley J, Lenz HJ, Redman MW, Carleton JE, et al. Phase III trial of irinotecan/cisplatin compared with etoposide/cisplatin in extensive-stage small-cell lung cancer: clinical and pharmacogenomic results from SWOG S0124. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(15):2530-5.
28. Hou Z EA, Lozano R, et al. A pilot study of irinotecan plus cisplatin in patients with metastatic high-grade neuroendocrine carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncology*. 2003;22(Abstr 1508): 375.
29. Mani M SR, Jacobs C, et al. A phase II study of irinotecan and cisplatin for metastatic or unresectable high grade neuroendocrine carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 15550.
30. Okita NT, Kato K, Takahari D, Hirashima Y, Nakajima TE, Matsubara J, et al. Neuroendocrine tumors of the stomach: chemotherapy with cisplatin plus irinotecan is effective for gastric poorly-differentiated neuroendocrine carcinoma. *Gastric Cancer*. 2011;14(2):161-5.
31. Nakano K, Takahashi S, Yuasa T, Nishimura N, Mishima Y, Sakajiri S, et al. Feasibility and efficacy of combined cisplatin and irinotecan chemotherapy for poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42(8):697-703.
32. Yamaguchi T MN, Kasuga A et al. Multicenter retrospective analysis of systemic chemotherapy in poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of the digestive system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30 (suppl 4; abstr 274).
33. Terashima T, Morizane C, Hiraoka N, Tsuda H, Tamura T, Shimada Y, et al. Comparison of chemotherapeutic treatment outcomes of advanced extrapulmonary neuroendocrine carcinomas and advanced small-cell lung carcinoma. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):324-32.
34. Takubo K, Nakamura K, Sawabe M, Arai T, Esaki Y, Miyashita M, et al. Primary undifferentiated small cell carcinoma of the esophagus. *Human pathology*. 1999;30(2):216-21.

35. Galea AM, Murray V. The interaction of cisplatin and analogues with DNA in reconstituted chromatin. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1579(2-3):142-52.
36. Kirschner K, Melton DW. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer research*. 2010;30(9):3223-32.
37. Bohanes P, Labonte MJ, Lenz HJ. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2011;10(3):157-64.
38. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(23):4298-304.
39. Warnecke-Eberz U, Vallbohmer D, Alakus H, Kutting F, Lurje G, Bollschweiler E, et al. ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg*. 2009;13(8):1411-21.
40. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(1):309-16.
41. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(7):2286-91.
42. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2006;355(10):983-91.
43. Kim MK, Cho KJ, Kwon GY, Park SI, Kim YH, Kim JH, et al. Patients with ERCC1-negative locally advanced esophageal cancers may benefit from preoperative chemoradiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(13):4225-31.

44. Kwon HC, Roh MS, Oh SY, Kim SH, Kim MC, Kim JS, et al. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(3):504-9.
45. Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, Taranchon E, Lacau-St-Guily J, Soria JC, et al. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(13):3855-9.
46. Kim SH, Kwon HC, Oh SY, Lee DM, Lee S, Lee JH, et al. Prognostic value of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase pi for 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Am J Clin Oncol*. 2009;32(1):38-43.
47. Steffensen KD, Waldstrom M, Jakobsen A. The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(5):820-5.
48. Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(12):1101-10.
49. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;352(25):2589-97.
50. Strauss GM, Herndon JE, 2nd, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(31):5043-51.
51. Lee HW, Han JH, Kim JH, Lee MH, Jeong SH, Kang SY, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in patients with small cell lung cancer. *Lung cancer*. 2008;59(1):95-104.

52. Ceppi P, Longo M, Volante M, Novello S, Cappia S, Bacillo E, et al. Excision repair cross complementing-1 and topoisomerase IIalpha gene expression in small-cell lung cancer patients treated with platinum and etoposide: a retrospective study. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2008;3(6):583-9.
53. Rossi G, Nannini N, Tiseo M. ERCC1 and small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2010;5(11):1876-7.
54. Kim YH, Ishii G, Goto K, Ota S, Kubota K, Murata Y, et al. Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung cancer*. 2009;65(1):105-11.
55. Sodja E, Knez L, Kern I, Ovcaricek T, Sadikov A, Cufer T. Impact of ERCC1 expression on treatment outcome in small-cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2012;48(18):3378-85.
56. Muley TR, Sianidou M, Thomas M, Bischoff H, Dienemann H, Meister M, et al. Comparison of two ERCC1 antibodies as prognostic and predictive biomarkers for early non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 2014;34(7):3707-13.
57. Yu D, Zhang X, Liu J, Yuan P, Tan W, Guo Y, et al. Characterization of functional excision repair cross-complementation group 1 variants and their association with lung cancer risk and prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(9):2878-86.
58. Karachaliou N, Papadaki C, Lagoudaki E, Trypaki M, Sfakianaki M, Koutsopoulos A, et al. Predictive value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPOI, TOPOmicron-IIA, TOPOIIB and C-MYC genes in patients with small cell lung cancer (SCLC) who received first line therapy with cisplatin and etoposide. *PloS one*. 2013;8(9):e74611.
59. Hubner RA, Riley RD, Billingham LJ, Popat S. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) status and lung cancer outcomes: a meta-analysis of published studies and recommendations. *PloS one*. 2011;6(10):e25164.
60. Skov BG, Holm B, Erreboe A, Skov T, Mellemgaard A. ERCC1 and Ki67 in small cell lung carcinoma and other neuroendocrine tumors of the lung: distribution and impact on survival. *J Thorac Oncol*. 5(4):453-9.

61. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
62. Viswanathan SR, Daley GQ. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell*. 140(4):445-9.
63. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007;131(6):1109-23.
64. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2007;39(5):673-7.
65. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*. 2008;18(10):505-16.
66. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 2006;20(16):2202-7.
67. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*. 2009;41(7):843-8.
68. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunneff K, Takeuchi A, Park IH, et al. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 2009;460(7257):909-13.
69. Ma X, Li C, Sun L, Huang D, Li T, He X, et al. Lin28/let-7 axis regulates aerobic glycolysis and cancer progression via PDK1. *Nature communications*. 2014;5:5212.
70. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
71. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res*. 2007;67(23):11111-6.
72. Jeong SH, Wu HG, Park WY. LIN28B confers radio-resistance through the posttranscriptional control of KRAS. *Exp Mol Med*. 2009;41(12):912-8.
73. Lu L, Katsaros D, Shaverdashvili K, Qian B, Wu Y, de la Longrais IA, et al. Pluripotent factor lin-28 and its homologue lin-28b in epithelial ovarian cancer and their associations with disease outcomes and expression of let-7a and IGF-II. *Eur J Cancer*. 2009;45(12):2212-8.

74. Li Y, VandenBoom TG, 2nd, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(16):6704-12.
75. Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, et al. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2006;3(5):317-24.
76. Yang N, Kaur S, Volinia S, Greshock J, Lassus H, Hasegawa K, et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2008;68(24):10307-14.
77. Lu L, Schwartz P, Scarampi L, Rutherford T, Canuto EM, Yu H, et al. MicroRNA let-7a: A potential marker for selection of paclitaxel in ovarian cancer management. *Gynecol Oncol.* 122(2):366-71.
78. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:395-419.
79. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem.* 2002;277(16):13430-7.
80. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell.* 1996;87(4):629-38.
81. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:73-91.
82. Azad N, Iyer AK, Manosroi A, Wang L, Rojanasakul Y. Superoxide-mediated proteasomal degradation of Bcl-2 determines cell susceptibility to Cr(VI)-induced apoptosis. *Carcinogenesis.* 2008;29(8):1538-45.
83. Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, et al. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1062-9.
84. Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V, et al. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2008;73(1):119-27.

85. Gazitt Y, Rothenberg ML, Hilsenbeck SG, Fey V, Thomas C, Montegomrey W. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 1998;13(4):839-48.
86. Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005;6(12):1163-9.
87. Ghita C, Vilcea ID, Dumitrescu M, Vilcea AM, Mirea CS, Aschie M, et al. The prognostic value of the immunohistochemical aspects of tumor suppressor genes p53, bcl-2, PTEN and nuclear proliferative antigen Ki-67 in resected colorectal carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(3):549-56.
88. Sahi H, Koljonen V, Kavola H, Haglund C, Tukiainen E, Sihto H, et al. Bcl-2 expression indicates better prognosis of Merkel cell carcinoma regardless of the presence of Merkel cell polyomavirus. *Virchows Arch.* 2012;461(5):553-9.
89. Yildirim M, Suren D, Goktas S, Dilli UD, Kaya C, Copuroglu R, et al. The predictive role of Bcl-2 expression in operable locally advanced or metastatic gastric carcinoma. *J BUON.* 2012;17(1):106-9.
90. Boonyaphiphat P, Pruegsanusak K, Thongsuksai P. The prognostic value of p53, Bcl-2 and Bax expression in laryngeal cancer. *J Med Assoc Thai.* 2012;95(10):1317-20.
91. Pavlenko IA, Povilaitite PE, Gorelik MZ, Petrov AV. [Bcl-2 as a prognostic factor in different molecular genetic subtypes of breast cancer]. *Arkh Patol.* 2012;74(5):36-40.
92. Shivakumar L, Armitage JO. Bcl-2 gene expression as a predictor of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical lymphoma & myeloma.* 2006;6(6):455-7.
93. Chu SH, Ma YB, Feng DF, Li ZQ, Jiang PC. Correlation between SATB1 and Bcl-2 expression in human glioblastoma multiforme. *Mol Med Rep.* 2012.
94. Halasova E, Adamkov M, Matakova T, Vybohova D, Antosova M, Janickova M, et al. Expression of Ki-67, Bcl-2, Survivin and p53 Proteins in Patients with Pulmonary Carcinoma. *Adv Exp Med Biol.* 2013;756:15-21.
95. Pal'tsev MA, Demura SA, Kogan EA, Jaques G, Zende B. Role of Bcl-2, Bax, and Bak in spontaneous apoptosis and proliferation in neuroendocrine lung tumors: immunohistochemical study. *Bull Exp Biol Med.* 2000;130(7):697-700.

96. Coppola D, Clarke M, Landreneau R, Weyant RJ, Cooper D, Yousem SA. Bcl-2, p53, CD44, and CD44v6 isoform expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Mod Pathol*. 1996;9(5):484-90.
97. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C, et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *The American journal of pathology*. 1996;149(6):1941-52.
98. Vilar E, Salazar R, Perez-Garcia J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J. Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(2):221-32.
99. Thomas Walter DT, Eric Baudin, et al. Characteristics, prognosis and treatments of 294 patients with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: The FFCD-GTE national cohort. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;Vol 33 (No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: 4095).
100. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.
101. Ferrarotto R, Testa L, Riechelmann RP, Sahade M, Siqueira LT, Costa FP, et al. Combination of Capecitabine and Oxaliplatin is an Effective Treatment Option for Advanced Neuroendocrine Tumors. *Rare tumors*. 2013;5(3):e35.
102. Okimoto T, Tsubata Y, Sutani A, Fuchita H, Koba N, Hotta T, et al. Immunohistochemical comparison of biomarker expression in biopsy and surgical specimens of non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 2014;34(6):2755-61.
103. Kilshaw J, Ollerenshaw R. Assessment of spinal movement. 1954. *The Journal of audiovisual media in medicine*. 1991;14(1):23-8.
104. Emily K. Bergsland RR, Phil Stephens, et al. Genomic profiling to distinguish poorly differentiated neuroendocrine carcinomas arising in different sites. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34:No 15_suppl (May 20 Supplement), 2016: 4020.
105. Meder L, Konig K, Ozretic L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP, et al. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int J Cancer*. 2016;138(4):927-38.

106. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, Sun W, Bahary N, Kuan SF, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Human pathology*. 2016;49:124-34.
107. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.