

MARCELO LUIZ BALANCIN

**Relevância do perfil morfológico, molecular e imunomatricial como
sinalizadores de alvos terapêuticos no mesotelioma maligno**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Balancin, Marcelo Luiz
Relevância do perfil morfológico, molecular e
imunomatricial como sinalizadores de alvos
terapêuticos no mesotelioma maligno / Marcelo Luiz
Balancin. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Mesotelioma 2.Imuno-histoquímica
3.Imunoterapia 4.Matriz extracelular 5.Colágeno
6.Biologia computacional 7.Inteligência artificial
8.Patologia

USP/FM/DBD-013/2020

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Quando vemos um castelo, não nos vem, de imediato, a imagem de que o monumento de hoje repousa sobre o que, no passado, fora uma ideia. Sem aqueles que alicerçassem, conduzissem e executassem essa ideia, não veríamos o castelo; tampouco a vida dos que o construíram, habitaram, e mesmo, passaram por ele, não seria transformada. Dadas suas proporções, a tese não deixa de ser o primeiro castelo que construímos como cientistas; ela nos transforma e nos permite transformar os outros, sem os quais não existiria. A todos esses somos gratos.

À família, que oferece os alicerces de valores, perseverança e companheirismo; meus pais Célia e Oscar Balancin e minha querida Larissa Defendi, que estiveram ao meu lado, acreditaram, incentivaram e cederam às concessões necessárias.

A quem conduz e faz valer o significado da palavra orientar, a Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, uma verdadeira professora, cuja generosidade em dividir seu conhecimento é única. Ensinou-me a tornar a tese em uma aventura de métodos e de hipóteses, que se desenovelou com o encanto único da Ciência e com doses diárias de humildade, respeito e dedicação.

E a todos aqueles que executaram juntos: ao grupo da Profa. Dra. Walcy Rosolia Teodoro, no estudo do colágeno, a quem sou grato pelas discussões e IFs (documentadas por J Tomaz de Miranda). A quem confeccionou os TMAs com perfeição (Aline Assato, LIM14). À dedicação e busca por excelência nas inúmeras reações IHQs (Esmeralda Eher, Sandra Fenerzlian e Neila Silva), ao capricho da histotécnica (Cassia Arruda) e a Reginaldo Silva do Nascimento pela digitalização das lâminas. Àqueles que permitiram acesso aos casos (Dra. Sheila Siqueira, DAP; Profa. Dra. Vera Demarchi Aiello, InCOR, Prof. Dr. Evandro Sobroza de Melo, ICESP e Dra. Paola da Costa Souza). Ao apoio acadêmico de Thiago Luiz Vieira Rezende.

Àqueles que trouxeram sua visão: Dr. Roberto Falzoni (APC/DAP), Dra. Anja Roden (Mayo Clinic Rochester, EUA), Prof. Helmut Popper (Universidade de Graz, Áustria), Profa. Françoise Galateau-Salle (Universidade de Lyon e Mesopath, França) e Prof. Roberto Salgado (TIL Working Group, Bélgica).

Como todo castelo, esse tem seu passado e não posso deixar de mencionar dois professores da graduação, da “Gloriosa” FMRP-USP, que influenciaram em peso minha visão de Ciência e de Medicina: o Prof. Dr. Gustavo Ballejo Oliveira e o Prof. Dr. Ajith Kumar Sankarankutty, sobretudo por inculcar o interesse pela jornada acadêmica.

Aos demais colegas do DAP, em especial o Dr. Alexandre Muxfeldt Ab’Saber, pela amizade, aos residentes e equipe de secretaria pelo suporte e aos amigos Buzina Júnior e Surdina Netto ficam meus mais sinceros agradecimentos pela participação em construirmos juntos esse castelo.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2018/20403-6).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico, CNPq (processo CNPq-483005/2012-6).

Roche Diagnostics pelo *grant* para estudo de PD-L1 (agradecemos à Profa. Dra. Mariza Dinnocenzo por intermediar a parceria Indústria-Universidade).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal 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. 2ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Tabelas e Gráficos	
Lista de Figuras	
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	1
HISTÓRIA E IMPACTO SOCIAL	2
EPIDEMIOLOGIA	6
CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE	7
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	9
GRADAÇÃO NUCLEAR	13
ESTADIAMENTO TNM/AJCC, OITAVA EDIÇÃO (2018)	13
DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DA SOCIEDADE AMERICANA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2018	13
FARMACODINÂMICA DOS ALVOS E MICROAMBIENTE CELULAR	15
NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS	15
ALVOS DE IMUNOCHECKPOINTS E VIAS IMUNOLÓGICAS	16
ALVOS RELACIONADOS À BIOLOGIA TUMORAL	19
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
CASUÍSTICA	28
FUNDAMENTAÇÃO DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS	33
CONSTRUÇÃO DE TISSUE MICROARRAY (TMA)	34
HISTOQUÍMICA	35
IMUNO-HISTOQUÍMICA	37
INTERPRETAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	38
TUNEL	47
IMUNOFLUORESCÊNCIA	47
DIGITALIZAÇÃO E CAPTURA DE IMAGENS DAS LÂMINAS DE HISTOLOGIA	48
QUANTIFICAÇÃO SEMI-ASSISTIDA COMPUTADORIZADA	49
ALINHAMENTO DE IMUNOFLUORESCÊNCIAS DO COLÁGENO	53
RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL E IMPRESSÃO 3D DO COLÁGENO	54
ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
RESUMO DE MÉTODOS EMPREGADOS E DESENVOLVIDOS NA TESE (TABELA 2.5)	57
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXO I	112
ANEXO II	117
ANEXO III	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

.stl	Formato de arquivo “stereolithography”
.tif	Formato de arquivo “Tagged Image File Format”
A	Trial Ativo
AAK	Aurora A Kinase
AE1AE3	Citoqueratinas AE1 (pan-ácidas) e AE3 (pan-básicas)
AJCC	American Joint Commission on Cancer
BAP1	Breast Associated Protein 1
BAP1	GENE BRCA1 associated protein 1
BCR-ABL	BCR-ABL mutation
Ber-EP4	Epithelial Cell Adhesion Molecule / EPCAM
BRCA-1	Gene Breast Cancer 1, early onset
c-Met	Tyrosine-protein kinase Met
CAM 5.2	Citoqueratina CAM 5.2
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy
CCD	Coupled Charged Detector
CD20	Cluster of Differentiation 20
CD26	Cluster of differentiation 26, DPP4 (Dipeptidil peptidase 4)
CD30	Cluster of differentiation 30, TNFRSF8 (Ki-1)
CD30TS	CD30 Tumor Score
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD68	Cluster of Differentiation 68
CD74	Cluster of differentiation 74, CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
CD8	Cluster of differentiation 8
CDK4/6	Cyclin-dependent kinase 4/6
CDKN2a/ARF	Gene Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CFAP45	Gene Cilia and Flagella Associated Protein 45
CK5/6	Citoqueratinas 5 e 6
CK7/20	Citoqueratinas 7 e 20
CL I/II	Cluster I/II
CMa	Carcinoma mamário
CMs	Células malignas
CNPC	Carcinoma não pequenas células
Col	Colágeno
CP	Câncer de Pulmão
CPS	Combined positive score
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
D2-40	Podoplanina
DAB	3'-Diaminobenzidine
DAP	Divisão de Anatomia Patológica
DART B7-H3	Dual-affinity re-targeting protein B7-H3 histone complex

DDX3X	Gene ATP-dependent RNA helicase DDX3X
DLL3	Delta like protein 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês)
EC	Extracelular
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	Histone-lysine N-methyltransferase enzyme (H3K27)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLUT1	Glucose Transporter 1
H-SCORE	Histological Score
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Hippo	Via de sinalização intracelular Salvador-Warts-Hippo
Hsp90	Heat Shock Protein 90
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IF	Imunofluorescência
IFN-g	Interferon gamma
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-1b	Interleucina 1 beta
iMIG	International Mesothelioma Interest Group
InCOR	Instituto do Coração
Ki-67	Antígeno Ki-67 (Kihel-67)
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14
LMB-100	Mesothelin-Targeted Immunotoxin LMB-100
Mab	Monoclonal antibody
MEC	Matriz Extracelular
MET	Mesenchymal-epithelial transition factor
MIDS	Mononuclear immune cell density score
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MLB	Marcelo Luiz Balancin
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2
MM	Mesotelioma maligno
mm²	Milímetro quadrado
mm³	Milímetro cúbico
MMP-9	Metaloproteinase 9
MOC31	Epithelial Specific Antigen/Ep-CAM
MSH2	MutS homolog 2

MSH6	MutS homolog 6
mTOR	Gene mammalian target of rapamycin
NAE	NEDD8-activating enzyme
NF2	Gene Neurofibromatosis type 2
NLRP3	Gene NLR family pyrin domain containing 3, CIAS1
NR	Trial não Recrutando
OHSA	Occupational Health and Security Administration
OMS	Organização Mundial da Saúde
p40	Protein 40
p53	Gene supressor tumoral TP53
p63	Protein 63
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein 1-Ligand
PEG-Arginine	Pegylated Arginine Deiminase
PIK3/AKT	Via de sinalização phosphoinositide-3-kinase–protein kinase
PMS2	MS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
R	Trial em Recrutamento
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumours
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês)
RYR2	Gene Ryanodine receptor 2
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SETD2	Gene SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase
SETDB1	Gene SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1
SV40	Simian Virus 40
Tb	Terabyte
TBS	Tris-buffered saline
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor Nodes Metastasis
TP53	Gene Tumor Protein
TPS	Tumor positive score
TTF1	Thyroid Transcription Factor 1
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UICC	Union for International Cancer Control
ULK2	Gene Unc-51-like kinase 2
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor
VLC	Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi
Weka	Waikato Environment for Knowledge Analysis
WT1	Wilms Transcription Factor 1

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1.1	Abordagem diagnóstica histopatológica com fundamentação racional para construção de painéis imuno-histoquímicos.	12
Tabela 1.2	Revisão de estudos com descrição de porcentagem de expressão de alvos e sobrevida ou resposta terapêutica.	18
Tabela 1.3	Ensaio clínico em andamento para MM com uso de terapia alvo.	21
Tabela 1.4	Revisão de evidências e hipóteses de ação do Col (V) no câncer em literatura indexada.	24
Tabela 2.1	Elementos teciduais que são identificados ao Pentacrômio de Movat.	35
Tabela 2.2	Relação de antígenos com discriminação de método para testes imuno-histoquímicos.	40
Tabela 2.3	Células de interesse e expectativas de padrões de marcação e expressão. Método de avaliação empregado.	41
Tabela 2.4	Parâmetros empregados para quantificação digital.	50
Tabela 2.5	Resumo de métodos empregados e desenvolvidos na tese.	56
Tabela 3.1	Características clínico epidemiológicas da coorte de pacientes MM.	58
Tabela 3.2	Distribuição dos tipos histológicos das coortes.	59
Tabela 3.3	Distribuição dos elementos clínicos e epidemiológicos entre os tipos epitelióide e sarcomatóide do MM.	62
Tabela 3.4	Distribuição do perfil imuno-histoquímico de antígenos para histogênese mesotelial.	63
Tabela 3.5	Comparação entre os grupos e características morfológicas.	64
Tabela 3.6	Distribuição das células inflamatórias avaliadas.	65
Tabela 3.7	Distribuição dos elementos matriciais.	66
Tabela 3.8	Imunoexpressão de antígenos relacionados à proliferação celular, características oncogênicas, proteínas de instabilidade de microssatélite e apoptose (TUNEL).	68
Tabela 3.9	Caracterização imuno-histoquímica do fenótipo EMT.	69
Tabela 3.10	Caracterização imuno-histoquímica de alvos terapêuticos.	70
Tabela 3.11	Associações dos elementos imunomatriciais com TILs.	71
Tabela 3.12	Padrões de distribuição da IHQ do Col (V).	83
Tabela 3.13	Padrões de distribuição da IHQ do Col (V) por tipo e subtipo histológico.	84
Tabela 3.14	Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ e por tipos histológicos.	85
Tabela 3.15	Distribuição do padrão de marcação e correlação entre os métodos IF e IHQ.	88
Tabela 3.16	Correlação com status (vivos vs óbito) nos métodos de avaliação do Col (V).	88

Tabela 3.17	Diferenças entre os grupos vivos e óbitos pelos padrões avaliados à IHQ.	88
Tabela 3.18	Correlação entre intensidade de expressão de IHQ, IF e sobrevida do Col (V).	89
Gráfico 3.1	Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevida em vista da presença de necrose.	64
Gráfico 3.2	Boxplot de distribuição de Linfócitos T CD4 entre os grupos orientado pelo evento óbito.	65
Gráfico 3.3	Boxplots de distribuição de Linfócitos B CD8 e CD20 entre os grupos tipo histológico epitelióide e sarcomatóide.	65
Gráfico 3.4	Boxplots da distribuição de elementos matriciais (celularidade, ácido hialurônico, fibrina e colágeno total) entre os grupos epitelióide e sarcomatóide.	68
Gráfico 3.5	Boxplot de distribuição de PMS2.	69
Gráfico 3.6	Dendograma e distribuição gráfica de distribuição dos casos agrupados pelos clusters.	77
Gráfico 3.7	Curva de Kaplan-Meier para os grupos de cluster de baixo e alto risco.	77
Gráfico 3.8	Padrões de distribuição da IHQ do Col (V).	83
Gráfico 3.9	Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.	
Gráfico 3.10	Curvas ROC para o Col (V) para diagnóstico de MM pela IHQ.	86
Gráfico 3.11	Curvas ROC para o Col (V) para diagnóstico de MM pela IF.	86
Gráfico 3.12	Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para os padrões IHQ de Col (V).	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Características morfológicas do MM epitelióide pleural.	8
Figura 1.2	Comparação entre os tipos histológicos de MM.	9
Figura 1.3	Aspectos imuno-histoquímicos do MM	11
Figura 1.4	Pontos de ação celular de terapia alvo em ensaio clínico.	20
Figura 2.1	Fluxo de busca de casos e inclusão para o estudo.	28
Figura 2.2	Caraterísticas nucleares, segundo <i>Kadota et al.</i>	33
Figura 2.3	Avaliação de Linfócitos Intratumorais (TIL), segundo <i>Hendry et al.</i>	33
Figura 2.4	Exemplo de seleção de pontos no TMA.	34
Figura 2.5	Visão microscópica panorama dos TMAs construídos.	35
Figura 2.6	Elementos de matriz extracelular corados pela técnica histoquímica de Pentacrômio de Movat.	36
Figura 2.7	Padrões de fibras colagênicas I e III observados sob a coloração de picrosírius sob luz polarizada.	36
Figura 2.8	Razões consideradas para avaliação quantitativa da positividade de imunexpressão de PD-1, PD-L1 e CD30.	38
Figura 2.9	Sumário dos métodos e marcadores, avaliados através das técnicas de imuno-histoquímica, histoquímica e imunofluorescência nos diversos componentes celular e extracelular.	39
Figura 2.10	Imunexpressão de PD-1 e PD-L1 em células neoplásicas e imunes (linfócitos e macrófagos) e PD-L1 em células neoplásicas e imunes.	42
Figura 2.11	Padrão de imunexpressão dos elementos do fenótipo de transição epitélio mesênquima.	42
Figura 2.12	Padrões de imunexpressão dos antígenos descritos na Tabela 2 para o diagnóstico e avaliação de infiltrado inflamatório.	43
Figura 2.13	Padrão de expressão de Ki-67 como método de avaliação indireta de atividade proliferativa e P53.	44
Figura 2.14	Padrão de imunexpressão de proteínas de reparo de DNA, de padrão nuclear nas células neoplásicas: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.	44
Figura 2.15	Padronização da IHQ do Col (V), com o padrão das diversas diluições testadas.	45
Figura 2.16	Padrão de marcação de TUNEL para avaliação de apoptose.	46
Figura 2.17	Áreas de anotação nos spots de TMA para análise de imagem no software QuPath.	49
Figura 2.18	Fluxo de para quantificação pelo software QuPath.	49
Figura 2.19	Composição do Histoscore (H-SCORE) digital.	
Figura 2.20	Conjunto de treinamento para o algoritmo WEKA, composto como um mosaico de áreas previamente selecionadas representativas das “verdades fundamentais”.	50
Figura 2.21	Imagens de entrada (<i>input</i>) e saída (<i>output</i>) da segmentação WEKA, mostrando áreas de verdades fundamentais segmentadas.	51
Figura 2.22	Imagens de entrada (<i>input</i>) (A) e (B) saída (<i>output</i>) da segmentação.	52

Figura 2.23	Ilustração das características histoquímicas sob a técnica de coloração picrossírius.	53
Figura 2.24	Fluxo de trabalho para geração do modelo tridimensional do componente colagênico (fibras tipos I e III) da MEC.	55
Figura 2.25	Modelos de impressão 3D.	55
Figura 3.1	Classificação histológica da coorte MM, com suas respectivas frequências.	60
Figura 3.2	Classificação histológica da coorte câncer de pulmão, com suas respectivas frequências.	61
Figura 3.3	Classificação histológica da coorte câncer de mama, com suas respectivas frequências.	61
Figura 3.4	Características morfológicas à microscopia convencional (HE, Picrosírius, bidimensionais) e identificadas no modelo 3D.	67
Figura 3.5	Tangenciabilidade do modelo de MEC (Colágenos I e III) impresso em reina.	67
Figura 3.6	Representação morfológica dos tipos epiteloide e sarcomatoide com celularidade (HE) e elementos de MEC (Movat).	72
Figura 3.7	Perfil de colágeno à IF em MM epitelioides e sarcomatoides.	73
Figura 3.8	Perfil imuno-histoquímico nos tipos epiteloide e sarcomatoide.	74
Figura 3.9	Perfil de alvos e marcadores específicos nos tipos epiteloide e sarcomatoide.	75
Figura 3.10	IF para Col (I), (III), (IV) e (V).	78
Figura 3.11	IF para Col (I, magenta) e (III, verde), reconstruído digitalmente com alinhamento das imagens.	79
Figura 3.12	IF para Col (V) e dupla marcação com D2-40.	79
Figura 3.13	IF para Col (V) - padrões: células individualizadas, misto e blocos celulares.	80
Figura 3.14	Padrões imuno-histoquímicos para Col (V).	81
Figura 3.15	IHQ para Col (V) com os respectivos padrões.	82
Figura 3.16	Correlação entre os padrões morfológicos, imuno-histoquímicos e à imunofluorescência do Col (V).	87
Figura 4.1	Proposição de modelo interpretativo do Col (V) como biomarcador diagnóstico e prognóstico no MM.	

RESUMO

Balancin ML. *Relevância do perfil morfológico, molecular e imunomatricial como sinalizadores de alvos terapêuticos no mesotelioma maligno* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: O mesotelioma maligno (MM) é uma neoplasia maligna altamente letal e associada à exposição às fibras do amianto. Os modelos preditivos e prognósticos levam em consideração os tipos histológicos (epiteloide vs sarcomatoide) e o estadiamento clínico. Além da falta de modelos histopatológicos matemáticos, pouco se conhece sobre o papel da matriz extracelular (MEC) e da presença de outros alvos terapêuticos, como a resposta imunocelular. Nessa tese, sugerimos um modelo prognóstico com base nas características histopatológicas e imunomatriciais e identificamos um novo potencial biomarcador diagnóstico e prognóstico.

MÉTODOS: Foram construídos microarranjos teciduais (TMAs) a partir de amostras parafinadas de MM (epiteloide e sarcomatoide), de carcinomas de mama e de pulmão. Foram avaliados parâmetros morfológicos (celularidade tumoral, grau nuclear e linfócitos intratumorais, TILs), imuno-histoquímicos (IHQ), como BAP-1, Ki-67, P53, D2-40, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, PD-1, PD-L1, CD30, CD4, CD8, CD20, CD68, Vimentina, E-Caderina e imunofluorescência (IF) para Colágeno V (Col (V)). A matriz extracelular (MEC) fibrilar foi caracterizada para fibras grossas e finas do colágeno (Picrosírius), fibras elásticas (Resorcina) e fibras do colágeno (Imunofluorescência) tipos I, III, IV e V. A MEC não-fibrilar foi avaliada para o ácido hialurônico através do Pentacromio de Movat. Apoptose em células malignas (CMs) foi estimada através da técnica do TUNEL. As lâminas contendo os TMAs foram digitalizadas por métodos computacionais para avaliação e quantificação dos marcadores. Os parâmetros obtidos foram clusterizados em modelo semi-assistido segundo relevâncias biológica e da regressão logística, com desfecho em sobrevida. Finalmente, o padrão de imunossupressão do Col (V) foi comparado entre as células malignas (CMs) dos MM, carcinomas de mama e pulmão e correlacionado aos demais marcadores e sobrevida.

RESULTADOS: (I) Caracterização da coorte: A coorte foi composta por 82 pacientes, sendo 73 (89%) portadores de MM epiteloide e 9 (11%) MM sarcomatoide. A densidade de TILs foi correlacionada à densidade de CMs PD-L1 positivas ($p=0,01$) e linfócitos T CD8 positivos ($p=0,005$) em 69% (57/82) dos MM. Todos MM apresentaram fenótipo de transição epitélio mesenquimal (Vimentina positivo e perda de expressão de E-caderina), sendo que a MEC fibrilar e não-fibrilar dos tipos epiteloide e sarcomatoide apresentou composição diferente (densidade de ácido hialurônico de 6,57 vs 10,73, $p<0,05$, elastina 6,08 vs 2,03, $p<0,05$, colágeno total de 12,05 vs 32,71, $p<0,05$, colágeno I de 1,10 vs 0,16, $p<0,05$ e fibrina de 4,14 vs 1,02, $p<0,05$ na comparação entre epiteloide e sarcomatoide, em fibras/mm³). Isoladamente, a baixa expressão de PMS2 (58,44% vs 29,14% no grupo óbito com $p<0,001$) foi correlacionada à ao risco de óbito ($R=1,20$). (II) Modelo preditivo: A análise de cluster hierárquico estratificou dois grupos de pacientes com o desfecho óbito. O cluster de alto risco demonstrou alta densidade de fibras de Col (V), baixa densidade de linfócitos T CD8+ e alta celularidade tumoral, independentes das demais características histopatológicas ($p<0,01$, com razão de risco de 2,19 (0,54-3,03)). (III) Colágeno V: O Col (V) foi colocalizado ao D2-40 ($p<0,05$; $R=0,95$), com padrão de expressão por IF individualizando CMs em 95% dos MM e 0% dos carcinomas de mama e pulmão; padrão em blocos CMs em 5% dos MM, 9,3% dos carcinomas de pulmão e 98,9% de mama ($p<0,05$) e padrão misto (individual e blocos de CMs) em 0% MM, 7,7% carcinomas de pulmão e 1,2% de mama; A IF do Col (V) revelou predominância da expressão individualizada de CMs nos MM (75,6%) em comparação a 7,3% e 17,1% dos carcinomas de pulmão e mama ($p<0,001$) e baixa expressão do padrão em blocos celulares (3,7% MM vs 35,2% pulmão e 61% mama, $p<0,001$). A intensidade de expressão

também foi mais intensa nos MM (H-Score mediano de 100 para MM vs 47 em carcinomas de pulmão e 60,6 em mama; $p=0,047$ e $p=0,024$ entre os respectivos grupos). A especificidade da IHQ em padrão de células isoladas para Col (V) foi de 0,901, com sensibilidade do padrão em blocos para carcinomas de 0,961. O padrão de expressão do Col (V) mostrou-se preditivo da sobrevida livre de doença quando expresso no padrão CMs isoladas em comparação a blocos ($p=0,05$; $R= 0,69$). A igualdade distribuição dos padrões entre a IF e IHQ foi observada somente no grupo de blocos CMs ($p=0,054$). CONCLUSÕES: A necessidade de conhecimento de potenciais alvos terapêuticos para o MM é irrefutável em vista de poucas opções terapêuticas, assim como a caracterização da MEC para melhor compreensão da biologia tumoral. Construimos um modelo de fluxo de trabalho de extração de dados histopatológicos com uso de técnicas de patologia computacional acessíveis, integramos os dados em um modelo prognóstico com utilidade clínica. Finalmente, descrevemos um biomarcador da MEC, não descrito previamente, o Col (V), como promissor marcador preditivo de diagnóstico e prognóstico do MM na rotina clínica da patologia cirúrgica.

Descritores: Mesotelioma; Imuno-histoquímica; Imunoterapia; Matriz extracelular; Colágeno; Biologia computacional; Inteligência artificial; Patologia.

ABSTRACT

Balancin ML. *Morphologic, molecular and immunomatrix profile applicability at signaling therapeutic targets in malignant mesothelioma* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

INTRODUCTION: Malignant mesothelioma (MM) is a highly lethal malignancy associated with exposure to asbestos fibers. Prognostic models take into account histological type (epithelioid vs sarcomatoid) and clinical staging, while biomarkers are often neglected. Current therapeutic targets, as PD-L1, are incipiently reported, as well as little is known about the extracellular matrix (ECM). In this thesis, we suggest a mathematical prognostic model based on histopathological features extracted through computational pathology, characterize ECM and describe a new diagnostic and prognostic biomarker with potential practical use in surgical pathology. **METHODS:** Tissue microarrays were built from paraffin-embedded MM (epithelioid and sarcomatoid), breast and lung cancer blocks. We evaluated morphological (nuclear grade and intratumoral lymphocytes, TILs) and immunohistochemical (IHC) parameters such as BAP-1, Ki-67, P53, MLH1, PMS2, MSH2, PD-1, PD-L1, CD30, CD4, CD8, CD20, CD68, Vimentin, E-Cadherin and Collagen V (Col (V)). Fibrillary ECM was characterized by histochemical stains (Picrosirius for thick and thin collagen fibers), Resorcin (elastic fibers) and IF for collagen types I, III, IV and V. Non-fibrillar fibers were evaluated by Movat Pentachrome for hyaluronic acid. Apoptosis was estimated using the TUNEL technique. Histology slides were digitalized for the evaluation and quantification of the markers, through computational technique. Data was clustered through semi-assisted model according to biological and logistic regression relevance, targeted at survival outcome. In addition, Col (V) immunoexpression pattern was compared between MM and breast and lung tumors and correlated with other markers and survival. **RESULTS:** (I) Cohort characterization: The MM cohort consisted of 82 patients, 73 (89%) epithelioid type and 9 (11%) sarcomatoid; Of the prognostic markers, the expression of TILs was correlated to tumor cells expression of PD-L1 ($p = 0.01$) and CD8 ($p = 0.005$). All cases are of EMT phenotype (vimentin positive with loss of expression of e-cadherin) and the ECM compositions of the epithelioid and sarcomatoid types was distinct (hyaluronic acid density of 6.57 vs 10.73, $p < 0.05$, elastin 6.08 vs 2.03, $p < 0.05$, total collagen 12.05 vs 32.71, $p < 0.05$, type I collagen 1.10 vs 0.16, $p < 0.05$ and fibrin 4.14 vs 1.02, $p < 0.05$ epithelioid vs sarcomatoid, fibers/mm³). Also, low PMS2 expression (58.44% vs 29.14% dead of disease group $p < 0.001$) was isolated correlated with poor survival ($R = 1.20$). (II) Hierarchical cluster analysis stratified into two groups of patients with the death outcome. The high-risk cluster showed high density of Col (V) fibers, low density of CD8 + T lymphocytes and high cellularity, independent of the other histopathological characteristics ($p < 0.01$, HR 2.19 (0.54-3.03)). (III) Collagen V: Col (V) was colocalized with D2-40 ($p = 0.95$, Spearman). IF Col (V) expression was evidenced in patterns of individualized cells, blocks and mixed pattern. The pattern of individualized cells was evidenced in 95% of MM cases and 0% in other tumors, mixed pattern in 0% MM, 7.7% lung and 1.2% breast and cell block pattern in 5% of MM, 9.3% lung and 98.9% breast ($p < 0.001$). Col (V) IHC revealed predominance of expression of isolated cell pattern in MM (75.6%) compared to 7.3% and 17.1% in lung and breast ($p < 0.001$), as well as low expression of cell blocks pattern (3.7% MM vs 35.2% lung and 61% breast, $p < 0.001$). Expression intensity was also more intense in MM (median H-Score from 100 to MM vs 47 in lung adenocarcinoma and 60.6 in breast, $p = 0.047$ and $p = 0.024$ between the respective groups) The specificity of the IHC in isolated cells was 0.901, while the block pattern had a sensitivity of 0.961 for the diagnosis of adenocarcinoma. The Col (V) expression pattern provided predictive data for disease-free survival when expressed in the single cell pattern compared to blocks ($p = 0.05$, RR 0.69). **CONCLUSIONS:** The necessity of

data supporting potential therapeutic targets for MM is unquestionable in view of the reduced therapeutic options, as well as the characterization of ECM for a better understanding of tumor biology. We offer a histopathological data extraction workflow model using accessible computational pathology techniques, integrating the data into a prognostic model with clinical utility. Finally, we describe a new ECM biomarker, Col (V), with diagnostic, prognostic and predictive utility in MM.

Descriptors: Mesothelioma; Immunohistochemistry; Immunotherapy; Extracellular matrix; Collagen; Computational biology; Artificial intelligence; Pathology.

INTRODUÇÃO

História e impacto social

Em 1909 nasce a cidade de Asbestos, na província de Québec, no Canadá. Surge de forma simples e espontânea, como é, geralmente, o nascimento dos núcleos urbanos, através da aglomeração de pessoas ao redor de um interesse. Aqui, uma placa com a palavra “Asbestos”, o equivalente grego à forma latina amianto¹, que designa um grupo heterogêneo de minérios em fibras, de relevância comercial¹. Essa placa sinalizará uma das maiores reservas mundiais de amianto e será o exemplo de uma comunidade que vivenciará seu ciclo de exploração.

A composição do núcleo urbano foi iniciada pela instalação dos mineradores, logo seguida por suas famílias e por toda a rede de apoio que suportaria as atividades do núcleo minerador da Jeffrey Mining Co, que era a maior mineradora canadense em termos de relevância econômica². A cidade cresceu; ao redor da década de 1930, o núcleo urbano ganhava força, agora com setor de serviços e comércio autônomos, tornando-se, cada vez mais, uma cidade como qualquer outra. Na década de 1970, Asbestos era um marco na mineração de amianto no Canadá, alcançando a faixa de \$230 milhões de dólares canadenses em 1973 (estimado em \$1,04 bilhões de dólares americanos em 2018)³.

O ciclo de crescimento socioeconômico continuou até a década de 1980, quando foram iniciadas medidas mundiais de banimento da mineração e manufatura do amianto em vista de associações com doenças relacionadas diretamente à exposição ocupacional e indiretamente, em virtude da exposição dos familiares e demais indivíduos (exposição para-ocupacional)². Para completar o ciclo, retraiu-se continuamente, com um minguante econômico até 2011, quando ocorreu o banimento definitivo do amianto no Canadá³ e o fechamento da mineradora Jeffrey Mining Co.

Nesse ponto, interrompeu-se a principal fonte de renda da cidade de Asbestos. O declínio foi evidente, tanto em termos socioeconômicos – devido ao embargo à exploração do minério³ – quanto populacionais: de cerca de dez mil habitantes, na década de 1970, a cidade passou a contar com menos de seis mil em 1999.

Tal cenário não foi exclusivo dessa cidade e até repetiu-se em outras, com nomes semelhantes, como Asbest, na Rússia. A exploração do amianto foi particular dentre outros minérios pelo risco de desenvolvimento de doenças relacionadas às suas fibras através da exposição ocupacional e para-ocupacional.

A exposição ao amianto, tratado como sinônimo para asbestos, é associada ao desenvolvimento de diversas doenças graves, limitantes e potencialmente letais⁴. O

espessamento pleural com a caracterização de placas pleurais, determinando pneumopatia do tipo restritiva, com dor e dificuldade respiratória, é um exemplo de doença benigna, assim como as pneumoconioses; o câncer da pleura (mesotelioma maligno, MM) e diversos outros, como de laringe e pulmão, exemplificam as doenças malignas^{5,6}.

As descrições epidemiológicas atrelam duas características: a exposição e o período de latência de 10 a 40 anos, que é variável, a depender da série relatada^{4,7}.

A possibilidade de nexos entre a exposição e desenvolvimento de doenças foi aventada em uma série de casos da África do Sul⁸ publicada em 1960. Houve descrições anteriores; porém, tratavam-se de relatos de casos que não alcançaram impacto científico⁹. Essa série retratou que, entre trinta e três pacientes com mesotelioma pleural difuso, em todos exceto um foi relatado antecedente de exposição ao amianto crocidolito (“Cape blue”). Além disso, houve associação geográfica: em sua maioria, a exposição ocorreu no Vale do Amianto, ao noroeste da Província do Cabo, na África do Sul⁸. Esse primeiro estudo foi decisivo para o conhecimento atual epidemiológico.

Os reflexos da série foram observados nos anos imediatamente subsequentes: entre 1964 e 1965, o MM foi apontado como uma doença relacionada à exposição por outros pesquisadores^{5,6}, culminando com a publicação, no *British Medical Journal*, que “ao final de 1965 estava claro que os mineradores de amianto estão sob risco especial de desenvolver mesotelioma”¹⁰.

Ainda assim, notava-se uma atmosfera de certo ceticismo, que se especula ter sido incutido pelo lobby do poder econômico e político das mineradoras e dos interesses econômicos e geopolíticos envolvidos¹⁰. A associação da exposição à carcinogênese não foi aceita de imediato, como em outro exemplo histórico: em 1775, Percivall Pott¹¹ observou que a “verruga de fuligem”, uma lesão cutânea escrotal (variante do carcinoma escamoso) que surgia em limpadores de chaminés da Inglaterra industrial, era consequente do contato da pele com a fuligem das chaminés por longo período de exposição. Geralmente esses homens desenvolviam o câncer ainda jovens, em vista das extensas horas de exposição e início precoce da atividade laborativa para os parâmetros atuais. Por muito tempo, o interesse em manter esses trabalhadores a baixo custo foi a força motriz para se negar essa associação.

Apesar de com o MM o contexto não ser diferente, o peso crescente das evidências epidemiológicas geradas era inevitável. Em 1970 iniciaram-se as regulações laborais, em vista do reconhecimento do nexos e riscos legais inerentes ao trabalho com amianto. A primeira agência foi a “Administração de Saúde e Segurança Ocupacional dos Estados Unidos” (OHSa), limitando a exposição inicialmente a 5 fibras/ml, no início da década e reduzido a 2

fibras/ml em 1976¹². Em 1977, a “Agência Internacional para Pesquisa em Câncer” (IARC) publica documento em que designa ao amianto a classificação de carcinógeno classe I, de risco a câncer inegável, junto a elementos como a radiação ionizante¹². A Inglaterra reforçou a necessidade de medidas de segurança e limitou sua exposição a 0,1 fibra/ml na década de 1980. Em 1997, foram publicados os critérios de Helsinki para doenças ocupacionais com exposição ao amianto. Considerou-se a interposição entre dados de imagem (como natureza da doença pleural ou pulmonar, caracterizada por placas ou imagens nodulares ou difusas) e a exposição mínima de 10 anos, nivelada em leve, moderada ou intensa (como ocorre na manufatura de produtos com amianto e instilação direta, por exemplo).

De fato, a carga neoplásica relacionada ao amianto, estimada em 2004¹³, é de cerca de 20.000 casos de câncer de pulmão e 10.000 casos de mesotelioma por ano na Europa Ocidental, Escandinávia, América do Norte, Japão e Austrália¹⁴, representando cerca de 107.000 mortes e perda de 1.523.000 anos de vida por incapacidade.

Os dados epidemiológicos possuem certas lacunas, uma vez que a subnotificação é um problema que assola muitos países⁷, dentre eles o Brasil, o terceiro maior produtor mundial do minério (307 mil toneladas cúbicas, abaixo somente da Rússia e da China). Há uma grande discrepância entre os registros e a dimensão da produção de amianto no país: 3178 óbitos relacionados ao amianto foram notificados no período entre 1980 e 2003 e 827 óbitos entre 2000 e 2010^{7,15}. Estima-se que esses números sejam ainda maiores.

Embora o uso do amianto tenha sido banido isoladamente por alguns países na década de 1970 e pela União Europeia em 2005, sua utilização não é universalmente proibida e uma epidemia de mesotelioma poderá ocorrer, especialmente nos países que ainda o mineram ou utilizam, como China, Índia, Rússia, Zâmbia, Colômbia e Cazaquistã¹³.

O MM em geral é diagnosticado na pleura, em pacientes do sexo masculino, em sua sétima ou oitava década de vida, com sobrevida menor que cinco anos em mais de 95% dos casos¹⁶. O diagnóstico é tardio. Dor e dispneia são os sintomas que ocasionam a busca por atenção médica¹⁶. No Brasil não é aplicado nenhum programa de rastreio^{7,17}.

O custo ao sistema de saúde é inegável. Primeiramente, por ser uma doença de diagnóstico em fase avançada, com necessidade de maior suporte, seja pela complexidade de intervenções ou pela necessidade de palição. Na Europa, o custo anual por paciente varia entre 33,5 mil euros (França) e 67 mil euros (Itália)¹⁸. Nesses países, o custo de mesotelioma foi comparável ao de outros cânceres do sistema respiratório. Nos Estados Unidos, estimou-se um custo médio anual de 41 milhões de dólares para 2014, uma fração dos custos com câncer de

pulmão (2,16 bilhões de dólares para o mesmo período). Na Escócia, em 2000, o custo estimado foi de 942 mil libras para 100 pacientes que foram a óbito naquele ano¹⁹.

O segundo ponto impactante ao sistema de saúde é o tempo de latência para o desenvolvimento da doença. Na década de 1990, foram publicadas as primeiras curvas de projeção: notou-se que os picos de incidência seguiram o período de latência, de forma que as projeções mostravam aumento exponencial na incidência nos anos 2000, com picos estimados entre 2020-2030⁴. Em 2012, as projeções mostravam-se sustentadas, com incidências quadruplicadas a sextuplicadas em relação àquelas dos anos 1960-1970²⁰.

As cidades do amianto, como Asbestos, no Canadá, Asbest, na Rússia e Minaçu, no Brasil, ilustram que o risco de doença não é único do paciente ou do trabalhador, mas da comunidade como um todo. Nas “comunidades empoeiradas” (“*dust communitites*”)²¹, são relatadas várias consequências, desde psicológicas (depressão, fobias, ansiedade) a relacionais (retração social, perda da sensação de pertencimento e coesividade social)²¹. As consequências intrapessoais e interpessoais são atreladas à ideia de um “assassino invisível”, o amianto, que ativa a fantasia e o medo de contaminação aérea: uma vez que o indivíduo abre sua porta, ou se expõe ao externo de sua residência, está sujeito a potenciais efeitos catastróficos²¹. É referido, ainda, o medo de isolamento do indivíduo pela comunidade e a sensação de vergonha por ser carreador de uma doença grave e letal²¹.

No Brasil, em Bom Jesus da Serra, na Bahia, foram entrevistados 83 sujeitos expostos ao amianto. Os resultados mostraram que predominava o medo de contaminação do ar pela poeira, porém, a população negou o conhecimento de seus riscos ambientais²².

A história do mesotelioma permite uma observação imediata: trata-se de uma doença evitável que impacta direta e indiretamente a vida das pessoas. Os expostos diretamente por situação ocupacional estão sob riscos, assim como os coabitantes pela exposição para-ocupacional. O custo gerado sobre o sistema de saúde repercute sobre outros indivíduos, que têm seu acesso restrito pela finitude dos recursos.

Por fim, salienta-se que, embora a opção de trabalhar com a extração ou manufatura do amianto seja individual, sob a ótica da mineradora e do minerador, o custo do MM e de outras doenças associadas à exposição ao minério reflete em todos. É uma preocupação global e geral: a poeira das comunidades empoeiradas espalha-se e atinge a todos.

Epidemiologia

As referências ao que foi denominado mesotelioma remetem a uma época da Medicina anterior à visão da Patologia como disciplina médica. Há relatos de autópsias de massas epitelioides carnosas que foram descritas em uma série de 1767 por Joseph Lieutaud como "tumores pleurais"²³.

Passado um século e meio, o termo "mesotelioma primário da pleura" foi proposto por Du Bray e Rosson²⁴ em 1920. Substituiu uma entidade controversa, o endotelioma da pleura, um tumor predominantemente epitelióide com componente misto fusocelular, que se acreditava surgir a partir do endotélio de vasos linfáticos. A nova taxonomia propunha que a origem desse tumor remetia ao epitélio do revestimento pleural, o mesotélio.

Essa mudança de paradigma foi embasada em experimentos com cultura de células que demonstravam a proliferação e a formação de massas a partir de células mesoteliais²⁵. Além disso, já havia sido demonstrada a transformação do fenótipo epitelióide tanto em células mesoteliais quanto fibroblásticas, permitindo supor a presença de componentes epitelióide e sarcomatóide em uma neoplasia que não fosse sarcoma e, tampouco, carcinoma.

Klemperer e Rabin²⁶, em 1931, começaram a difundir o termo *mesotelioma* para referir-se a tumores de base pleural que apresentavam aparência grosseiramente uniforme, embora microscopicamente se confirmasse que eram compostos por várias formas histológicas, ora semelhantes a neoplasias epitelioides, ora sarcomatóides ou com fenótipo misto²⁷.

Os trinta anos seguintes foram marcados por controvérsias e pelo uso indevido do termo, embora tenha havido progresso significativo em sua investigação epidemiológica. Em 1960, foi publicado o artigo "*Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province*"⁸, que relatava a prevalência da neoplasia em trabalhadores e habitantes nos arredores de uma área de mineração do chamado "amianto do Cabo Azul", na África do Sul. Desde então, não foram poupados esforços para investigar a ligação entre a exposição às fibras de amianto e o mesotelioma, incluindo-se desde aquelas mais longas (anfíbólio) às mais curtas (crisotila).

Estima-se que a exposição ao amianto esteja implicada em cerca de 70-80% dos casos de mesotelioma maligno (MM)¹³. Os casos restantes têm sido associados a diversos fatores, alguns com evidências questionáveis, como a vacina contra a poliomielite. Vírus SV40 e exposição prévia a radioterapia no tratamento do linfoma de Hodgkin são outros dois candidatos oncogênicos, embora as evidências atuais sejam fracas¹³. A síndrome do câncer familiar BAP1 é responsável por cerca de 10 a 20% dos casos e pode estar associada a um

número ainda maior, se confirmado seu comportamento de “iniciador de tumor”, como proposto por alguns autores²⁸.

Classificação patológica pela Organização Mundial da Saúde

O MM epitelióide é o tipo histológico mais comum do MM (em torno de 80-85%), seguido pelos sarcomatóide (10-15%) e bifásico (5%)²⁸. São reconhecidos pela OMS as variantes de subtipos histológicos do MM pleural epitelióide: tubulopapilar, papilar, acinar, micropapilar, sólido, trabecular, adenomatóide e pleomórfico. Além desses, são relatadas outras subclassificações, com taxonomias advindas de séries de casos anedóticos, como deciduóide²⁹ e "em anel de anel de sinete"³⁰. Embora esses subtipos tenham sido relatados por muitos autores, alguns de maneira intercambiável e não clara, a OMS os classifica como MM epitelióide.

A reprodutibilidade foi alcançada para os subtipos mais comuns e foram inferidas repercussões clínicas pela subclassificação morfológica: algumas características prognósticas, como invasão linfovascular são mais comum em tumores micropapilares e tumores epitelióides com características pleomórficas são de pior prognóstico no grupo do epitelióides²⁸. A subclassificação morfológica pelo componente de maior prevalência, como no adenocarcinoma pulmonar, ainda não é oficialmente estimulada, uma vez que é necessária a compilação de evidências mais fortes para maior assertividade e replicabilidade^{28,31}.

O mesotelioma sarcomatóide é o segundo tipo histológico mais comum na classificação da OMS e está associado a pior prognóstico, compreendendo o subtipo. É composto por uma proliferação de células fusiformes mesenquimais malignas, dispostas de maneira difusa e infiltrativa sobre a superfície pleural, simulando sarcomas. No tipo desmoplásico, o padrão predominante de distribuição celular estoriforme ("padrão sem padrão") é entremeado por um tecido colagenizado denso presente em pelo menos 50% do tumor.

Espera-se que o padrão bifásico mostre pelo menos 10% de cada componente principal (epitelióide e sarcomatóide). Uma observação importante é sobre a descrição de elementos heterólogos diagnosticados nesses tumores, como, por exemplo, tecido cartilaginoso ou ósseo³¹, reforçando a cautela de uma neoplasia sarcomatosa como diagnóstico diferencial.

Nas **Figuras 1.1 e 1.2** são ilustrados aspectos morfológicos dos diferentes tipos. Uma característica geral do MM, a infiltração subconjuntival da camada adiposa é vista na **Figura 1.1.A**. O tipo epitelióide, com marcada proliferação epitelióide maligna, que é hiper celular, disposta de formas sólida e difusa, tipo camada, dissecando as lâminas na **Figura 1.1.B**. As

células malignas, bem delimitadas, do tipo hepatoide, com nucléolos proeminentes na **Figura 1.1.C**. A **Figura 1.2** ilustra as diferenças morfológicas mais importantes entre os tipos sarcomatoide, desmoplástico e pleomórfico epitelióide

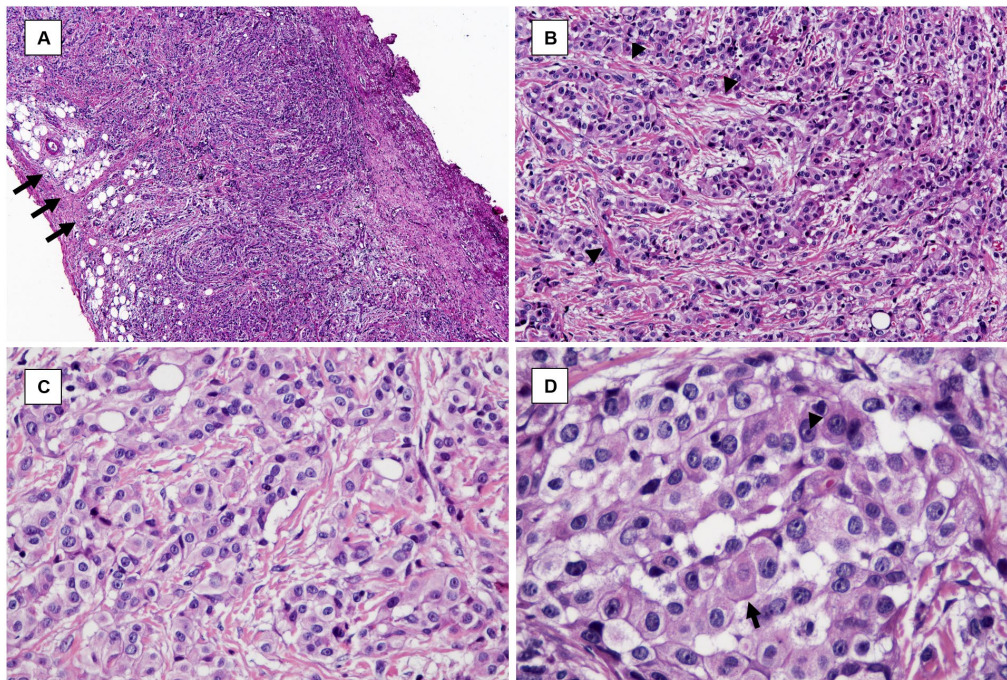


Figura 1.1. Características morfológicas do MM epitelióide pleural. (A) Neoplasia infiltrativa hipercelular, estendendo-se em forma de placa por toda a pleura visceral, desde o revestimento mesotelial superficial, passando pelas lâminas submesoteliais e adiposas (setas na infiltração de tecido adiposo). (B) dissociação da matriz intercelular por celularidade epitelióide maligna (pontas de seta na desmoplasia tumoral); Células neoplásicas epitelióides (C, D) infiltrativas e dissociativas, compondo um arranjo predominantemente sólido, com citoplasma delineado (seta) e nucléolos proeminentes (ponta de seta).

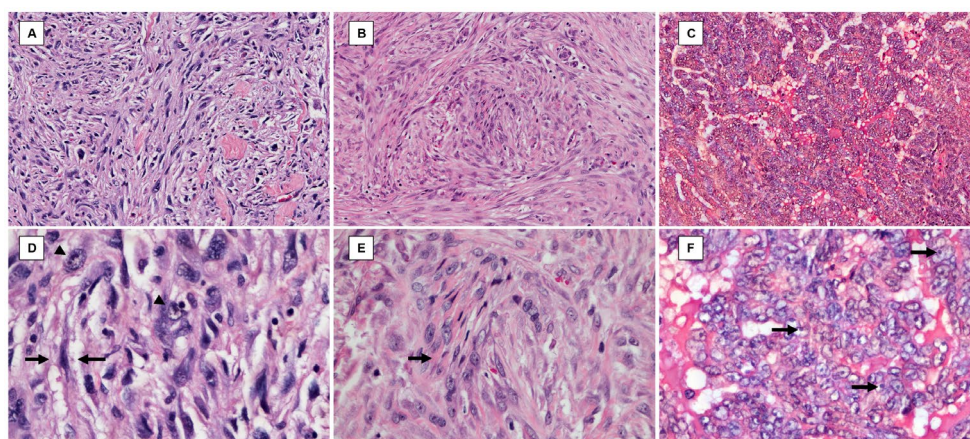


Figura 1.2. Comparação entre os tipos histológicos de MM (Sarcomatoide, Desmoplástico e Epitelióide). (A, D) Tipo sarcomatoide, composto por células fusiformes hipercelulares (setas, D) com intenso pleomorfismo nuclear (ponta de seta); (B, E) Tipo desmoplástico, neoplasia menos celular de células fusiformes, em padrão estoriforme, com intensa matriz extracelular (seta); (C, F) Tipo epitelióide, com características pleomórficas (setas nos nucléolos proeminentes).

Diagnóstico histopatológico

A base do diagnóstico histopatológico é a amostragem adequada. O MM é uma neoplasia de apresentação múltipla, com mais de dez subtipos histológicos descritos pela OMS e três tipos histológicos, epitelióide, sarcomatóide e bifásico. A amostragem adequada é essencial para a classificação correta da neoplasia²⁸.

O diagnóstico de mesotelioma bifásico deve ser evitado em amostras pequenas e reservado aos produtos de ressecção cirúrgica^{28,31}, uma vez que é mandatória a identificação concomitante de ambos componentes epitelióide e sarcomatóide, com pelo menos 10% de cada.

A citologia, com seus respectivos “cell block”, pode ser empregada, embora com cautela, pois a sensibilidade para o diagnóstico citológico de MM varia entre 30 a 75%, provavelmente devido a amostragem inadequada. Técnicas imuno-citoquímicas e moleculares (como a hibridização “in situ” por fluorescência para p16 (translocação 9p21)) podem ser empregadas nessas amostras²⁸.

O painel imuno-histoquímico adequado deve ser eficaz, a fim de equilibrar a necessidade e a utilidade dos marcadores. Deve ser construído através de uma abordagem bayesiana, empregando dados clínicos pré-analíticos, incluindo achados radiológicos e cirúrgicos, correlacionados com a morfologia. A localização da lesão e gênero do paciente influenciam fortemente as probabilidades pré-teste dos diagnósticos diferenciais, principalmente nos MM extra pleurais, moldando a construção de painel imuno-histoquímico caso a caso. A exposição ao amianto não deve ser levada em consideração como uma necessidade para conformar o diagnóstico histopatológico²⁸.

Em geral, o diagnóstico diferencial ao MM é amplo. Na prática da patologia cirúrgica, não é incomum um relatório preliminar com diagnósticos vagos, como “Neoplasia epitelióide maligna” ou “Neoplasia de células fusiformes malignas” precedente à investigação de histogênese com imuno-histoquímica. Não há consenso atual sobre um painel obrigatório; do ponto de vista de boas práticas, o consenso é eleger, pelo menos, dois anticorpos positivos e dois negativos, cada um com um mínimo de 80% de sensibilidade, que devem ser avaliados em conjunto²⁸. Essas recomendações são das atuais Diretrizes da MIG (*Mesothelioma Interest Group*), originadas de observações de longa data. Diversos marcadores já foram aventados ao diagnóstico de MM, como GLUT-1³². Dentre esses, uma glicoproteína de membrana foi apontada como altamente sensível e específico, a mesothelin³³, porém não caiu em uso.

Curiosamente, hoje se tem visto que a utilidade dessa glicoproteína não reside somente no campo diagnóstico, porém é de implicação terapêutica³⁴, como será discutido.

Para lesões suspeitas epitelioides, o primeiro painel imuno-histoquímico contrapõe marcadores mesoteliais (Calretinina, D2-40, WT1, CK5/6) a marcadores de adenocarcinoma (Ber-EP4, MOC31). Os últimos devem ser negativos. Se este painel nos levar a um possível adenocarcinoma, é proposto um segundo painel expandido. Para lesões pleurais, por exemplo, diferenciais comuns são carcinomas, incluindo adenocarcinoma de pulmão e carcinoma de células escamosas. Para estes, um amplo coquetel de queratina é empregado (como a panqueratina AE1/AE3 e citoqueratinas 7, 20, CAM 5.2, EMA) para demonstrar a natureza epitelial da neoplasia, seguido por anticorpos primários para adenocarcinoma pulmonar (como TTF1, Napsin A, com sensibilidade em torno de 80-90% para adenocarcinomas pulmonares³¹) e células escamosas (como p63 ou p40). É necessário cuidado para avaliar este painel ao lado do anterior, pois a CK5/6 pode ser focalmente positiva em um pequeno subconjunto de adenocarcinoma de pulmão (2-20%). Para uma neoplasia epitelióide de imunoexpressão negativa de citoqueratina AE1/AE3, o próximo passo é ampliar seu escopo, empregando outras citoqueratinas, como CAM 5.2, CK7/20, CK5/6 e considerando outras neoplasias malignas epitelioides, como melanoma maligno, hemangioendotelioma epitelióide ou angiosarcoma e linfoma. Para o mesotelioma epitelióide peritoneal, os diferenciais devem considerar também o adenocarcinoma metastático, especialmente o carcinoma de células renais (PAX-8 positivo) e o adenocarcinoma seroso papilífero, bem como o adenocarcinoma não ginecológico (biliar, pancreático, gástrico e colônico). Na **Tabela 1.1**, nossa abordagem é contextualizada e na **Figura 1.3** um exemplo de mesotelioma epitelióide típico com marcadores mesoteliais positivos (marcadores D2-40, Calretinina e Adenocarcinoma Negativo (Ber-EP4, MOC31).

Para suspeitas de lesões sarcomatoides, os carcinomas ainda devem ser descartados, pois os carcinomas sarcomatoides são fusocelulares. Além disso, é recomendável cautela, pois marcadores mesoteliais específicos não se comportam da mesma maneira nos MM epitelioides e sarcomatoides, conforme resumido na **Tabela 1.1**.

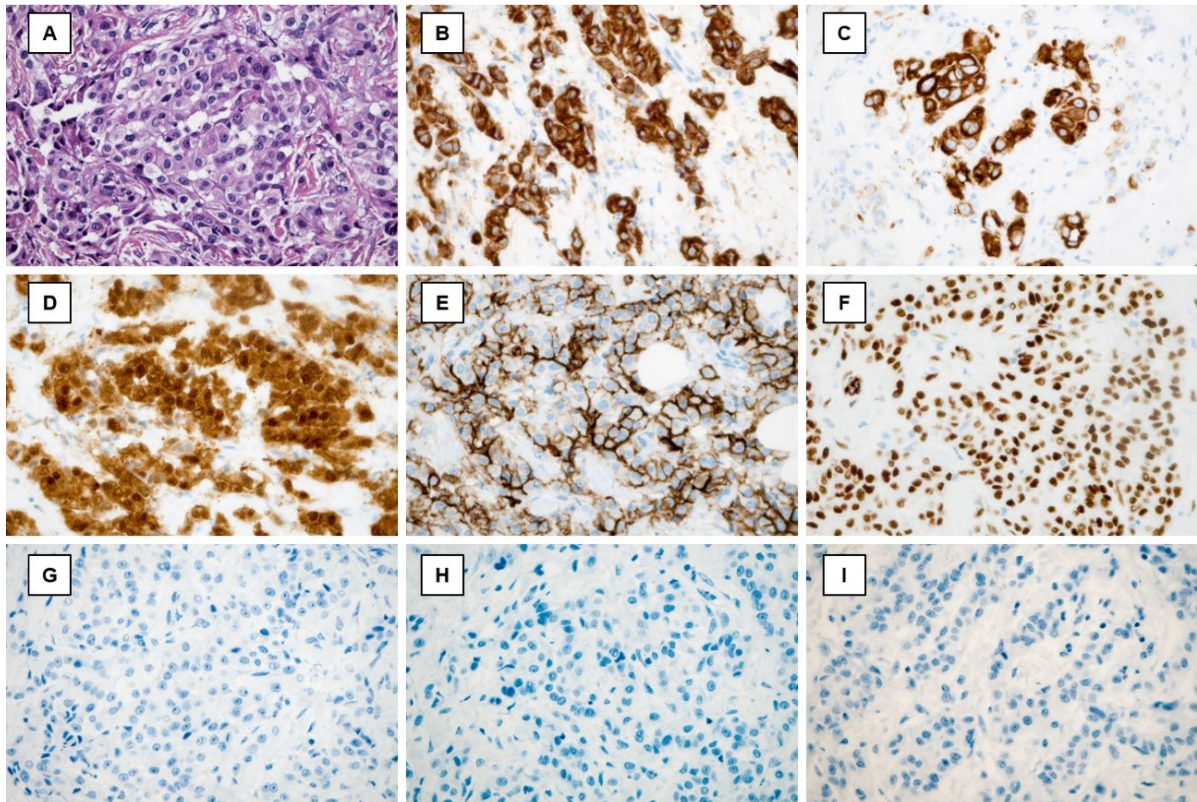


Figura 1.3. Aspectos imuno-histoquímicos do MM - (A) lâmina corada com H&E, mesotelioma maligno do tipo epitelioide; (B-F) Marcadores típicos de imuno-histoquímica positiva - (B) citoqueratina AE1/AE3, (C) citoqueratina CK7, (D) calretinina, (E) podoplanina (E2-40); (F) WT1; (G-I) Marcadores típicos de imuno-histoquímica negativa, (G) citoqueratina 20, (H) Ber-EP4, (I) MOC31 (HE, IHQ, 400x).

Tabela 1.1 Abordagem diagnóstica histopatológica com fundamentação racional para construção de painéis imuno-histoquímicos.

Painel inicial – considerar a morfologia			
<i>Morfologia</i>	<i>Painel</i>	<i>Interpretação / Diferenciais</i>	<i>Conclusão</i>
Epitelioide	<i>Mesoteliais</i> (Calretinina, Citoqueratina 5/6, WT1, D2-40, Mesotelina)	2 Mesoteliais positivos E 2 Negativos para Adenocarcinoma	Mesotelioma Maligno Epitelioide*
	<i>Adenocarcinoma</i> (MOC31, BER-EP4, Claudin 4)	Adenocarcinoma positivo E Mesoteliais negativos	Adenocarcinoma, expandir o painel
Sarcomatoide	<i>Mesoteliais</i>	Calretinina (30% positivo) Podoplanina (D2-40) CK 5/6 é limitado	Considerar teste molecular (deleção homozigótica de 9p21 (p16) FISH e diferenciais (translocação X;18 para Sarcoma Sinovial))
	Carcinomas sarcomatoides	Pulmão, carcinoma de células renais	
	Sarcomas	Sarcoma sinovial Angiosarcoma epitelioide Lipossarcoma	
	<i>Excluir mesotelioma sarcomatoide queratina-negativo com diferenciação heteróloga</i>		
Painel expandido para Adenocarcinomas – considerar a localização			
<i>Localização</i>	<i>Painel</i>	<i>Interpretação / Diferenciais</i>	<i>Conclusão</i>
Pleura	TTF1, Napsin A	Se positivo E Mesotelial Negativo	Adenocarcinoma de sítio primário pulmonar
	p40, p63	Se positivo E Mesotelial Negativo	Carcinoma de Células Escamosas
	<i>Carcinoma de células renais</i> (PAX-8), evitar CD10, usar RCC com cuidado	Se positivo E Mesotelial Negativo RCC pode ser positivo em até 30% dos mesoteliomas	Carcinoma de Células Renais Metastático
Peritônio	<i>Carcinoma Seroso Papilífero</i> (Claudina 4, MOC31, PAX8, BG8, BER-EP4, Receptor de estrogênio)	Se positivo E Mesotelial Negativo	Carcinoma Seroso Papilífero Metastático
	<i>Adenocarcinoma não ginecológico</i>	CDX2 (cólon, intestino delgado, estômago) BER-EP4 (pâncreas, ducto biliar, cólon) CK7, CK20	Adenocarcinoma metastático, sugerir sítio primário

*O diagnóstico diferencial entre mimetizadores benignos (mesotelioma papilar bem diferenciado, mesotelioma multicístico benigno e pleurite) e mesotelioma maligno localizado ("in situ"), assim como o mesotelioma desmoplásico, é baseado em características morfológicas, como atípicas e complexidade citoarquitetural, além de zonulação. A imuno-histoquímica para BAP1 e a hibridação fluorescente p16 (FISH) devem ser empregadas em casos duvidosos³⁵.

Gradação nuclear

O sistema de classificação nuclear foi proposto em 2011³⁶. Esse sistema revelou significância prognóstica sob um escore de três níveis, aplicável somente ao tipo epitelióide, composto por características citológicas (atipia nuclear, razão nuclear / citoplasmática, padrão de cromatina, inclusão intranuclear, proeminência de nucléolos, contagem mitótica e presença de mitoses atípicas). Outros autores replicaram, modificaram e validaram os sistemas de classificação nuclear. Em 2018, em uma coorte multicêntrica de 776 casos, foi observada uma diferença significativa de sobrevida global entre os pacientes com grau nuclear 1 vs 3 (31 vs 11 meses, respectivamente)³⁷.

Estadiamento TNM/AJCC, oitava edição (2018)

O estadiamento de MM é um trabalho contínuo e em andamento desde a sua primeira classificação, pelo Grupo Internacional de Mesotelioma, em 1994³⁸. Para a edição TNM de 2018, o estadiamento patológico não mostrou diferenças marcantes entre os estágios adjacentes, exceto T3 e T4. Nos últimos anos, houve tentativas de enriquecer a classificação preditiva com base em novos dados, como morfologia tumoral³¹, pleomorfismo celular^{36,37}, e volume tumoral³⁸. Esses dados não foram incorporados à última revisão do TNM, uma vez que isoladamente apresentam relevância à sobrevida, porém não houve replicabilidade populacional que permitisse uso amplo como novos marcadores prognósticos.

Diretrizes terapêuticas da Sociedade Americana de Oncologia Clínica, 2018

Em janeiro de 2018, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica atualizou suas diretrizes de condutas no MM³⁹. Algumas recomendações importantes são resumidas e discutidas abaixo, de acordo com o tópico correspondente:

Diagnóstico: o diagnóstico histopatológico é necessário e precede o tratamento. São válidas a avaliação inicial do derrame pleural sintomático (citologia do líquido pleural), a biópsia toracoscópica ou por agulha grossa, para diagnóstico adequado do tipo histológico, com confirmação imuno-histoquímica, abrindo a possibilidade de testes de biologia molecular e pesquisa de alvos terapêuticos. A utilidade de biópsia líquida está em avaliação; não há evidência formal de sua utilidade para monitorar o tratamento e a resposta, assim como o sequenciamento genômico do MM.

Estadiamento: Os estudos de imagem são um requisito (tomografia inicial do tórax e abdome superior com contraste intravenoso, complementada com tomografia por emissão de pósitrons e computadorizada ou ressonância nuclear magnética para avaliar a extensão da doença). A abordagem cirúrgica com mediastinoscopia deve ser considerada se houver aumento de volume mediastinal ou nódulos não caracterizados pela imagem, porém com captação de atividade metabólica, assim como a laparotomia deve ser considerada em achados suspeitos abdominais. Durante o acompanhamento, é recomendável que sejam reportados os critérios de evolução de resposta de imagem (RECIST). O emprego do volume neoplásico obtido pela tomografia computadorizada pode ser útil no seguimento, porém não é formalmente recomendada, uma vez que não há dados suficientes que a validem.

Quimioterapia: A quimioterapia deve ser oferecida a pacientes com MM com critérios mínimos. Pacientes assintomáticos com histologia epitelial e doença pleural mínima, não elegíveis para cirurgia, pode ser feito seguimento criterioso antes da quimioterapia. A terapia de primeira linha é combinada, com pemetrexede e agente derivado de platina (cisplatina / carboplatina). A participação em ensaios clínicos deve ser oferecida como uma opção, dada a atividade limitada da quimioterapia de segunda linha (vinorelbina). O pemetrexede não deve ser utilizado como terapia de manutenção devido à baixa qualidade de evidência.

Cirurgia citorrredutora: A citorredução cirúrgica máxima é fortemente recomendada em doença em estágio inicial, atendendo a critérios funcionais cardiopulmonares pré-operatórios específicos, sem evidência de doença torácica extra e preservando a capacidade de receber tratamento multimodal, exceto aqueles diagnosticados com mesotelioma sarcomatoide), embora seja insuficiente como uma opção de tratamento de modalidade única, exigindo tratamento antineoplásico adicional (quimioterapia e / ou radioterapia). O tratamento neoadjuvante deve ser reservado para critérios como: doença transdiafragmática, invasão multifocal da parede torácica, envolvimento dos linfonodos mediastinais contralaterais ou supraclaviculares. O envolvimento de linfonodos em estágio N3 (contralateral ou supraclavicular) deve ser uma contraindicação absoluta à citorredução cirúrgica. A citorredução poupadora de pulmão deve ser preferida; a quimioterapia pode ser pré ou pós-cirúrgica e terapias intracavitárias podem ser administradas em centros de referência.

Radioterapia: o tratamento neoadjuvante deve ser oferecido com cautela; pode ser oferecido para recorrência local assintomática e como recurso paliativo, especialmente para pacientes com doença sintomática (muita dor, por exemplo).

Farmacodinâmica dos Alvos e Microambiente Celular

A patogênese do MM vem sendo estudada desde sua associação epidemiológica com a exposição ao amianto, porém ainda restam algumas lacunas. Em termos gerais, é vista como o produto de exposição crônica com processo inflamatório associado a remodelamento de longa data. As investigações mais recentes apontam a importância da relação epitélio-mesênquima para a promoção da transformação fenotípica de células de células mesoteliais a fibroblásticas, dependentes da via inflamatória NLRP3 associada a IL-1 β , em vista de ganho fenotípico da expressão de marcadores mesenquimais (vimentina e N-caderina) e perda de marcadores epiteliais (como E-caderina)⁴⁰. A mesma via, dependente de IL-1 β , foi avaliada em modelo experimental⁴¹, com replicabilidade em modelo humano e extensão a outras doenças crônicas pulmonares, em que se compartilham as vias inflamatórias como responsáveis pelo processo patológico⁴².

A caracterização de eventos moleculares da patogênese vem ganhado significância, em termos da repercussão em potenciais alvos terapêuticos. As características do perfil mutacional mais comuns no MM são mutação dos genes Inibidor de Ciclina-Kinase 2A dependente (CDKN2/ARF), neurofibromatose tipo 2 (NF2) e de proteína associado a BRCA-1 (BAP1)⁴³. Além desses, são relatados mutação de BAP1 em 47,6% dos pacientes, NF2 em 38,1% e perda de CDKN2A/B em 35,7% sendo que em 95,2% havia mutação em via relacionado a ao menos um agente terapêutico aprovado pelo FDA⁴⁴. Em revisão ampla do panorama genético, quando avaliado o transcriptoma de 216 casos de MMP, com distinção entre os tipos histológicos, foram evidenciadas mutações significativas em BAP1, NF2, TP53, SETD2, DDX3X, ULK2, RYR2, CFAP45, SETDB1 e DDX51³⁹. Fusões e alterações relacionadas a *splicing* para inativação de NF2, BAP1 e SETD2 também forma identificadas, assim como alterações nas vias Hippo, mTOR, metilação de histona, helicase de RNA e vias de sinalização de p53³⁹.

A repercussão desse conhecimento é na detecção de alvos terapêuticos, discutido a seguir.

Novos alvos terapêuticos

A oncologia torácica está em uma nova era de perspectivas em vista das terapias alvo, que incluem os inibidores de tirosina quinase, imunobiológicos, inibidores de *checkpoint* imune (*immunecheckpoint*) e outros agentes. As primeiras neoplasias malignas torácicas que

obtiveram benefícios com aumento de sobrevida foram os carcinomas não-pequenas células (CNPC)⁴⁵.

O prognóstico do mesotelioma com drogas alvo tem sido reportado com otimismo. Em alguns estudos, a sobrevida média é de 10 meses sem tratamento, em contraponto a 13 meses com regimes quimioterápicos combinados baseados em platina. Com inibidores de PD-L1, há relatos de sobrevida mediana de 18,8 meses em combinação com esquema combinado tradicional de quimioterapia⁴⁶.

Agentes inibidores de *immune checkpoint*, como anti-PD-1, PD-L1 e CTLA4 têm sido apontados como promissores. No MM, por exemplo, a expressão de PD-L1 em células neoplásicas reportada é ao redor de 20 a 40%⁴⁷. Dados de sobrevida global e livre de doença associados à ação das drogas ainda são escassos na literatura em vista do andamento dos ensaios clínicos, em fases I e II, sem substrato para indicação e aprovação do uso das drogas pelos FDA em MM^{48,49}. Além disso, a avaliação histopatológica do PD-L1 está sobre debate, uma vez que não houve consenso da interoperabilidade de marcadores para sinalização independente de droga alvo, mantendo o vínculo entre clone e droga a ser prescrita⁴⁶.

Os agentes imunobiológicos são outra classe de droga em desenvolvimento, aguardado com otimismo. São vários, como imunotoxinas, vacinas, agentes monoclonais quiméricos, receptores de linfócitos T quiméricos (CAR-T) e conjugados anticorpo-droga para destruição específica das células neoplásicas malignas. Alguns desses alcançam a sofisticação de ter a droga acoplada a um anticorpo anti-mesotelina, uma glicoproteína de membrana específica às células mesoteliais, fazendo valer a especificidade às células tumorais⁵⁰.

Na **Tabela 1.3**, resumimos os ensaios clínicos mais recentes arrolados em *Clinicaltrials.gov* até junho de 2019. Desses, ativos e em recrutamento, 70 foram selecionados, englobando 8732 pacientes nos Estados Unidos e Europa. A maioria é em agentes de inibição de *immune checkpoint* (PD-1, PD-L1, CTLA-4 e LAG-3); novas drogas também estão sendo exploradas, anti-FAK e anti-NanogStemness, terapias anti-mesotelina e CAR-T. A **Figura 1.4** foi composta a partir do mecanismo celular de ação das drogas e ilustra os alvos terapêuticos.

Alvos de Imunocheckpoints e vias imunológicas

i. PD-L1

O microambiente tumoral é alvo de discussão desde as hipóteses de Virchow quanto ao infiltrado linforeticular como origem do câncer em quadros de inflamação crônica⁵¹. Desde então, o entendimento sobre a importância do infiltrado inflamatório no câncer é crescente,

com abertura de possibilidades terapêuticas na última década. Atualmente, entende-se a existência de tumores “inflamados” e “não inflamados” e drogas como o PD-L1 tomam proveito disso. O infiltrado inflamatório rico em linfócitos T CD8, com produção de IFN-gama, expressão de PD-L1 nas células imunes e possível alta instabilidade genômica caracteriza tumores “inflamados” ou quentes, em contraste com tumores “não inflamados”, frios, de pobre infiltrado linfocitário (linfócitos T CD8) e baixa expressão de PD-L1, quando não ausente³⁹. Em estudos clínicos (EC), a possibilidade de bloqueio de PD-L1 com anticorpos anti-PDL1, como nivolumab e pembrolizumab, no melanoma maligno, por exemplo, tem mostrado sobrevida global de até 73% em um ano versus 42%; em pulmão com aumento de 24% com drogas tradicionais (docetaxel) a 42% (nivolumab), assim como incremento de 26% na sobrevida livre de doença em pacientes portadores de câncer de bexiga⁵². Para o mesotelioma, estão em estudo clínico diversas drogas relacionadas a essa via, como Durvalumab, Pembrelizumab e Nivolumab. A **Tabela 1.2** resume os estudos envolvendo a investigação de alvo e/ou ação terapêutica do PD-L1 em mesoteliomas.

ii. CTLA-4^{53,54}

É um regulador negativo da ativação de linfócitos T, com anticorpo monoclonal aprovado pelo FDA, sendo evidenciado até 56% de expressão em células tumorais de MM. Em EC: Tremelimumab associado ao Durvalumab.

iii. CD74^{55,56}

É o receptor da pró-citocina de fator migratório inibitório (MIF), que tem papel associado na tumorigênese, com expressão em diversas neoplasias e oncogênese com proliferação celular e bloqueio de apoptose, uma vez que a ligação MIF-CD74 ativa a via PI3K/Akt, além de associação com transição epitélio-mesênquima pela perda de moléculas de adesão, como E-caderina. Em série⁵⁶, observou-se expressão de CD74 e MIF em 95 e 98% dos espécimes MM, caracterizando-o como possível alvo. Em EC: Pemetrexed.

iv. CD30^{57,58}

Trata-se de receptor de citocina da superfamília TNF, com aplicação diagnóstica nos Linfomas de Hodgkin e Linfoma Anaplásico, ao qual se associa a aplicação terapêutica com bloqueadores de CD30. Em EC está o Brentuzimab.

Tabela 1.2. Revisão de estudos com descrição de porcentagem de expressão de alvos e sobrevida ou resposta terapêutica.

País	Casos	Sobrevida (- /+, meses)*	Expressão ≥1% (clone)	Tipo	Ano	Ref
Espanha	119		20,7% (E1L3N)	Série	2015	59
Espanha	27		23%	Série	2016	60
EUA	65		63%	Série	2016	61
França	58		23% (E1L3N), 11% (SP142)	Série	2016	62
Suécia	74		38%	Série	2017	63
França	45		31,1% (E1L3N), 22,2% (SP142)	Série	2017	64
EUA	64		40%	Série	2017	65
França	117		46% (22C3)	Série	2018	66
Austrália	58	15,5 / 6	72,40%	Série	2018	67
Japão	175	18,0 / 6	33%	Série	2018	68
Alemanha			53,1% (SP142)			
Japão	32		28,1% (SP263) 51,1 (28-8) 56,3% (22C3)	Série	2018	69
Holanda	34	Resposta parcial em 12 semanas (24%)	27%	Trial	2018	70
Suíça	93	10,2 / 7,2	14%	Trial	2018	71
Austrália						
Itália	62	18 / 12	40,3% (22C3)	Série	2018	72
Itália	93	16,4 / 11,3	37,50%	Série	2018	73
Itália	40	Resposta em 28%.		Trial	2018	74
Inglaterra						
EUA	125		22-27%	Série	2019	75
França	214	19,3 / 10,5	35,9% (E1L3M)	Série	2019	76
Itália	55		72%	Série	2019	77
Canadá	62		25,8% (22C3)	Série	2019	78
Japão		Resposta de 29%, sobrevida média de 17,3		Revisão	2020	79

*Em parte dos estudos revistos não houve análise de sobrevida.

v. *FAK*⁸⁰

Quinase de adesão focal (FAK) é expressa em diversas neoplasias, como mama, cólon, próstata e melanoma, sendo evidenciado seu papel como apresentador de antígenos tumoral. Em EC no MM: Defactinib.

Alvos relacionados à biologia tumoral

i. *Mesothelin*^{81,82}

Glicoproteína expressa em níveis baixos em tecido mesotelial com forte expressão no MM, que é mantida mesmo após quimioterapia tradicional, assim como em linfonodos metastáticos. Associada à expressão de metaloproteinase-9 (MMP-9), que está envolvida na degradação da MEC, facilitando a migração e invasão de células neoplásicas. Em EC no MM: LMB-100, Anetumab e infusões de células T iCasp9M28z.

ii. *BAP1*⁸³⁻⁸⁶

Breast Cancer 1 Associated Protein (BAP1) é uma debiquitinase nuclear que regula expressão gênica, transcrição e reparo de DNA no MM, com utilidade diagnóstica para distinção entre os processos hiperplásicos e atípicos, com perda de expressão nos últimos, com possibilidade terapêutica em investigações recentes. Estão em EC: Tazemetostat e MGD009.

Vias de proliferação e angiogênese

i. *c-Met*⁸⁷

Mutações de c-Met foram identificadas em 3 a 16% dos MMP, com possibilidade de inibidores de tirosina quinase como alvos terapêuticos. Em EC está a ABBV-368 para o MM.

ii. *VEGF*⁸⁸⁻⁹⁰

É o fator de crescimento vascular, possivelmente um dos agentes do microambiente tumoral mais bem estudados no mesotelioma, por sua associação com aumento de densidade vascular e mecanismos de regulação autóctone tumoral. Além disso, os anticorpos monoclonais anti-VEGF são modelos de drogas que se baseiam no conceito inicial e fundamental de drogas alvo. Em EC: Nintedanib.

iii. *PI3K/mTOR*^{91,92}

Trata-se de via de sinalização proliferativa, cujo papel específico no MM como biomarcador não está bem estabelecido, com séries anedóticas que o retratam como biomarcador pré e pós quimioterapia. Em EC: LY3023414.

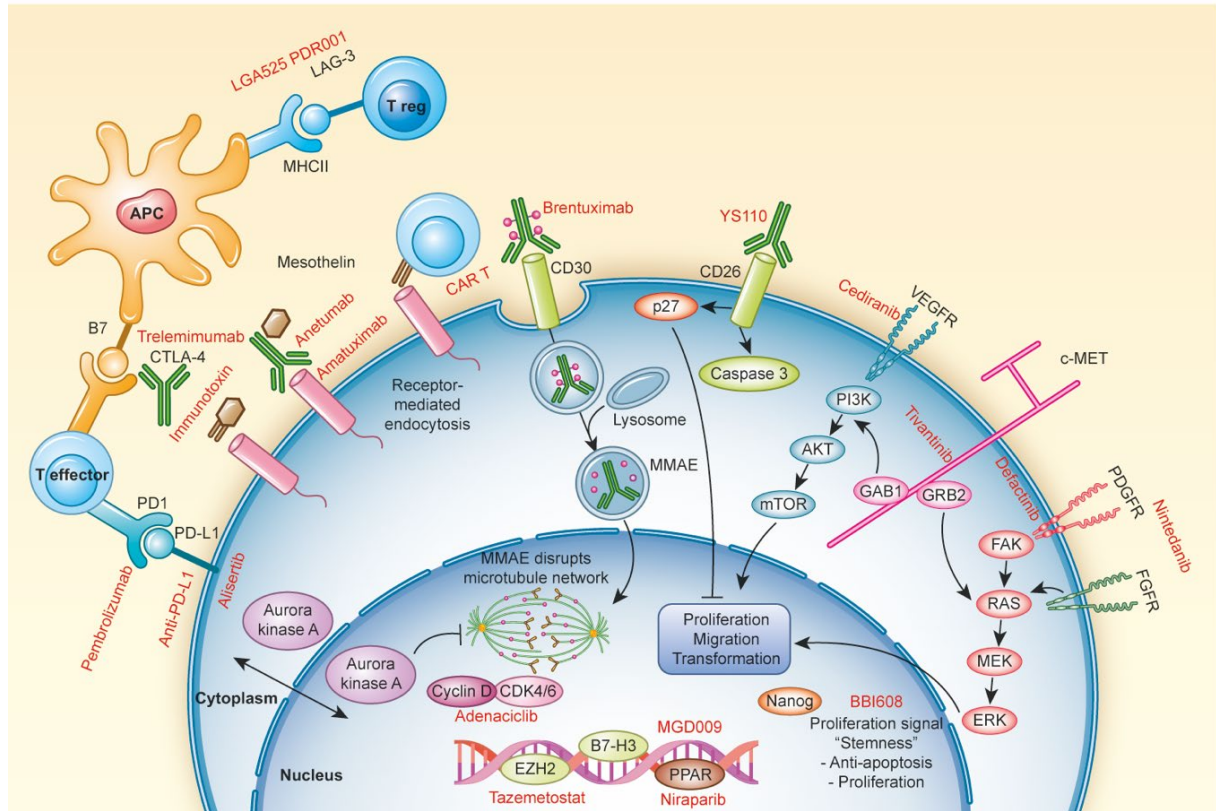


Figura 1.4. Pontos de ação celular de terapia alvo em ensaio clínico. Figura baseada nos achados descritos na Tabela 1.2; nela, abordamos o alvo celular das drogas de terapia alvo em ensaio clínico. Nota-se a ampla gama de agentes, com ação nos diversos componentes celulares, desde alvos imunoterapêuticos, como os inibidores de immunecheckpoint, a alvos de ação direta na transcrição do DNA, com ação em histonas. (Fonte: autor).

Tabela 1.3 Ensaios clínicos em andamento para MM com uso de terapia alvo.

Ação biológica	Alvo terapêutico	Agente	Fase	Ensaio (n=70)	Pacientes (n=8732)	Status*
Immune checkpoint	PD-1	Pembrolizumab	I II	9	2188	A / R
	PD-1	Nivolumab	I II III	7	1407	A / R
	CTLA-4	Tremelimumab	I II	3	631	A / R
	LAG-3	LGA525 PDR001	I II	1	515	R
	PD-L1	Atezolimumab / Avelumab / Durvalumab	I II	4	199	R
	FAK	Defactinib	II	1	38	A
Glicoproteína de membrana Mesothelin	Anticorpo monoclonal	Amatuximab, Antumab	I II	3	490	A / R
	Vacina	Dendritic Cell	I II	6	338	A / R
	CAR-T	CAR-T	I II	6	248	A / R
	Immunotoxin		I II	3	109	A / R
	Vetor viral		I II	2	70	A / R
Ligante extracelular	CD30	Brentuximab	II	1	50	R
	CD26	YS110	I II	1	48	R
	Biológico	TILs autólogos	I II	2	28	A / R
Inibidores de angiogênese	PDGFR, FGFR	Nintedanib	I II	5	757	A / R
	VEGF	Cediranib	I II	1	116	A
Relacionados ao ciclo celular	PEG-Arginine	ADI-PEG 20	I II III	2	470	A / R
	CDK4/6	Abemaciclib	I	1	150	R
	BCR-ABL	Bosutinib, Dasatinib	I	2	84	A / R
	NAE	Pevonedistat	I II	1	42	R
	Aurora A	Alisertib	II	1	28	A
	Hsp90	Ganetespib	I II	1	27	A
Complexo de histona	EZH2	Tazemetostat	II	2	367	R / A
	DART B7-H3	MGD009	I	1	114	R
Reparo de DNA	PARP	Niraparib	II	1	47	NR
	DLL3	Rovalpitumab	I	1	116	R
Cancer Stem-Cell	Nanog-Stemness	BBI608	I II	1	24	A

FONTE: clinicaltrials.gov (acessado em junho de 2019).

*A (ativo); R (em recrutamento); NR (não recrutando).

Matriz Extracelular e Colágeno V

O entendimento sobre a contribuição dos elementos da MEC na ontogênese do câncer é crescente. De 1976 a 1996, os descritores “cancer” e “ecm” geravam 547 resultados de busca no portal pubmed.org; em 2019 são 843 artigos científicos. O reflexo do enfoque em pesquisa nesse assunto gerou uma ampla gama de conhecimento. Nessa introdução, serão abordados alguns tópicos fundamentais para a compreensão do papel da MEC no câncer, em especial no que tange ao Colágeno V.

A MEC é um elemento essencial à vida celular, pois é um mantenedor da homeostase e um componente essencial do microambiente tumoral; composta por uma rede complexa de macromoléculas dispostas tridimensionalmente, que se reúnem em estruturas supramoleculares com características próprias, atua no regulamento do crescimento celular, influi sobre a diferenciação e motilidade⁹³. Os constituintes essenciais são colágenos, elastina, fibronectina, laminias, proteoglicanos, ácido hialurônico e glioproteínas matricelulares, que interagem entre si e com as células através de receptores celulares, como integrinas, receptores de domínio discoidina, proteoglicanos de superfícies celulares, receptores de ácido hialurônico, como CD44, entre outros⁹⁴.

A MEC é essencial em diversos processos biológicos, como na embriogênese, por exemplo, cuja relevância é conhecido desde a década de 1980 em modelos experimentais que variações induzidas à composição colagênica podem modelar a ramificação e crescimento ductal de órgão, seja pela estimulação de expressão por TGFβ ou adição de colagenase⁹⁵.

Uma de suas características é a comunicação de mão dupla entre mensageiros celulares e o microambiente, incluindo atributos bioquímicos e biofísicos em processo dinâmico de remodelamento constante, com repercussões na biologia (progressão) e na morfologia (histologia) da doença⁹⁶. No câncer, como na embriogênese, seu papel é fundamental; é uma característica morfofuncional que contribui ao comportamento biológico. A desmoplasia tumoral, uma característica essencial da interação entre células neoplásicas e MEC durante a invasão do estroma, que também é empregado como critério para o diagnóstico de neoplasia invasora, é a representação histológica de modificações pós-translacionais.

Nesse contexto, vale salientar que alguns genes de remodelamento de matriz, como as metaloproteinases, por exemplo, são preditivas de pior prognóstico em câncer de mama. Da iniciação tumoral à metástase a MEC possui algum papel em todas as fases de progressão do câncer. Alguns eventos que exemplificam a atuação da MEC, como a sinalização induzida por adesão pelas vias ERK e PIK3, redução de apoptose pela inibição dos supressores p15 e p21,

ativação de vias pró-migratórias, relacionada ao TGF β e pró-angiogênicas são extensivamente revistos por Pickup e colaboradores⁹³.

Os colágenos são as principais proteínas estruturais da MEC e são categorizados segundo sua homologia e função em sete tipos. Colágenos fibrilares incluem os tipos I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII, que são os mais comumente encontrados; desses, o tipo I é o mais abundante na MEC de seres humanos. São domínios colagênicos ininterruptos e fazem parte de fibrilas heterotípicas, em geral com Col (I), (III) ou (V). Na pele, por exemplo, a composição por fibras heterotópicas de colágenos I e III/V é comum, enquanto em cartilagem, são encontradas fibras heterotópicas de colágenos tipo II associado com IX e XI. Outra conformação são os colágenos que foram redes, como o tipo IV, encontrado na membrana basal. Os colágenos associados a fibrila com interrupção de tripla hélice são moléculas curtas com múltiplas interrupções em seus domínios, que se associam com colágenos fibrilares e outros componentes da ECM, regulando a fibrilogênese e funcionalidade do colágeno, compostos pelos tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI e XXII. Os tipos XIII, XVII, XXIII e XXV são os tipos associado à membrana com interrupção da tripla hélice; são proteínas transmembrana tipo II com domínio N-terminal citoplasmático curto e longo domínio C-terminal extra citoplasmático, com domínios colagênicos e não colagênicos, operando como receptores de superfície celular envolvidos na adesão e motilidade celular. Os tipos VII, XXVI, XXVIII interconectam elementos de MEC e outras estruturas. Os colágenos tipo XV e XVIII interagem com fatores de crescimento e citocinas, comumente presentes em elementos vasculares, como endotélios e na membrana basal epitelial, também essenciais na interconexão delas com tecido conjuntivo subjacente⁹⁴.

O Colágeno tipo V é um colágeno fibrilar com características regulatórias, formador de fibrilas, regulando a fibrilogênese de Col (I) e (III) intersticiais. Ocorre na forma de fibras heterotópicas com colágeno tipo I. É considerado minoritário em termos de deposição no ser humano. São conhecidas três isoformas moleculares diferentes, compostas pela combinação de três cadeias polipeptídicas distintas, $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, e $\alpha 3(V)$. A combinação em isoformas distintas resulta, conseqüentemente, em funções distintas, exploradas na literatura. Interagem com outras moléculas de matriz, como a fibronectina, proteoglicanas, elastina e Col (I)/(III), contribuindo ao remodelamento da MEC, além de servir como reservatório para moléculas fibrogênicas, interagindo com fatores de crescimento (como TGF β 1 e metaloproteinase-2). Além disso, possui contato com membrana basal, apesar de não a compor⁹⁷.

Seu papel no câncer tem sido pouco explorado e as evidências variam. Em revisão aos artigos originais indexados em língua inglesa, os principais relatos, sumariados na **Tabela 1.4**,

são variáveis quanto a seu papel na progressão ou supressão do câncer. Os estudos em modelos humanos, com estudo em blocos de parafina dos laboratórios de patologia cirúrgica notaram alguma ação relacionada à progressão da doença (6/7), enquanto os estudos experimentais em cultura de células apresentaram resultados variáveis. Não há estudos que avaliem seu papel no MM.

Tabela 1.4. Revisão de evidências e hipóteses de ação do Col (V) no câncer em literatura indexada.

Órgão	Tumor	Ação	Método	Fração *	Ano	Ref
Adrenal	Carcinoma adrenocortical	Supressão	Exp		2014	98
Bexiga	Carcinoma	Progressão	Humano	COL5A2	2018	99
Bexiga	Carcinoma	Progressão	Humano	COL5A2	2018	100
Mama	CDI	Supressão	Exp		2017	101
Mama	CDI	Progressão	Exp	COL5A1	2018	102
Mama	CDI	Progressão	Humano	AB	1982	103
Mama	CDI	Supressão	Exp		2013	104
Mama	CDI	Supressão	Exp		1991	105
Mama	CDI	Supressão	Exp		2005	106
Mama	CDI	Progressão	Humano	COL5A1	2019	107
Pâncreas	Adenocarcinoma	Progressão	Exp		2015	108
Pulmão	Adenocarcinoma	Supressão	Exp		2016	109
Pulmão	Adenocarcinoma	Progressão / Metástase	Humano	COL5A1	2018	110
Pulmão	NSCC	Supressão	Humano		2010	111
Pele	CEC	Progressão	Exp		1987	112
Língua	CEC	Progressão / Supressão	Humano	COL5A1 COL5A2	2019	113

CDI (Carcinoma ductal invasor), CEC (Carcinoma de células escamosas), Exp (experimental).

*Em alguns estudos, não havia a informação disponível.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando-se:

O papel socioeconômico pela posição do Brasil como o terceiro maior produtor de fibras amiantoides, com relevância e consequências à Saúde Pública e ao Sistema Único de Saúde;

As expectativas de picos globais de incidência de MM nas próximas duas décadas;

O diagnóstico tardio, com poucas opções terapêuticas convencionais;

Que a imunoterapia mostrou-se uma opção terapêutica a outras neoplasias com apresentação tardia e prognóstico ruim;

Que a possibilidade de resposta à imunoterapia está atrelada à seleção adequada de pacientes com base no perfil de biomarcadores tumorais relacionados ao microambiente inflamatório;

O desconhecimento do microambiente tumoral inflamatório e da matriz extracelular no MM;

A emergência de modelos objetivos e baseados em algoritmos de Inteligência Artificial na Medicina, com integração de dados histopatológicos morfológicos ao modelo de sobrevida, propomos os seguintes objetivos:

1. Objetivo Geral

Estabelecimento de fluxo de trabalho para extração de dados histopatológicos quantitativos para a construção de modelo matemático de sobrevida pautado em dados histopatológicos objetivos integrando aspectos celulares, imunológicos e matriciais da neoplasia. Esse modelo de estudo deve ser replicável a outros tumores.

2. Objetivos Específicos

2.1 Caracterização de linfócitos intratumoriais (TILs, T CD4+, T CD8+, CD20).

2.2 Caracterização da composição da Matriz Extracelular.

2.3 Caracterização da composição Colagênica (I, III, IV, V).

2.4 Caracterização do fenótipo de Transição Epitélio-mesênquima (EMT).

2.5 Avaliação imuno-histoquímica de marcadores celulares para potencial de agressão biológica (Ki-67, P53) e apoptose (TUNEL).

2.6 Avaliação da expressão imuno-histoquímica de BAP-1.

2.7 Avaliação de perfil de alvos terapêuticos (PD-1, PD-L1, CD30).

2.8 Comparação do perfil entre mesoteliomas epitelioide e sarcomatoide.

2.9 Comparação do perfil colagênico com outros tumores.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Trata-se de estudo retrospectivo, sediado nas instituições vinculadas ao Complexo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram incluídos o Instituto Central (Divisão de Anatomia Patológica, DAP), o Instituto do Coração (InCOR, Laboratório de Anatomia Patológica) e o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). O projeto iniciou após aprovação pelo Comitê de Ética (parecer 2.394.571, Anexo 1).

Foram selecionados três grupos de pacientes, com diagnósticos de: mesotelioma maligno (MM), carcinoma mamário (CMA) e carcinomas pulmonares (CP). O cerne dessa tese são os casos de MM, porém foram selecionados casos de outras neoplasias para comparação de elementos de matriz extracelular, especificamente o Col (V).

Os casos foram selecionados com busca em sistema de informática laboratorial a partir das palavras-chave: “mesotelioma”, “carcinoma mamário”, “carcinoma pulmonar”. O período de busca foi de 20 anos (2008-2018). Para MM, foram revistos todos os casos encontrados, enquanto para CMA e CP foram revistos os cinquenta casos mais recentes.

A partir da busca por palavras-chave, foram identificados 246 casos nas três instituições, sendo 75 no InCOR, 59 no HC-FMUSP e 112 no ICESP. Esse método de busca inflou os achados, uma vez que a presença da palavra “mesotelioma” identificou laudos de outros diagnósticos que continham a palavra nos comentários, assim como diagnósticos de mesotelioma benigno e suas variantes (papilífero, cístico bem diferenciado) e exames citológicos. Além disso, houve perdas por blocos não encontrados ou retirados para revisão externa e casos que não atingissem aos critérios de inclusão propostos, totalizando 82 casos (33% da busca inicial), como esquematizado na **Figura 2.1**.

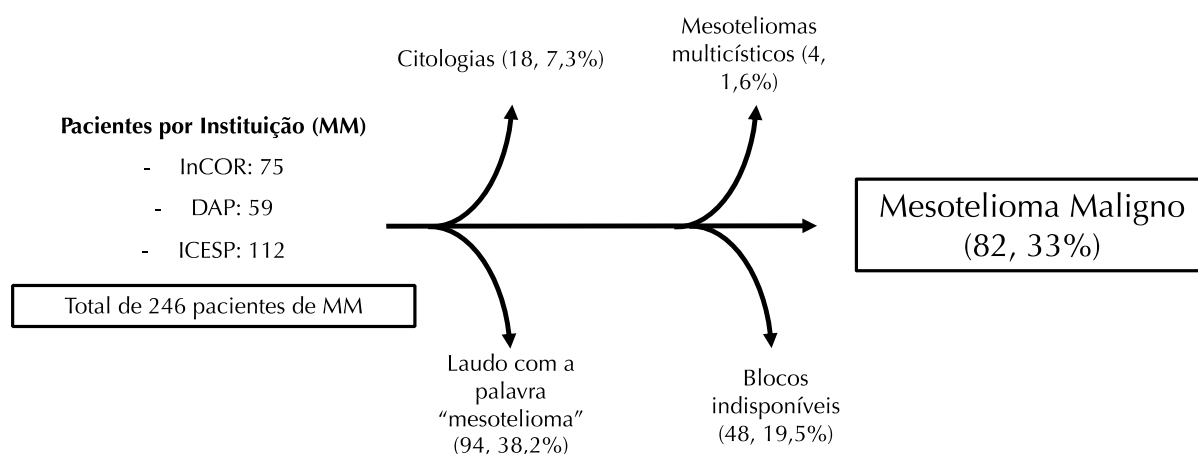


Figura 2.1. Fluxo de busca de casos e inclusão para o estudo.

Todos os blocos e lâminas dos casos inicialmente encontrados (246) foram solicitados aos arquivos de patologia para revisão por dois patologistas experientes em Patologia Torácica e Pulmonar (VLC e MLB). A revisão comparou o diagnóstico e achados relatados nos laudos anatomopatológicos, incluindo de exame imuno-histoquímico, com base nas lâminas originais. Quando descoradas ou com artefatos de preservação por conta de desgaste temporal, foram consideradas inadequadas para reavaliação e novos cortes ou reações imuno-histoquímicas foram feitos.

Para a revisão, foram empregados os critérios diagnósticos reportados na última atualização da Organização Mundial da Saúde, de 2015²⁸. Os critérios da pleura foram extrapolados aos sítios extra pleurais, sendo considerados lesão hipercelulares com atipias citológicas, invasão estromal (além de lâmina própria, com infiltração de lâmina conjuntiva submesotelial na pleura e estromal em outras topografias), com falta de zonulação (adensamento de celularidade neoplásica invasora além da superfície) e aumento de complexidade arquitetural, com formações sólidas ou complexas (como tubulopapilares, cribriformes e de células descoesas).

Os casos de MM foram classificados pelo tipo histológico predominante em epitelióide, sarcomatóide e bifásico; o último quando presentes ambos tipos epitelióide e sarcomatóide, com ao menos 10% de cada). A classificação em subtipos histológicos seguiu o pressuposto pela OMS, sendo reportado somente o subtipo predominante na amostra. Tanto para o tipo histológico quanto para o subtipo, foi considerado predominante como aquele identificado em mais de 50% da amostra.

O tipo epitelióide foi subclassificado em tubulopapilífero (estruturas tubulares e papilíferas confluentes), trabecular (formações em trabéculas), papilífero (formações com papilas com eixos papilares fibrovasculares), micropapilíferos (formações de papilas sem eixo fibrovascular), sólido (confluência sólida das células neoplásicas) e epitelióide pleomórfico (com pleomorfismo celular). O tipo sarcomatóide foi subclassificado em desmoplásico, quando identificadas células neoplásicas fusocelulares em meio a extensa desmoplasia e mantido o tipo sarcomatóide, quando composto por células fusiformes com aumento de atipias nucleares.

O perfil imuno-histoquímico foi revisto para todos os casos, e ampliado quando necessário, para que sempre houvesse, no mínimo, dois marcadores positivos para MM e dois negativos, segundo proposto pela OMS^{28,31}. A expectativa de positividade foi a D2-40 foi de 80 a 100%, 70 a 93% de WT1 e negatividade em 95 a 100% para D2-40 e MOC31. Caso houvesse dúvida remanescente, o painel foi ampliado, avaliado com o BAP1 e individualizado segundo o contexto clínico caso a caso.

Os dados clínicos foram extraídos dos relatórios anatomopatológicos originais, laudos de exames de imagem, relatórios cirúrgicos e prontuários dos pacientes. A exposição ao amianto foi inferida por dados indiretos, como a localização residencial e antecedente laboral registrado. Também foram pesquisados em mecanismos de busca da internet o nome do paciente por indexação por litígio ou associação a grupos ex-trabalhadores das indústrias do amianto. A sobrevida global, definida como o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico histopatológico e do evento de desfecho (óbito ou final do segmento, se vivo) foi obtida por registros de óbito de cartório ou em serviço de verificações de óbitos. A última data de seguimento, se não identificados registros de óbitos, foi considerada com base na última consulta ou coleta de exame laboratorial em registro no sistema informatizado hospitalar. O desfecho somente contemplou óbito ou sobrevida. Não houve estratificação quanto ao status livre de doença ou com doença; essa avaliação não foi do escopo do projeto.

O estadiamento seguiu modelo clínico patológico da 8ª edição da AJCC/UICC³⁸ para mesotelioma pleural, incorporando-se os dados de estadiamento patológico ao clínico. Os casos extrapleurais seguiram o estadiamento descrito em prontuário.

Estadiamento Patológico (pTNM, 8ª edição):

Tumor primário (pT):

pTX: não avaliável

pT0: Ausência de evidência de tumor primário

pT1: Tumor limitado à pleura parietal ipsilateral com ou sem comprometimento de pleuras visceral, mediastinal e diafragmática.

pT2: Tumor comprometendo cada superfície pleural ipsilateral (parietal, mediastinal, diafragmática e visceral), com pelo menos uma das características: comprometimento do músculo diafragmático e/ou extensão da pleura visceral ao parênquima pulmonar subjacente.

pT3: Descreve doença localmente avançada, porém potencialmente ressecável: o tumor compromete todas as superfícies pleurais ipsilaterais, com pelo menos uma das características: comprometimento da fáscia endotorácica; extensão à gordura mediastinal; solitário, foco completamente ressecável de tumor com extensão a partes moles da parede torácica; comprometimento não transmural do pericárdio.

pT4: Descreve tumor localmente avançado, tecnicamente não ressecável. Tumor com comprometimento das superfícies pleuras ipsilaterais, com pelo menos um dos critérios: extensão difusa ou massas multifocais do tumor na parede torácica, com ou sem destruição cartilaginosa associada; extensão transdiafragmática do tumor ao peritônio; extensão direta à pleura contralateral;

extensão direta a órgãos mediastinais; extensão direta à coluna; extensão através da superfície interna do pericárdio, com ou sem derrame, ou comprometimento direto miocárdico.

Linfonodos regionais (pN):

pNX: Não avaliáveis.

pN0: Negativos para comprometimento neoplásico.

pN1: Metástase a linfonodos broncopulmonares hilares ou mediastinais (inclui mama interna, peridiafragmático, de coxim adiposo pericárdico ou intercostais).

pN2: Metástase em mediastinais contralaterais, ipsilaterais ou supraclavicular contralateral.

Metástase à distância:

pM1: Metástase à distância presente, confirmada por histopatologia.

Estadiamento Clínico (AJCC): ^{38,39}

IA – T1 N0 M0 ou T2 N0 M0

IB – T3 N0 M0

II – T1-T2 N1 M0

IIIA – T3 N1 M0

IIIB – T1-T3 N2 M0 ou T4 M0 (qualquer N)

IV – M1 (qualquer T, qualquer N).

Foram empregados os critérios de inclusão abaixo:

Crítérios de Inclusão:

- Casos das Instituições com aceitação do Comitê de Ética em Pesquisa (HC-FMUSP, ICESP e InCOR);
- Período de estudo: 1998-2018;
- Pacientes adultos (com mais de 18 anos);
- Disponibilidade de lâminas e blocos para revisão e novos cortes;
- Diagnósticos para inclusão:
 - Mesotelioma Maligno confirmado em revisão;
 - Concordância por dois patologistas experientes em patologia torácica e pulmonar (VLC e MLB);
 - Revisão morfológica e do painel imuno-histoquímico, consistente com os critérios preconizados pela OMS (2015);

- Caso haja dúvida, marcadores adicionais poderiam ser feitos, a critério dos revisores.
- Somente foram incluídos os subtipos epitelióide e sarcomatóide;
- Todas as topografias foram elegíveis (pleura, peritônio, pericárdio e paratesticular).
- Peças e biópsias cirúrgicas foram aceitáveis, desde que preenchidas os critérios:
 - Um bloco de parafina com o equivalente a seis áreas circulares de raio de 1,0 milímetro disponíveis (três áreas para a construção do TMA e três áreas de reserva);
 - Celularidade mínima por área: 30% da área circular composta por celularidade tumoral.

Critérios de Exclusão:

- Blocos de parafina indisponíveis;
- Diagnóstico de MM não foi confirmado em revisão;
- Subtipo histológico bifásico não foi elegível (*discutido abaixo*);
- Área e/ou Celularidade mínima remanescente no bloco para construção de TMA não disponível;
- Má preservação dos blocos de parafina ou reações imuno-histoquímicas resultante com artefatos pré-analíticos de fixação.

Os casos diagnosticados como MM bifásico foram excluídos da análise, em vista das controversas de sua classificação. Em 2018 foi proposto que sejam classificados como tipo “transicional” epitelióide e sarcomatóide, em vista de maior proximidade à sobrevida pelo subtipo predominante em casos bifásicos^{114,115}; dessa forma, optamos por excluir os dois casos de MM bifásicos identificados, para garantir maior reprodutibilidade do estudo e reduzir a possibilidade de controvérsias.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Foi solicitado a dispensa do TCLE por ser de caráter retrospectivo, sem interferência na conduta do paciente.

Fundamentação do Protocolo de Avaliação Morfológica das Amostras

Foi empregada a classificação OMS 2015 de Tumores do Tórax e Mediastino¹¹⁶ e empregados os critérios previamente discutidos.

A avaliação de Grau Nuclear seguiu os critérios compostos por Kadota¹¹⁷. As lâminas foram observadas sob objetiva de 40x (ou equivalente a campo de visão de 0,237 mm²) e avaliados os critérios de atipias nucleares (classificados em graus 1 a 3, de núcleos homogêneos, equivalentes até o dobro de dimensões de hemácias, grau 2 com nucléolos evidentes e aumento nas dimensões nucleares e grau 3 com atipias intensas, com nucléolos evidentes, convoluções nucleares e pleomorfismo). A contagem mitótica foi realizada sob a mesma objetiva ou equivalente ótico, em 50 campos de grande aumento e classificada segundo a proporção de mitoses contadas no equivalente a 10 campos de grande aumento, em baixo índice (0-1/10), intermediário (2-4/10) e alto (superior a 5/10). O grau final foi composto pela soma e estratificado em graus 1 (soma 2-3), 2 (4-5) e 4 (6). Para casos com heterogeneidade no grau final, foi optado o de maior somatória. As características nucleares estão ilustradas na **Figura 2.2**.

A estimativa de linfócitos intratumorais (TIL, do inglês *Tumor Infiltrating Lymphocyte*), seguiu a proposição de Hendry¹¹⁸, estratificado em três graus, segundo estimativa visual da quantidade de linfócitos em meio ao componente celular viável neoplásico. Grau 1 quando inferior a 10%, Grau 2 quando entre 10 e 50% e Grau 3 quando superior a 50% da celularidade geral tumoral fosse composta por linfócitos intratumorais, como ilustrado na **Figura 2.3**.

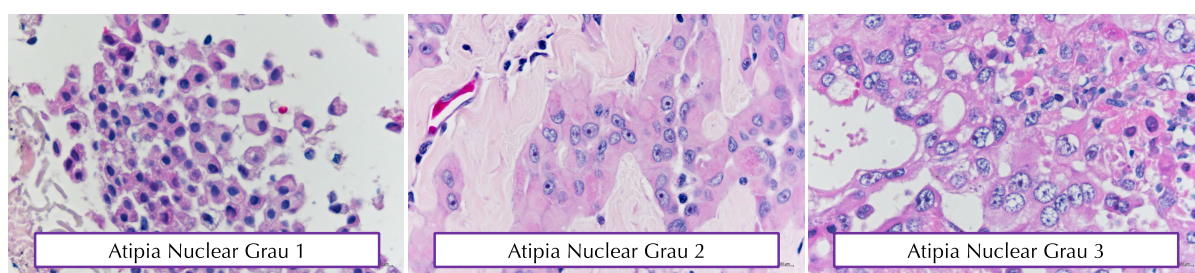


Figura 2.2. Características nucleares, segundo Kadota *et al*³⁶: atipias nucleares leves, exibindo núcleos homogêneos e nucléolo inconspícuo (A), atipias nucleares moderadas, com aumento na relação núcleo citoplasma, formato e variações em dimensões com nucléolos proeminentes (B), atipias nucleares intensas, com pleomorfismo, nucléolos proeminentes e alta relação nucleocitoplasma (HE, 400x).

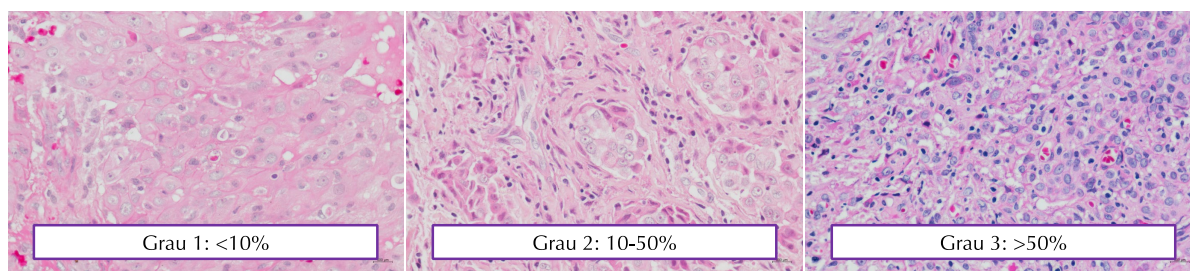


Figura 2.3. Avaliação de Linfócitos Intratumorais (TIL), segundo *Hendry et al*¹¹⁸: Grau 1, com menos de 10% de TIL compondo a celularidade tumoral (D), Grau 2, entre 10 e 50% (E) e Grau 3, compondo mais de 50% (F). (A-C, HE, 630x; D-F, HE, 400x).

Construção de Tissue Microarray (TMA)

O modelo de investigação em TMA foi adotado com base em validação prévia na literatura, inclusive para o estudo de resposta imune¹¹⁹⁻¹²¹. Foram anotadas três áreas de 1,0 milímetro de diâmetro nas lâminas e blocos correspondentes originais (blocos “doadores”); desses foram extraídas e transportadas a blocos de parafina receptores através de equipamento mecanizado de precisão MTA1 (*Manual Tissue Microarrayer*, Beecher Instruments, EUA). Os blocos receptores foram confeccionados com parafina Histosec em pastilhas (Merck, EUA). Cada cilindro foi posicionado no bloco receptor segundo mapa previamente elaborado, com espaçamento de 0,3 milímetro entre as amostras (**Figura 2.4**). Para orientação e posição para análise em microscópio, foram incluídos controles de tecido renal obtidos de autópsia nas três primeiras posições da primeira linha da matriz do TMA, conforme protocolo de procedimentos do Laboratório de Investigações Médicas 14, LIM-14 da FMUSP.

Cada caso foi representado em três cilindros distribuídos em duplicata em bloco receptor e bloco espelho, visando minimizar possível viés de amostragem, resultante de perdas físicas e/ou de representatividade inerentes à tecnologia de TMA. Os blocos de TMA foram submetidos, em sessão única para evitar perdas com aparamento a cortes seriados com espessura em 3µm em micrótomo manual (Leica Instruments, Alemanha), obtendo-se 70 cortes de cada bloco, cada um distribuído em lâmina sinalizada, que foi embebida em parafina e arquivada em caixa escura a -20°C, visando preservação da antigenicidade das amostras. Os TMAs construídos estão ilustrados na **Figura 2.5**.

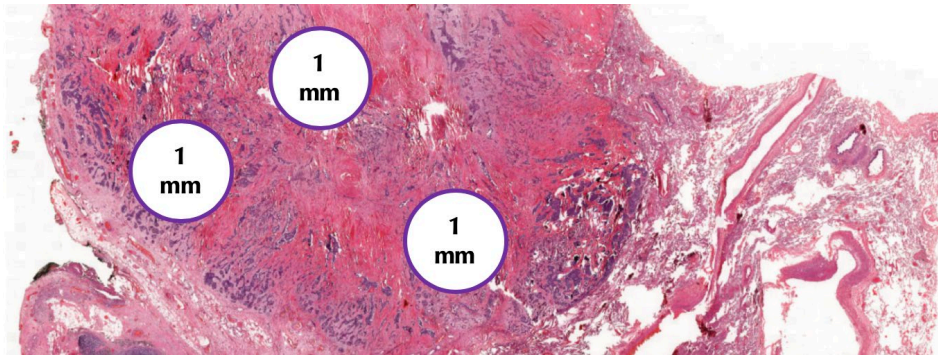


Figura 2.4. Exemplo de seleção de pontos no TMA. Nota-se a preferência por áreas heterogêneas, sem evidências de necrose (HE, 2,5x).

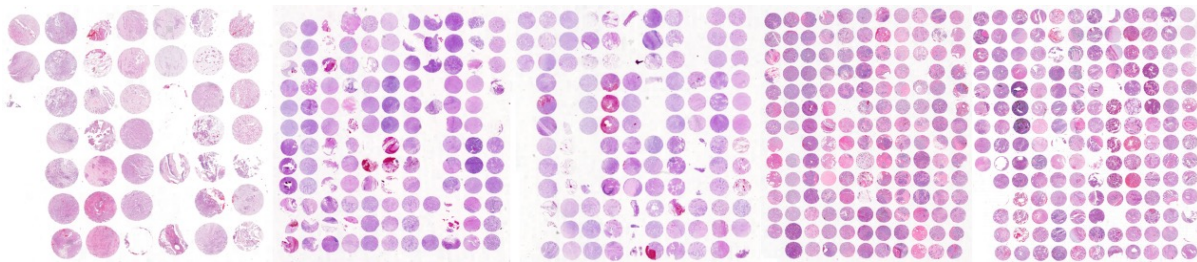


Figura 2.5. Visão microscópica panorama dos TMAs construídos. TMA 417, 463, 464, 479 e 480, da esquerda para a direita, correspondentes a MM, três primeiros, CMa e CP (HE, 0,5x).

Histoquímica

Um corte de cada TMA de MM foi submetido ao protocolo de coloração de Russel-Movat, segundo protocolo¹²² do setor de histotécnica da FMUSP.

O pentacrômio de Movat foi descrito em 1955¹²³ como uma técnica histoquímica com a finalidade de sobressair múltiplos componentes do compartimento conjuntivo¹²⁴; em 1972 foi modificado por Russell¹²⁵, com otimização da técnica. No pentacrômico são agregados elementos de outras colorações, como de Verhoeff, tiosulfato de sódio, ácido acético, alcian blue, croceína Scarlet com fucsina ácida e soluções de álcool safronado. Na **Tabela 2.1** são listados os elementos conjuntivos avaliáveis, com os respectivos tons de coloração. A **Figura 2.6** ilustra os elementos do Pentacrômico de Movat avaliados.

Tabela 2.1. Elementos teciduais conjuntivos, incluindo tecido muscular e elementos de matriz extracelular, que são identificados ao pentacrômico de Movat-Russel (“Pentacrômio de Movat”) e os respectivos tons correspondentes.

Elemento tecidual	Tom de coloração
Fibra elástica	Preto a azul escuro
Fibras colagênicas / reticulares	Amarelo
Mucina / Ácido hialurônico	Azul claro
Fibrina	Vermelho claro
Tecido muscular	Vermelho

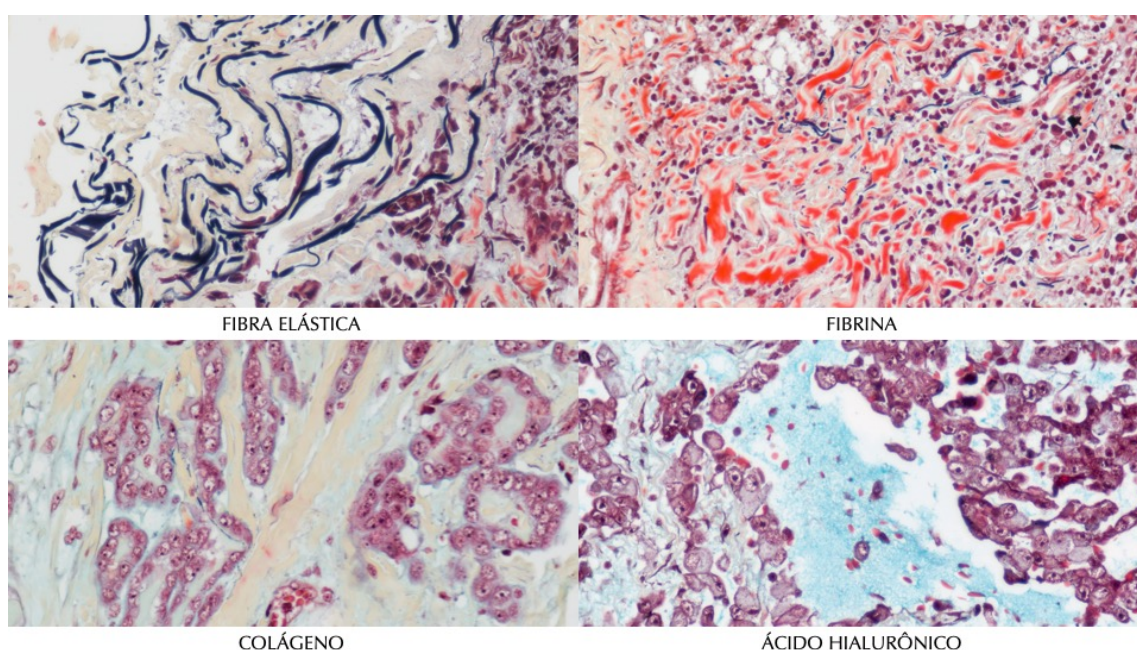


Figura 2.6. Elementos de matriz extracelular corados pela técnica histoquímica de Pentacrômio de Movat. Notam-se as fibras elásticas, com conformação densa fibrilar, de cor preta a azul escuro; a fibrina em vermelho claro; o colágeno ou áreas de fibrose em amarelo e o ácido hialurônico (também caracterizado como mucina) em azul claro. (Pentacrômio de Movat, 400x).

Submetemos um bloco de parafina com corte de peça cirúrgica representativo à coloração histoquímica de Picrosírius e visualizado à luz polarizada sob 90 graus, com identificação indireta de fibras tipo I (de aspecto mais grosseiro, em tons oscilantes entre amarelado até avermelhado) e fibras tipo III (mais delicadas e esverdeadas)^{126,127}. A **Figura 2.7** ilustra os dois padrões de fibras.

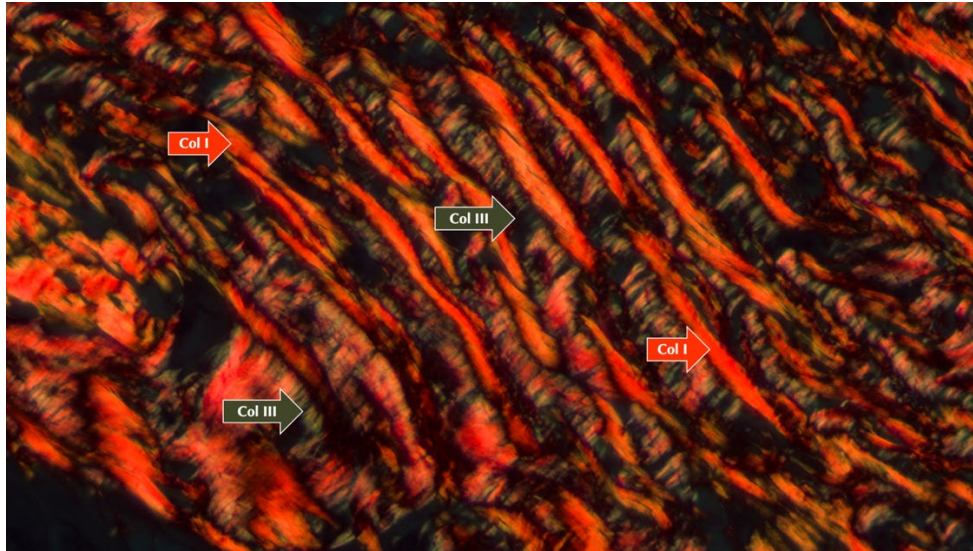


Figura 2.7. Padrões de fibras colagênicas I e III observados sob a coloração de picrosírius sob luz polarizada. Fibras do tipo I (fibras avermelhadas e grosseiras) e tipo III (fibras esverdeadas e finas) são apontadas pelas setas (vermelha e verde, respectivamente) (Picrosírius sob luz polarizada, 630x).

Imuno-histoquímica

Cortes dos TMAs foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA). As lâminas foram desparafinadas em 3 banhos de xilol de 5 minutos cada (um à 60°C e dois à temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%), água destilada e deixadas em tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS).

Para o método manual, foi empregado o protocolo a seguir: a recuperação dos sítios antigênicos foi realizada por alta temperatura em Tris-EDTA pH 9 e citrato, com pH variável segundo antígeno, conforme **Tabela 2.2**. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada a 10 volumes (3%), em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e deixadas em tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS). Para CD4, CD8, CD20 e Colágeno V o bloqueio foi de metanol, água oxigenada 3% e PBS. Os anticorpos foram diluídos nas concentrações conforme **Tabela 2.2**. As lâminas foram incubadas overnight à 4°C em câmara úmida. Posteriormente foi feita a incubação com o anticorpo secundário Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB (SPRING) por 30 minutos em estufa 37 graus. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Em seguida ocorreu a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram montadas com lamínula em Permount (Fischer, código SP15-500).

A imuno-histoquímica para o Colágeno tipo V foi padronizada segundo o protocolo acima, com tentativas em diluições graduais, partindo-se de 1:1200, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000 e 1:10000, como ilustrado na **Figura 2.15**. O ponto de validação foi a identificação do

padrão de marcação imuno-histoquímico com correspondência ao padrão da imunofluorescência, mantendo a expressão nas células neoplásicas, com fundo sem deposição inespecífica.

Para o método automatizado, realizada na Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, foi empregado protocolo proprietário em plataforma automatizada Ventana Benchmark Ultra (Roche, Ventana, Tucson, EUA).

Interpretação da Imuno-histoquímica

A interpretação qualitativa foi feita por dois patologistas com experiência em imuno-histoquímica (VLC, MLB). A imunoexpressão foi pontuada de forma binária (positiva ou negativa) para os antígenos D2-40, WT1, MOC31, Ber-EP4, Vimentina. BAP1 e E-Caderina também foram interpretados qualitativamente de forma binária, porém considerando-se a perda de expressão (negatividade nas células neoplásicas em contraponto ao controle interno positivo de linfócitos), nuclear para BAP1 e de membrana para E-Caderina. A **Figura 2.12** ilustram o padrão de positividade esperado para o MM.

As proteínas de reparo de DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) foram quantificadas, mensurando-se a proporção de células positivas em relação à totalidade de células neoplásicas. O alvo de avaliação desse teste é a busca pela perda de expressão, comparando-se a expressão em núcleos de células neoplásicas com o controle interno de linfócitos intraepiteliais e tecido não neoplásico¹²⁸; nosso enfoque foi a avaliação quantitativa. Foi considerado como perda de expressão o limiar de positividade inferior ou igual a 1% na avaliação por análise de imagem e validado por interpretação qualitativa isolada por patologistas experientes (MLB, VLC).

Os marcadores para alvos terapêuticos foram avaliados qualitativamente e quantitativamente. A expressão de CD30 foi considerada positiva quando de membrana. A expressão de PD-1 e PD-L1 foi avaliada em células tumorais e imunes (linfócitos e macrófagos) e discriminadas segundo as proporções estabelecidas como CPS (“Cellular Positive Score”, Pontuação Positiva Celular), TPS (“Tumoral Positive Score”, Pontuação Positiva Tumoral) e MIDS (“Mononuclear Immune Cell Density Score”, Pontuação de Densidade de Células Imunes Mononucleares), segundo discutido por Kulangara et al¹²⁹. A quantificação segue como na **Figura 2.8**.

Todas as quantificações foram feitas digitalmente por técnica de análise de imagem, conforme será discutido. Para PD-1, PD-L1 e CD30, os cut-offs foram calculados a partir dos dados de quantificação e uma nova variável, agora nominal (positivo, para aqueles que

atingiram os cut-offs, e negativo) foi gerada. Esse novo dado gerado foi validado com interpretação dos casos por patologistas certificados pela indústria e experientes na avaliação desses biomarcadores (MLB, VLC). Os testes de correlação estatísticos foram realizados com ambas variáveis, quanti e qualitativas.

Scores PD-1 / PD-L1	
$CPS = \frac{Células\ Totais\ (N+f)+}{Células\ Neoplásicas\ Viáveis} \times 100$	
$TPS = \frac{Células\ Neoplásicas\ +}{Células\ Neoplásicas\ Viáveis} \times 100$	
$MIDS = \frac{Células\ Imune}{Células\ Neoplásicas\ Viáveis} \times 100$	
Cut-off $\geq 1\%$ POSITIVO	

CD30 Tumor Score
$CD30TS = \frac{Células\ Tumorais\ CD30+}{Células\ Tumorais\ Viáveis} \times 100$
CD30TS $\geq 1\%$ POSITIVO

Figura 2.8. Razões consideradas para avaliação quantitativa da positividade de imunexpressão de PD-1, PD-L1 e CD30.

A imuno-histoquímica ao Colágeno V foi padronizada para essa investigação. A base racional foi a tentativa de replicar o padrão encontrado na IF do Col (V). Para isso, foram realizadas múltiplas diluições, partindo-se de 1:1200 até 1:10000. O alvo foi obter reações sem fundo aparente, com deposição de DAB restrita aos elementos celulares (membrana, citoplasma). O padrão escolhido para estudo foi da diluição de 1:8000, em que era observado ausência de deposição em padrão de fundo sem prejuízo para a deposição celular, como ilustrado na **Figura 2.15**.

Os antígenos para avaliação de elementos de transição epitélio mesênquima escolhidos foram a Vimentina e a E-Caderina, como ilustrados na **Figura 2.11**. Foi avaliado a positividade nas células neoplásicas, desconsiderando-se a expressão estromal. A positividade a E-caderina e negatividade a Vimentina nas células neoplásicas foi interpretado como ausência de transição epitélio-mesênquima (EMT), enquanto o inverso (perda de expressão de membrana de E-caderina e vimentina positivo) foi considerado como positivo à EMT. A E-caderina foi considerada como negativa (perda de expressão) quando sua expressão fosse inferior a 60% das células neoplásicas; a vimentina foi considerada positiva quando a expressão foi superior a 10% das células neoplásicas.

A avaliação quantitativa seguiu os protocolos automatizados em lâminas de imuno-histoquímica digitalizadas (escaneadas), conforme será discutido a seguir.

A expectativa dos achados dos antígenos e a natureza do método de interpretação seguem na **Tabela 2.3** e **Figura 2.9**.

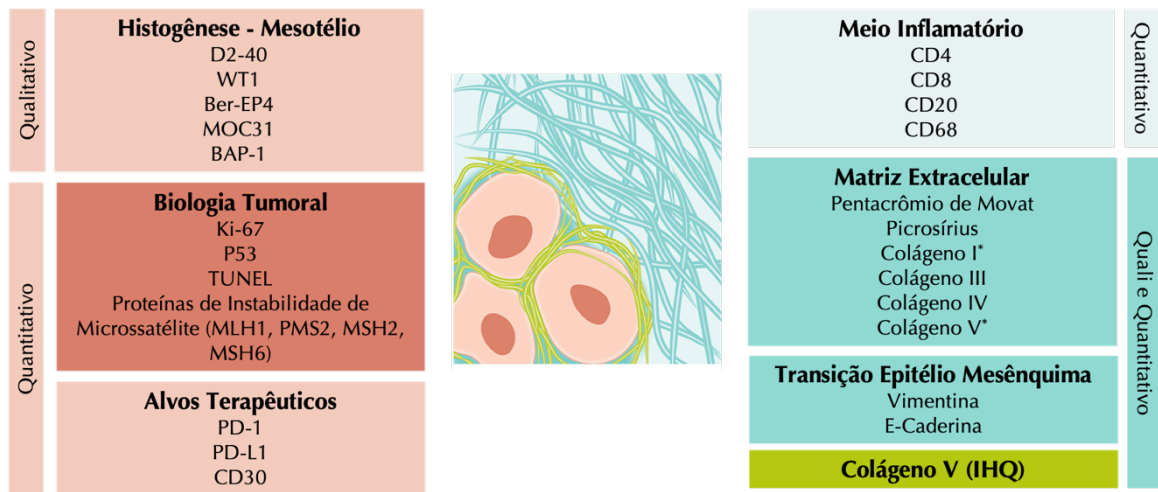


Figura 2.9. Sumário dos métodos e marcadores, avaliados através das técnicas de imuno-histoquímica, histoquímica e imunofluorescência nos diversos componentes celular e extracelular. Foram empregadas técnicas quantitativas baseadas em análise de imagem e qualitativas em marcadores de diversas naturezas em compartimentos celulares de membrana, citoplasma, núcleo e extracelulares, incluindo a interação célula-matriz e da matriz extracelular.

Tabela 2.2. Relação de antígenos com discriminação de método para testes imunohistoquímicos.

Grupo*	Antígeno	Clone	Fabricante	Diluição	Tampão (pH)	Recuperação antigênica	Sistema de detecção e amplificação	Método
Imuno	CD4	368	Novocastra	1:50	9,0	Panela	Reveal	Manual
	CD8	C8/144B	Dako	1:400	6,0	Panela	Reveal	Manual
	CD20	L26	Dako	1:2000	6,0	Panela	Reveal	Manual
	CD68	KP1	Dako	1:5000	6,0	Panela	Reveal	Manual
Mesotélio	D2-40	D2-40	Dako	1:1000	6,0	Panela	Reveal	Aut.**
	WT-1	6F-H2	Cellmarque	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Ultraview	Aut.
	MOC31	MOC31	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Ultraview	Aut.
	Ber-EP4	Ber-EP4	Cellmarque	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Ultraview	Aut.
	BAP1	C-4	Santa Cruz	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
Cell.	P53	DO-7	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Ultraview	Aut.
	Ki-67	MIB-1	Dako	1:400	6,0	Panela	Novolink	Aut.
Alvos	PD-1	Nat 105	Cellmarque	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Ultraview	Aut.
	PD-L1	SP263	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
	CD30	BER-H2	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
Reparo	MLH1	M1	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
	MSH2	G219-1129	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
	MSH6	SP93	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
	PMS2	A16-4	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Optiview	Aut.
MEC	Col V	poli	Rockland	1:1400	9,0	Panela	Reveal	Manual
TEM	Vimentina	M0725	Dako	1:500	6,0	Panela	Reveal	Manual
	e-caderina	36	Roche	Prediluído	8,4	Ultra CC1	Ultraview	Aut.

*Classificação em grupos relacionados à função e localização do antígeno (Imunológica, Mesotélio, Celularidade, Alvos Terapêuticos, Genes de Reparo de DNA, Matriz Extracelular (MEC) e Transição epitélio-mesênquima (EMC)). **A abreviação Aut. equivale a Automatizado. ** UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, referência 760-500, pronto para uso).

Tabela 2.3. Células de interesse e expectativas de padrões de marcação e expressão. Método de avaliação empregado.

Grupo*	Antígeno	Célula alvo de interesse**	Padrão de marcação	Padrão de expressão	Método de avaliação	Formato de resultado
Imuno	CD4	Linfócito T	Membrana	Binário***	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	CD8	Linfócito T	Membrana	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	CD20	Linfócito B	Membrana	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	CD68	Macrófago	Citoplasma	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
Mesotélio	D2-40	Mesotélio	Membrana	Binário	Qualitativo	%+ casos ^{##}
	WT-1	Mesotélio	Núcleo	Binário	Qualitativo	%+ casos ^{##}
	MOC31	Mesotélio	Membrana	Negativo	Qualitativo	%- casos ^{##}
	Ber-EP4	Mesotélio	Membrana e citoplasma	Negativo	Qualitativo	%- casos ^{##}
	BAP1	Mesotelioma	Núcleo	Perda ¹	Qualitativo	%- casos ^{##}
Celular	P53	Mesotelioma	Núcleo	Acúmulo ²	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	Ki67	Mesotelioma	Núcleo, Nucléolo, Membrana nuclear	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
Alvos	PD-1	Mesotelioma	Membrana	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	PD-L1	Mesotelioma	Membrana	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	CD30	Mesotelioma	Membrana	Binário	Quantitativo	/mm ² e % [#]
Reparo	MLH1	Mesotelioma	Núcleo	Perda	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	MSH2	Mesotelioma	Núcleo	Perda	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	MSH6	Mesotelioma	Núcleo	Perda	Quantitativo	/mm ² e % [#]
	PMS2	Mesotelioma	Núcleo	Perda	Quantitativo	/mm ² e % [#]
MEC	Col V	Mesotelioma	Membrana	Estromal	Quali/Quanti****	/mm ³ , % [#] e padrão nos casos
		MEC	Estroma	Membrana Misto ³		
TEM	Vimentina	Mesotelioma	Membrana	Binário	Quali/Quanti	/mm ² e % [#]
		MEC	Citoplasma Estroma			
	E-Caderina	Mesotelioma	Membrana Citoplasma	Perda	Quali/Quanti	/mm ² e % [#]

*Classificação em grupos, conforme Tabela 1. **Células consideradas para avaliação. Por Mesotelioma entenda-se a célula neoplásica; mesotélio compreende à contrapartida benigna do mesotélio e a neoplasias com diferenciação mesotelial, incluindo as contrapartidas benigna e maligna, como o MM. ***Binária: repostada positivo ou negativo. ****Quali/Quanti: Qualitativo e Quantitativo #Porcentagem expressa como a razão entre o número de células de interesse positivas e o número de células neoplásicas. ##Porcentagem expressa como a razão entre os casos com achado de interesse (+ positivo,

- negativo ou perda de expressão) e a casuística total. ¹Perda: a expressão nas células neoplásicas é negativa, em contraponto às benignas, positivas. ²Acúmulo: padrão com positividade superior a 10% por baixa depuração de proteínas aberrantes. ³Padrões descritos na exploração do perfil de expressão de Colágeno V, vide resultados.

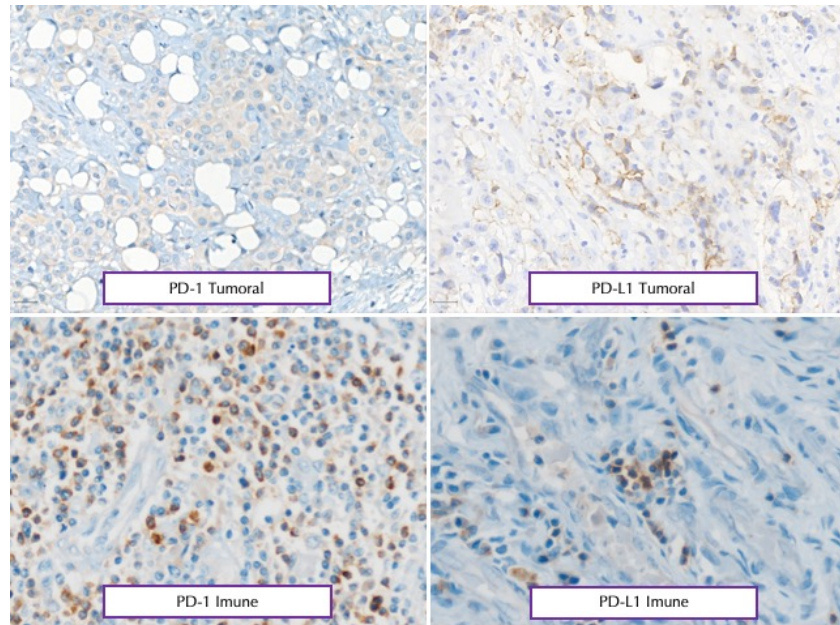


Figura 2.10. Imunoexpressão de PD-1 e PD-L1 em células neoplásicas e imunes (linfócitos e macrófagos) e PD-L1 em células neoplásicas e imunes (IHQ, 400x).

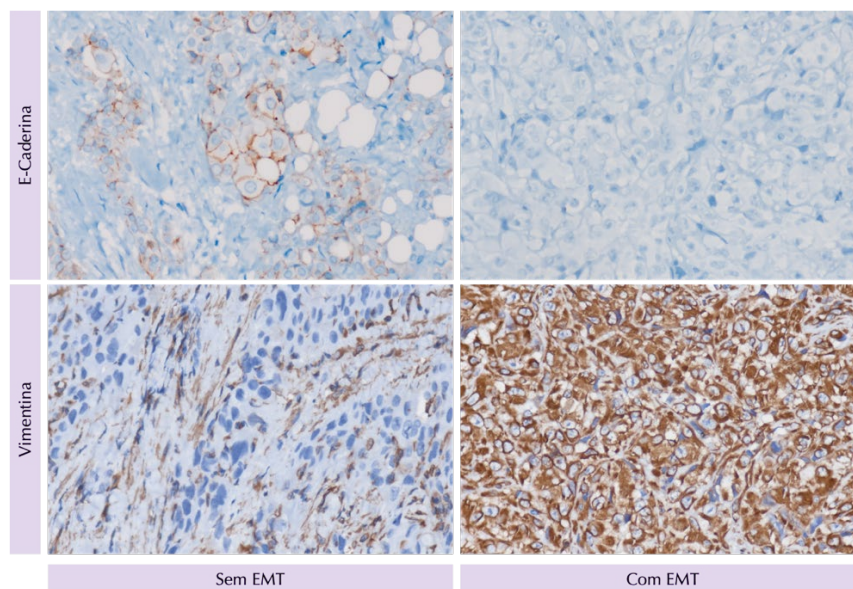


Figura 2.11. Padrão de imunoexpressão dos elementos do fenótipo de transição epitélio mesênquima. O fenótipo EMT é interpretado como negativo quando há manutenção da expressão de E-Caderina (padrão de membrana celular) e ausência de expressão de vimentina nas células neoplásicas; a positividade é quando há perda de expressão de E-Caderina (considerada pelo cut-off de expressão inferior a 60%) e positividade de vimentina nas células neoplásicas (IHQ, 400x).

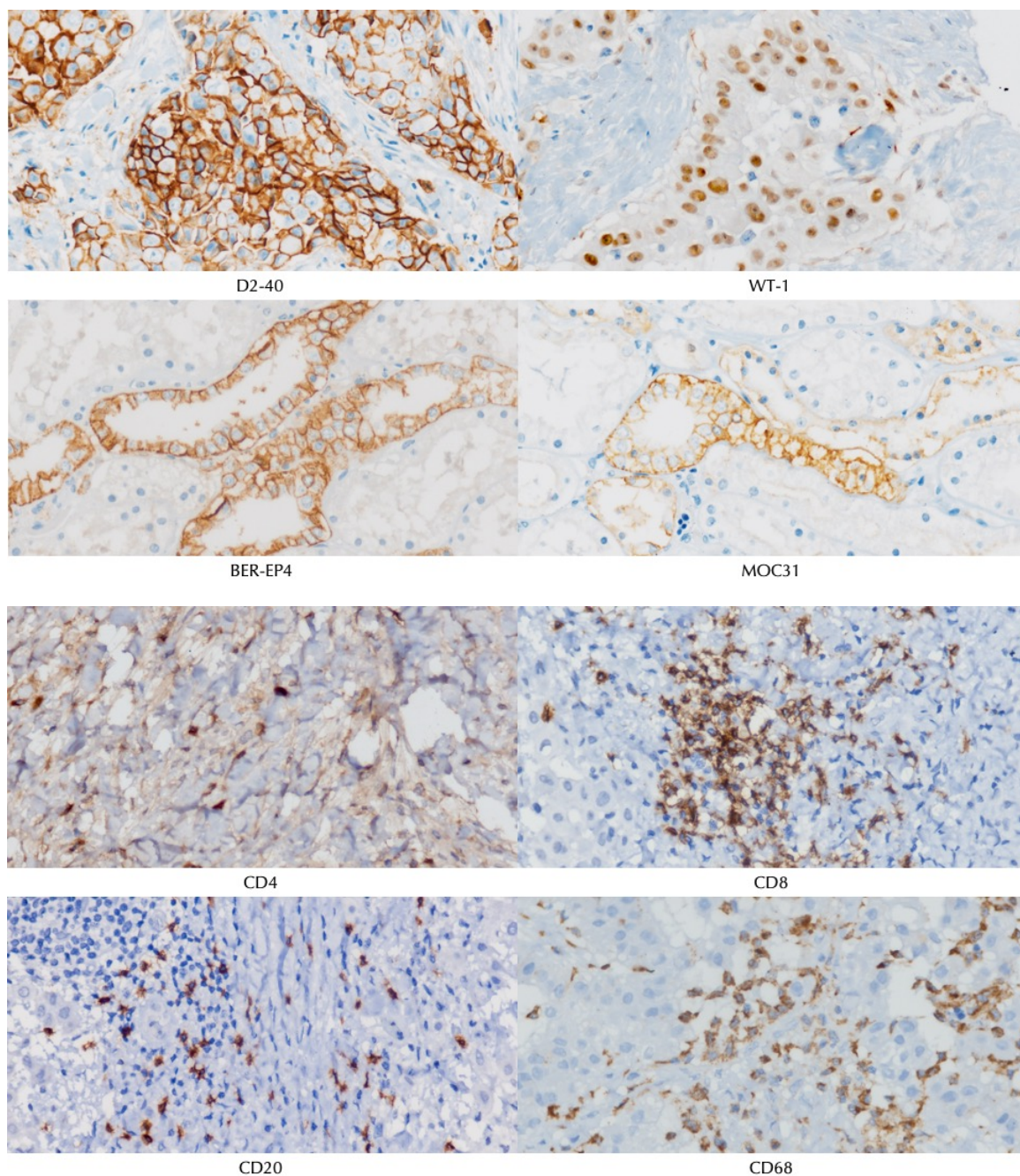


Figura 2.12. Padrões de imunexpressão dos antígenos descritos na Tabela 2 para o diagnóstico e avaliação de infiltrado inflamatório. Marcadores positivos para diferenciação mesotelial, D2-40, WT-1 e negativos (positivos para adenocarcinoma), BER-EP4 e MOC31. O padrão de imunexpressão é predominante de membrana, com possibilidade de expansão ao citoplasma para D2-40, BER-EP4 e MOC31. WT-1 é de expressão nuclear. Para avaliação do infiltrado inflamatório foram empregados CD4 e CD8 para linfócitos T, CD20, para linfócitos B e CD68 para macrófagos. O padrão de expressão é de membrana com expansão ao citoplasma, exceto no CD68, que predomina no citoplasma (IHQ, 400x).

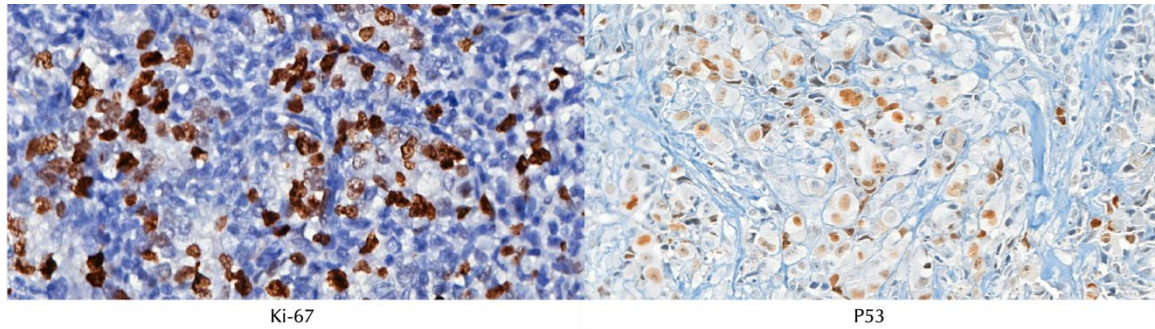


Figura 2.13. Padrão de expressão de Ki-67 como método de avaliação indireta de atividade proliferativa e P53. O Ki-67 possui marcação positiva em núcleos, nucléolos e membrana nuclear de células em qualquer fase do ciclo celular. O P53 é positivo nos núcleos das células neoplásicas (IHQ, 400x).

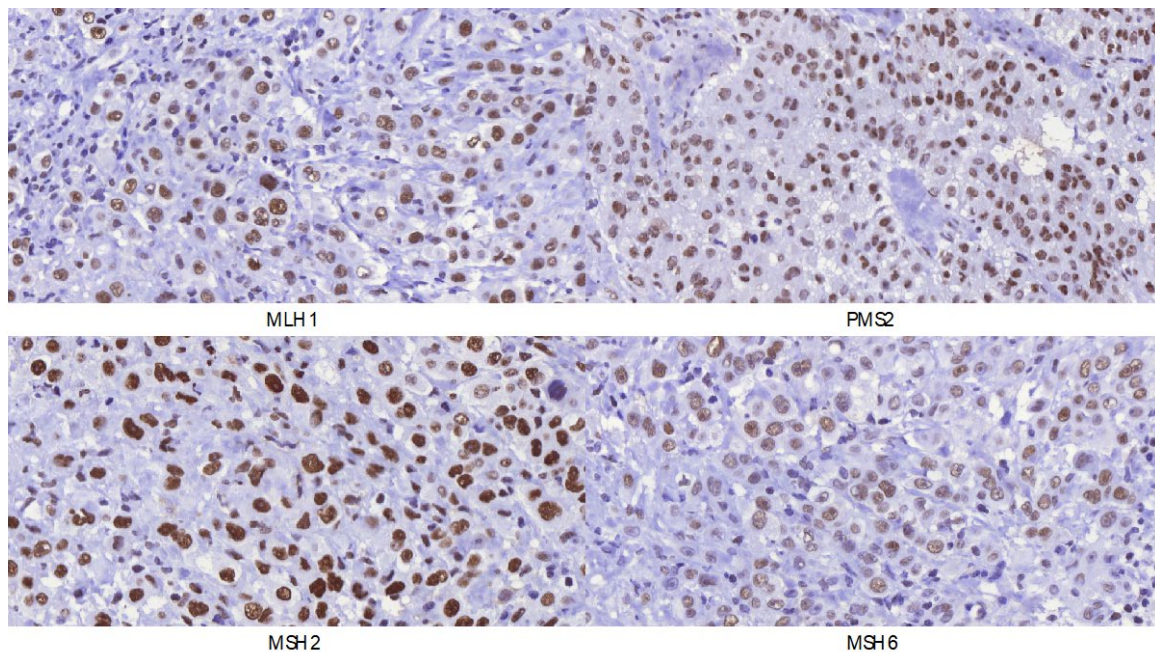


Figura 2.14. Padrão de imunexpressão de proteínas de reparo de DNA, de padrão nuclear nas células neoplásicas: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. A perda de expressão nas células neoplásica é considerada o alvo desse teste; aqui, foi avaliado a quantidade de células positivas (IHQ, 400x).

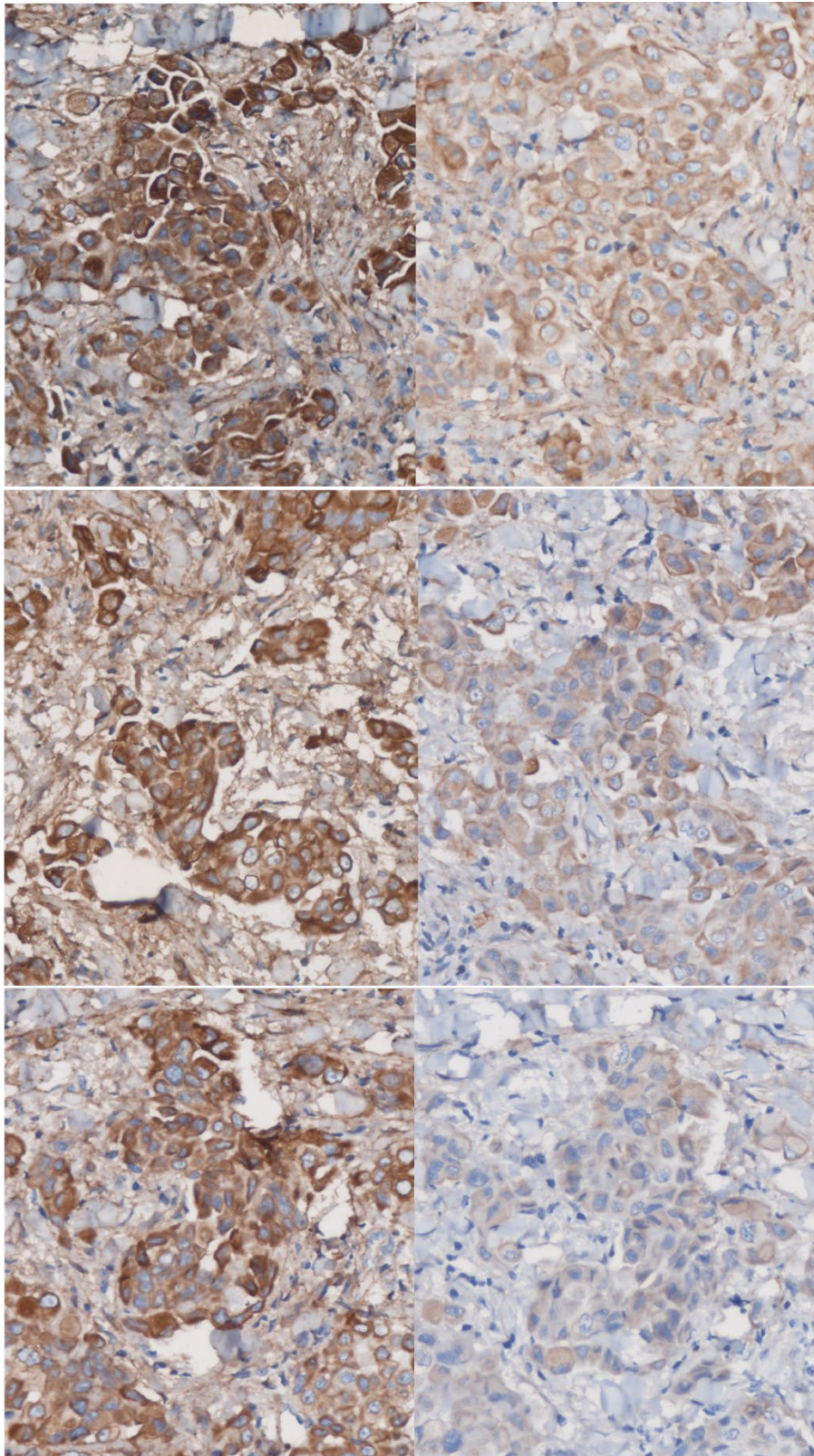


Figura 2.15. Padronização da IHQ do Col (V), com o padrão das diversas diluições testadas (1:1200, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000). O desfecho da padronização para a escolha da diluição foi a correlação com o padrão evidenciado na imunofluorescência do Colágeno V, com manutenção da especificidade das células neoplásicas e o fundo com menor deposição de Colágeno V. A diluição escolhida foi 1:8000 (IHQ, 400x).

TUNEL

Para a análise do número de células apoptóticas foi realizado através do teste *terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) - mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL, Roche, Indianapolis, IN, EUA). O teste do TUNEL marca preferencialmente segmentos de DNA clivados durante a apoptose. Esse teste foi realizado de acordo com rotina do laboratório de Imuno-histoquímica da FMUSP. As lâminas foram desparafinadas em 3 banhos de xilol de 5 minutos cada (um à 60°C e dois à temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%), água destilada e deixadas em tampão fosfato pH 7.4 (PBS). A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada por incubação com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 0,3% em metanol por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram incubadas com a mistura de reação TUNEL (5µl da solução de enzima, mais 45µl da solução de marcador) a 37°C por 60 minutos e então lavadas 3 vezes em PBS. Posteriormente houve a incubação com conversor de peroxidase em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e então lavadas 3 vezes em PBS. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). As lâminas foram contra-coradas por verde de Metila e montadas com lamínula em Permout (Fischer, código SP15-500), com resultante como na **Figura 2.16**.

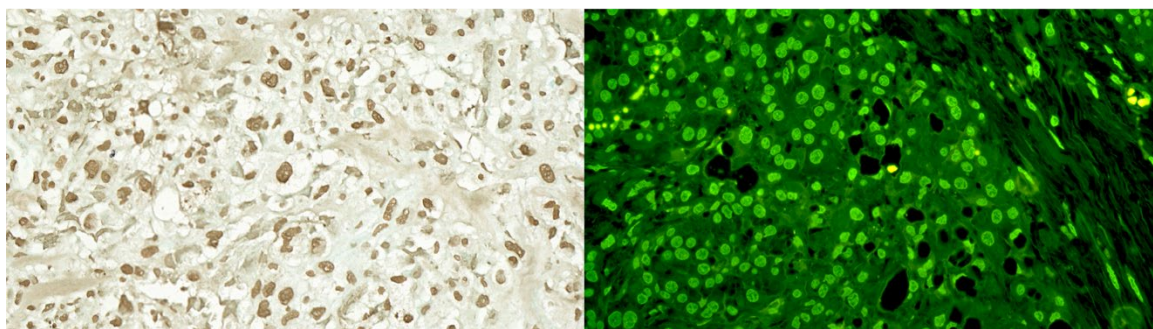


Figura 2.16. Padrão de marcação de TUNEL para avaliação de apoptose. (A) padrão nuclear observado à técnica de hibridização cromogênica em campo claro e (B) contrapartida para controle da reação em fluorescência de campo escuro. (IHQ, IF, 400x).

Imunofluorescência

Para a imunofluorescência dos Colágenos tipo I, III IV e V, seções de 3 µm embebidas em parafina foram montadas em 3-aminopropiltrietoxissilano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), desparafinizadas em xileno e hidratadas em etanol graduado. A recuperação do antígeno foi determinada pelo tratamento enzimático do tecido com pepsina bovina (10.000

unidades secas / ml; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em tampão de ácido acético a 0,5 N (pH 2,2) (4 ng/ml) por 30 minutos a 37°C. Locais inespecíficos foram bloqueados com albumina sérica bovina (BSA) a 5% em solução salina tampão fosfato (PBS) por 30 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas durante a noite (*overnight*) com anti-humano policlonal de coelho tipo I (1: 200), III (1:400), IV (1:100) e V (1: 300) (Rockland, Limerick, PA, EUA). Além disso, foi realizada uma coloração policlonal de tipo duplo anti-humano policlonal tipo V (1: 300) e D2-40 (1: 1000) (1: 1000, D2-40, Dako). Para controles negativos, as seções foram incubadas com soro bovino fetal em vez do anticorpo primário. O mesmo tratamento foi realizado para detecção de imunofluorescência. As seções foram incubadas com o mesmo anticorpo primário diluído com solução salina tamponada com fosfato mais albumina de soro bovino a 1% durante a noite a 4°C em atmosfera úmida. As seções foram lavadas em PBS com Tween 20 a 0,05% e incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente com IgG anti-camundongo de cabra conjugada com Alexa 488 (1: 200, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) e anti-cabra conjugada com Alexa 546. IgG de coelho (1: 200, Invitrogen, Eugene, OR, EUA). Os núcleos foram contrastados com 0,4mM/mL de dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes™, Invitrogen, Eugene, OR, EUA), por 15 minutos em temperatura ambiente. Para controles negativos e de autofluorescência, as seções foram incubadas com PBS e soro normal de coelho ou camundongo em vez do anticorpo específico. As amostras foram montadas com um meio de montagem aquoso e observadas por microscopia de imunofluorescência (Olympus BX51). Os diferentes tipos de fibras colágenas (I e V) foram avaliados quantitativamente no microambiente tumoral por análise de imagem.

Digitalização e Captura de Imagens das Lâminas de Histologia

As lâminas de histologia para visualização em campo claro (HE, Movat, IHQ, TUNEL) foram digitalizadas em *scanner* Panoramic 250 (3DHistech, Budapeste, Hungria), sob objetiva de 40x (Plan-Apochromat, 40x/NA0,95, Zeiss, Alemanha), com densidade de pixel resultante de 0,185 μm^2 . Os arquivos resultantes, salvos em formato .mirax foram armazenados em disco rígido externo com 2 TB de capacidade, com cópia redundante em disco secundário para segurança de dados. A visualização foi feita em software próprio, Panoramic Viewer (3DHistech) e em plataforma aberta QuPath, versão 0.2.0-m4 (Centre for Cancer Research & Cell Biology, University of Edinburgh, Edinbug, Escócia).

Imagens de fluorescência foram capturadas em câmera científica (Olympus Co, St Laurant, Quèbec, Canada) acoplada a microscópico Olympus (Olympus BX51) através do

software de imagem Image-ProPlus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Foram adquiridas cinco imagens em cada filtro de interesse para todos os *spots* de TMA (uma imagem panorâmica do *spot*, sob objetiva de 5x e quatro imagens de maior aumento, de áreas de maior celularidade do *spot*, sob objetiva de 40x), de forma a garantir ampla amostragem em maior aumento das áreas de deposição colagênica. Foram adquiridas 21150 imagens.

Para documentação científica e aquisição de imagens de microscopia sob luz polarizada, foram adquiridas imagens de campo claro e de luz polarizada através de câmera científica Zeiss AxioCam 512 (Zeiss, Alemanha) acoplada a microscópio ótico Zeiss AxioScope A1 com objetivas N-Planocromática x40 e x63 (Zeiss) sob o software Zen 3.0 (Zeiss).

Quantificação Semi-Assistida Computadorizada

Foi empregado o software de visualização de análise QuPath, sob forma semi-assistida. Essa plataforma já foi previamente validada em demais estudos¹³⁰ e foi seguido protocolo sugerido pelos autores¹³¹. Uma vez aberta no software, seguiu-se à normalização automática dos vetores da lâmina, classificação de área tecidual de interesse, correção da detecção automatizada da amostra, com anotação das áreas de interesse (**Figura 2.17**) e caracterização da celularidade. Foi empregado o método de limiar ótico padrão a partir da coloração DAB nuclear para marcadores nucleares e DAB membrana para marcadores de membrana, com ajustes quando necessário. Os limiares empregados por antígeno estudado estão descritos na **Tabela 2.4**. Uma vez exibida a marcação celular, todos os casos foram revistos e validados por patologista experiente (MLB). Para os resultados de marcadores imuno-histoquímicos, o resultado foi exibido por spot de TMA, em células positivas/mm² (**Figura 2.18**).

A quantificação de Colágeno foi realizada no software ImagePro-Plus 6.0 sob técnica de limiar ótico. O limiar ótico de positividade foi escolhido por proximidade à coloração capturada e foi exibido o resultado em áreas positivas por mm³.

A quantificação da coloração de Movat foi realizado com a ferramenta de aprendizado de máquina Weka (“Waikato Environment for Knowledge Segmentation”)¹³² no software ImageJ (National Institute of Health, USA). Um conjunto de treinamento foi criado por patologista experiente (MLB) composto por 18 imagens de 100x100 pixels extraídos da casuística geral. Essas imagens são representativas de áreas “ideais” (*ground truth*), representando os componentes ressaltados nessa coloração: fibrina, matriz colagênica, ácido hialurônico, fibras elásticas (**Figuras 2.20-21**). A correspondência de cada um desses elementos foi “ensinada” ao sistema através de anotação nas lâminas, execução do algoritmo

e, com tentativa e erro, correção até a adequação e validação do mesmo. Uma vez validado, no conjunto de treinamento, o algoritmo foi executado para todos os *spots* em imagens separadas. A segmentação resultou em imagens de 8-bit coloridas censuradas pelos códigos de cor previamente designados, sendo novamente validadas por patologista (MLB) e, finalmente, quantificadas por componente sob limiar óptico no software ImageJ (**Figura 2.22**). Os dados foram emitidos em porcentagem de expressão de componente por mm^2 .

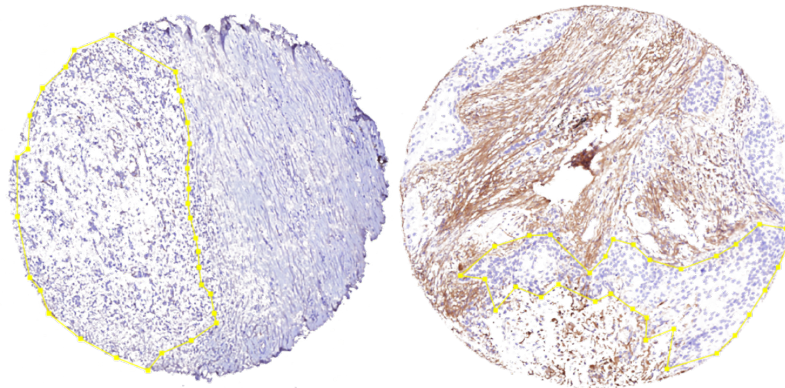


Figura 2.17. Áreas de anotação nos spots de TMA para análise de imagem no software QuPath. Notam-se as áreas de tracejados amarelados, que foram construídos manualmente para indicação de áreas de interesse. As quantificações foram feitas nessas áreas, que foram selecionadas em todos os spots de TMA, para assegurar especificidade das quantificações.

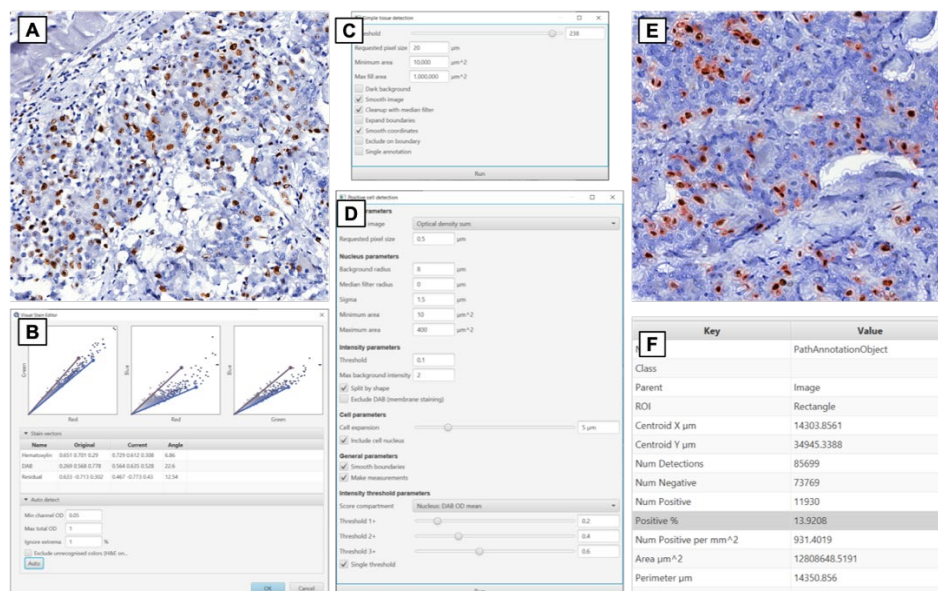


Figura 2.18. Fluxo de para quantificação pelo software QuPath. Área de interesse (A) passa pela normalização dos vetores de cor (B), com seleção de celularidade (C), determinação de limiares óticos (D), quantificação e estimativa de celularidade (E), com validação por observador e emissão de resultados (F) em processo automatizado.

Tabela 2.4. Parâmetros empregados para quantificação digital.

Antígeno	Pixel (µm)	Mínima (µm ²)	Máxima (µm ²)	Método Score	Limiar 1+	Limiar 2+	Limiar 3+
CD4	0,5	5	30	Célula	0,20		
CD8	0,5	5	30	Célula	0,20		
CD20	0,5	5	30	Célula	0,20		
CD68	0,5	5	30	Célula	0,18		
Ki-67	0,5	40	400	Núcleo	0,20		
P53	0,5	40	400	Núcleo	0,18		
TUNEL	0,5	40	400	Núcleo	0,10		
MLH1	0,5	40	400	Núcleo	0,25		
PMS2	0,5	40	400	Núcleo	0,15		
MSH2	0,5	40	400	Núcleo	0,25		
MSH6	0,5	40	400	Núcleo	0,20		
PD-1	0,5	40	400	Célula	0,09		
PD-L1	0,5	40	400	Célula	0,09		
CD30	0,5	40	400	Célula	0,10		
Vimentina	0,2	40	400	Célula	0,15	0,25	0,40
E-Caderina	0,2	40	400	Célula	0,10	0,15	0,20
Colágeno V	0,2	40	400	Célula	0,13	0,20	0,25

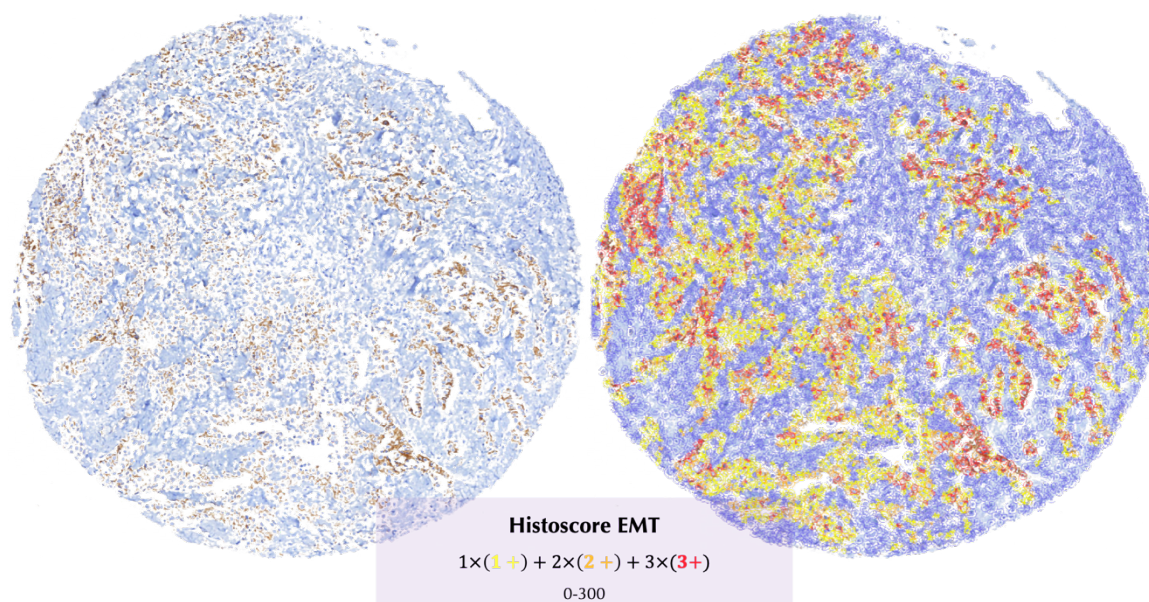


Figura 2.19. Composição do Histoscore (H-SCORE) digital. A quantificação com atribuição de peso aos elementos em diferentes intensidades foi feita digitalmente, seguindo a fórmula descrita. As imagens mostram o mesmo spot sem e com as áreas de detecção, com código de cores (amarelo 1+, laranja 2+ e vermelho 3+), segundo os limiares estabelecidos, conforme designados na tabela acima.

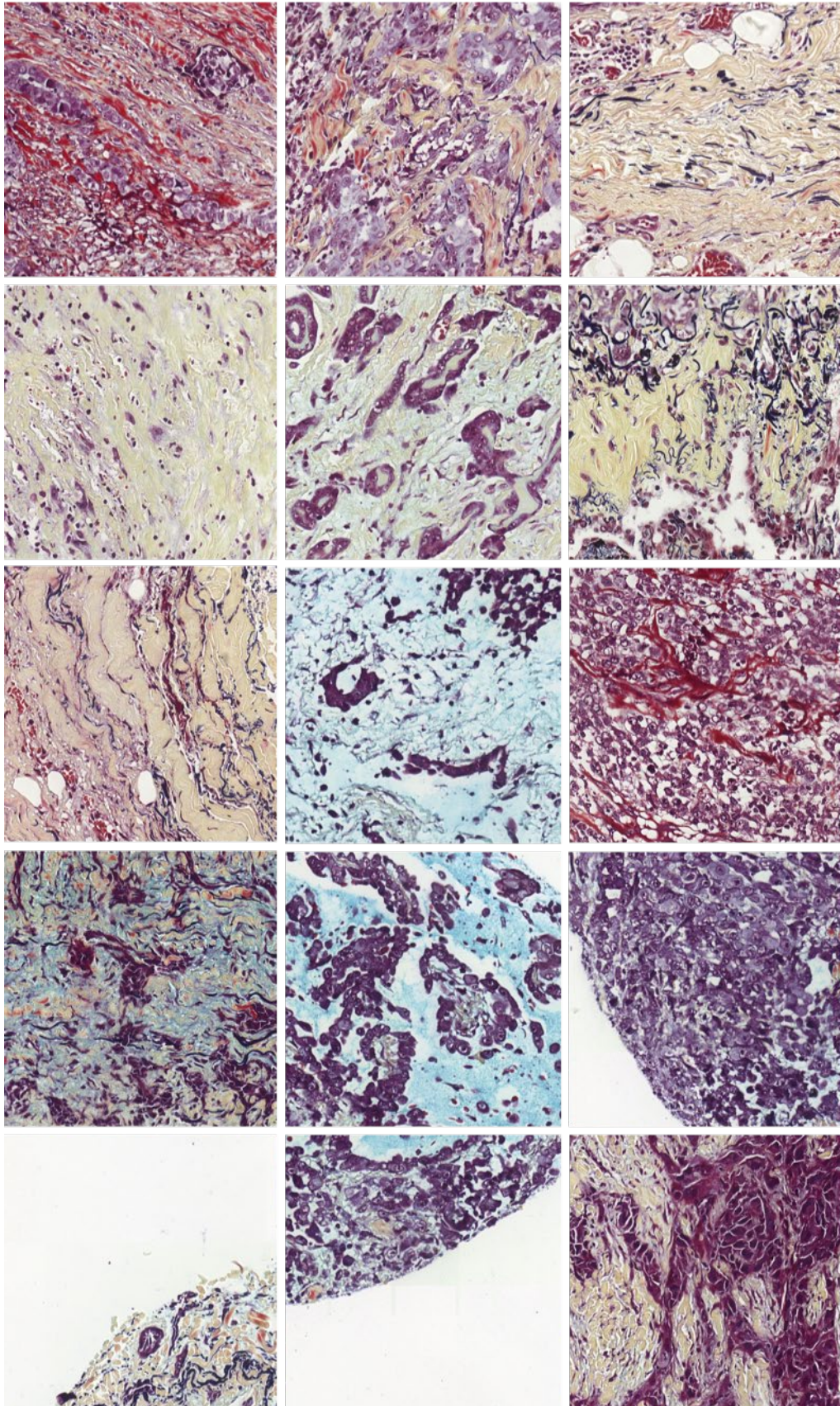


Figura 2.20. Conjunto de treinamento para o algoritmo WEKA, composto como um mosaico de áreas previamente selecionadas representativas das “verdades fundamentais”.

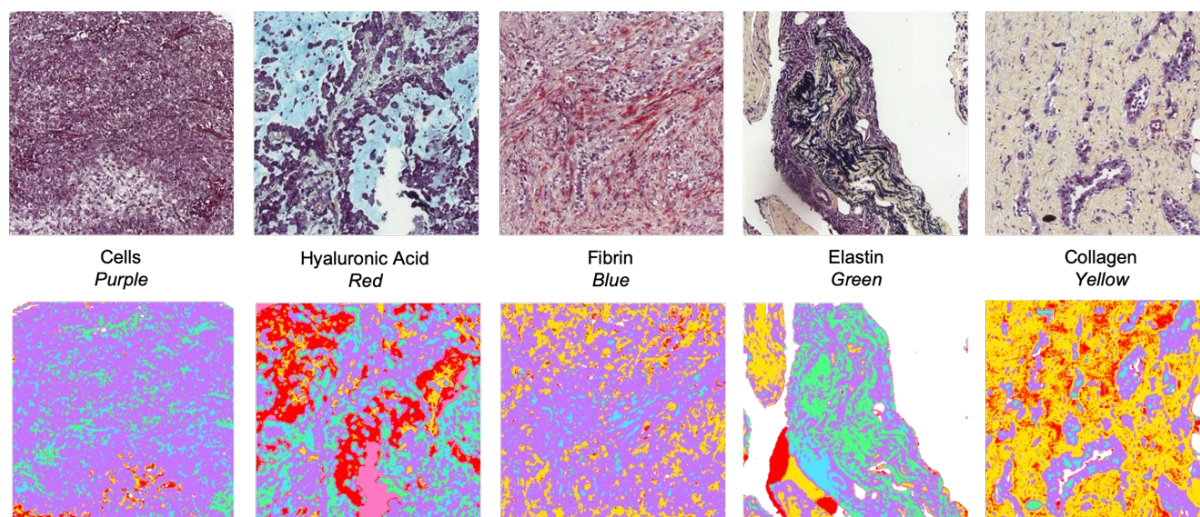


Figura 2.21. Imagens de entrada (*input*) e saída (*output*) da segmentação WEKA, mostrando áreas de verdades fundamentais segmentadas.

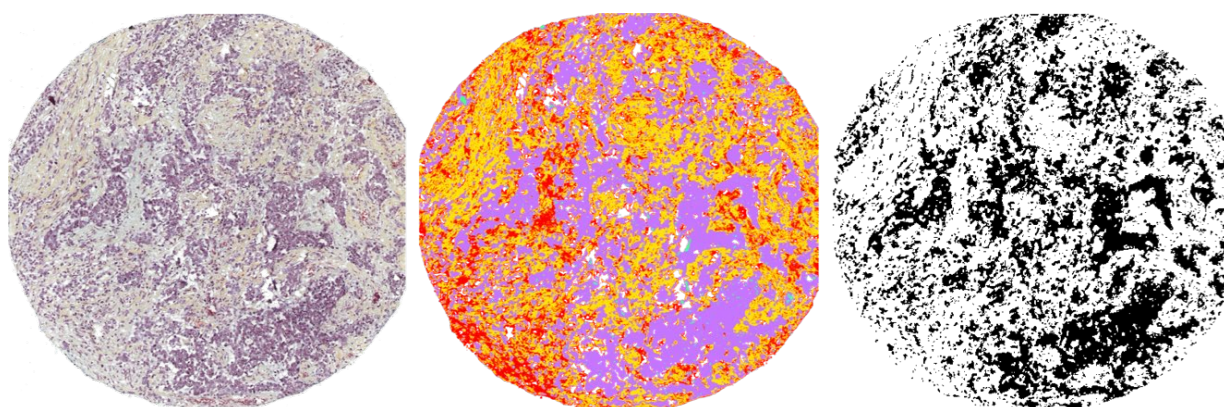


Figura 2.22. Imagens de entrada (*input*) (A), *spot* de TMA corado pela coloração modificada de Russel-Movat; (B) saída (*output*) da segmentação WEKA e saída da segmentação pelo método de limiar (*threshold*) para extração de dado por coloração.

Alinhamento de Imunofluorescências do Colágeno

A imunofluorescência do Colágeno (I) e (V) foi integrada digitalmente no software ImageJ para ilustração da relação entre ambos. As imagens originais foram transformadas a 8-bit em tons de cinza e agregadas pela ferramenta de conjuntos de cores (*stack*), atribuído a coloração verde ao Col (V), magenta ao Col (I) e azul ao DAPI (núcleos). A sobreposição de imagens de microscopia de fluorescência do Colágeno foi feita no software ImageJ a partir de fotomicrografias adquiridas sob o mesmo ponto de alinhamento.

Reconstrução Tridimensional e Impressão 3D do Colágeno

Foram reconstruídos os colágenos tipo I e III a partir da coloração histológica do picrosírius que é baseado no pigmento azóico Sirius Red F 3B em ácido pícrico saturado, conforme descrito por Junqueira em 1979¹³³. A finalidade dos métodos de reconstrução foi a visualização 3D do padrão de trama colagênica dos tipos I e III, não individualizados para a compreensão da distribuição espacial entre os blocos celulares neoplásicos. Os demais tipos não foram reconstruídos por este método, uma vez que o uso da coloração de picrosírius foi oportuno para o método de microscopia destrutiva, de baixo custo, avaliado.

Nessa coloração, sob visualização à luz polarizada em microscópio ótico de campo claro, as fibras do Col (I) são identificadas como fibras grossas, de coloração avermelhada ou alaranjada, enquanto as fibras do Col (III) são finas e esverdeadas. A **Figura 2.23** é uma microfotografia que resalta os padrões observados da coloração com ou sem polarização. Sem polarização são identificados os tons avermelhados das fibras colagênicas e tons amarelados de citoplasma e tecido muscular, enquanto à luz polarizada são vistos os padrões de refringência das fibras, suas conformações e padrão de coloração, conforme descrito acima. Em menor aumento, nota-se a distribuição arquitetural como componentes de MEC e em maior aumento o padrão das fibras: as mais grossas e em tons alaranjados e avermelhados são do Col (I) e as finas e em tons esverdeados são as fibras de Col (III).

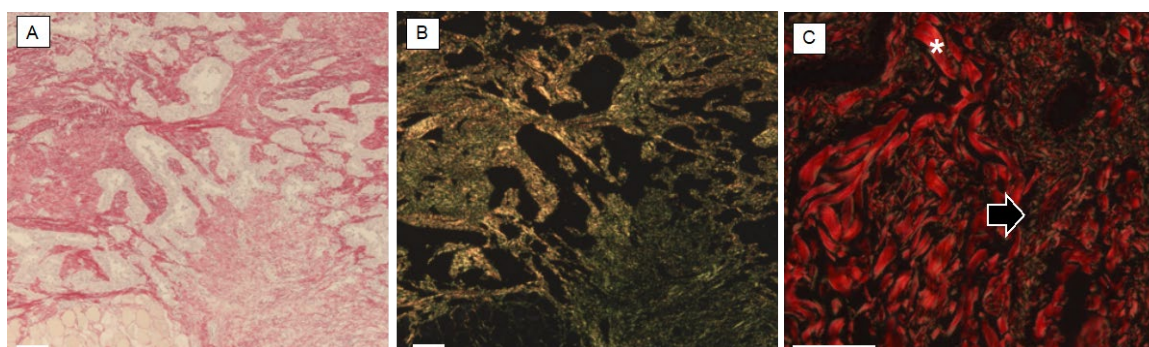


Figura 2.23. Ilustração das características histoquímicas sob a técnica de coloração picrosírius. (A) Em menor aumento, as fibras do colágeno I e III são identificadas indiretamente pela coloração avermelhada ou alaranjada, sem polarização; (B) sob polarização são identificados em tons alaranjados as fibras do tipo I e esverdeados as fibras tipo III. Nota-se a diferença que sob a exposição da luz polarizada somente as estruturas colagênicas são ressaltadas, enquanto as demais, como os blocos celulares não são vistos (áreas de campo escuro sem estruturas visíveis). (C) Em maior aumento, sob luz polarizada, são identificadas as fibras grossas do colágeno tipo I (asterisco) e as fibras finas esverdeadas do colágeno III. (Picosirius, 40x, 200x e 630x sob polarização).

Para a reconstrução do colágeno, foi empregada técnica de microscopia destrutiva¹³⁴, sendo realizados dez cortes sequenciais de um bloco de parafina de peça cirúrgica, com representação celular tumoral viável e de MEC. Foram cortes de 3 μ cada, todos corados à técnica do picrossírius. A coloração foi realizada também sequencialmente, no mesmo momento, para evitar variações sobre a técnica.

Foram adquiridas imagens em microscópio ótico de campo claro (Zeiss Axioscope A1, Zeiss), com objetivas de 4x (N-Achroplan NA:0.15, Zeiss), 20x (N-Achroplan, NA: 0.45, Zeiss) e 63x (Achroplan, NA:0.56, Zeiss), com polarizador e fonte de luz led. A câmera empregada é uma câmera científica, de sensor CCD de uma polegada e 12 megapixels, AxioCam 512 (Zeiss). As imagens foram adquiridas nas múltiplas magnitudes, sequencialmente, no mesmo ponto em todas as lâminas. Os arquivos de imagem foram salvos no formato proprietário do software Zen 3.0 captura (Zeiss) .czi, e exportadas em formato .tif sem compactação, com qualidade 100%. Foram empregadas para reconstrução as imagens adquiridas sob polarização e sob objetivas de 4 e 20x.

O próximo passo foi o alinhamento digital das imagens. Foram importadas ao software Fiji, criado um agrupamento de imagens (*stack*), transposto a 8-bit em tons de cinza, aplicado o limiar ótico (*threshold*) pelo método de Otsui para ressaltar as fibras de colágeno I e III e alinhadas pelo *plugin* TrakEM2¹³⁵ na opção de alinhamento de *stack*, sem deformações, nas configurações propostas, com método de transformação *affine*. Após validação pela visualização do alinhamento, as imagens resultantes foram exportadas em formato .tif.

Para a visualização tridimensional, foram empregados os softwares Fiji, na opção do visualizador 3D e no software 3D Slicer (versão 4.10.2 r28257)¹³⁶. Para o software 3D Slicer, as imagens em formato .tif previamente tratadas, como descrito acima foram importadas. Para a visualização no eixo z, definiu-se o espaçamento virtual de 5mm na configuração dos metadados do *voxel*. Estabeleceu-se o limiar ótico semelhante às fibras colagênicas através da opção de *threshold*, definiu-se o preenchimento de planos e fez-se o tratamento de suavização. A visualização 3D foi feita pelo visualizador do *software*, com exportação do modelo ao formato .stf, com dimensões de 1.9 gigabytes. A **Figura 2.24** ilustra a imagem resultante das reconstruções pelos softwares Fiji (A) e 3D Slicer (B).

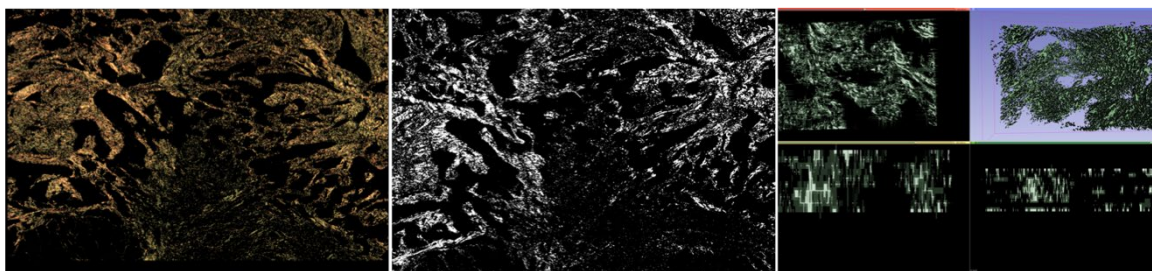


Figura 2.24. Fluxo de trabalho para geração do modelo tridimensional do componente colagênico (fibras tipos I e III) da MEC. Fotografias de áreas de interesse dos cortes polarizados e corados com picrossírius, alinhamento e aplicação de limiar ótico, sobreposição digital no software Slicer3D.

Com esse arquivo, o próximo passo foi a preparação para impressão 3D, com redução de vértices e triângulos da imagem. De 30966169 vértices e 61915216 triângulos, com 2,88 gigabytes, a resolução de triângulos foi reduzida a alcançar possibilidade de impressão, sem perda de qualidade na percepção da reconstrução. O software empregado foi o Autodesk Meshmixer (Autodesk, EUA)^{137,138}, que gerou um arquivo .stl de 18,8 megabytes, com 116147 vértices e 234066 triângulos, nas dimensões de 100,00 x 65,713 x 22,203 mm.

Além disso, o modelo foi simplificado com exclusão de pontos soltos, sem conexão com demais pontos e arredondamento das extremidades para a impressão, ilustrado na **Figura 2.25**. Uma vez ajustado para impressão, o modelo foi submetido ao site Craftcloud (www.craftcloud.com, Alemanha) para impressão em impressora de resina com resolução de 0,05 mm.

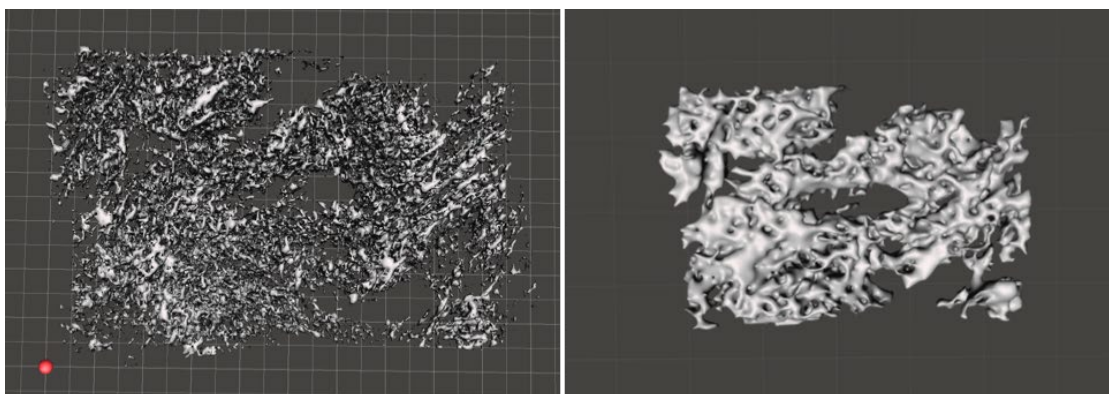


Figura 2.25. Modelos de impressão 3D: (A) Redução do vértices e (B) modelo trabalhado no software Autodesk Meshmixer, com geração de arquivo .stl com redução da resolução dos triângulos e exclusão de pontos isolados.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS v18 (Chicago, IL, EUA) para Windows. A relação entre variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste *t* de Student e a análise de variância foi usada para correlacionar os padrões de coloração. A análise multivariada foi realizada usando a razão de risco proporcional de Cox. Além disso, o teste *t* de amostras pareadas e o modelo linear geral foram usados para testar a relação entre uma variável contínua e várias outras. Um modelo de cluster de duas camadas foi elaborado de forma semi assistida, com método de agrupamento de Ward com distâncias euclidianas^{139,140}, usando o recurso de cluster hierárquico e fatores significativos foram eleitos com base no modelo de regressão multivariada (stepwise forward) e no significado biológico, integrando elementos celulares, imunológicos e matriciais. Múltiplos modelos foram gerados e o mais significativo integrando os elementos desejados e correlacionados com o desfecho de sobrevivência foi escolhido. O tempo total de sobrevivência acumulado foi calculado pelo método de Kaplan-Meier e analisado pelo teste de log-rank. Para todos os testes, considerou-se estatisticamente significativo um valor de *p* de duas costuras inferior a 0,05.

Resumo de Métodos Empregados e Desenvolvidos na Tese (Tabela 2.5)

Tabela 2.5. Sumário dos métodos (ou ferramentas) empregados e seus objetivos durante a elaboração da tese.

Método ou Ferramenta	Objetivo
Estudo de Casos	Revisão das características clínicas e histopatológicas para assegurar integridade da coorte
Histoquímica	Caracterização do tecido
Imuno-Histoquímica	Avaliação de antigenicidade variada
Imunofluorescência	Avaliação de antigenicidade de fibras colagênicas
TUNEL	Caracterização de apoptose
Quantificação digital – QuPath	Quantificação de IHQ e TUNEL
Quantificação digital – Weka	Quantificação de MEC – histoquímica
Quantificação digital – ImagePro Plus	Quantificação de IF
Reconstrução 3D da MEC / Col – TrakEM2, 3DSlicer	Tangibilidade e didática de MEC
Impressão 3D da MEC / Col – Meshmixer	Tangibilidade e didática da MEC
Análise estatística – modelos clássicos	Caracterização e busca por correlações uni e multivariáveis
Análise estatística – modelo de clusterização / análise de componente principal	Busca por elementos de agrupamento em cenários multivariáveis, semi assistidos

RESULTADOS

A apresentação de resultado será dividida em três partes: (I) Caracterização das amostras; (II) Modelo prognóstico e (III) Padrões de IF e IHQ de Colágeno V.

I. Caracterização das amostras:

Foram avaliados três coortes de pacientes: MM, Câncer de Pulmão e de Mama. Resultaram na construção de cinco TMAs, três de MM e um de cada dos demais. Foram incluídos 82, 52 e 49 pacientes de cada doença, respectivamente.

Em vista do interesse exploratório da busca por elementos de prognósticos da investigação do MM, somente caracterizamos o perfil clínico e epidemiológico nesses pacientes. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 60 anos, com predominância de pacientes do sexo masculino (70,7%), com antecedente de exposição a amianto (53,6%), localizados em pleura (75,6%). A maior parte dos espécimes admitidos foi oriundo de produto de ressecção cirúrgica (85,4%), com sobrevida média de 17,8 meses. A **Tabela 3.1** sumariza os dados.

Tabela 3.1. Características clínico epidemiológicas da coorte de pacientes MM.

Característica	
Idade ao diagnóstico	60 anos (35-91)
Sexo	Masculino (58, 70,7%) Feminino (24, 29,3%)
Exposição a amianto	Sim (44, 53,6%) Não (38, 46,4%)
Localização	Pleural (62, 75,6%) Extra pleural (20, 24,4%)
Tipo de espécime	Biópsia (12, 14,6%) Peça cirúrgica (70, 85,4%)
Tratamento	Cirúrgico (70, 85,4%) Adjuvante (12, 14,6%)
Sobrevida média (meses)	17,8 (0,23 – 46,4)

Os tipos histológicos observados nas três coortes estão descritos na **Tabela 3.2**. A documentação histológica, a título ilustrativo, segue nas **Figuras 3.1 até 3.3**.

Tabela 3.2. Distribuição dos tipos histológicos das coortes.

Doença (n)	Tipo Histológico (n, %)	Subtipo Histológico (n, %)	
Mesotelioma Maligno (82)	<i>Epitelioide (73, 89%)</i>	Sólido (19, 23%)	
		Tubulopapilífero (19, 23%)	
		Trabecular (18, 22%)	
		Micropapilar (4, 5%)	
		Rico em estroma mucinoso (4, 5%)	
		Microcístico (3, 3,5%)	
		Epitelioide pleomórfico (2, 2,5%)	
		Deciduoide (1, 1,25%)	
		Linfohistiocitoide (1, 1,25%)	
		<i>Sarcomatoide (9, 11%)</i>	Sarcomatoide (7, 8,5%)
	Desmoplásico (2, 2,5%)		
Câncer de Pulmão (52)	<i>Adenocarcinoma (37, 72%)</i>	Acinar (12, 23%)	
		Sólido (11, 21%)	
		Mucinoso (5, 10%)	
		Papilífero (4, 7,5%)	
		Micropapilífero (3, 6%)	
		Lepídico (1, 2%)	
		Fetal (1, 2%)	
		<i>Carcinoma de Células Escamosas (11, 21%)</i>	
		<i>Carcinoma Neuroendócrino de Grandes Células (4, 7,5%)</i>	
		Câncer de Mama (49)	<i>Tipo Não Especial (41, 84%)</i>
Grau II (18, 37%)			
Grau III (16, 33%)			
<i>Lobular (6, 12%)</i>	Grau I (2, 4%)		
	Grau II (4, 8%)		
	Grau III (1, 2%)		
	<i>Metaplásico (1, 2%)</i>	Grau II (1, 2%)	
	<i>Mucinoso (1, 2%)</i>		

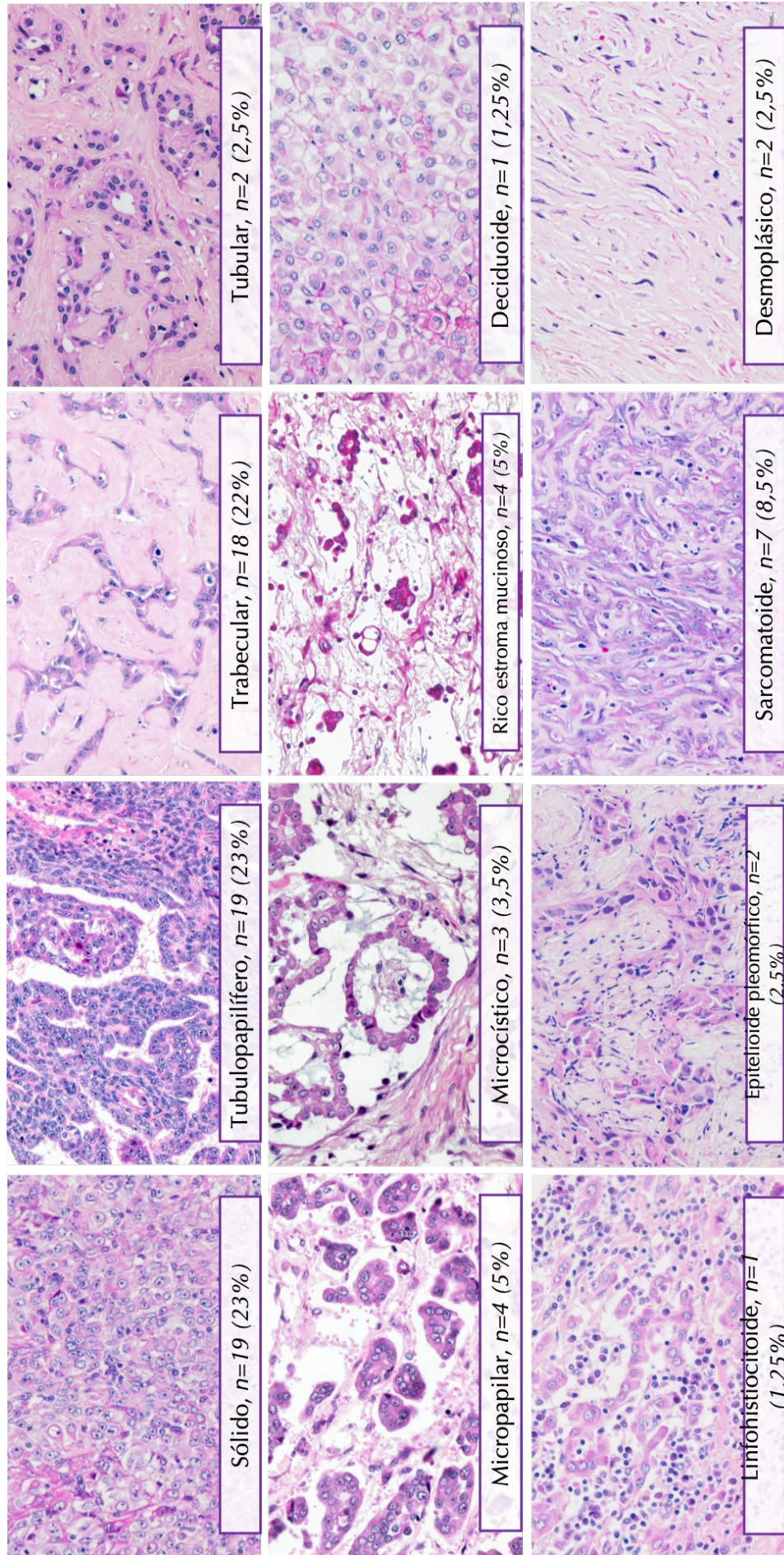


Figura 3.1: Classificação histológica da coorte MM, com suas respectivas frequências (HE, x400).

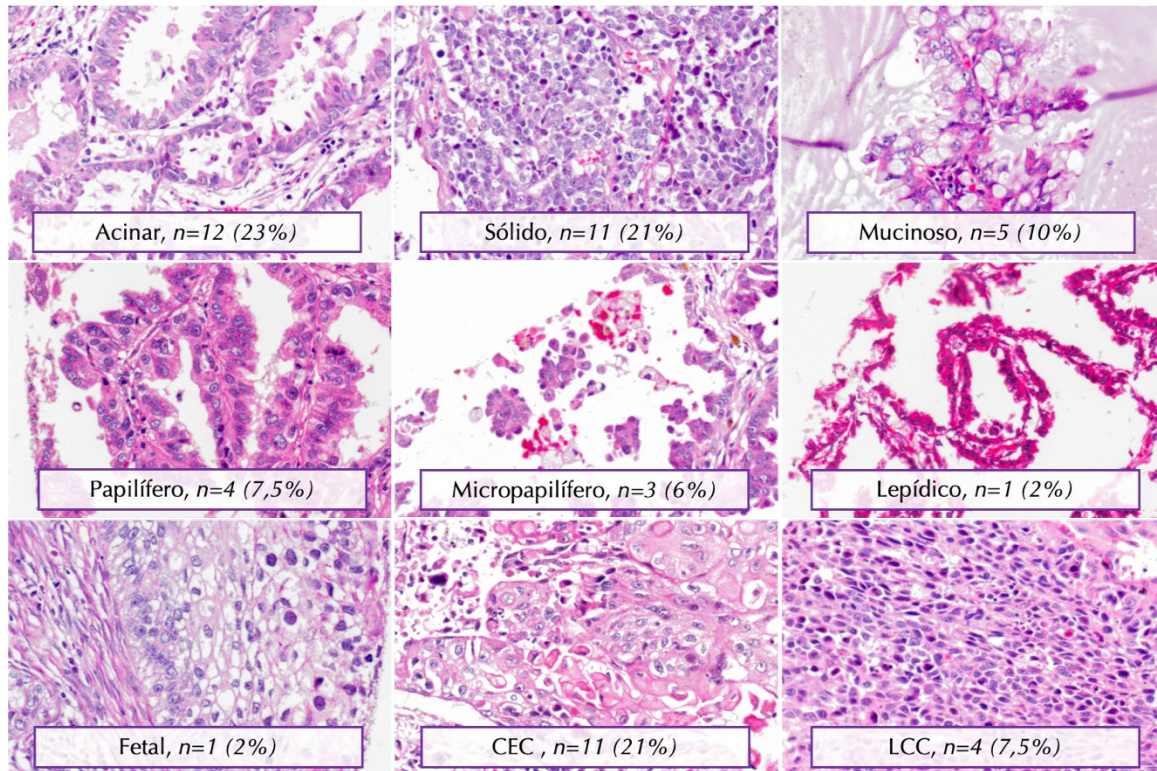


Figura 3.2: Classificação histológica da coorte câncer de pulmão, com suas respectivas frequências (HE, x400).

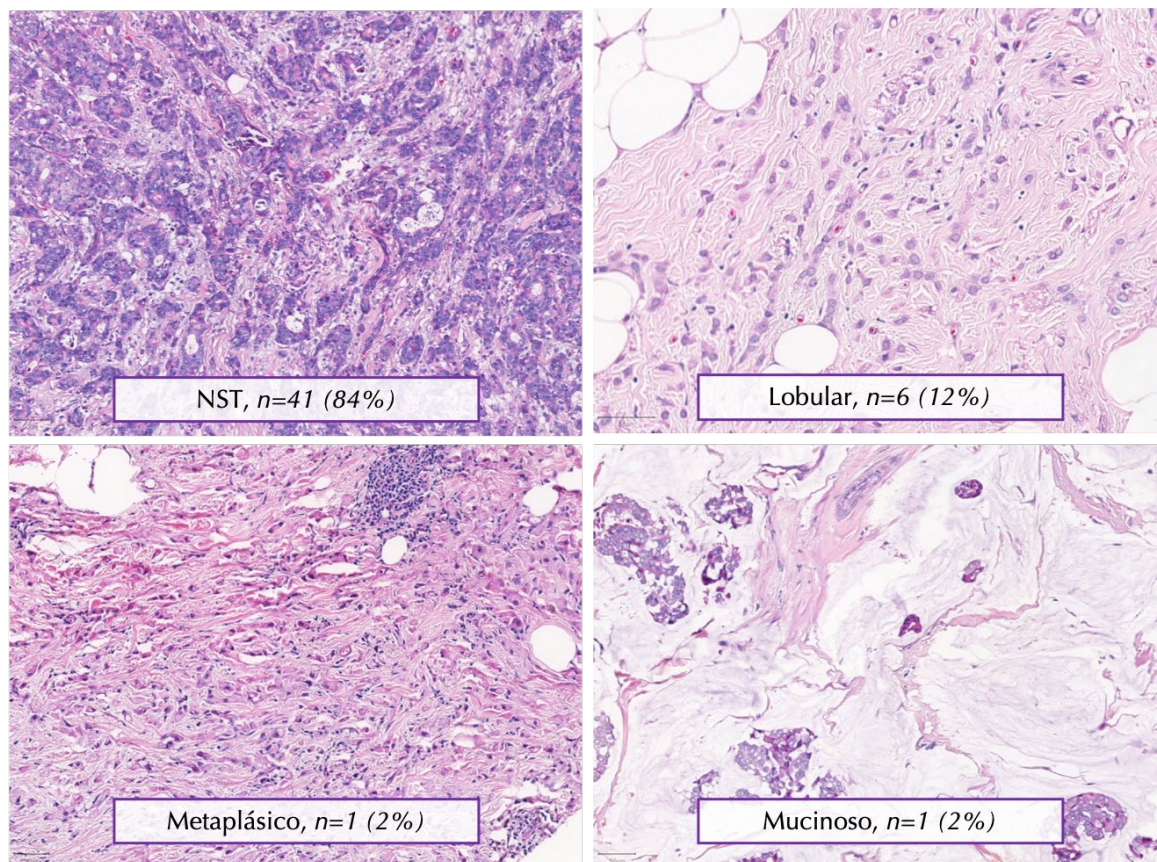


Figura 3.3: Classificação histológica da coorte câncer de mama, com suas respectivas frequências (HE, 400x).

Uma vez caracterizadas as coortes, o próximo passo foi o estudo individual e aprofundado das características celulares e matriciais do MM, assim como a comparação entre os tipos epitelióide e sarcomatóide.

Os elementos epidemiológicos não evidenciaram diferenças estatísticas em suas distribuições entre esses dois grupos, como disposto na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3. Distribuição dos elementos clínicos e epidemiológicos entre os tipos epitelióide e sarcomatóide do MM.

Característica	Epitelióide (n=73)	Sarcomatóide (n=9)	p valor
Idade, mediana	60 anos	56 anos	0,51
Sexo, n (%)			
Masculino	52 (63%)	6 (7,3%)	0,52
Feminino	21 (25,6%)	3 (3,7%)	
Exposição a amianto, n (%)			
Não	35 (42,7%)	3 (3,7%)	0,32
Sim	38 (46,3%)	6 (7,3%)	
Localização, n (%)			
Pleura	54 (65,9%)	8 (9,8%)	0,57
Extrapleural	19 (23,2%)	1 (1,2%)	
Estadiamento† III/IV	73 (100%)	9 (100%)	
Tipo de espécime			
Biópsia	11 (13,4%)	1 (1,2%)	0,60
Peça cirúrgica	62 (75,6%)	8 (9,8%)	
Tratamento, n (%)			
Cirurgia	62 (75,6%)	8 (9,8%)	0,54
Quimioterapia	13 (15%)	2 (2,3%)	0,55
Tempo de seguimento	22 meses	18 meses	0,56

O perfil imuno-histoquímico da histogênese mesotelial, incluindo os antígenos de diferenciação mesotelial (D2-40, WT1), incluindo as glicoproteínas de membrana características de adenocarcinoma (MOC31 e BER-EP4) e o BAP-1 evidenciado seguiu conforme a expectativa para o MM. Notou-se positividade difusa para D2-40 no tipo epitelióide (83,6%) e focal no sarcomatóide (55,6%), com positividade total a D2-40 em 98,7% dos epitelióides e 100% dos sarcomatóides (incluindo a focal, considerada quando a expressão foi

positiva em menos de 10% das células neoplásicas). WT-1 também foi predominantemente positivo (79,5% e 66,7%). MOC31 foi predominantemente negativo (93,2% e 100%), assim como BER-EP4 (91,8% e 100%). Houve perda de expressão de BAP-1 em 76,7% dos casos de epitelióide e 66,7% de sarcomatóide, contabilizando 75,6% (62 casos) ao todo, como exposto na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4. Distribuição do perfil imuno-histoquímico de antígenos para histogênese mesotelial.

Antígeno	Expressão	Epitelióide (n=73)	Sarcomatóide (n=9)	Valor de <i>p</i>
D2-40				
	Positivo	61 (83,6%)	4 (44,4%)	0,015
	Focal	11 (15,1%)	5 (55,6%)	
	Negativo	1 (1,3%)	0	
WT-1				
	Positivo	58 (79,5%)	6 (66,7%)	0,382
	Negativo	15 (20,5%)	3 (33,3%)	
MOC31				
	Positivo	3 (4,1%)	0	0,720
	Focal	2 (2,7%)	0	
	Negativo	68 (93,2%)	9 (100%)	
Ber-EP4				
	Positivo	1 (1,4%)	0	0,671
	Focal	5 (6,8%)	0	
	Negativo	67 (91,8%)	9 (100%)	
BAP-1				
	Preservado	17 (23,3%)	3 (33,3%)	0,508
	Perda (Negativo)	56 (76,7%)	6 (66,7%)	

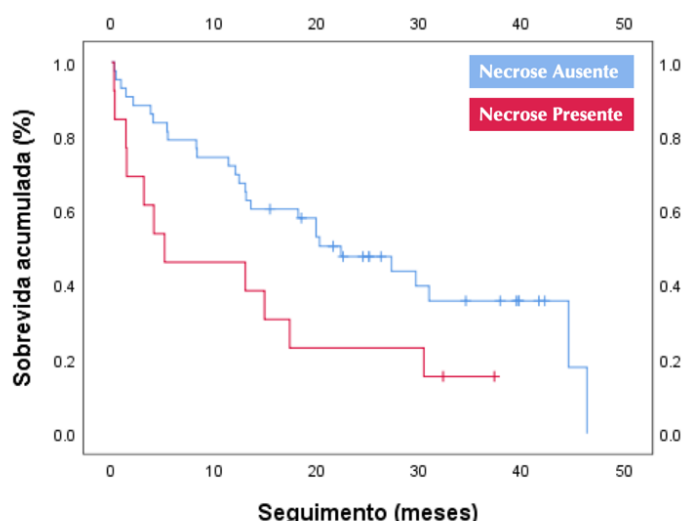
Das três características morfológicas avaliadas (presença de necrose), grau nuclear e linfócitos intratumorais (TIL), houve diferença no grau nuclear entre os grupos epitelióide e sarcomatóide, com predomínio de grau 2 nos últimos. Aproveitamos para ressaltar que os critérios de grau nuclear empregados foram validados para o tipo epitelióide, de forma a reduzir a significância dessa comparação. Quanto à diferença de desfecho, a presença de necrose foi

associada ao grupo de óbitos, presente em 28,6% vs 12,9% ($p=0,035$), como sumariados na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5. Comparação entre os grupos e características morfológicas.

Característica Morfológica	Epiteloide (n=73)	Sarcomatoide (n=9)	<i>p</i>	Vivos (n=31)	Óbito (n=49)	<i>p</i>
Necrose						
Presente	17 (23,3%)	1 (11,1%)	0,405	4 (12,9%)	14 (28,6%)	0,035
Ausente	56 (87,5%)	8 (88,9%)		27 (87,1%)	35 (71,4%)	
Grau Nuclear						
Grau 1	4 (5,6%)	2 (22,2%)	0,042	2 (6,5%)	4 (8,2%)	0,206
Grau 2	45 (61,6%)	7 (77,8%)		24 (77,4%)	27 (55,1%)	
Grau 3	24 (32,9%)	0		5 (16,1%)	18 (36,7%)	
TIL						
Grau 1	25 (34,2%)	1 (11,1%)	0,140	12 (38,7%)	14 (28,6%)	0,797
Grau 2	40 (54,8%)	8 (88,9%)		15 (48,4%)	32 (65,3%)	
Grau 3	8 (11%)	0		4 (12,9%)	3 (42,9%)	

A curva de sobrevida de Kaplan-Meier ilustra a diferença entre os grupos na presença ou ausência de necrose na **Figura 3.4**.



Necrose	Sobrevida	IC95% _{inferior}	IC95% _{superior}	p-valor
Ausente	22,367	12,690	32,043	0,035
Presente	5,167	0	16,792	

Gráfico 3.1. Gráfico de Kaplan-Meier para sobrevida em vista da presença de necrose.

A distribuição de linfócitos T CD4+ foi diferente nos grupos vivos vs óbitos, com mediana de linfócitos/mm² cerca de 2,3 vezes maior no grupo de pacientes vivos (p=0,012). Entre os tipos sarcomatoide e epitelioides houve maior concentração de linfócitos B CD 8+ e CD20+ no tipo epitelioides (9,54 e 19 vezes maior, respectivamente). Não houve diferença na distribuição de macrófagos, inferidos por célula CD68 positivas /mm².

Tabela 3.6. Distribuição das células inflamatórias avaliadas.

	Epitelioides (n=73)	Sarcomatoide (n=9)	Valor de p	Vivos (n=31)	Óbito (n=49)	Valor de p
CD4	135,65	161,45	0,83	203,51	89,68	0,012
CD8	62,40	6,54	<0,05	63,68	44,97	0,343
CD20	110,02	5,79	<0,05	125,38	82,77	0,537
CD68	21,70	16,14	0,26	18,71	14,89	0,165

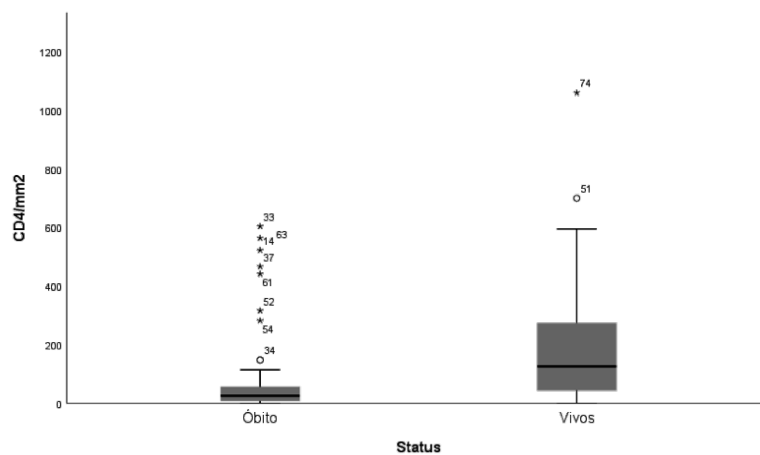


Gráfico 3.2. Boxplot de distribuição de Linfócitos T CD4+ entre os grupos orientado pelo evento óbito.

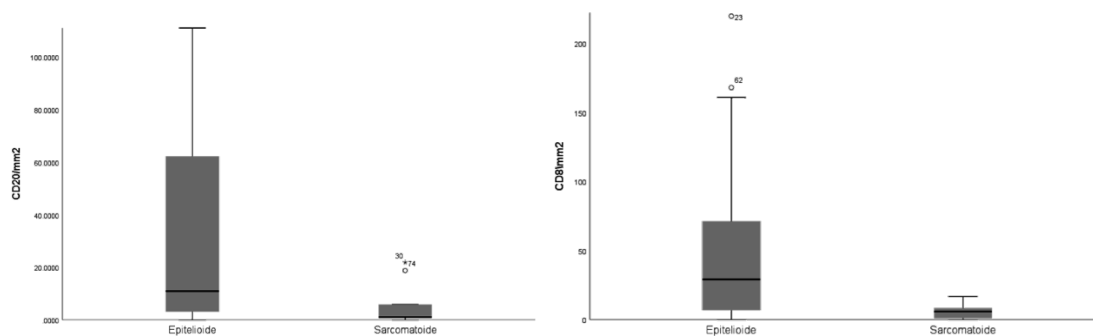


Gráfico 3.3. Boxplots de distribuição de Linfócitos B CD8+ e CD20+ entre os grupos tipo histológico epitelioides e sarcomatoide.

A avaliação da MEC pelos elementos do Pentacrômio e Movat e pela IF dos colágenos I e V mostrou dois perfis distintos. O tipo epitelióide foi de maior densidade celular média (/mm²) (1,33 vezes superior ao sarcomatóide), com maior composição matricial de fibras elásticas (2,64 vezes superior), fibrina (4,06 vezes superior) e colágeno tipo I (6,9 vezes superior). O ácido hialurônico, elemento da MEC não fibrilar, foi predominante no tipo sarcomatóide (1,63 vezes). O colágeno V foi o único elemento mantido em termos quantitativos absolutos, porém compondo maior fração das fibras colagênicas nos MM epitelióides (36,6% vs 0,5%).

Quanto ao desfecho de sobrevida, a expressão absoluta de colágeno I foi mais intensa nos pacientes alocados ao grupo de vivos (2,35 vezes mais intensa).

Tabela 3.7. Distribuição dos elementos matriciais.

Elemento	Epitelióides (n=73)	Sarcomatóides (n=9)	Valor de <i>p</i>	Vivos (n=31)	Óbito (n=49)	Valor de <i>p</i>
Ac. Hialurônico	6,57	10,73	0,05	6,68	7,46	0,579
Elastina	6,08	2,30	<0,05	5,12	5,96	0,50
Colágeno Total	12,05	32,71	<0,05	14,04	14,89	0,769
Colágeno I	1,10	0,16	<0,05	14,04	14,89	0,769
Colágeno V	4,41	4,45	0,97	5,79	3,72	0,607
Fibrina	4,14	1,02	<0,05	4,06	3,53	0,607
Celularidade média	71,74	53,22	<0,05	70,09	68,14	0,546

A reconstrução tridimensional da MEC com base no picrosírius permitiu a exposição dos Col I e III; a estimativa de volume das duas frações de colágeno foi de 14% do volume total no bloco escolhido, consistente com a mediana do volume estimado dos Col totais (12,05) para os MM epitelióides. O modelo digital foi simplificado para permitir a impressão tridimensional e evitar estruturas desconexas. Na **Figura 3.4**, nota-se o modelo e as características que não são observadas à microscopia ótica de campo claro de luz de transmissão bidimensional, como canais formados pelas fibras de Col que circundam os blocos celulares neoplásicos. Esse modelo permite a visualização de áreas canais celulares entre as fibras colagênicas. O modelo impresso, por sua vez, permitiu a tangibilidade da MEC, como ilustrado na **Figura 3.5**. Ressaltamos que o modelo impresso é uma representação grosseira do modelo digital original, em vista da necessidade de simplificação para impressão, como discutido em métodos **Figura 2.25**.

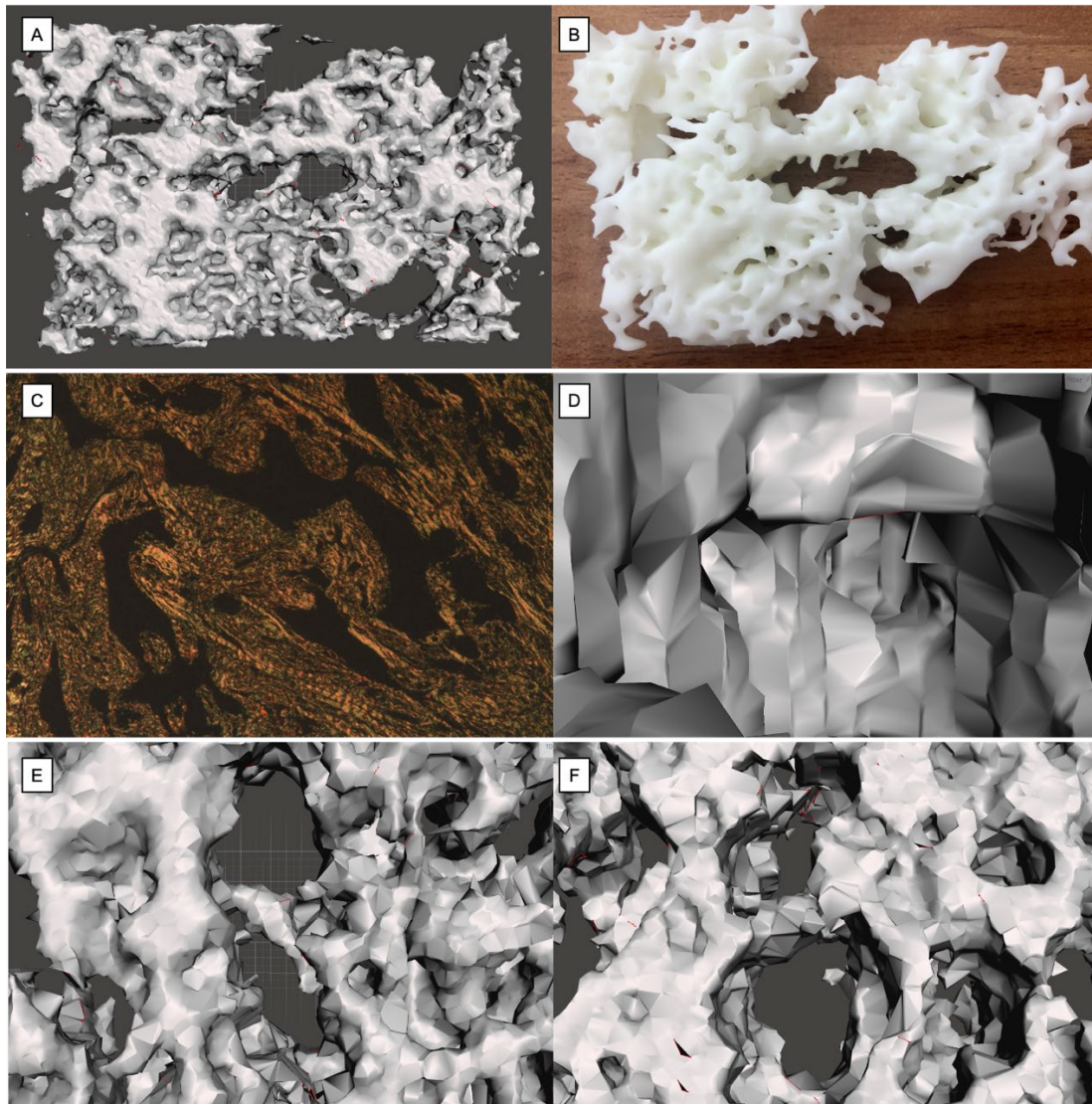


Figura 3.4. Características morfológicas à microscopia convencional e identificadas no modelo 3D. (A) Modelo 3D simplificado; (B) Modelo 3D impresso; (C) Microfotografia 2D – Picrosírius; (D) No modelo 3D notam-se características como os canais comunicantes apontados; (E) e (F) são o equivalente aos septos grosseiros centrais de (C) vistos por ângulos diferentes no modelo 3D.



Figura 3.5. Tangibilidade do modelo de MEC (Colágenos I e III) impresso em resina.

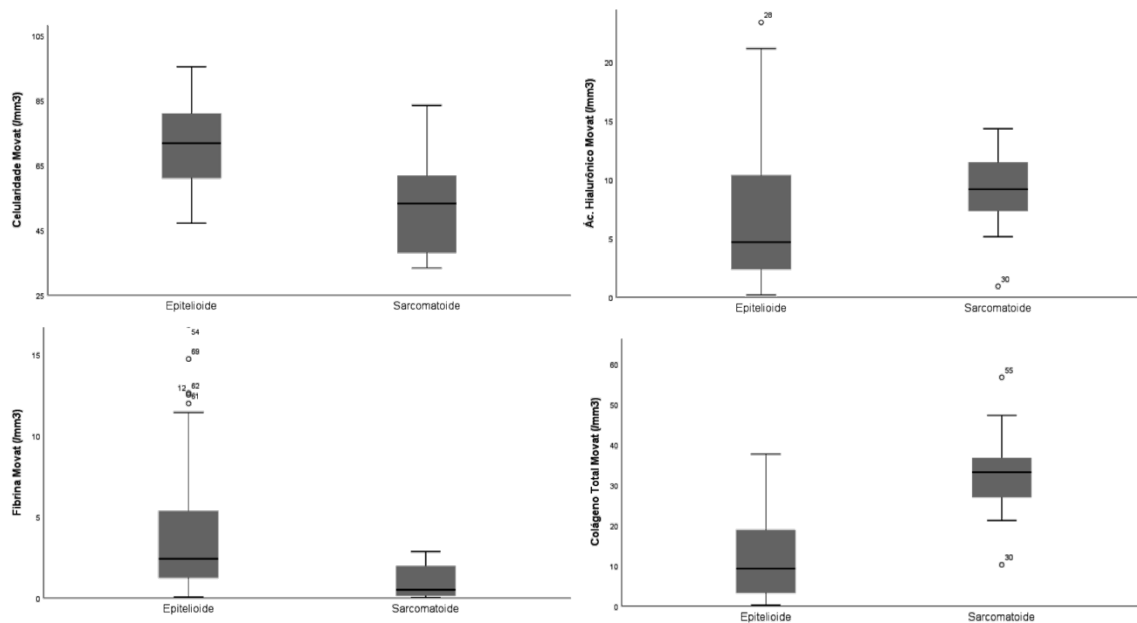


Gráfico 3.4. Boxplots da distribuição de elementos matriciais (celularidade, ácido hialurônico, fibrina e colágeno total) entre os grupos epitelióide e sarcomatóide.

Quanto aos elementos celulares e genes de reparo, a imunoposição mediana de PMS2 foi inferior no grupo de pacientes com desfecho óbito. Nos pacientes vivos ao final do estudo, a mediana de expressão foi de positividade vista em 58,44% das células neoplásicas; enquanto aos óbitos foi de 29,14% (49,8% da expressão do grupo vivo).

Tabela 3.8. Imunoexpressão de antígenos relacionados à proliferação celular, características oncogênicas, proteínas de instabilidade de microssatélite e apoptose (Tunel).

	Epitelióide (n=73)	Sarcomatóide (n=9)	Valor de p	Vivos (n=31)	Óbito (n=49)	Valor de p
Ki-67	1,87	1,99	0,894	1,85	1,86	0,994
Tunel	20,21	14,48	0,459	15,59	22,50	0,171
P53	2,74	0,66	0,170	3,98	1,71	<0,05
MLH1	48,87	35,22	0,132	52,21	43,98	0,165
MSH2	47,92	41,28	0,513	40,99	49,25	0,205
MSH6	54,56	63,15	0,390	58,32	54,16	0,521
PMS2	40,99	31,30	0,386	58,44	29,14	<0,001

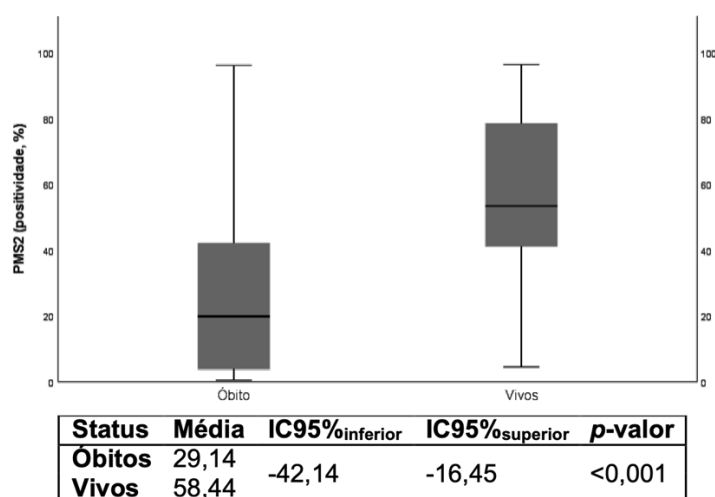


Gráfico 3.5. Boxplot de distribuição de PMS2.

O fenótipo de transição epitélio mesênquima (EMT) foi evidenciado em todos os casos, com EMT total caracterizada pela positividade à vimentina em mais de 10% das células neoplásicas e perda de expressão de e-caderina em mais de 60% das células neoplásicas em 80 de 82 casos de MM (97,5%). A EMT parcial foi vista em dois casos de MM epitelioide (2,7% dos epitelioides), caracterizada pela positividade à vimentina, com manutenção da expressão de e-caderina.

Tabela 3.9. Caracterização imuno-histoquímica do fenótipo EMT.

	Epitelioide (n=73)	Sarcomatoide (n=9)	Valor de p	Vivos (n=31)	Óbitos (n=49)	Valor de p
Vimentina H-SCORE	133,34	149,45	0,411	147,36	128,09	0,124
Vimentina Preservado	72 (98,6%)	9 (11,1%)	0,724	31 (100%)	48 (98%)	0,423
Vimentina Perda	1 (1,4%)	0		1	0	
E-Caderina H-SCORE	14,25	7,96	0,373	9,49	16,10	0,154
E-Caderina Preservado	2 (2,7%)	0	0,615	1 (3,2%)	1 (2%)	0,741
E-Caderina Perda	71 (97,3%)	9 (100%)		30 (96,8%)	48 (98%)	
EMT Total	71 (97,3%)	9 (100%)	0,615	30 (96,8%)	48 (98%)	0,741
EMT Parcial	2 (2,7%)	0		1 (3,2%)	1 (2%)	

H-SCORE: (histoscore, calculado digitalmente, variando de 0 a 300). EMT: transição epitélio mesênquima.

Apesar de a mediana de porcentagem de expressão de CD30 em células malignas (CD30-SCORE) ter sido maior nos tipos sarcomatoides, foi abaixo do limiar de 1,0%. Houve positividade em 30,1% dos casos para PD-L1 nas células neoplásicas e 69,5% de PD-1 nas células inflamatórias, como sumariado na **Tabela 3.8**.

Tabela 3.10. Caracterização imuno-histoquímica de alvos terapêuticos.

	Epiteloide (n=73)	Sarcomatoide (n=9)	Valor de p	Vivos (n=31)	Óbitos (n=49)	Valor de p
CD30	0,08	0,74	0,006	0,06	0,22	0,315
CD30 Positivo	2 (2,7%)	1 (11,1%)	0,207	0	3 (6,1%)	0,160
CD30 Negativo	71 (97,3%)	8 (88,9%)		31 (100%)	46 (93,9%)	
PD-L1 CPS	3,78	10,41	0,107	6,30	3,44	0,293
PD-L1 TPS	2,88	9,19	0,083	5,29	2,52	0,249
PD-L1 MIDS	0,90	1,22	0,607	1,00	0,92	0,831
PD-L1 Positivo	30 (41,1%)	6 (66,7%)	0,145	12 (38,7%)	23 (46,9%)	0,470
PD-L1 Negativo	43 (58,9%)	3 (33,3%)		19 (61,3%)	26 (53,1%)	
PD-1 CPS	6,48	3,69	0,414	5,63	6,67	0,293
PD-1 TPS	5,16	2,44	0,392	4,16	5,44	0,249
PD-1 MIDS	1,32	1,25	0,888	1,47	1,24	0,931
PD-1 Positivo	50 (68,5%)	7 (77,8%)	0,568	25 (80,6%)	30 (61,22%)	0,068
PD-1 Negativo	23 (31,5%)	2 (22,2%)		6 (19,4%)	19 (38,8%)	

Os linfócitos intraepiteliais quando expressos em alto grau (TIL HD na **Tabela 3.9**, scores 2 e 3) foram associados à menor expressão de ácido hialurônico, maior densidade de linfócitos T CD8+ e maior positividade à imunexpressão de PD-L1 em células neoplásicas.

Tabela 3.11. Associações dos elementos imunomatriciais com TILs.

		TIL LG (n=26)	TIL HG (n=53)	Valor de p
Matriz Extracelular				
	Colágeno I	1,25	0,88	0,388
	Colágeno V	4,65	4,31	0,779
	Colágeno	17,20	13,00	0,156
	Elastina	4,72	6,10	0,278
	Fibrina	3,63	3,86	0,829
	Hialurônico	9,25	5,97	0,020
Celularidade				
		65,16	71,04	0,072
Células Inflamatórias				
	CD4	107,93	152,18	0,364
	CD8	15,85	75,04	0,005
	CD20	13,58	138,04	0,067
	CD68	15,40	16,941	0,116
Biologia Tumoral				
	Ki-67	2,13	1,76	0,578
	Tunel	13,20	22,54	0,070
	P53	3,37	2,13	0,229
Proteínas de Reparo				
	MLH1	46,90	47,57	0,914
	MSH2	49,46	46,10	0,623
	MSH6	54,65	55,90	0,854
	PMS2	42,88	38,60	0,573
Alvos Terapêuticos				
	CD30	0,57	0,20	0,364
	CD30 Positivo	0	3 (5,4%)	0,229
	CD30 Negativo	26	53 (94,6%)	
	PD-L1 CPS	2,79	5,31	0,365
	PD-L1 TPS	2,12	4,25	0,386
	PD-L1 MIDS	0,67	1,06	0,363
	PD-L1 Positivo	6 (23,1%)	30 (83,3%)	0,010
	PD-L1 Negativo	20 (76,9%)	26 (46,4%)	
	PD-1 CPS	6,07	6,22	0,949
	PD-1 TPS	4,60	4,97	0,859
	PD-1 MIDS	1,47	1,24	0,516
	PD-1 Positivo	19 (73,1%)	38 (67,9%)	0,633
	PD-1 Negativo	7 (26,9%)	18 (32,1%)	
EMT				
	Vimentina	145,69	130,42	0,251
	E-Caderina	14,61	13,08	0,751

II. Modelo prognóstico:

A construção do modelo prognóstico levou em consideração as características histomorfométricas avaliadas e partiu da tentativa semisupervisionada de clusterização das mesmas em várias tentativas até a construção de modelo com relevância preditiva.

Partindo desse pressuposto, aproveitamos para rever alguns dos pontos considerados:

O MM epitelióide mostra alta celularidade do tumor, com estroma rico em baixa densidade de ácido hialurônico (**Figura 3.6**).

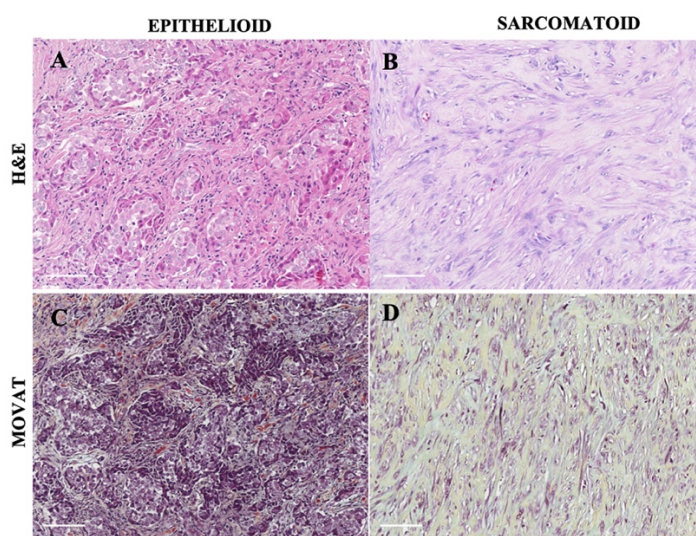


Figura 3.6. Representação morfológica dos tipos epitelióide e sarcomatóide com celularidade (HE) e elementos de MEC (Movat) (400x).

O MM epitelióide também exibe uma forte birrefringência verde das fibras Col I (**Figura 3.7-A**) e V (**Figura 3.7-C**) sob microscopia de fluorescência. No MM epitelióide, ambas as fibras colágenas estão organizadas em um padrão fibrilar denso e irregular; no entanto, as fibras Col I envolvem grupos de células malignas, enquanto as fibras Col V envolvem células malignas individuais (**Figura 3.7-G**). No MM epitelióide, os linfócitos T CD8 + (**Figura 3.8-A**) são distribuídos de forma difusa e os linfócitos CD20 + B (**Figura 3.8-C**) são distribuídos em pequenos grupos. As células malignas de MM epitelióide mostram forte expressão de P53 (**Figura 3.8-E**) e PMS2 (**Figura 3.8-G**). Em contraste, os MM sarcomatóides (**Figura 3.6-B**) apresentam celularidade tumoral modesta e alta deposição de ácido hialurônico (**Figura 3.6-D**), bem como distorção do ambiente tumoral e uma birrefringência difusa e verde da Col I (**Figura 3.7-B**) e Col V (**Figura 3.7-D**). No MM sarcomatóide, as fibras Col I são organizadas predominantemente em fibras espessas alongadas em grandes grupos individuais de células sarcomatóides. Col V forma uma textura mais regular com fibras finas envolvendo células sarcomatóides individuais coincidindo com o padrão fusiforme visualizado sob

coloração HE. A dupla coloração para Col V e D2-40 confirma a especificidade das células MM circundantes da expressão de Col V (Figura 3.7-E, F). Linfócitos T CD8 + esparsos (Figura 3.8-B) e linfócitos CD20 + B (Figura 3.8-D) são encontrados no ambiente de MM sarcomatoide. As células malignas nesses tumores retêm expressão semelhante de P53 (Figura 3.8-F) e PMS2 (Figura 3.8-H).

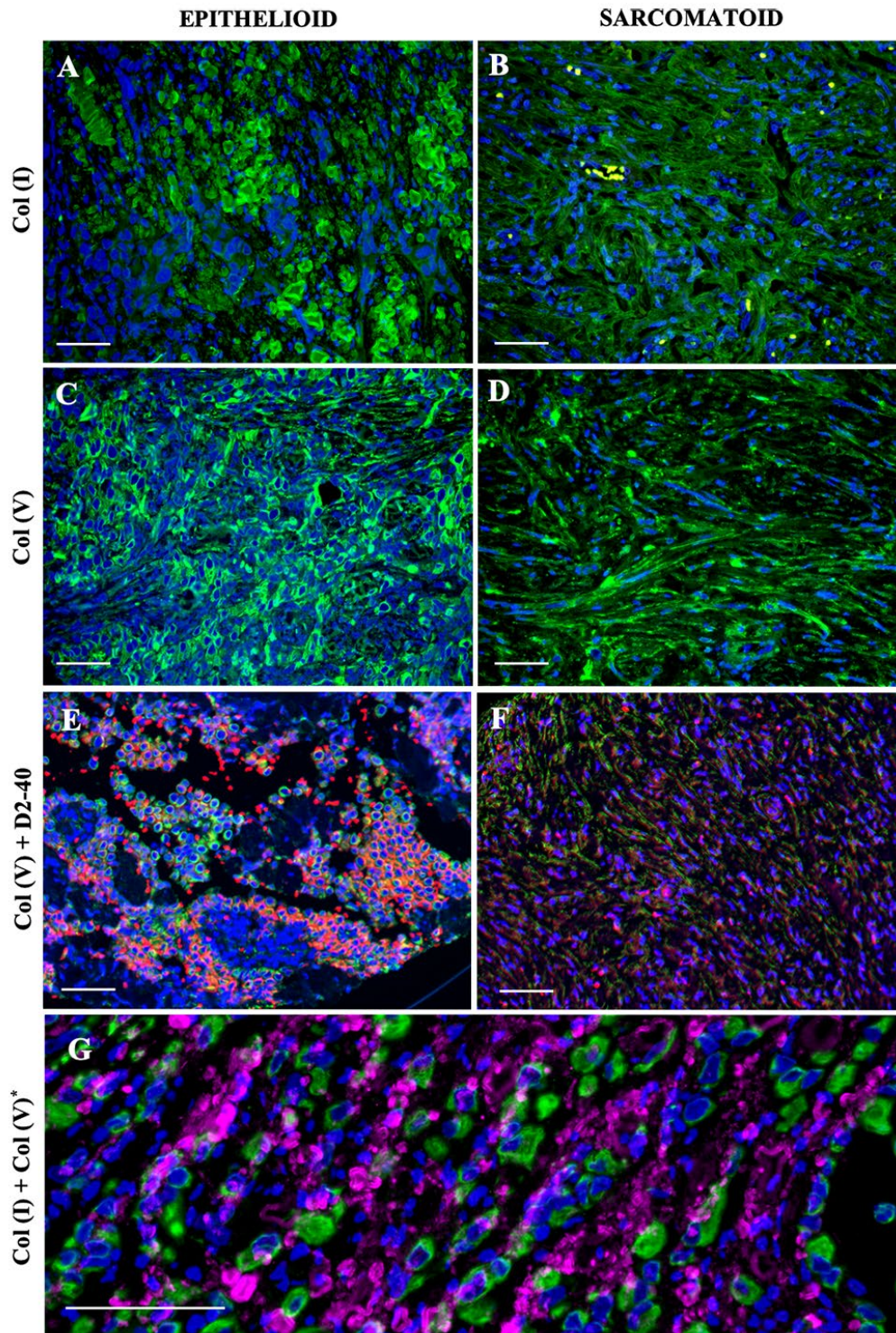


Figura 3.7. Associações dos elementos imunomatrixiais com TILs.

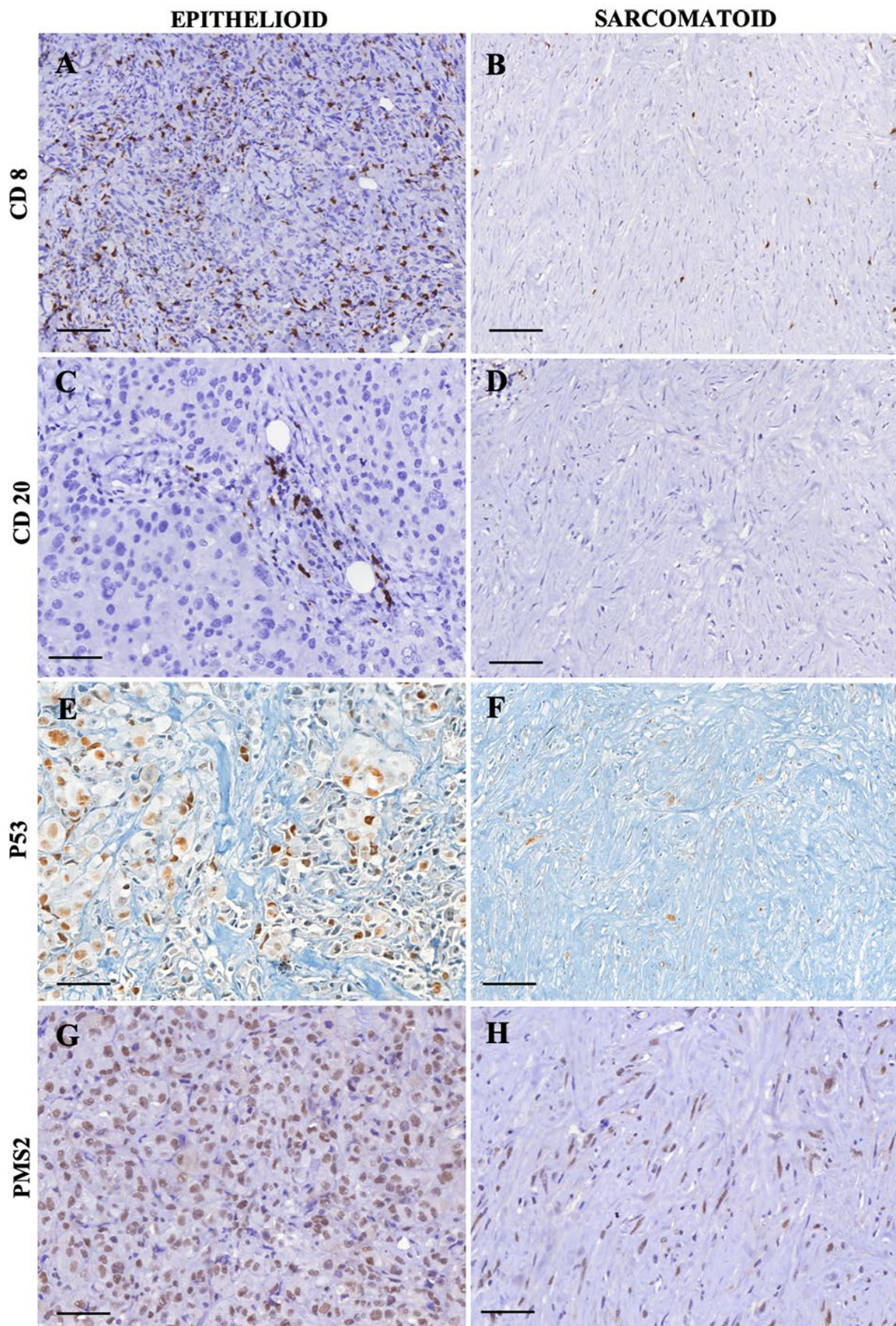


Figura 3.8. Perfil de colágeno à IF em MM epitelioides e sarcomatoides (IF, Col (I), Col (V), 400x).

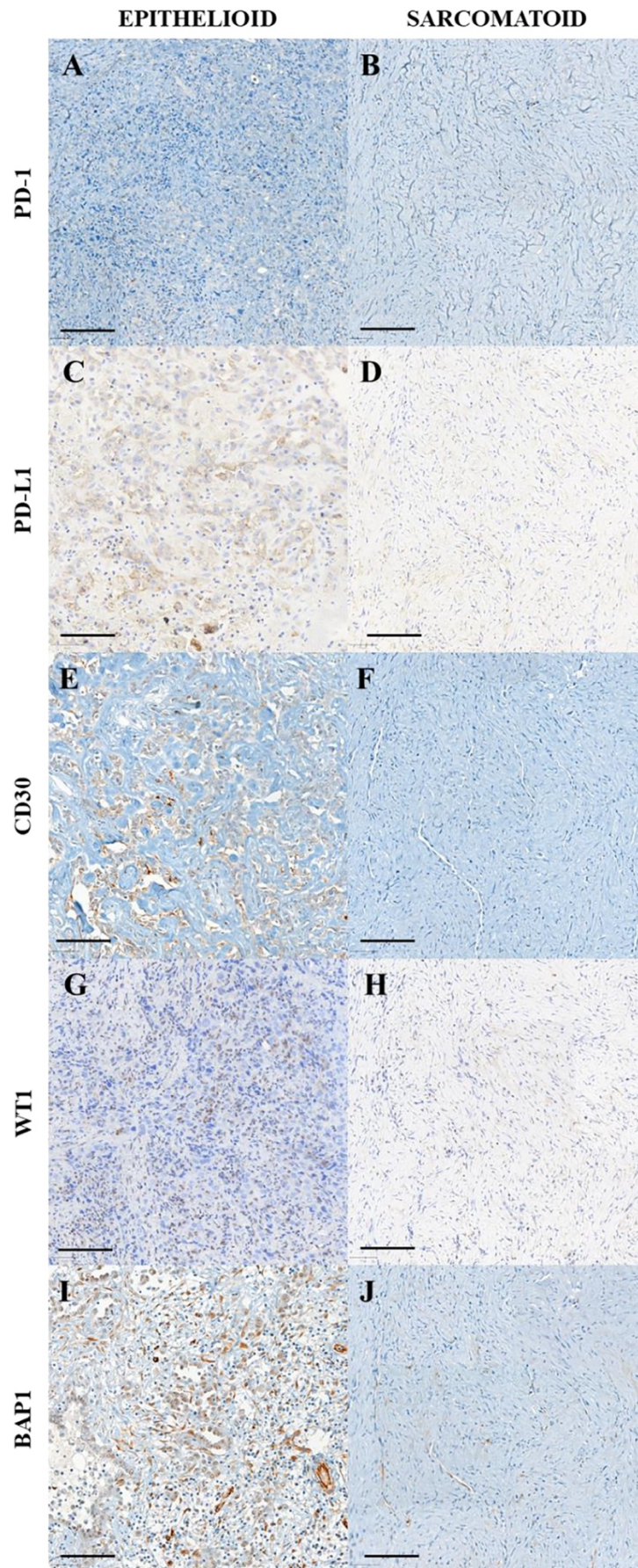


Figura 3.9. Perfil de alvos e marcadores específicos nos tipos epitelióide e sarcomatóide (IHQ, 400x).

A análise univariada mostrou que o MM epitelióide exibe maior celularidade do tumor e mais células tumorais expressando a proteína p53 e preservando a expressão de PMS2 do que o MM sarcomatóide. Além disso, MM epitelióide abrigava colágeno total, fibras I e elásticas significativas, além de linfócitos T CD8 do que MM sarcomatóide.

As variáveis morfométricas que diferiram significativamente entre MM epitelióide e sarcomatóide por análise univariada (grau nuclear, celularidade tumoral, proteína p53, proteína de reparo de incompatibilidade PMS2, ácido hialurônico, fibras elásticas, colágeno total, Col I, col V e linfócitos T CD8) foram agrupados por análise hierárquica de agrupamentos independente de variáveis clínico-patológicas; foram identificados dois grupos de pacientes com 67 indivíduos no Cluster 1 (CL I) e 15 no Cluster 2 (CL II) (**Gráfico 3.6-A, B**). O **Gráfico 3.6-A** mostra o dendrograma de cluster, separando dois grupos por similaridades de dispersão, conforme plotado no gráfico de dispersão (**Gráfico 3.6-B**). O CL I, classificado como baixo risco de morte da doença, inclui tumores com celularidade inferior a 80,6 células / mm², densidade de fibras Col V inferior a 7,75 fibras / mm³ e celularidade média de linfócitos T CD8 superior a 99,77 células / mm². O CL II, classificado como de alto risco, é composto por MM com celularidade superior a 80,6 células / mm², densidade de fibras Col V superior a 7,75 fibras / mm³ e celularidade de linfócitos T CD8 inferior a 99,77 células / mm².

Os resultados da análise multivariável estão resumidos na tabela 4. A análise multivariada mostra que a celularidade tumoral > 80,6 células / mm², Col V > 7,75 fibras / mm³ e linfócitos T CD8 < 99,77 células / mm² estão associados a um risco aumentado de morte. Pacientes com MM CL II tiveram duas vezes o risco de morte do que pacientes em CL I.

A exposição ao amianto, a biópsia (ressecção cirúrgica) e o grupo de clusters altos estão associados ao aumento do risco de morte aos 40 meses na análise univariada. A biópsia (vs ressecção cirúrgica) e o grupo de aglomerados altos continuaram significativos para o risco de morte aos 40 meses na análise multivariada; nenhuma quimioterapia se tornou significativa enquanto a exposição ao amianto não estava mais associada ao resultado. Enquanto a razão de verossimilhança geral do modelo Cox usando exposição ao amianto, tipo histológico e tratamento isoladamente foi de apenas 12,42, a razão de verossimilhança nos grupos de tratamento e cluster foi de 15,05. A Fig. 5-C mostra as curvas de Kaplan-Meier dos clusters de alto e baixo risco para todos os MM. Os pacientes no grupo de baixo risco CL I tiveram uma sobrevida global melhor, com um tempo médio de sobrevida que não foi atingido durante o acompanhamento e um tempo médio de sobrevida de 21 meses. Por outro lado, os pacientes do cluster de alto risco CL2 tiveram um tempo médio de sobrevida mediano menor de apenas 12 meses (p = 0,03).

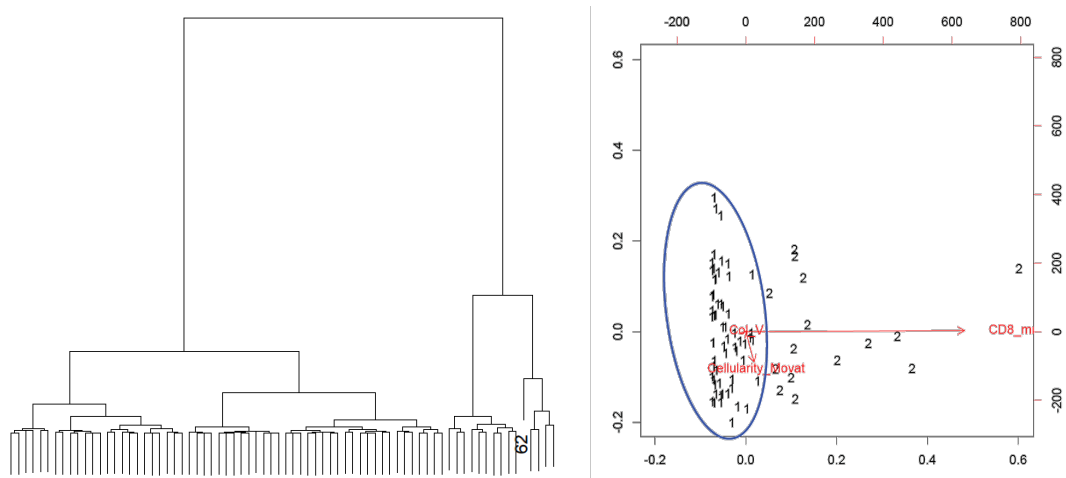


Gráfico 3.6. Dendrograma de distribuição dos casos agrupados pelos clusters e distribuição gráfica dos casos agrupados por clusters, com sinalização dos elementos.

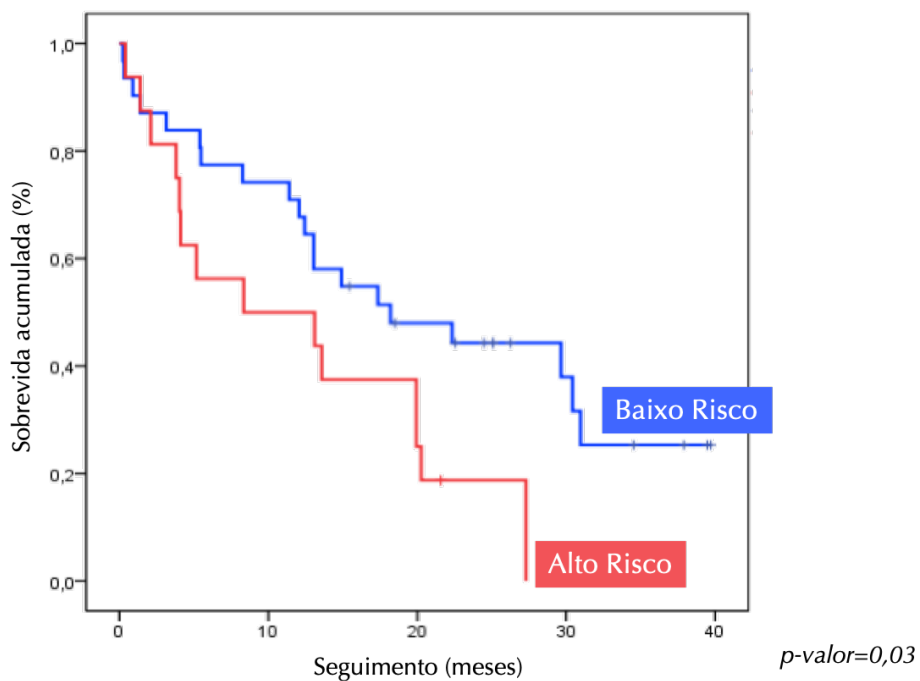


Gráfico 3.7. Curva de Kaplan-Meier para os grupos de cluster de baixo e alto risco.

III. Padrão de imunofluorescência e imuno-histoquímica do Colágeno V:

A IF dos colágenos revelou a particularidade no padrão de deposição de fibras tipos I e V e sua relação com as células neoplásicas. O padrão de deposição do Col (I) foi em feixes lamelares, dispostos ao longo das células neoplásicas, enquanto o Col (V) circundou as células neoplásicas, de forma a esboçar o desenho da membrana celular. As formas III e IV do Col foram de deposição inespecífica, em blocos grosseiros celulares. Essas formas, como mencionado previamente, não foram quantificadas por esse motivo.

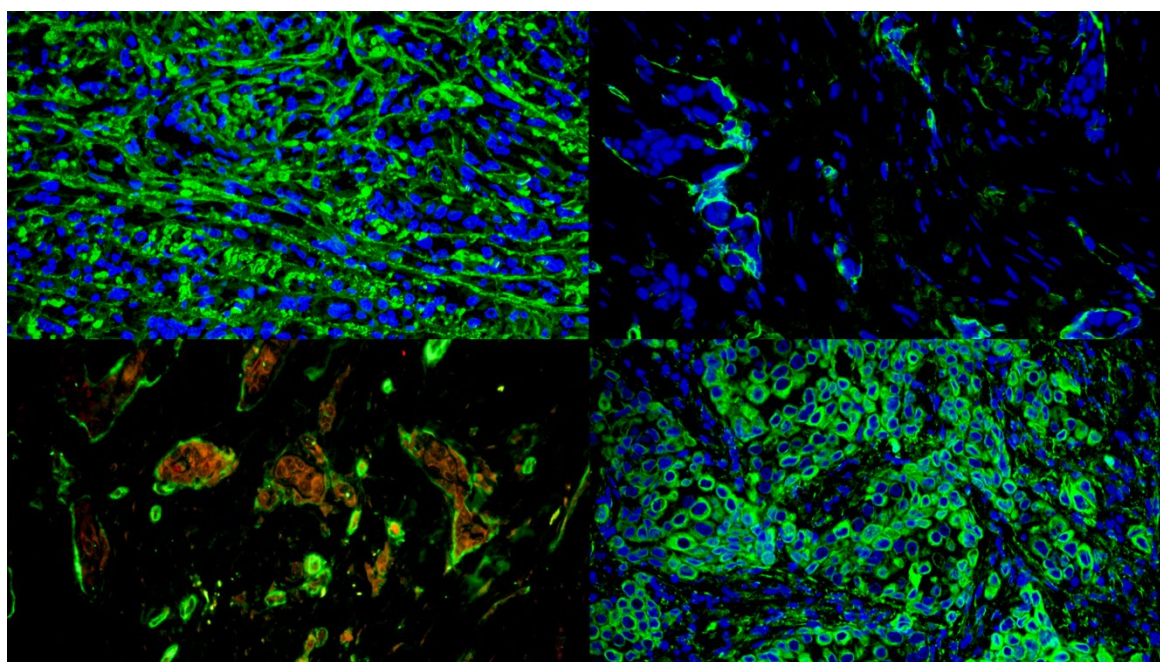


Figura 3.10. IF para Col (I), (III), (IV) e (V). (IF, 400x).

A reconstrução digital com alinhamento entre IFs de Col (I) e Col (V) indica o padrão de deposição em colocalização similar à membrana citoplasmática do último, enquanto o primeiro está entre as células neoplásicas em forma de fascículos. A relação entre as formas não é clara quando visualizadas por esse método.

Quando avaliado isoladamente, a particularidade do padrão do Col (V) é sua localização semelhante à membrana citoplasmática, de forma a quase revestir as células neoplásicas e isolá-las, como pode ser visto em maior aumento. Em marcação dupla com o antígeno D2-40, específico para glicoproteína de membrana encontrada na membrana das células mesoteliais, mostraram colocalização quase perfeita, sem diferença entre os parâmetros de intensidade ($p=0,95$, Spearman).

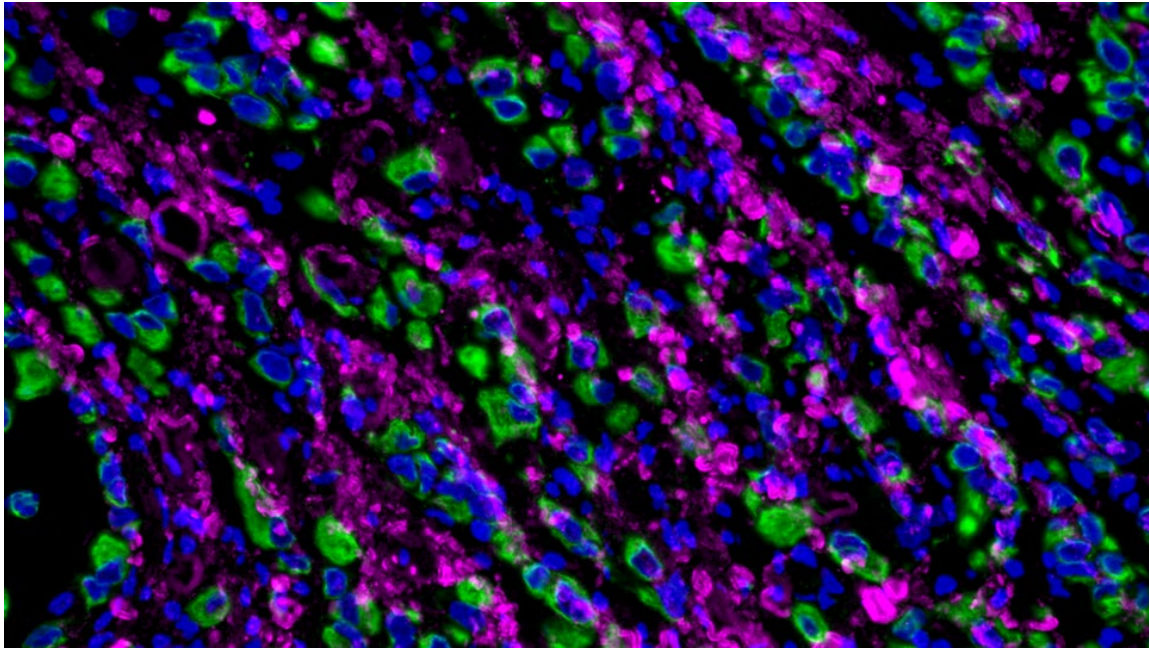


Figura 3.11. IF para Col (I, magenta) e (III, verde), reconstruído digitalmente com alinhamento das imagens (IF, 400x).

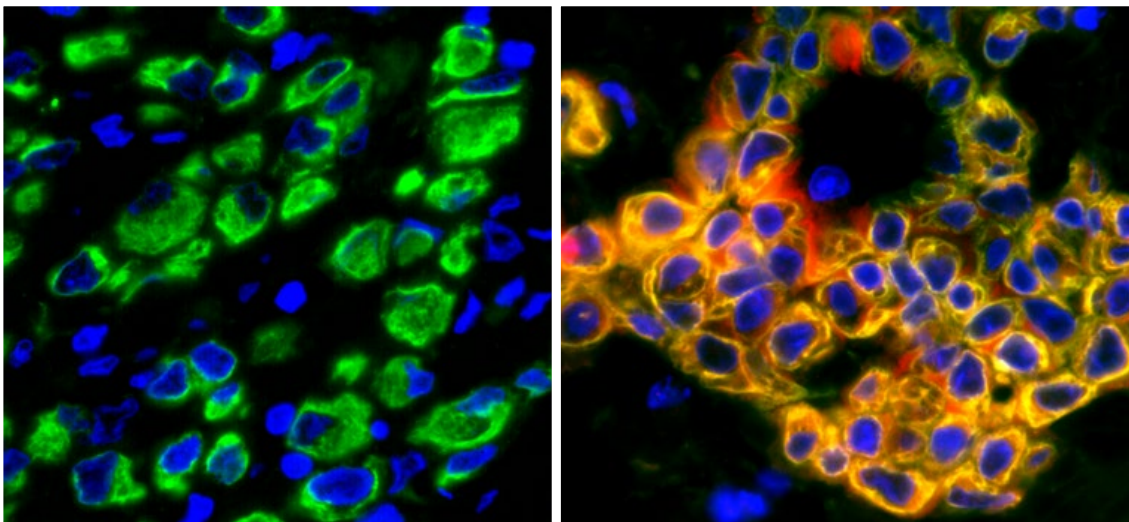


Figura 3.12. IF para Col (V) e dupla marcação com D2-40 (IF, 1000x, 400x).

Nos casos de MM foram identificados três padrões de deposição do Col (V) através da IF: o padrão supramencionado de células isoladas (CI), o padrão de deposição em blocos celulares (BC), em que as fibras circundam e delimitam blocos de células neoplásicas e o padrão misto (PM), com pelo menos 10% de cada padrão, como ilustrado na **Figura 3.13**. Desses casos, foram identificados 95% de padrão de CI, 5% BC e 0% PM, contrapondo a outros tipos tumorais: 0% CI, 9,3% BC e 7,7% PM no câncer de pulmão e 0% CI, 98,8% BC e 1,2% PM no câncer de mama, com diferença estatística no padrão de distribuição dos grupos ($p < 0,05$).

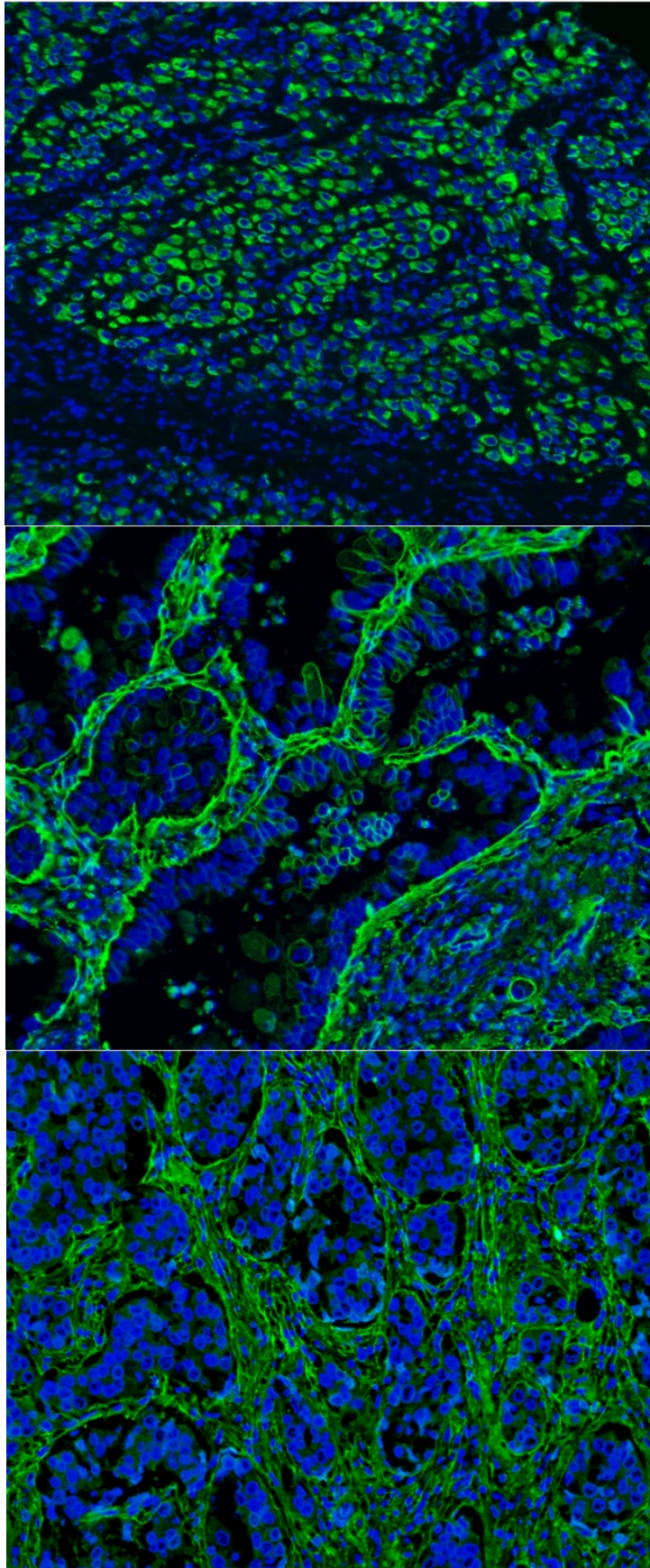


Figura 3.13. IF para Col (V) - padrões: células individualizadas, misto e blocos celulares (IF, 200x).

O próximo passo foi a correlação com a IHQ do Col (V). Nesse teste, foram identificados três padrões morfológicos: células individualizadas, com o mesmo princípio de isolamento de células e padrão de marcação citoplasmático. Foram estabelecidos dois critérios para esse padrão: a individualização célula a célula e o reforço de membrana em mais do que 10% das células neoplásicas marcadas. O padrão de blocos celulares (BC) também foi identificado na IHQ. Para esse, foram estabelecidos dois critérios: isolamento de blocos celulares e a identificação de um gradiente de célula a célula; a diferença do padrão de BC para CI pela IHQ foi estabelecido como a ausência de clara delimitação celular favorecendo os blocos e, quando a delimitação célula a célula fosse clara, seria designado como CI. Em alguns casos não foi possível o delineamento claro entre algum desses padrões, sendo evidenciado marcação citoplasmática inespecífica, sendo designado ao padrão citoplasma.

A IHQ mostrou algumas particularidades em relação à IF: o padrão previamente designado como misto não foi identificado, porém na IHQ tem-se um padrão pouco específico, sem o delineamento claro de elementos dos demais; além disso, chamamos à atenção a sutileza que o padrão de marcação entre células isoladas e blocos pode apresentar, como ilustrado na **Figura 3.14-3.15**. Nela, são ilustrados os critérios para os padrões de CI (delineamento para células isoladas) e para BC (reforço de membrana para a formação de blocos).

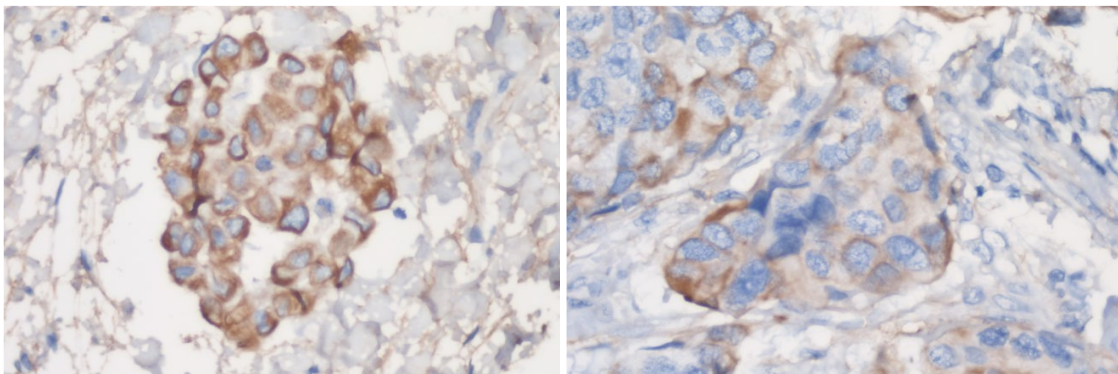
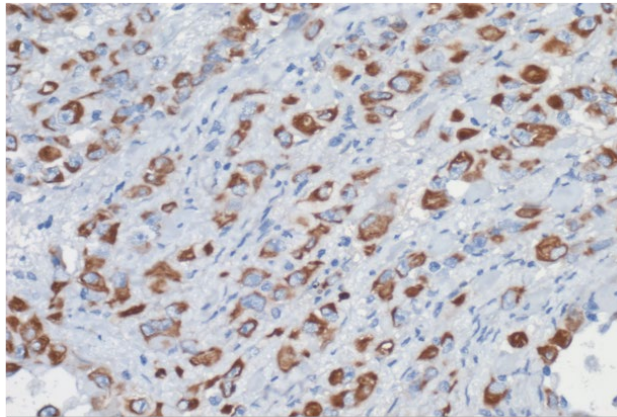
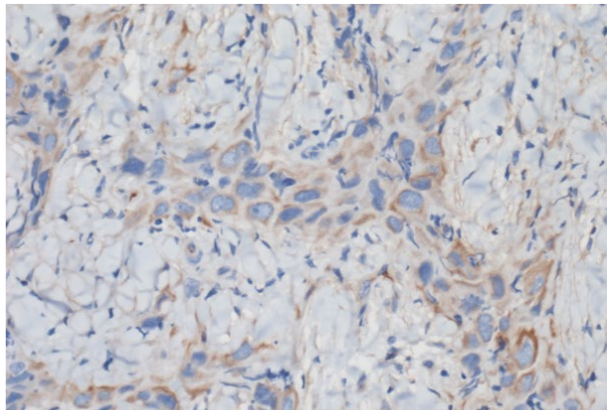


Figura 3.14. Padrões imuno-histoquímicos para Col (V). (A) células isoladas, com individualização célula a célula e reforço de membrana (seta) e (B) blocos celulares, com individualização do bloco e formação de gradiente de marcação entre as células do bloco (IHQ, 400x).



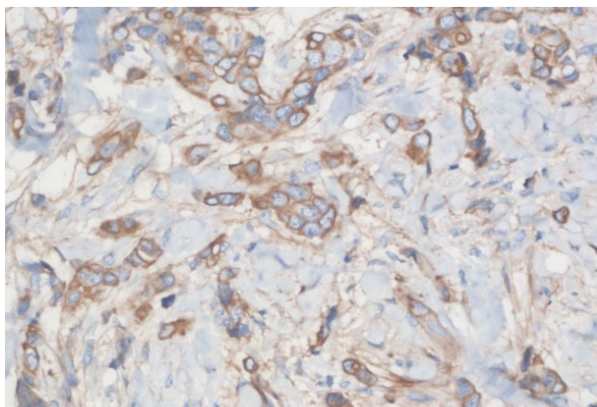
Célula Individualizada

- ✓ Individualiza célula a célula
- ✓ Reforço de membrana (>10%)



Citoplasma

- ✓ Fraco, citoplasmático
- ✓ Não há critérios para os demais



Bloco Celular

- ✓ Individualiza os blocos celulares
- ✓ Gradiente entre células do bloco

Figura 3.15. IHQ para Col (V) com os respectivos padrões (IHQ, 400x).

A distribuição dos padrões pela imuno-histoquímica mostrou diferença entre os grupos MM, pulmão e mama, com concentração dos padrões CI e Citoplasma (75,6% e 50%) no MM, com raros casos no padrão BC (3,7%), como ilustrado no **Gráfico 3.8**.

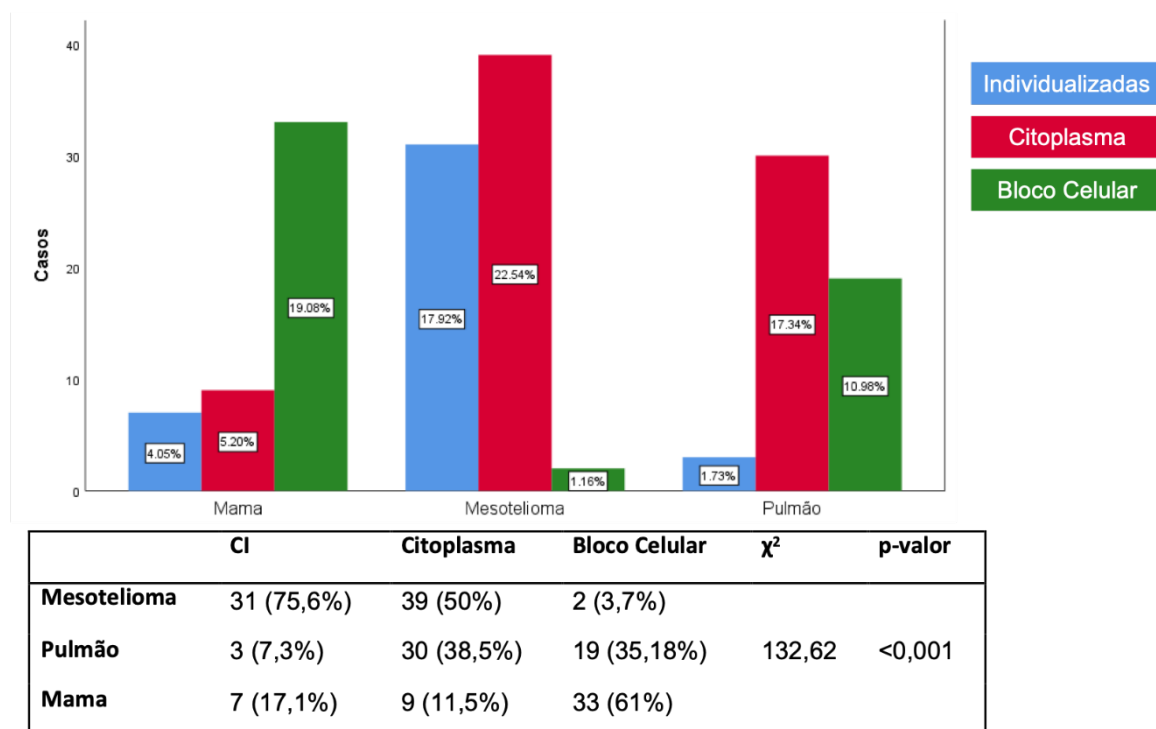


Gráfico 3.8. Padrões de distribuição da IHQ do Col (V).

Quando comparados as distribuições do padrão de IHQ de Col (V) entre pulmão com MM e mama com MM, há diferenças estatísticas, como ilustrado na **Tabela 3.12**.

Tabela 3.12. Padrões de distribuição da IHQ do Col (V).

	Célula Isolada	Citoplasma	Blocos Celulares	p-valor	IC _{95%}
Pulmão	3 (7,3%)	30 (38,5%)	19 (35,18%)	<0,001	-0,913 - -0,508
Mesotelioma	31 (75,6%)	39 (50%)	2 (3,7%)		
Mama	7 (17,1%)	9 (11,5%)	33 (61%)	<0,001	-1,165 - -0,702

Além disso, avaliamos o padrão de deposição do Col (V) à IHQ por tipo e subtipo celular (**Tabela 3.13**).

Tabela 3.13. Padrões de distribuição da IHQ do Col (V) por tipo e subtipo histológico.

Doença	Tipo Histológico	Subtipo Histológico	Célula Isolada	Citoplasma	Blocos Celulares
Mesotelioma (n=72)	Epitelióide (63)		31 (75,6%)	39 (50%)	2 (3,7%)
		Tubulopapilífero (18)	5 (12,2%)	12 (15,4%)	1 (1,8%)
		Trabecular (12)	7 (17,1%)	5 (6,4%)	0
		Sólido (18)	5 (12,2%)	9 (11,5%)	1 (1,8%)
		Micropapilífero (3)	2 (4,8%)	1 (1,3%)	0
		Outros (12)	7 (17,1%)	4 (5,1%)	0
		Sarcomatóide (9)	1 (2,4%)	8 (10,2%)	0
Pulmão (n=52)	Adenocarcinoma (37)		3 (7,3%)	30 (38,5%)	19 (35,18%)
		Acinar (12)	3 (7,3%)	7 (8,9%)	4 (7,4%)
		Sólido (11)	0	7 (8,9%)	3 (5,5%)
		Mucinoso (5)	0	1 (1,3%)	3 (5,5%)
		Outros (9)	0	4 (5,1%)	5 (9,2%)
		CEC (11)	0	7 (8,9%)	4 (7,4%)
		LCC (4)	0	4 (5,1%)	0
Mama (n=49)			7 (17,1%)	9 (11,5%)	33 (61%)
		NST (41)	4 (9,7%)	8 (10,2%)	29 (53,7%)
		Lobular (6)	3 (7,3%)	1 (1,3%)	2 (3,7%)
		Outros (2)	0	0	2 (3,7%)
		41 (100%)	78 (100%)	54 (100%)	

O padrão da intensidade, quando considerado o H-SCORE, foi diferente e mais intenso no MM quando comparado com os casos de pulmão ($p=0,047$) e mama ($p=0,024$), como ilustrado no **Gráfico 3.9** e designado na **Tabela 3.14**.

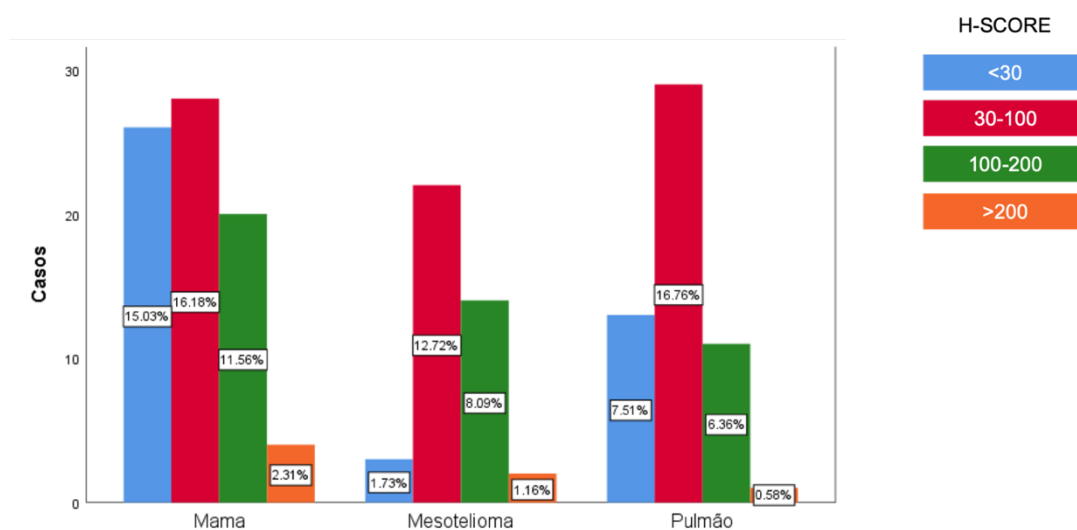


Gráfico 3.9. Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.

Tabela 3.14. Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.

	Intensidade					IC _{95%}			P-valor
	Typo Histológico	Neg	Fraca	Mod	For	HS	Inf	Sup	
Pulmão	Adenoca*	13 (35,1%)	20 (54,1%)	4 (10,8%)	0	47,17	35,90	62,77	0,047 (0,520 – 1,072)
	CEC**	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	0	16,17	0,344	58,16	
	LCC***	3 (75%)	1 (25%)	0	0	10,35	9,69	44,24	
MM	Epi [#]	8 (12,7%)	23 (36,5%)	26 (41,3%)	6 (9,5%)	100,79	90,40	120,86	0,024 (0,043 – 0,614)
	Sarc ^{\$}	2 (22,2%)	4 (44,4%)	3 (33,3%)	0	77,31	35,92	106,30	
Mama	NST ^{##}	6 (14,6%)	24 (58,5%)	10 (24,2%)	1 (2,4%)	60,66	55,92	87,57	0,024 (0,043 – 0,614)
	Lobular	1 (16,7%)	4 (66,7%)	1 (16,7%)	0	56,01	19,22	105,64	

*Adenocarcinoma, **Carcinoma de Células Escamosas, ***Carcinoma Neuroendócrino de Grandes Células (*Large Cell Carcioma*), [#]Epidermoide, ^{\$}Sarcomatoide, ^{##}*Non Special Type*. Demais: Neg (Negativa), Mod (Moderada), For (Forte), HS (Histoscore), Inf (Inferior), Sup (Superior).

A curva ROC para o Col V como biomarcador à IHQ revelou que quanto interpretado como célula individualizada para o diagnóstico de MM, possui área sobre a curva de 0,257 (IC 0,175-0,339), com sensibilidade de 0,254 e especificidade de 0,901 (Gráfico 3.10, A). Para o diagnóstico diferencial com adenocarcinoma sob a interpretação de células isoladas, mostra área sobre a curva de 0,715 (IC 0,639-0,790), com sensibilidade de 0,961 e especificidade de 0,515 (Gráficos 3.10-11).

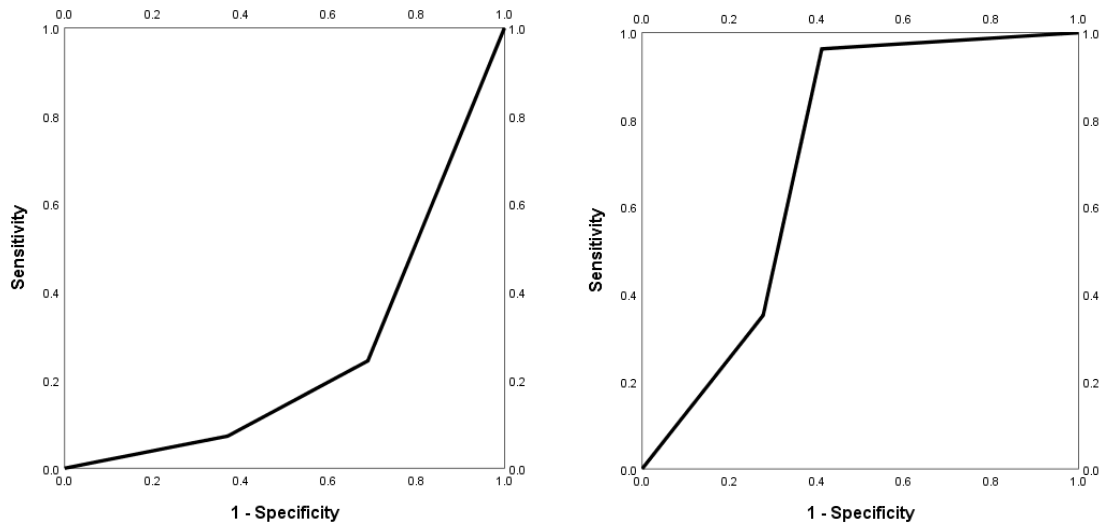


Gráfico 3.10. Curvas ROC para o Col V pelas interpretações da IHQ. Padrão de células isoladas (A, alta especificidade para o diagnóstico de MM) e para o diagnóstico diferencial com adenocarcinoma sob o padrão de blocos celulares (B, alta sensibilidade).

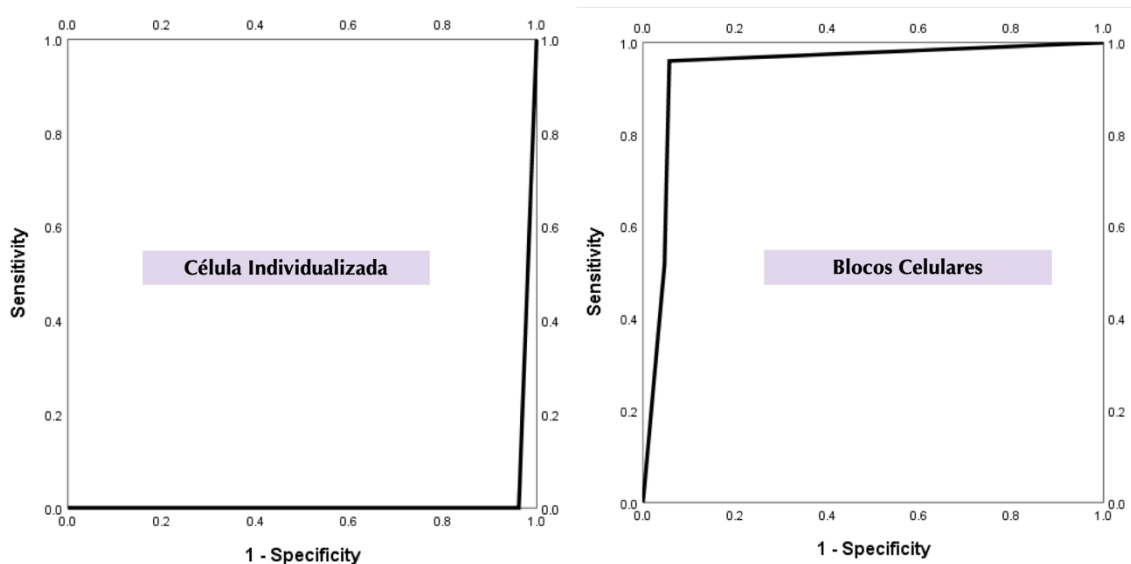


Gráfico 3.11. Curvas ROC para o diagnóstico de MM pelo padrão de células isoladas (A) e de adenocarcinoma pelo padrão de blocos celulares (B) pela IF.

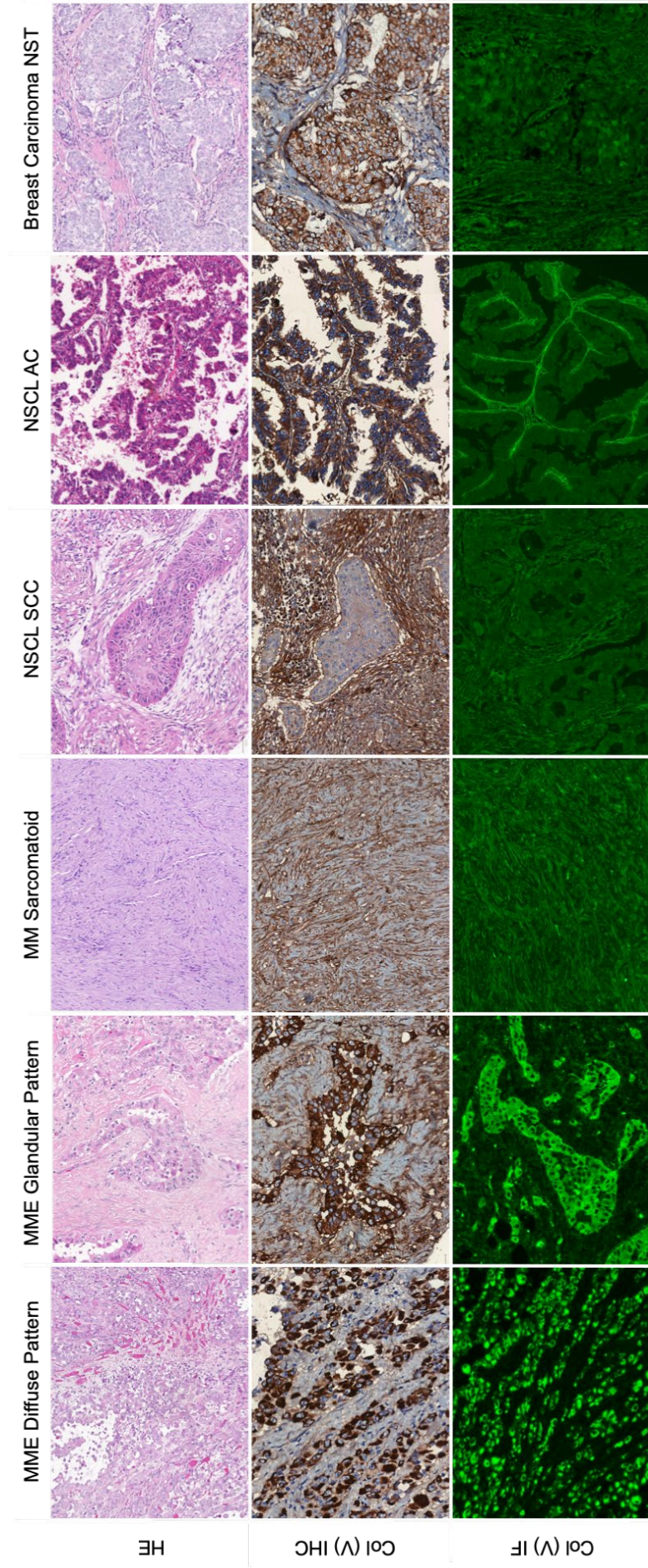


Figura 3.16. Correlação entre os padrões morfológicos, imuno-histoquímicos e à imunofluorescência do Col (V) (HE, IHQ, IF, x200).

A correlação entre a distribuição do padrão pela IHQ e IF de marcação mostrou ausência de diferença entre os grupos de blocos celulares ($p=0,054$, **Tabela 3.14**), os demais grupos mostraram diferença na distribuição dos tipos, apesar de serem encontradas similaridades morfológicas em casos isolados, como apontado na **Figura 3.16**.

Tabela 3.15. Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.

	Célula Isolada IF	Célula Isolada IHQ	<i>p</i>	Misto IF	Citoplasma IHQ	<i>p</i>	Blocos IF	Blocos IHQ	<i>p</i>
MM	182 (100%)	31 (75,6%)		0	39 (50%)		9 (3,4%)	2 (3,7%)	0
Pulmão	0	3 (7,3%)	<0,001	9 (81,8%)	30 (38,5%)	<0,001	117 (51,7%)	19 (35,18%)	0,5
Mama	0	7 (17,1%)		2 (22,2%)	9 (11,5%)		100 (44,2%)	33 (61%)	4

Finalmente, buscamos a correlação entre o padrão de expressão e o status de desfecho. O padrão de células isoladas é potencialmente um carreador de correlação com status nesse coorte de MM, uma vez que houve diferença estatística com o grupo que apresentou expressão IHQ em padrão citoplasmático, com razão de risco de 0,53, sendo um elemento de predição ao grupo de sobrevida ($p=0,033$), como disposto nas **Tabelas 3.16-17**.

Tabela 3.16. Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.

Col (V)	<i>p</i> valor	IC95% inferior	IC95% superior
IF (Quantificação)	0,080	-4,703	0,274
IHQ (H-SCORE)	0,069	-56,772	2,201
IHQ (Intensidade)	0,070	-0,801	0,032
IHQ (Padrão)	0,016	0,063	0,592
IHQ (Isolado-Citoplasma)	0,033	0,021	0,488

Tabela 3.17. Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.

Padrão	Vivos	Óbito	<i>p</i> valor
Células Isoladas	15 (60%)	14 (31,8%)	0,033
Citoplasma	10 (40%)	28 (63,6%)	0,415
Bloco Celular	0	2 (4,5%)	

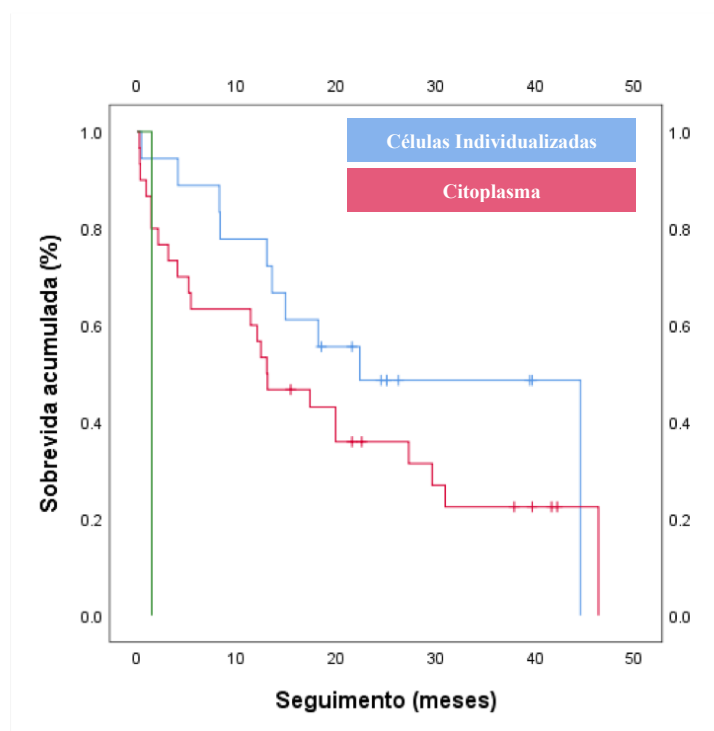
A intensidade de expressão IHQ através do H-SCORE também foi um elemento que trouxe correlação com o grupo de sobrevivida.

Tabela 3.18. Distribuição da intensidade de marcação do Col (V) pela IHQ.

Col (V)	p valor	IC95%inferior	IC95%superior
IF	0,106	8,64	17,06
IHQ (H-SCORE)	0,017	-102,00	-65,71

*Col(V) IF-IHQ: p-valor 0,005 (-113,014 - -84,078).

A IHQ do Col (V) também ofereceu correlação com a mediana de sobrevivida, com 1,44 vezes maior que o grupo de padrão de expressão citoplasmático (p=0,05), como ilustrado na curva de sobrevivida de Kaplan-Meier do **Gráfico 3.12**.



Col V	Mediana de sobrevivida	IC95% _{inf}	IC95% _{sup}	χ^2	p-valor
CI	27,706	11,080	33,653	3,848	0,05
Citoplasma	19,282	12,881	25,682		
Blocos	1,467				

Gráfico 3.12. Curva de sobrevivida de Kaplan-Meier para os padrões IHQ de Col (V) (Células Individualizadas, azul; Citoplasma, vermelho e Blocos, verde).

DISCUSSÃO

Trata-se de um estudo amplo, cuja originalidade prezou pela análise do MM no cenário morfológico, com geração de modelo prognóstico e proposição de biomarcador inédito, o Colágeno V.

Partimos da determinação de características histopatológicas de forma objetiva, com base em princípios de patologia computacional para avaliação de biomarcadores tumorais e do microambiente tumoral, incluindo a matriz extracelular. Caracterizamos a amostra na população brasileira, outra originalidade do estudo. Dados epidemiológicos da casuística em nosso país são criticados pela escassez e possível subnotificação⁷; estudos das características histopatológicas por autores brasileiros são igualmente escassos¹⁴²⁻¹⁴⁵. Propomos um modelo de grupos de risco para o desfecho de sobrevida global com base no agrupamento das características histopatológicas, cuja originalidade reside no uso de dados quantificados digitalmente, com potencial de replicabilidade e exclusão do viés do observador. A avaliação objetiva dos elementos de MEC em um tumor sólido, algo incomum na prática clínica da patologia, nos permitiu a identificação de um biomarcador com uso potencial na rotina diagnóstica e como prognóstico, o Col (V). O estudo da MEC nos levou à proposição de um fluxo de trabalho a partir de técnicas de microscopia ótica de campo claro de transmissão (disponíveis em qualquer laboratório) visando à reconstrução tridimensional de fração colagênica da MEC, com finalidade didática, expositiva e até quantitativa, uma última originalidade dessa tese.

Por fim, a tese é a melhor forma de sumariarmos nossos trabalhos. Contribuímos com o conhecimento biológico da interação tumor e MEC e, sob o pano de fundo da exploração do MM, propusemos a construção de métodos em Anatomia Patológica, pavimentando o terreno de uma Medicina que indubitavelmente seguirá, neste século XXI, lado a lado com ferramentas computacionais.

Do ponto de vista biológico, notamos que os linfócitos T CD8, o Col (V) e a densidade celular do tumor permitiram a caracterização de subgrupos de alto e baixo risco com impacto no desfecho de sobrevida, independentemente do grau e da classificação histológica e outros fatores tumorais. Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo a analisar as associações entre o efeito potencial de uma abordagem quantitativa para o perfil imunológico e o controle modulatório matricial do comportamento do MM.

Nossa coorte incluiu 82 pacientes com MM. As características clínico-patológicas dos pacientes concordam com estudos anteriores, incluindo idade, sexo, exposição ao amianto¹⁴⁶, subtipos histológicos¹¹⁷, local do MM¹⁴⁷, estágio¹⁴⁶ e sobrevida^{112,148}. Embora a ressecção cirúrgica tenha sido realizada na maioria dos nossos pacientes, seguida por quimioterapia

adjuvante, 49 pacientes (56%) morreram da doença, indicando demanda para melhor estratificação, ressaltando que a proposição de biomarcadores prognósticos e preditivos é relevante à prática médica.

Apesar dos avanços em nossa compreensão da patogênese do MM, existem desafios complexos na identificação desses biomarcadores, como a falta de ajuste adequado para possíveis fatores de viés. Na histopatologia, por exemplo, o relato de biomarcadores difere muito entre os estudos, em especial no que tange ao método de avaliação histopatológico: alguns se valem de pontos de corte binários, enquanto outros são semiquantitativos, enfraquecendo a replicabilidade dos alvos em estudo.

A partir desse estudo, utilizando uma abordagem quantitativa, com base em algoritmos de aprendizado de máquina previamente validados¹³¹⁻¹³³, avaliamos a associação entre tumor e microambiente tumoral e o comportamento do MM nesses pacientes. A análise univariada mostrou que o MM epitelióide apresentou alta celularidade e expressão da proteína p53 e manteve a expressão da proteína PMS2, enquanto o ambiente apresentou grandes quantidades de colágeno total, Col (I), fibras elásticas e alto número de linfócitos T CD8. Em contraste, os MM sarcomatóides mostraram menor celularidade, ausência de expressão de p53 e da proteína PMS2, juntamente com aumento das fibras colágenas totais. Col (V) estava igualmente presente em torno de células tumorais mesoteliais coincidindo com a expressão de ácido hialurônico em ambos os tipos histológicos.

As variáveis que foram significativamente diferentes entre MM epitelióide e sarcomatóide e independentes de variáveis clínico-patológicas foram agrupadas pelo cálculo de clusterização para caracterizar diferentes subgrupos de MM. A análise identificou dois subgrupos de pacientes, que compõem os CL (cluster) I (baixo risco de morte) e CL II (alto risco de óbito). No geral, nossos resultados mostraram que o risco de morte foi aumentado para pacientes do cluster II, caracterizado por aumento da celularidade do tumor, fibras Col (V) mais densas e menos linfócitos T CD8. De fato, esses pacientes tiveram duas vezes mais risco de morte do que os pacientes em CL I.

Nosso CL II indica que a Col (V) está presente em quantidades aumentadas no microambiente ECM do MM. Mostramos que no MM epitelióide, as fibras Col (I) envolvem grupos de células malignas, enquanto as fibras Col (V) envolvem células malignas de maneira individualizada. Em contraste, no MM sarcomatóide, as fibras Col (I) mostram um padrão diferente e são organizadas como fibras grossas alongadas, envolvendo grandes grupos de células tumorais em um alinhamento radial, enquanto as fibras Col (V) formam uma textura mais regular, com fibras finas envolvendo células fusiformes malignas individuais. Em

particular, infere-se que a invasão celular local é predominantemente orientada ao longo de certas fibras de colágeno alinhadas, sugerindo que a organização radial das fibras Col em relação às células tumorais facilita a invasão¹⁴⁹. Postulam-se o reaparecimento do Col (I) 'embrionário' e um aumento no conteúdo de Col (V) na MEC, assim como reportado no carcinoma de mama¹⁵⁰.

Luparello e colaboradores¹⁵⁰ compararam os efeitos desses dois tipos de colágeno no padrão de disseminação, organização citoesquelética e comportamento móvel de células de carcinoma da mama cultivadas. Eles descobriram que as células cultivadas em Col (I) eram estacionárias, com uma distribuição bem espalhada e um extenso padrão de fibras de estresse, enquanto as células cultivadas em Col (V) também eram estacionárias, mas exibiam uma distribuição mal espalhada e alongada. Por outro lado, as células cultivadas no trímero (trim) de Col (I) eram móveis e exibiam um arranjo compacto e um conteúdo reduzido de fibras de estresse. Tanto a motilidade unicelular quanto a de grupo foram detectáveis no substrato de trímero de Col (I). Estes dados são consistentes com a existência de dois sinais locais opostos, trim (I) e Col (V), que podem conferir diferentes fenótipos metastáticos em células de carcinoma da mama. Em outras palavras, a reposição de colágeno "embrionário" na MEC, produzida pelas próprias células tumorais, pode estar envolvida em vias estromais que permitem que as células neoplásicas se infiltrem no tecido hospedeiro circundante, por analogia com o papel de 'orientação de contato' do substrato ECM durante o desenvolvimento.

Nossos resultados atuais levantam questões sobre a origem do aumento do Col (V). Mostramos evidências sugerindo que a fonte do Col (V) no ambiente está relacionada a células tumorais invasivas. Os dados de imunofluorescência revelaram consistentemente a presença de Col (V) envolvendo a membrana de células tumorais invasivas. O padrão de Col (V) no estroma como depósitos fibrilares e lineares, em contraste com a distribuição homogênea mais difusa do Col (I), enfatiza as propriedades de distribuição únicas do Col (V) como um colágeno intersticial pericelular no ambiente da MEC. Nossas observações da presença de Col (V) envolvendo as células tumorais são diferentes das observações de outros pesquisadores em outros carcinomas, incluindo carcinoma de mama. Esses carcinomas sintetizaram consistentemente Col (V), que ocorreu como depósitos lineares no interstício (estroma desmoplásico ao redor do tumor)^{149,151}. Foi possível demonstrar a coloração pericelular membranosa de Col (V) com nossa técnica de imunofluorescência. Portanto, levantamos a hipótese de que o aumento do Col (V) observado no microambiente da MEC representava uma resposta do hospedeiro ao MM invasivo e que esse colágeno foi sintetizado pelas células do MM. Embora a origem exata do Col (V) ainda seja, em geral, controversa, acredita-se que

esteja presente adjacente às membranas basais das células mesoteliais e ocorra como um colágeno pericelular. De fato, as células mesoteliais são células do tipo epitelial derivadas embriologicamente do mesoderma e expressam características mesenquimais, incluindo vimentina e desmina¹⁵²; além disso, são células pluripotentes capazes de sintetizar citocinas / quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de MEC (incluindo colágeno tipos I, III e IV), elastina, fibronectina, laminina e proteoglicanos¹⁵³⁻¹⁵⁷. Portanto, levantamos a hipótese de que os MCs têm a capacidade de sintetizar o Col (V). Nossa observação atual do aumento do Col V no microambiente da MEC aumenta a possibilidade de que a infiltração do MM estimule células malignas a secretarem o Col (V). A observação do aumento de Col (V) no MM é semelhante a achados anteriores em câncer de mama¹⁵¹, câncer colorretal¹⁵⁸, câncer de pulmão¹¹² e carcinoma ductal pancreático primário¹⁰⁹.

O Col (V) também tem sido relatado como auto-antígeno em doenças inflamatórias crônicas¹⁵⁹, transplantes pulmonares agudos e crônicos¹⁶⁰ e câncer de pulmão¹⁶¹. Por ser um colágeno menor, o Col (V) é normalmente sequestrado na MEC e, portanto, é ocultado do sistema imunológico. A remodelação da MEC induzida por células malignas pode causar exposição e superexpressão do Col (V), o que por sua vez pode levar ao desenvolvimento de imunidade anti-Col (V), facilitando a progressão do tumor. Além disso, na imunidade antitumoral, os linfócitos T citotóxicos CD8 e as células *natural killers* atuam como efetores, induzindo a apoptose das células tumorais¹⁶² e inibindo o crescimento do tumor¹⁶³. Além disso, relatórios anteriores sugerem que o amianto pode prejudicar gradualmente a imunidade antitumoral¹⁶⁴. Kumagai-Takei e colaboradores¹⁶⁵ demonstraram que os pacientes com MM apresentam comprometimento da citotoxicidade induzida pela estimulação dos linfócitos CD8 do sangue periférico, possivelmente relacionado à exposição ao amianto. Além disso, a exposição ao amianto está associada à produção de auto-anticorpos para células malignas e induz a deposição de colágeno por células malignas cultivadas¹⁶⁶. Em nossa coorte de pacientes expostos ao amianto, também mostramos que a baixa infiltração de linfócitos T CD8 no ambiente MM estava associada a comportamento agressivo, de acordo com relatos anteriores^{167,168}.

Em vista do potencial papel fisiopatológico do Col (V) no MM, os achados da IF foram extrapolados para a IHQ, de forma a investigar a empregabilidade do Col (V) como um marcador na rotina diagnóstica. Em ambas as técnicas, IF e IHQ, o padrão de deposição do Col (V) nas células neoplásicas foi uma informação relevante, correlacionada ao diagnóstico e ao evento final de sobrevida, como descrevemos na IHQ.

Propomos um modelo para a análise morfológica do Col (V) embasado em nossa interpretação de seu papel biológico. Como se vê na ilustração central da **Figura 4.1**, interpretamos que o Col (V) circunda as células neoplásicas do MM, inferência que fizemos da colocalização com o D2-40, a podoplanina, uma glicoproteína depositada na membrana celular. Como discutimos, o mecanismo fisiopatológico desse fenômeno nos é desconhecido e merece atenção em um segundo momento, porém inferimos que se dê pela síntese ao atingir o fenótipo ou a funcionalidade de células fibroblásticas.

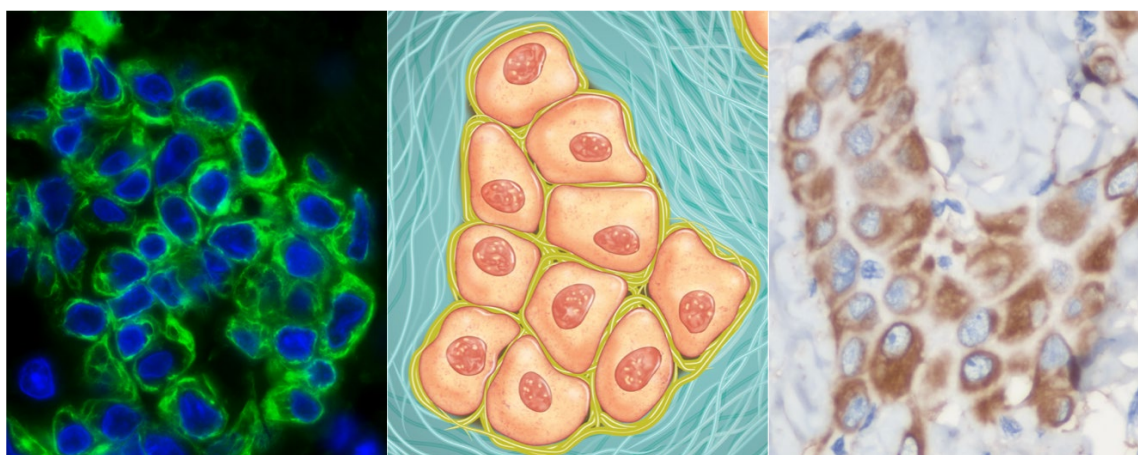


Figura 4.1. Proposição de modelo interpretativo do Col (V) como biomarcador diagnóstico e prognóstico no MM. IF (Col (V) em verde, DAPI em azul), ilustração com feixes finos de Col (V) em amarelo circundando as células neoplásicas e feixes grosseiros de Col (I) na MEC fora dos blocos celulares e IHQ do Col (V).

Dessa forma, entendemos que a interpretação do Col V na IF e na IHQ deva ser restrita às células mesoteliais, desconsiderando-se o elemento de deposição estromal. Notamos três padrões de interesse na IHQ, como apontamos na **Figura 3.15**: de células isoladas, correlacionado com o diagnóstico de MM e melhor grupo prognóstico; de blocos celulares, em que, à diferença das CI, a unidade circundada são blocos de células neoplásicas, não sendo claro o isolamento de célula a célula; e, finalmente, o padrão citoplasmático, inespecífico. Aproveitamos para salientar que, mesmo à revisão das demais diluições realizadas, o padrão citoplasmático manteve-se inalterado, excluindo a possibilidade de artefato da diluição eleita para o estudo. Esse tipo de deposição não foi identificado à IF, de forma que optamos por não a igualar ao grupo de deposição mista (com a presença de deposição em blocos e em células isoladas concomitantes).

Esse foi o primeiro passo na proposição de um biomarcador com potencial diagnóstico e prognóstico. Aproveitamos para reiterar que a validação para aplicação clínica da IHQ do

Col (V) deverá seguir um caminho longo, a exemplos de outros marcadores, como o Her-2¹⁶⁹⁻¹⁷², o painel de classificação dos tipos de câncer de mama¹⁷³, as proteínas de reparo de DNA¹²⁹ e mais recentemente, os marcadores para terapia alvo, incluindo alguns na natureza de *companion diagnosis*, entre eles ALK^{77,174}, PD-L1¹⁷⁵, ROS1¹⁷⁶ e NTRK¹⁷⁷.

Em primeiro ponto, entendemos da necessidade de assegurar a replicabilidade da classificação proposta nos padrões celulares; entendemos que há sutilezas na nossa proposta, em especial para diferenciar os padrões em bloco e células isoladas. Também ressaltamos a limitação da empregabilidade de IHQ de colágenos na prática clínica da patologia. Apesar da sua utilidade na exploração da oncogênese, as tentativas práticas de uso de Col (IV) foram restritas^{178,179}. Nesse paradigma, identificamos dois passos naturais a seguir, de forma concomitante: a expansão a estudos multicêntricos e o desenvolvimento de futuros trabalhos objetivando a melhoria técnica do anticorpo para IHQ.

O próximo passo no Col (V) como biomarcador é a associação com seu potencial terapêutico. Assim como existem tentativas de correlacionar sua ação à biologia tumoral, há estudos em andamento abarcando seu potencial imunogênico, inclusive em doenças benignas, como a esclerose sistêmica (em modelo experimental¹⁸⁰), a fibrose pulmonar (em estudo clínico¹⁸¹) e o carcinoma não pequenas células de pulmão¹¹⁰. No modelo experimental do câncer, o potencial de ação foi visto com administração nasal e indução de resposta imune com aumento da apoptose nas células malignas. Dessa forma, além de potencial diagnóstico e prognóstico, existe o potencial preditivo desse biomarcador.

Por todas as razões acima, não devemos nos surpreender ao saber que a combinação de fatores matriciais imunes pode fornecer informações prognósticas importantes sobre o MM. Nossos resultados confirmaram a importância prognóstica dos linfócitos T CD8 e Col (V) nessa neoplasia. Na análise de regressão de Cox, descobrimos que a exposição ao amianto, subtipo sarcomatoide, biópsia (*vs* ressecção cirúrgica) e quimioterapia adjuvante estavam significativamente relacionadas com o aumento do risco de morte na ausência de configuração de grupos de risco.

Nossa análise tem várias limitações que não puderam ser abordadas neste primeiro estudo quantitativo. Uma grande limitação foi a coorte relativamente pequena de 82 casos coletados retrospectivamente, com um seguimento máximo de 40 meses. Outra limitação foi o formato TMA, que poderia ter induzido sub ou sobre-representação de variáveis devido à heterogeneidade intratumoral. Aproveitamos para reiterar que esses são pontos fracos ubíquos às propostas de modelos no MM. O reflexo de ser um tumor raro é que os estudos trabalham com casuísticas limitadas, com redução de poder estatístico; talvez esse seja um ponto a ser

abordado, com estudos multicêntricos, de forma a aumentar o poder, uma vez que não existe uma concordância sólida nos fatores prognósticos eleitos para composição dos grupos de risco. Além disso, faltam dados sobre as respostas às terapias inibidoras do ponto de verificação imunológico em nossa população de pacientes. No futuro, esperamos poder realizar estudos semelhantes em amostras de pacientes tratados com essa terapia e com colaborações multicêntricas para redução do viés da raridade da doença.

CONCLUSÕES

1. *Conclusão Geral:*

Implementamos o modelo de fluxo de trabalho em patologia digital baseado em ferramentas *open-source*, com aprendizado de máquina e clinicamente validadas. Desses dados, geramos modelo prognóstico. Esse fluxo de trabalho é replicável a outras doenças. Mostramos que existem peculiaridades na composição da matriz extracelular do mesotelioma. Caracterizamos um novo biomarcador em potencial

2. *Conclusões Específicas:*

2.1 Existem diferenças na composição da MEC das variantes epitelióide e sarcomatóide do MM.

2.1.1 Existem particularidades na MEC do MM em comparação aos tumores comparados (pulmão e mama).

2.2 O fator morfológico diretamente correlacionado com sobrevida foi presença de necrose (uni e multivariáveis).

2.2.1 Grau nuclear e TILs não se correlacionaram independentemente com sobrevida.

2.3 A redução na expressão de PMS2 foi relacionada ao desfecho óbito, que pode indicar relação com carga mutacional.

2.4 Existe expressão de PD-L1 em células neoplásicas, mostrando potencial para ação de droga alvo.

2.4.1 É morfológicamente sinalizado por TILs, em especial linfócitos T CD8+.

2.5 O Mesotelioma Maligno é um tumor de fenótipo Transição Epitélio-mesênquima, que pode justificar seu comportamento agressivo e caráter multi fenotípico.

2.6 O padrão de expressão de colágeno V nas células neoplásicas do mesotelioma maligno é um potencial biomarcador diagnóstico e prognóstico, com aplicação prática na rotina diagnóstica da patologia cirúrgica.

REFERÊNCIAS

1. Mendes, R. Asbesto (amianto) e doença : revisão do conhecimento científico e fundamentação para uma urgente mudança da atual política brasileira sobre a questão Asbestos and disease : state-of-the-art review and a rationale for urgent change in current Brazilian p. *Cad. Saúde Pública* **17**, 7–29 (2001).
2. van Horsen, J. *A Town Called Asbestos: Environmental Contamination, Health, and Resilience in a Resource Community*. (UBC Press, 2016).
3. Archer, L. A small Canadian mining town is trying to leave its past behind, but can Asbestos ever escape the shadow cast by its history? *BBC* (2018).
4. Cavone, D. *et al.* Epidemiology of mesothelioma. *Environ. - MDPI* **6**, (2019).
5. Takahashi, K. & Landrigan, P. J. The Global Health Dimensions of Asbestos and Asbestos-Related Diseases. *Ann. Glob. Heal.* **82**, 209–213 (2016).
6. Landrigan, P. J. Comments on the Causation of Malignant Mesothelioma: Rebutting the False Concept That Recent Exposures to Asbestos Do Not Contribute to Causation of Mesothelioma. *Ann. Glob. Heal.* **82**, 214–216 (2016).
7. Pedra, F., Mattos, I. E. & Castro, H. A. Mesothelioma-mortality-rate-in-brazil-1980-to-2010. *Pedra*. **60**, 199–206 (2010).
8. WAGNER, J. C., SLEGGES, C. A. & MARCHAND, P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br. J. Ind. Med.* **17**, 260–271 (1960).
9. Watterson, A., Gorman, T., Malcolm, C., Robinson, M. & Beck, M. The economic costs of health service treatments for asbestos-related mesothelioma deaths. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1076**, 871–881 (2006).
10. Bahk, J., Choi, Y., Lim, S. & Paek, D. Why some, but not all, countries have banned asbestos. *Int. J. Occup. Environ. Health* **19**, 127–135 (2013).
11. Waldron, H. A. A brief history of scrotal cancer. *Br. J. Ind. Med.* **40**, 390–401 (1983).
12. Bartrip, P. W. J. History of asbestos related disease. *Postgrad. Med. J.* **80**, 72–76 (2004).
13. Røe, O. D. & Stella, G. M. Malignant pleural mesothelioma: History, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur. Respir. Rev.* **24**, 115–131 (2015).
14. Peto, J., Decarli, A., La Vecchia, C., Levi, F. & Negri, E. The European mesothelioma epidemic. *Br. J. Cancer* **79**, 666–672 (1999).
15. Pasetto, R., Terracini, B., Marsili, D. & Comba, P. Occupational burden of asbestos-related cancer in argentina, Brazil, Colombia, and Mexico. *Ann. Glob. Heal.* **80**, 263–268 (2014).
16. Beebe-Dimmer, J. L. *et al.* Mesothelioma in the United States: A surveillance, epidemiology, and end results (SEER)–medicare investigation of treatment patterns and overall survival. *Clin. Epidemiol.* **8**, 743–750 (2016).
17. Algranti, E. *et al.* Prevention of asbestos exposure in Latin America within a global public health perspective. *Ann. Glob. Heal.* **85**, 1–15 (2019).
18. Tompa, E. *et al.* The economic burden of lung cancer and mesothelioma due to occupational and para-occupational asbestos exposure. *Occup. Environ. Med.* **74**, 816–822 (2017).
19. Borrelli, E., Babcock, Z. & Kogut, S. Costs of medical care for mesothelioma. *Rare Tumors* **11**, (2019).
20. Reid, A. *et al.* Mesothelioma risk after 40 years since first exposure to asbestos: A pooled analysis. *Thorax* **69**, 843–850 (2014).
21. Guglielmucci, F., Franzoi, I. G., Zuffranieri, M. & Granieri, A. Living in contaminated sites: Which cost for psychic health? *Mediterr. J. Soc. Sci.* **6**, 207–214 (2015).
22. Moniz, M. de A. “Amianto, Perigo e invisibilidade: percepção de riscos ambientais e à saúde de moradores do município de Bom Jesus da Serra/ Bahia”. *Diss. Mestrado. FIOCRUZ* (2010).

23. Lieutaud, J. Historia anatomico-medica. *Hist. Anat.* **2**, (1767).
24. Du Bray, E. & Rosson, F. Primary Mesothelioma of the Pleura. *Arch Intern Med* **26**, 715–737 (1920).
25. Maximow, A. Ueber Das Mesothelium (Deckzellen Der Serösen Haute) Und Die Zellen Der Serösen Exudate. *Arch Exp Zelforsch* **4**, 1 (1927).
26. Klemperer, P. & Rabin, C. . Primary Neoplasms of the Pleura. A Report of Five Cases. *Arch. Pathol.* **11**, 385–412 (1931).
27. Mccaughey, W. T. E. PRIMARY TUMOCRS OF THE PLEURA. (1958).
28. Galateau-Salle, F., Churg, A., Roggli, V. & Travis, W. D. The 2015 world health organization classification of tumors of the pleura: Advances since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 142–154 (2016).
29. Ordóñez, N. G. Deciduoid mesothelioma: Report of 21 cases with review of the literature. *Mod. Pathol.* **25**, 1481–1495 (2012).
30. Ordóñez, N. G. Mesothelioma with signet-ring cell features: Report of 23 cases. *Mod. Pathol.* **26**, 370–384 (2013).
31. Husain, A. N. *et al.* Guidelines for pathologic diagnosis of Malignant Mesothelioma: 2017 Update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 89–108 (2018).
32. Minato, H. *et al.* Comparative immunohistochemical analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and desmin for distinguishing malignant mesothelioma from reactive mesothelial cells. *Am. J. Clin. Pathol.* **141**, 85–93 (2014).
33. Ordóñez, N. G. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod. Pathol.* **16**, 192–197 (2003).
34. Hassan, R. *et al.* Mesothelin immunotherapy for cancer: Ready for prime time? *J. Clin. Oncol.* **34**, 4171–4179 (2016).
35. Forte, I. M., Giordano, A. & Pentimalli, F. *Insert: Molecular Markers of Mesothelioma Aiding in Diagnostic Challenges: The Combined Use of p16 and BAP1. Malignant Pleural Mesothelioma* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-812724-7.00009-5.
36. Kadota, K. *et al.* A nuclear grading system is a strong predictor of survival in epitheloid diffuse malignant pleural mesothelioma. *Mod. Pathol.* **25**, 260–271 (2012).
37. Valente, K. *et al.* A Histomorphologic Grading System That Predicts Overall Survival in Diffuse Malignant Peritoneal Mesothelioma with Epithelioid Subtype. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 1243–1248 (2016).
38. Nicholson, A. G. *et al.* Eighth edition staging of thoracic malignancies: Implications for the reporting pathologist. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 645–661 (2018).
39. Kindler, H. L. *et al.* Treatment of malignant pleural mesothelioma: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol.* **36**, 1343–1373 (2018).
40. Thompson, J. K., MacPherson, M. B., Beuschel, S. L. & Shukla, A. Asbestos-Induced Mesothelial to Fibroblastic Transition Is Modulated by the Inflammasome. *Am. J. Pathol.* **187**, 665–678 (2017).
41. Acencio, M. M. P. *et al.* Inflammatory Cytokines Contribute to Asbestos-Induced Injury of Mesothelial Cells. *Lung* **193**, 831–837 (2015).
42. Sayan, M. & Mossman, B. T. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. *Part. Fibre Toxicol.* **13**, 1–15 (2016).
43. Sekido, Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis* **34**, 1413–1419 (2013).
44. Kato, S. *et al.* Genomic landscape of malignant mesotheliomas. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 2498–2507 (2016).
45. Soo, R. A. *et al.* Scientific Advances in Thoracic Oncology 2016. *J. Thorac. Oncol.* **12**, 1183–1209 (2017).

46. Lantuejoul, S., Le Stang, N., Damiola, F., Scherpereel, A. & Galateau-Sallé, F. PD-L1 Testing for Immune Checkpoint Inhibitors in Mesothelioma: For Want of Anything Better? *J. Thorac. Oncol.* **12**, 778–781 (2017).
47. Chatwal, M. S. & Tanvetyanon, T. Malignant mesothelioma clinical trial combines immunotherapy drugs. *Immunotherapy* **10**, 341–344 (2018).
48. Pasello, G. *et al.* Malignant pleural mesothelioma immune microenvironment and checkpoint expression: Correlation with clinical-pathological features and intratumor heterogeneity over time. *Ann. Oncol.* **29**, 1258–1265 (2018).
49. Lievens, L. A., Sterman, D. H., Cornelissen, R. & Aerts, J. G. Checkpoint blockade in lung cancer and mesothelioma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 274–282 (2017).
50. Mancuso, M. R. & Neal, J. W. Novel systemic therapy against malignant pleural mesothelioma. *Transl. Lung Cancer Res.* **6**, 295–314 (2017).
51. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545 (2001).
52. Hamanishi, J. *et al.* PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int. J. Clin. Oncol.* **21**, 462–473 (2016).
53. Laurent, S. *et al.* The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- α production. *J. Transl. Med.* **11**, 1–13 (2013).
54. Roncella, S. *et al.* CTLA-4 in mesothelioma patients: tissue expression, body fluid levels and possible relevance as a prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 909–917 (2016).
55. D’Amato-Brito, C. *et al.* Role of MIF/CD74 signaling pathway in the development of pleural mesothelioma. *Oncotarget* **7**, 11512–11525 (2016).
56. Otterstrom, C. *et al.* CD74: a new prognostic factor for patients with malignant pleural mesothelioma. *Br. J. Cancer* **110**, 2040–2046 (2014).
57. Dabir, S. *et al.* CD30 is a potential therapeutic target in malignant mesothelioma. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 740–746 (2015).
58. Dunphy, C. H., Gardner, L. J. & Bee, C. S. Malignant mesothelioma with CD30-positivity: A case report and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**, 1077–1079 (2000).
59. Cedrés, S. *et al.* Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *PLoS One* **10**, e0121071–e0121071 (2015).
60. Cedrés, S. *et al.* Analysis of expression of PTEN/PI3K pathway and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung Cancer* **96**, 1–6 (2016).
61. Khanna, S. *et al.* Malignant Mesothelioma Effusions Are Infiltrated by CD3(+) T Cells Highly Expressing PD-L1 and the PD-L1(+) Tumor Cells within These Effusions Are Susceptible to ADCC by the Anti-PD-L1 Antibody Avelumab. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 1993–2005 (2016).
62. Combaz-Lair, C. *et al.* Immune biomarkers PD-1/PD-L1 and TLR3 in malignant pleural mesotheliomas. *Hum. Pathol.* **52**, 9–18 (2016).
63. Mansour, M. S. I. *et al.* Determination of PD-L1 expression in effusions from mesothelioma by immuno-cytochemical staining. *Cancer Cytopathol.* **125**, 908–917 (2017).
64. Valmary-Degano, S. *et al.* Immunohistochemical evaluation of two antibodies against PD-L1 and prognostic significance of PD-L1 expression in epithelioid peritoneal malignant mesothelioma: A RENAPE study. *Eur. J. Surg. Oncol.* **43**, 1915–1923 (2017).
65. Terra, S. B. S. P., Mansfield, A. S., Dong, H., Peikert, T. & Roden, A. C. Temporal and

- spatial heterogeneity of programmed cell death 1-Ligand 1 expression in malignant mesothelioma. *Oncoimmunology* **6**, e1356146–e1356146 (2017).
66. Forest, F. *et al.* Nuclear grading, BAP1, mesothelin and PD-L1 expression in malignant pleural mesothelioma: prognostic implications. *Pathology* **50**, 635–641 (2018).
 67. Metaxas, Y. *et al.* Pembrolizumab as Palliative Immunotherapy in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 1784–1791 (2018).
 68. Inaguma, S. *et al.* Expression of ALCAM (CD166) and PD-L1 (CD274) independently predicts shorter survival in malignant pleural mesothelioma. *Hum. Pathol.* **71**, 1–7 (2018).
 69. Watanabe, T. *et al.* Four immunohistochemical assays to measure the PD-L1 expression in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget* **9**, 20769–20780 (2018).
 70. Quispel-Janssen, J. *et al.* Programmed Death 1 Blockade With Nivolumab in Patients With Recurrent Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 1569–1576 (2018).
 71. Patil, N. S. *et al.* Molecular and Histopathological Characterization of the Tumor Immune Microenvironment in Advanced Stage of Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 124–133 (2018).
 72. Pasello, G. *et al.* Malignant pleural mesothelioma immune microenvironment and checkpoint expression: correlation with clinical-pathological features and intratumor heterogeneity over time. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, 1258–1265 (2018).
 73. Losi, L. *et al.* Role of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes, programmed death-1 ligand 1 and mismatch repair proteins expression in malignant mesothelioma. *Int. J. Oncol.* **55**, 1157–1164 (2019).
 74. Calabrò, L. *et al.* Tremelimumab combined with durvalumab in patients with mesothelioma (NIBIT-MESO-1): an open-label, non-randomised, phase 2 study. *Lancet. Respir. Med.* **6**, 451–460 (2018).
 75. Chapel, D. B. *et al.* Tumor PD-L1 expression in malignant pleural and peritoneal mesothelioma by Dako PD-L1 22C3 pharmDx and Dako PD-L1 28-8 pharmDx assays. *Hum. Pathol.* **87**, 11–17 (2019).
 76. Wynes, M. W. *et al.* An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators. *J. Thorac. Oncol.* **9**, 631–638 (2014).
 77. Sobhani, N. *et al.* Tumour infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression as potential predictors of outcome in patients with malignant pleural mesothelioma. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 2713–2720 (2019).
 78. Derakhshan, F., Ionescu, D., Cheung, S. & Churg, A. Use of Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Staining to Separate Sarcomatoid Malignant Mesotheliomas From Benign Mesothelial Reactions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 10.5858/arpa.2019-0370-OA (2019) doi:10.5858/arpa.2019-0370-OA.
 79. Hotta, K., Fujimoto, N., Kozuki, T., Aoe, K. & Kiura, K. Nivolumab for the treatment of unresectable pleural mesothelioma. *Expert Opin. Biol. Ther.* **20**, 109–114 (2020).
 80. Ou, W. Bin *et al.* Co-targeting of FAK and MDM2 triggers additive anti-proliferative effects in mesothelioma via a coordinated reactivation of p53. *Br. J. Cancer* **115**, 1253–1263 (2016).
 81. Tada, Y. *et al.* Molecular-Targeted Therapy For Malignant Mesothelioma. *Pleura* **2**, 237399751560040 (2015).
 82. Villena-Vargas, J. & Adusumilli, P. S. Mesothelin-targeted immunotherapies for malignant pleural mesothelioma. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **1**, 466–46671 (2012).
 83. Andrici, J. *et al.* Loss of expression of BAP1 is a useful adjunct, which strongly supports

- the diagnosis of mesothelioma in effusion cytology. *Mod. Pathol.* **28**, 1360–1368 (2015).
84. Cigognetti, M. *et al.* BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod. Pathol.* **28**, 1043–1057 (2015).
 85. Hwang, H. C. *et al.* Utility of BAP1 immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology specimens. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 120–126 (2016).
 86. Singhi, A. D. *et al.* The prognostic significance of BAP1, NF2, and CDKN2A in malignant peritoneal mesothelioma. *Mod. Pathol.* **29**, 14–24 (2016).
 87. Bois, M. C. *et al.* C-Met expression and MET amplification in malignant pleural mesothelioma. *Ann. Diagn. Pathol.* **23**, 1–7 (2016).
 88. Adachi, Y., Yoshio-Hoshino, N., Aoki, C. & Nishimoto, N. VEGF targeting in mesotheliomas using an interleukin-6 signal inhibitor based on adenovirus gene delivery. *Anticancer Res.* **30**, 1947–1952 (2010).
 89. AOE, K. *et al.* Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Malignant Mesothelioma. *Anticancer Res.* **26**, 4833–4836 (2006).
 90. Yasumitsu, A. *et al.* Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **5**, 479–483 (2010).
 91. Bitanhirwe, B. K. Y. *et al.* PI3K/mTOR signaling in mesothelioma patients treated with induction chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy. *J. Thorac. Oncol.* **9**, 239–247 (2014).
 92. Dolly, S. O. *et al.* Indolent peritoneal mesothelioma: PI3K-mTOR inhibitors as a novel therapeutic strategy. *ESMO Open* **2**, 1–6 (2017).
 93. Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* **15**, 1243–1253 (2014).
 94. Theocharis, A. D., Manou, D. & Karamanos, N. K. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* **286**, 2830–2869 (2019).
 95. Rozario, T. & DeSimone, D. The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Dev Biol.* **341**, 126–140 (2011).
 96. Poltavets, V., Kochetkova, M., Pitson, S. M. & Samuel, M. S. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front. Oncol.* **8**, 1–19 (2018).
 97. Mak, K. M., Png, C. Y. M. & Lee, D. J. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat. Rec.* **299**, 613–629 (2016).
 98. Nardo, T. *et al.* Adhesion to type V collagen enhances staurosporine-induced apoptosis of adrenocortical cancer cells. *Tumour Biol.* **35**, 9949–9955 (2014).
 99. Zeng, X.-T., Liu, X.-P., Liu, T.-Z. & Wang, X.-H. The clinical significance of COL5A2 in patients with bladder cancer: A retrospective analysis of bladder cancer gene expression data. *Medicine (Baltimore)*. **97**, e0091–e0091 (2018).
 100. Meng, X.-Y. *et al.* The Role of COL5A2 in Patients With Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Bioinformatics Analysis of Public Datasets Involving 787 Subjects and 29 Cell Lines. *Front. Oncol.* **8**, 659 (2019).
 101. Huang, G., Ge, G., Izzi, V. & Greenspan, D. S. $\alpha 3$ Chains of type V collagen regulate breast tumour growth via glypican-1. *Nat. Commun.* **8**, 14351 (2017).
 102. Ren, W. *et al.* Overexpression of collagen type V $\alpha 1$ chain in human breast invasive ductal carcinoma is mediated by TGF- $\beta 1$. *Int. J. Oncol.* 10.3892/ijo.2018.4317 (2018) doi:10.3892/ijo.2018.4317.
 103. Barsky, S. H., Rao, C. N., Grotendorst, G. R. & Liotta, L. A. Increased content of Type V Collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* **108**, 276–283

- (1982).
104. Luparello, C., Sirchia, R. & Longo, A. Type V collagen and protein kinase C η down-regulation in 8701-BC breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* **52**, 348–358 (2013).
 105. Pucci-Minafra, I. & Luparello, C. Type V/type I collagen interactions in vitro and growth-inhibitory effect of hybrid substrates on 8701-BC carcinoma cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **23**, 67–74 (1991).
 106. Luparello, C. & Sirchia, R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **202**, 411–421 (2005).
 107. Wu, M. *et al.* Prospective molecular mechanism of COL5A1 in breast cancer based on a microarray, RNA sequencing and immunohistochemistry. *Oncol. Rep.* **42**, 151–175 (2019).
 108. Berchtold, S. *et al.* Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* **356**, 721–32 (2015).
 109. Parra, E. R. *et al.* Intranasal Administration of Type V Collagen Reduces Lung Carcinogenesis through Increasing Endothelial and Epithelial Apoptosis in a Urethane-Induced Lung Tumor Model. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **64**, 321–329 (2016).
 110. Liu, W. *et al.* COL5A1 may contribute the metastasis of lung adenocarcinoma. *Gene* **665**, 57–66 (2018).
 111. Souza, P. *et al.* Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* **41**, 239–48 (2010).
 112. Marian, B. & Danner, M. W. Skin tumor promotion is associated with increased type V collagen content in the dermis. *Carcinogenesis* **8**, 151–154 (1987).
 113. Chen, H.-C. *et al.* Differential clinical significance of COL5A1 and COL5A2 in tongue squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **48**, 468–476 (2019).
 114. Galateau Salle, F. *et al.* New Insights on Diagnostic Reproducibility of Biphasic Mesotheliomas: A Multi-Institutional Evaluation by the International Mesothelioma Panel From the MESOPATH Reference Center. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 1189–1203 (2018).
 115. Nicholson, A. G. *et al.* EURACAN/IASLC proposals for updating the histologic classification of pleural mesothelioma: towards a more multidisciplinary approach. *J. Thorac. Oncol.* **15**, 29–49 (2019).
 116. Galateau-Salle, F., Churg, A., Roggli, V. & Travis, W. D. The 2015 world health organization classification of tumors of the pleura: Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology* vol. 11 142–154 (2016).
 117. Kadota, K. *et al.* A nuclear grading system is a strong predictor of survival in epitheloid diffuse malignant pleural mesothelioma. *Mod. Pathol.* **25**, 260–71 (2012).
 118. Hendry, S. *et al.* Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Advances in Anatomic Pathology* vol. 24 311–335 (2017).
 119. Kao, S. C. H. *et al.* Validation of tissue microarray technology in malignant pleural mesothelioma. *Pathology* **43**, 128–132 (2011).
 120. Thapa, B. *et al.* The Immune Microenvironment, Genome-wide Copy Number Aberrations, and Survival in Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **12**, 850–859 (2017).
 121. Chee, S. J. *et al.* Evaluating the effect of immune cells on the outcome of patients with mesothelioma. *Br. J. Cancer* **117**, 1341–1348 (2017).

122. Russell Jr, H. K. A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch. Pathol.* **94**, 187–91 (1972).
123. MOVAT, H. Z. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA. Arch. Pathol.* **60**, 289–295 (1955).
124. Sigdel, S., Gemind, J. T. & Tomashefski, J. F. The Movat pentachrome stain as a means of identifying microcrystalline cellulose among other particulates found in lung tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 249–254 (2011).
125. Russell Jr, H. K. A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch. Pathol.* **94**, 187–191 (1972).
126. Lattouf, R. *et al.* Picosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 751–758 (2014).
127. Montes, G. S. *et al.* Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry* **65**, 131–141 (1980).
128. South, C. D. *et al.* Immunohistochemistry staining for the mismatch repair proteins in the clinical care of patients with colorectal cancer. *Genet. Med.* **11**, 812–817 (2009).
129. Kulangara, K. *et al.* Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **143**, 330–337 (2019).
130. Loughrey, M. B. *et al.* Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology* **73**, 327–338 (2018).
131. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
132. Arganda-Carreras, I. *et al.* Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics* **33**, 2424–2426 (2017).
133. Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447–455 (1979).
134. Livingston 3rd, D. P. *et al.* 3D volumes constructed from pixel-based images by digitally clearing plant and animal tissue. *J. Microsc.* **240**, 122–129 (2010).
135. Cardona, A. *et al.* TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS One* **7**, e38011–e38011 (2012).
136. Fedorov, A. *et al.* 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn. Reson. Imaging* **30**, 1323–1341 (2012).
137. Schubert, C., van Langeveld, M. C. & Donoso, L. A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 159–161 (2014).
138. Schmidt, R. & Ratto, M. Design-to-fabricate: maker hardware requires maker software. *IEEE Comput. Graph. Appl.* **33**, 26–34 (2013).
139. Cross, S. S. Grading and scoring in histopathology. *Histopathology* **33**, 99–106 (1998).
140. Droy-Dupré, L. *et al.* Hierarchical clustering identifies a subgroup of colonic adenocarcinomas expressing crypt-like differentiation markers, associated with MSS status and better prognosis. *Virchows Arch.* **466**, 383–391 (2015).
141. MOTTA, A. B. *et al.* Morphological aspects as a prognostic factor in malignant mesothelioma: a study of 58 cases. *J. bras. pneumol.* **32**, 322–332 (2006).
142. Pinheiro, G. A., Antão, V. C. S., Monteiro, M. M. T., Capelozzi, V. L. & Terra-Filho, M. Mortality from pleural mesothelioma in Rio de Janeiro, Brazil, 1979-2000: Estimation from death certificates, hospital records, and histopathologic assessments. *Int. J. Occup. Environ. Health* **9**, 147–152 (2003).
143. Yaziji, H. *et al.* Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma

- from adenocarcinoma: Identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Mod. Pathol.* **19**, 514–523 (2006).
144. Cury, P. M., Butcher, D. N., Corrin, B. & Nicholson, A. G. The use of histological and immunohistochemical markers to distinguish pleural malignant mesothelioma and in situ mesothelioma from reactive mesothelial hyperplasia and reactive pleural fibrosis. *J. Pathol.* **189**, 251–257 (1999).
 145. Sugarbaker, D. J. *et al.* Node status has prognostic significance in the multimodality therapy of diffuse, malignant mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **11**, 1172–8 (1993).
 146. Tsao, A. S., Wistuba, I., Roth, J. A. & Kindler, H. L. Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2081–2090 (2009).
 147. Sugarbaker, D. J. *et al.* Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **117**, 54–63; discussion 63-5 (1999).
 148. Provenzano, P. P. *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* **4**, (2006).
 149. Luparello, C., Sheterline, P., Pucci-Minafra, I. & Minafra, S. A comparison of spreading and motility behaviour of 8701-BC breast carcinoma cells on type I, I-trimer and type V collagen substrata. Evidence for a permissive effect of type I-trimer collagen on cell locomotion. *J. Cell Sci.* **100**, 179–185 (1991).
 150. Barsky, S. H., Rao, C. N., Grotendorst, G. R. & Liotta, L. A. Increased content of Type V Collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* **108**, 276–83 (1982).
 151. Batra, H. & Antony, V. B. The pleural mesothelium in development and disease. *Front. Physiol.* **5**, 284 (2014).
 152. Zhang, L. *et al.* Suppression for lung metastasis by depletion of collagen I and lysyl oxidase via losartan assisted with paclitaxel-loaded pH-sensitive liposomes in breast cancer. *Drug Deliv.* **23**, 2970–2979 (2016).
 153. Rennard, S. I. *et al.* Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **130**, 267–74 (1984).
 154. Laurent, G. J., Harrison, N. K. & McAnulty, R. J. The regulation of collagen production in normal lung and during interstitial lung disease. *Postgrad. Med. J.* **64 Suppl 4**, 26–34 (1988).
 155. Milligan, S. A., Owens, M. W., Henderson, R. J. & Grimes, S. R. Characterization of proteoglycans produced by rat pleural mesothelial cells in vitro. *Exp. Lung Res.* **21**, 559–575 (1995).
 156. Yung, S., Coles, G. A., Williams, J. D. & Davies, M. The source and possible significance of hyaluronan in the peritoneal cavity. *Kidney Int.* **46**, 527–33 (1994).
 157. Fischer, H., Stenling, R., Rubio, C. & Lindblom, A. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis* **22**, 875–8 (2001).
 158. Dart, M. L. *et al.* Interleukin-17-dependent autoimmunity to collagen type V in atherosclerosis. *Circ. Res.* **107**, 1106–16 (2010).
 159. Bobadilla, J. L. *et al.* Th-17, monokines, collagen type V, and primary graft dysfunction in lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 660–668 (2008).
 160. Fernandez-Madrid, F., Karvonen, R. L., Kraut, M. J., Czelusniak, B. & Ager, J. W. Autoimmunity to collagen in human lung cancer. *Cancer Res.* **56**, 121–126 (1996).
 161. Banchereau, J. & Palucka, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 296–306 (2005).

162. Yamada, N. *et al.* CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 1543–9 (2010).
163. Maeda, M. *et al.* Decreased CXCR3 expression in CD4⁺ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 795–803 (2011).
164. Kumagai-Takei, N. *et al.* Functional properties of CD8⁺ lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. *J. Immunol. Res.* **2014**, (2014).
165. Gilmer, J. *et al.* Mesothelial cell autoantibodies upregulate transcription factors associated with fibrosis. *Inhal. Toxicol.* **29**, 10–17 (2017).
166. Suzuki, K. *et al.* Chronic inflammation in tumor stroma is an independent predictor of prolonged survival in epithelioid malignant pleural mesothelioma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 1721–8 (2011).
167. Cornelissen, R. *et al.* Intratumoral macrophage phenotype and CD8⁺ T lymphocytes as potential tools to predict local tumor outgrowth at the intervention site in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **88**, 332–7 (2015).
168. Slamon, D. J. *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707–712 (1989).
169. Ramachandra, S., Machin, L., Ashley, S., Monaghan, P. & Gusterson, B. A. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in in situ breast carcinoma--a detailed morphological analysis. *J. Pathol.* **161**, 7–14 (1990).
170. Kerns, B. J., Pence, J. C., Huper, G., Kinney, R. B. & Iglehart, J. D. c-erbB-2 expression in breast cancer detected by immunoblotting and immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1823–1830 (1990).
171. van Diest, P. J., Baak, J. P., Chin, D., Theeuwes, J. W. & Bacus, S. S. Quantitation of HER-2/neu oncoprotein overexpression in invasive breast cancer by image analysis: a study comparing fresh and paraffin-embedded material. *Anal. Cell. Pathol.* **3**, 195–202 (1991).
172. Cheang, M. C. U. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736–750 (2009).
173. Hutarew, G., Hauser-Kronberger, C., Strasser, F., Llenos, I. C. & Dietze, O. Immunohistochemistry as a screening tool for ALK rearrangement in NSCLC: evaluation of five different ALK antibody clones and ALK FISH. *Histopathology* **65**, 398–407 (2014).
174. Hirsch, F. R. *et al.* PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J. Thorac. Oncol.* **12**, 208–222 (2017).
175. Conde, E. *et al.* Assessment of a New ROS1 Immunohistochemistry Clone (SP384) for the Identification of ROS1 Rearrangements in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma: the ROSING Study. *J. Thorac. Oncol.* **14**, 2120–2132 (2019).
176. Rudzinski, E. R. *et al.* Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **42**, 927–935 (2018).
177. Hewitt, R. E. *et al.* Laminin and collagen IV subunit distribution in normal and neoplastic tissues of colorectum and breast. *Br. J. Cancer* **75**, 221–229 (1997).
178. Tamamura, R. *et al.* Differential expression of basement membrane collagen-IV alpha1 to alpha6 chains during oral carcinogenesis. *Virchows Arch.* **449**, 358–366 (2006).
179. Velosa, A. P. P. *et al.* Collagen V-induced nasal tolerance downregulates pulmonary collagen mRNA gene and TGF-beta expression in experimental systemic sclerosis. *Respir. Res.* **11**, 1 (2010).

180. Wilkes, D. S. *et al.* Oral immunotherapy with type V collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **45**, 1393–1402 (2015).

ANEXO I
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relevância do Perfil Morfológico, Molecular e Imunomatricial como Sinalizadores de Alvos Terapêuticos no Mesotelioma Maligno

Pesquisador: Vera Luiza Capelozzi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79729317.1.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.394.571

Apresentação do Projeto:

Adequada. O pesquisador explica que trata-se de estudo de desenho retrospectivo, sem abordagem dos pacientes, com revisão de lâminas de histologia e confecção de tissue microarray (TMA) a partir de bloco representativo de neoplasia.d. Após revisão morfológica, será escolhido o bloco de melhor representatividade tumoral para confecção de áreas de interesse (03 punches centrais e 03 punches periféricos, se disponível representação periférica do tumor) para confecção do TMA, no qual serão realizados reações imunohistoquímica e imunofluorescência com quantificação.

Objetivo da Pesquisa:

o projeto visa o estabelecimento de relação entre os aspectos morfológicos, do microambiente tumoral, incluindo matriz extracelular e mediação imunitária à apresentação do MM em coorte retrospectiva de pacientes brasileiros, de forma a avaliar a possibilidade de novos alvos terapêuticos imunomediados e intrínsecos à biologia tumoral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Estudo observacional sem riscos.Possíveis Benefícios:Estabelecimentos de possíveis alvos terapêuticos e perfil prognóstico em pacientes com epidemiologia brasileira.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante sendo um estudo de caracter revisional que está focado na descrição do

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.394.571

perfil morfológico, histológico e imunohistoquímico em material coletado anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador menciona que trata-se de um projeto de doutorado, do aluno Marcelo Luiz Balancin.

Recomendações:

O estudo não envolve abordagem de pacientes, portanto não necessita de termo de consentimento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_977015.pdf	08/11/2017 16:44:01		Aceito
Outros	comv.pdf	08/11/2017 16:43:30	Vera Luiza Capelozzi	Aceito
Folha de Rosto	frmv.pdf	08/11/2017 16:42:41	Vera Luiza Capelozzi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	10/08/2017 17:28:40	Marcelo Luiz Balancin	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	10/08/2017 17:04:35	Marcelo Luiz Balancin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	10/08/2017 17:04:08	Marcelo Luiz Balancin	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.394.571

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Novembro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Memo 037/18

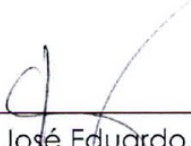
São Paulo, 10 de julho de 2018.

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Declaro estar ciente e de acordo com a participação do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, sob a responsabilidade e execução respectivas da Profa. Dra. Vera Demarchi Aiello e Dra. Vera Luiza Capelozzi, no protocolo de pesquisa SDC-COP 082/18/014 "Relevância no perfil morfológico, molecular e imunomatricial como sinalizadores de alvos terapêuticos no mesotelioma maligno". Trata-se de um projeto sem custo, conforme declarado pelos pesquisadores acima citados.

Este projeto encontra-se devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sob o parecer nº 2.394.571, relatoria em 23/11/2017, sob o CAAE 79729317.1.0000.0068.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Eduardo Krieger
Coordenação Administrativa dos Laboratórios de Pesquisa
do InCor-HCFMUSP

ANEXO II
ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO

Cancer Medicine

Preview

From: cancermed@wiley.com

To: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Subject: Cancer Medicine - Manuscript ID CAM4-2019-12-3994 [email ref: SE-6-a]

Body: 12-Dec-2019

Dear Dr. CAPELOZZI:

Your manuscript entitled "An Integrative Histopathologic Clustering Model Based on Immuno-matrix Elements to Predict the Risk of Death in Malignant Mesothelioma" by Balancin, Marcelo; Teodoro, Walcy; Farhat, Cecilia; Miranda, Tomaz; Assato, Aline; Souza, Neila; Velosa, Ana Paula; Falzoni, Roberto; Ab, Alexandre; Roden, Anja C.; CAPELOZZI, VERA, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Cancer Medicine.

The submitting author is the contact author for this paper, as such all further correspondence will be sent to Dr. VERA CAPELOZZI.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is CAM4-2019-12-3994.


Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/cancermedicine> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cancermedicine>.

Thank you for submitting your manuscript to Cancer Medicine.

Sincerely,
Cancer Medicine Editorial Office

Date Sent: 12-Dec-2019

 Close Window

An Integrative Histopathologic Clustering Model Based on Immuno-matrix Elements to Predict the Risk of Death in Malignant Mesothelioma

Abstract

Objective. Previous studies have reported a close relationship between malignant mesothelioma (MM) and the immune matrixial microenvironment (IMM). One of the major problems in these studies is the lack of adequate adjustment for potential confounders. Therefore, the aim of this study was to identify and quantify risk factors such as IMM and various tumour characteristics and their association with the subtype of MM and survival. **Methods.** We examined IMM and other tumor markers in tumour tissues from 82 patients with MM. These markers were evaluated by histochemistry, immunohistochemistry, immunofluorescence and morphometry. Logistic regression analysis, cluster analysis and Cox regression analysis were performed. **Results.** Hierarchical cluster analysis revealed two clusters of MM that were independent of clinicopathologic features. The high-risk cluster included MM with high tumour cellularity, high type V collagen (Col V) fibre density and low CD8+ T-lymphocyte density in the IMM. Our results showed that the risk of death was increased for patients with MM with high tumour cellularity (OR=1.63, 95% CI=1.29-2.89, p=0.02), overexpression of Col V (OR= 2.60, 95% CI=0.98-6.84, p=0.04) and decreased CD8 T-lymphocytes (OR=1.001, 95% CI=0.995-1.007, p=0.008). The hazard ratio for the high-risk cluster was 2.19 (95% CI=0.54-3.03, p<0.01) for mortality from MM at 40 months. **Conclusion.** Morphometric analysis of Col V, CD8+ T-lymphocytes and tumour cellularity can be used to identify patients with high risk of death from MM.

Key words. mesothelioma, extracellular matrix, biomarkers, collagen type V, immunomodulation, cluster analysis, computational pathology.

Introduction

Malignant mesothelioma (MM) is a highly lethal disease arising from mesothelial cells of the pleural, peritoneal, and pericardial cavities. The very low five-year survival rate of 16.6%¹ has not been improved over decades despite extensive research, indicating that a better and more detailed understanding of this type of cancer has to be achieved in order to design effective treatment strategies. The diagnosis of MM is complex because of various epithelial and/or mesenchymal patterns, its phenotypic variability from patient to patient, and its property of mimicking other cancers, particularly adenocarcinoma or benign processes which may lead to a delay of the diagnosis or inappropriate treatment². The histologic classification of MM includes three major subtypes: epithelioid (~60% of cases), sarcomatous (~20% of cases), and biphasic (~20% of cases)³. At present, histological subtype, lymph node status, and pathological TNM stage are prognostic factors for overall survival (OS)⁴⁻⁶. Patients diagnosed with epithelioid mesothelioma have the longest survival (12–27 months). The appropriate course of treatment of MM can be difficult to determine^{7, 8} and currently is largely guided by histological subtype, clinical stage and patient characteristics rather than objective biomarker signatures. Biomarkers that could assist in more individualized treatment are much needed. Thus, there is great interest in the development of biomarkers that might help to identify which MMs are likely to progress and lead to shorter survival of the patient⁹.

Autoimmune responses have been associated with asbestos exposure to induce antitumour immunity by CD8+ cytotoxic T-lymphocyte cells and extracellular matrix (ECM) synthesis^{10, 11}. The interaction between CD8+ cytotoxic T-lymphocyte cells and the ECM to identify mechanisms that might relate to tumour progression and shortened survival has been studied mainly in small and heterogeneous series and the data are inconclusive¹²⁻¹⁵. Because

the ECM plays a key regulatory role through a network of signalling molecules that alter the malignant potential of cells and consequently their invasive growth, quantitative and qualitative modifications of the collagen content of the ECM have been targeted as potentially useful tumour markers¹⁶⁻²². In MM, a pro-tumourigenic role of collagen type I (Col I) has been described²³, whereas the function of type V collagen (Col V) has not yet been thoroughly studied. Col V is a regulatory fibril-forming collagen which comprises only 2–5% of the total collagens in normal tissues. It has been shown that Col V-mediated activation of the β 1-integrin signalling pathway promotes cell migration and motility²⁴. It has also been reported that Col V overexpression may lead to the development of anti-Col V immunity facilitating tumour progression²⁵.

In this study, we explored the quantitative relationship between Col V and CD8+ T-lymphocytes and outcome of 82 patients with MM as well as their relationship with the tumour and tumor microenvironment factors. We first assessed the expression of several tumour and microenvironmental markers in epithelioid MM and sarcomatoid MM. Second, we explored the quantitative similarities between these factors by clustering to characterize a low and high-risk subgroup of MM. Finally, we tested the impact of the two subgroups on patient outcome.

Materials and methods

Case Selection and Clinicopathological Review

In this retrospective study patients with MM were retrieved from hospital records (2008 to 2018). The study was approved by the Ethics Committee of our Institution. Demographic and clinical data including follow-up data were obtained from medical records. All original slides were reviewed by two expert pathologists and classified according to the 2015 World Health Organization Classification of Pleural Tumors³. Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) were scored according to a three-tier scoring system for solid tumours, as previously proposed²⁶: score 1 (TILs occupy less than 10% of tumour area), score 2 (10-50%) and score 3 (more than 50%) exclusively in the intra-tumoural component. Nuclear grade was classified according to the guidelines proposed by Kadota and colleagues²⁷ (nuclear atypia, nuclear/cytoplasmic ratio, chromatin pattern, intranuclear inclusions, prominence of nucleoli, mitotic count, and atypical mitoses) and punctuated necrosis and classified in a three-tier system.

Tissue Microarray, Histochemistry, Immunohistochemistry and in situ Hybridization

Tumour tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Representative tumour blocks were selected after a review of all the original glass slides. Three 1.0 mm cores per case were annotated and extracted from the center of tumour areas, providing a triplicate sampling of all cases, totalling 229 valid cores for scoring (70% of cores) in a total of three recipient tissue microarray (TMA) blocks.

The slides were stained with a standard haematoxylin and eosin (H&E) staining protocol and with the modified Russel-Movat protocol²⁸, mixing five stains (alcian blue, Verhoeff hematoxylin, and Crocein Scarlet combined with acidic fuchsine and saffron at pH 2.5).

Supplementary Table 1 shows the primary antibodies, clones, dilution and source used for immunohistochemistry. Immunohistochemical staining was performed to evaluate immune cells (CD4, CD8, CD20, CD68), mismatch repair proteins (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), mesothelial cells (WT1, D2-40, MOC31, BerEP4), cellular characteristics (Ki-67, p53), and potential therapeutic targets (PD-1, PD-L1, CD30). The 4- μ m-thick TMA sections were subjected to immunohistochemistry staining with manual and automated techniques. For the manual technique, the Novolink Max Polymer (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK),

pressure cooking antigen retrieval, biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (Dako, Carpinteria, CA, USA; dilution 1:400), streptavidin combined in vitro with biotinylated horseradish peroxidase (Dako; dilution 1:1000), diaminobenzidine tetrahydrochloride, and counterstaining with haematoxylin were used. The automated technique was performed on a Ventana Benchmark Ultra Platform (Roche, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA) with the OptiView DAB IHD Detection Kit and OptiView Amplification Kit with proprietary protocols. IHC staining proteins were evaluated using a membrane algorithm to analyze immune checkpoint inhibitors, and a cytoplasmic algorithm to analyze immune cells and mismatch repair proteins, MOC31 and BerEP4. P53, WT1, D2-40 and Ki-67 protein were assessed using nuclear algorithm, which counted cells positive for expression PD-L1 was scored as tumor proportion score (Number of PD-L1-positive tumour cells divided by total number of tumour cells multiplied by 100).

In situ hybridization was employed to identify apoptosis via the nuclear expression of the tumour and surrounding environment by the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) method of nick-end labelling (TUNEL) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). This method involves the addition of deoxyuridine triphosphate labelled with fluorescein to the ends of the DNA fragments by the catalytic action of TdT. Paraffin-embedded sections (3-4 μm) were layered onto glass slides. The tissue sections were dewaxed with xylene and rehydrated with graded dilutions of ethanol in water. The sections were then washed 4 times with double distilled water for 2 minutes and immersed in TdT buffer (Boehringer Mannheim). Next, the sections were covered with TdT (0.3 U/ μl) and fluorescein-labelled deoxyuridine triphosphate in TdT buffer and then incubated in a humidified atmosphere at 37°C for 60 minutes. For negative controls, TdT was eliminated from the reaction mixture. The sections were then incubated with an antibody specific for fluorescein conjugated to peroxidase. The staining was observed with a substrate system, in which nuclei with DNA fragmentation stained brown. The reaction was terminated by washing the sections twice in phosphate-buffered saline (PBS). The nuclei without DNA fragmentation stained blue as a result of counterstaining with haematoxylin.

Immunofluorescence

To perform immunostaining for Col I and Col V, 3- μm paraffin-embedded sections were mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dewaxed in xylene and hydrated in graded ethanol. Antigen retrieval was determined by the enzymatic treatment of tissue with bovine pepsin (10,000 dry units/ml; Sigma Chemical Co.) in acetic acid buffer at 0.5 N (pH 2.2) (4 ng/ml) for 30 minutes at 37°C. Nonspecific sites were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 minutes at room temperature. The slides were then incubated overnight with rabbit polyclonal anti-human type I (1:200) and V (1:300) collagen (Rockland, Limerick, PA, USA). Additionally, double-type polyclonal anti-human type V collagen (1:300) and D2-40 (1:1000) (Dako) staining was performed. For negative controls, the sections were incubated with foetal bovine serum instead of the primary antibody. The same treatment was carried out for immunofluorescence detection. The sections were incubated with the same primary antibody diluted with PBS plus BSA 1% overnight at 4°C in a humidified atmosphere. The sections were then washed in PBS with Tween₂₀ 0.05% and incubated for 60 minutes at room temperature with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200, Invitrogen, Eugene, OR, USA) and Alexa 546-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Invitrogen, Eugene, OR, USA). The nuclei were counterstained with 0.4 mM/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; Molecular Probes™, Invitrogen, Eugene, OR, USA), for 15 minutes at room temperature. For negative and autofluorescence controls, the sections were incubated with PBS and normal rabbit or mouse serum instead of the specific antibody. Specimens were mounted with an aqueous mounting medium and observed

using immunofluorescence microscopy (Olympus BX51, Olympus, Japan). Image analysis was used to quantitate different types of collagen fibres (I and V) in the tumour microenvironment.

Image Analysis and Morphometry

All brightfield-observed slides were scanned using the Panoramic 250 whole slide scanner (3DHitech, Budapest, Hungary) at x40 magnification. Stained TMA sections were disarrayed within QuPath version 0.2.0-m4^{29, 30} (Centre for Cancer Research & Cell Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland), an open-source image analysis platform. All cores were evaluated during the scoring process to manually exclude invalid cores (less than 10% of tumour per core or artefacts).

For TMA quantification on QuPath, a simple automated semi-assisted method was employed. A desired threshold for positive cells was chosen for each marker after a few steps and posterior validation. Staining vectors were automatically analysed for each scanned TMA slide, followed by total tissue area detection, separation of tumour from non-tumour areas in each core and finally, automatic cellular detection. Positive cells were assigned through the optic density threshold from selected cells, tested on each core and after validation by an expert pathologist, applied to the whole array. For each marker, a threshold was employed after a manual trial-and-error fashion. For these data, the results were established as the number of positive cells per mm² of tissue and exported from the software. A corresponding script was then generated and executed on all imported TMA slides from each marker, automating the detection and exportation steps across all slides.

For Movat pentachrome staining quantification, the machine learning Trainable Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis Segmentation) plugin³¹ was used in ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). A training set was created by a pathologist from 20 10x10 titles compiled from the ground-truth areas of all slides. Reticulin, elastin, collagen, cells, hyaluronic acid and background were assigned to separate monochrome colours (red, black, yellow, purple, blue and pink, respectively) for an 8-bit segmented image. Colour-specific thresholds were applied and generated 8-bit monochrome images per component for quantification. The data were extracted as a percentage of expression per mm².

For fluorescent images, a low-power image of the TMA core was acquired followed by four 40x images of all filters of interest through an Olympus camera (Olympus Co., St. Laurent, Quebec, Canada) coupled to an Olympus microscope (Olympus BX51) using Image-Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). All high-power fluorescence images were segmented through selective optical threshold densities on Image-Pro Plus, and the data were extracted as collagen constitution per mm².

All computational pathology was performed on an off-the-shelf Intel Core i7 6700K with 32 GB RAM and 512 GB SSD running the mentioned software on Windows 10 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS v18 (Chicago, IL, USA) for Windows. The relationships between quantitative variables were evaluated by Student's t test, and analysis of variance was used to correlate staining patterns. Multivariate analysis was carried out using the Cox proportional hazards ratio. In addition, paired-samples t test and general linear model were used to test the relationship between one continuous variable and several others. A two-tier cluster model was elaborated in a semi-assisted fashion using the hierarchical clustering feature, and significant factors were selected based on the multivariate regression model and biological significance, integrating cellular, immunologic and matrix elements. Multiple models were generated, and the most significant model that integrated the desired

elements and correlated with the survival endpoint was chosen. The cumulative OS time was calculated by the Kaplan-Meier method and analysed by the log-rank test. For all tests, a two-tailed p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

The clinical and histologic characteristics of the patients are summarized in **Table 1**. All patients were of stage III or IV. The median follow-up time of the patients was 22 and 18 months for epithelioid and sarcomatoid histotypes, respectively. Forty-nine (56%) patients died of recurrence or metastases.

Epithelioid and sarcomatoid MM are represented in **Figs. 1-4**. Epithelioid MM (Fig. 1-A) show high tumour cellularity (Fig. 1-C) in tumor stroma with dense hyaluronic acid deposition (Fig. 1-C). Epithelioid MM also exhibit a strong green birefringence of Col I (Fig. 2-A) and V (Fig. 2-C) fibres under fluorescence microscopy. In epithelioid MM both collagen fibres are organized in a dense and irregular fibrillar pattern; however, Col I fibres surround groups of malignant cells, while Col V fibres involve individual malignant cells (Fig. 2-G). In epithelioid MM, CD8+ T-lymphocytes (Fig. 3-A) are diffusely distributed and CD20+ B lymphocytes (Fig. 3-C) are patchy distributed. Malignant cells of epithelioid MM show strong expression of P53 (Fig. 3-E) and PMS2 (Fig. 3-G). In contrast, sarcomatoid MM (Fig. 1-B) have modest tumour cellularity and hyaluronic acid deposition (Fig. 1-D) as well as a distortion of the tumoural environment and a diffuse green birefringence of Col I (Fig. 2-B) and Col V (Fig. 2-D) fibres. In sarcomatoid MM, Col I fibres are organized predominantly in elongated thick fibres in individual large groups of sarcomatoid cells. Col V forms a more regular texture with thin fibres involving individual sarcomatoid cells coinciding with the fusiform pattern visualized under H&E staining. Double staining for Col V and D2-40 confirms the specificity of Col V expression surround MM cells (Fig. 2-E, F). Sparse CD8+ T-lymphocytes (Fig. 3-B) and CD20+ B lymphocytes (Fig. 3-D) are found in the environment of sarcomatoid MM. The malignant cells in these tumours retain similar P53 expression (Fig. 3-F) and PMS2 (Fig. 3-H).

Table 2 summarizes the morphometric results of the tumours and surrounding microenvironment. Univariate analysis showed that epithelioid MM exhibit higher tumour cellularity, and more tumor cells expressing p53 protein and preserved PMS2 expression than sarcomatoid MM. Furthermore, epithelioid MM harboured significant more total collagen, Col I and elastic fibres as well as CD8 T-lymphocytes than sarcomatoid MM.

The morphometric variables that differed significantly between epithelioid and sarcomatoid MM by univariate analysis (nuclear grade, tumour cellularity, p53 protein, PMS2 mismatch repair protein, hyaluronic acid, elastic fibres, total collagen, Col I, Col V, and CD8+ T-lymphocytes) were grouped by hierarchical cluster analyses independent of clinicopathological variables; two clusters of patients with 67 subjects in cluster 1 (CL I) and 15 in cluster 2 (CL II) were identified (**Fig. 3-A, B; Table 3**). Fig. 3-A shows the cluster dendrogram, separating two groups by dispersion similarities, as plotted in the scatterplot (Fig. 3-B). CL I, categorized as low risk for death of disease, includes tumours with a cellularity of less than 80.6 cells/mm², Col V fibre density of less than 7.75 fibres/mm³ and CD8 T-lymphocyte mean cellularity of more than 99.77 cells/mm². CL II, categorized as high risk, is comprised of MM with a cellularity of more than 80.6 cells/mm², Col V fibre density of more than 7.75 fibres/mm³ and CD8 T-lymphocyte cellularity of less than 99.77 cells/mm².

The results of the multivariable analysis are summarized in table 4. Multivariate analysis shows that tumour cellularity > 80.6 cells/mm², Col V > 7.75 fibres/mm³ and CD8 T-lymphocytes < 99.77 cells/mm² are associated with an increased risk of death. Patients with MM in CL II had twice the risk of death than patients in CL I.

Results of univariate and multivariate analysis of clinicopathologic variables in relationship to risk of death at 40 months are summarized in **Table 5**. Asbestos exposure, biopsy (vs surgical resection) and high cluster group are associated with increased risk of death at 40 months in univariate analysis. Biopsy (vs surgical resection) and high cluster group continued to be significant for risk of death at 40 months in the multivariate analysis; no chemotherapy became significant while asbestos exposure was not associated with outcome anymore. Whereas the overall likelihood ratio of the Cox model using asbestos exposure, histotype and treatment alone was only 12.42, the likelihood ratio with treatment and cluster groups was 15.05. **Fig. 5-C** shows the Kaplan-Meier curves of the high-risk and low-risk clusters for all MM. The patients in the low risk cluster CLI had a better overall survival with a median survival time that was not reached during follow-up and a mean survival time of 21 months. In contrast, patients in the high risk cluster CL2 had a shorter median survival time of only 12 months ($p = 0.03$).

Discussion

In this study, we found a variety of associated effects on the behaviour of MM, including the following: (1) the clinicopathological characteristics of our cohort was in agreement with other studies; (2) an objective quantitative approach to evaluate tumour and microenvironment biomarkers was established; (3) validation of established clustering as the grouping of objects by calculating similarities in high-throughput protein analyses was performed to characterize two subgroups of MM risk; (4) Col V, CD8+ T-lymphocytes and tumour cellularity densities characterized high and low risk subgroups with impact on outcome, independent of the histologic grade, classification and other tumour factors; and (5) a low mutational burden and the tumour microenvironment rather than genetic abnormalities in MM cells contributed to MM asbestos-related progression. To the best of our knowledge, this was the first study to analyse the associations between the potential effect of a quantitative approach for immune profiling and the matricial modulatory control of MM behaviour.

Our cohort included 82 MM patients. The clinicopathological characteristics of the patients concurs with previous studies concerning clinicopathological characteristics including age, sex, asbestos exposure, histologic subtypes³, site of MM¹, stage⁵ and survival^{4,6}. Although surgical resection was performed in the majority of our patients followed by adjuvant chemotherapy, 49 (56%) patients died of disease. Therefore, risk stratification of patients with MM using prognostic and predictive biomarkers is important. Despite advances in our understanding of the pathogenesis of MM, there are complex challenges in identifying such biomarkers. One of the major problems is the lack of adequate adjustment for potential confounders. For instance, the reporting of biomarkers differs greatly between studies with some using binary cut-points to define a positive tumour or reporting results in a semiquantitative fashion and others expressing staining in relation to stromal staining or expression of other proteins

From this study, using an artificial intelligence quantitative approach, we evaluated the association between tumour and tumour microenvironment and the behaviour of MM in these patients. Univariate analysis showed that epithelioid MM presented with high cellularity and expression of p53 protein and retained expression of PMS2 protein, while the environment showed high amounts of total collagen, Col I, elastic fibres and high numbers of CD8+ T-lymphocytes. In contrast, sarcomatoid MM tumours showed lower cellularity, no p53 expression and lack of expression of PMS2 protein, together with increased total collagen fibres. Col V was similarly present around mesothelial tumour cells coinciding with hyaluronic acid expression in both histologic types. The presence of p53 expression and preserved expression of PMS2 protein indicates a low mutational burden, while collagen fibres and

immune cells compose a rich microenvironment rather than genetic abnormalities in MM cells, which may contribute to MM progression.

Subsequently, these variables that were significantly different between epithelioid and sarcomatoid MM and independent of clinicopathological variables, were grouped by calculating similarities in high-throughput protein analyses for characterizing different subgroups of MM. This analysis identified two subgroups of patients composing CL I (low risk of death) and CL II (high risk of death). Overall, our results showed that the risk of death was increased for patients in cluster II that was characterized by increased tumour cellularity, denser Col V fibres and less CD8 T-lymphocytes. In fact, these patients had two times the risk of death than patients in CL I.

Our CL II indicates that Col V is present in increased amounts in the ECM microenvironment of MM. We have shown that in epithelioid MM, Col I fibres surround groups of malignant cells, while Col V fibres surround individual malignant cells. In contrast, in sarcomatoid MM, Col I fibres show a different pattern and are organized as elongated thick fibres involving large groups of tumor cells in a radial alignment, while Col V fibres form a more regular texture with thin fibres involving individual malignant fusiform cells. In particular, local cell invasion has been found to be predominantly oriented along certain aligned collagen fibres, suggesting that the radial alignment of Col fibres relative to tumour cells facilitates invasion³³. The reappearance of the 'embryonic' Col I-trimer and an increase in Col V content in the ECM of breast carcinoma have been postulated³⁴. Luparello and colleagues³⁴ compared the effects of these two collagen types with Col I as culture substrata on the spreading pattern, cytoskeletal organization and motile behaviour of cultured breast carcinoma cells. They found that cells grown on Col I were stationary, with a well spread morphology and an extensive stress fibre pattern, while cells grown on Col V were also stationary but exhibited a poorly spread and elongated morphology. In contrast, cells grown on Col I-trimer were motile and displayed a compact arrangement and a reduced content of stress fibres. Both single-cell and group motility were detectable on trimer Col substratum. These data are consistent with the existence of two opposite local signals, Col I-trimer and Col V, which may confer different metastatic phenotypes in breast carcinoma cells. In other words, the re-deposition of 'embryonic' Col in ECM, produced by the tumour cells themselves, may be involved in stromal pathways that allow the neoplastic cells to infiltrate the surrounding host tissue, by analogy with the 'contact guidance' role of the ECM substrata during development.

Our present results raise questions concerning the origin of increased Col V. We showed evidence suggesting that the source of Col V in the environment is related to invasive tumour cells. Immunofluorescence data consistently revealed the presence of Col V involving the membrane of invasive tumour cells. The pattern of Col V in the stroma as fibrillar and linear deposits, in contrast to the more diffuse homogeneous distribution of Col I, emphasizes the unique distribution properties of Col V as a pericellular interstitial collagen in the ECM environment. Our observations of the presence of Col V involving the tumour cells are different from the observations of other investigators in other carcinomas, including breast carcinoma. These carcinomas consistently synthesized Col V, which occurred as linear deposits in the interstitium (desmoplastic stroma surrounding the tumour)^{33,35}. We were able to demonstrate pericellular membranous staining of Col V with our immunofluorescence technique. We therefore hypothesized that the increased Col V observed in the ECM microenvironment represented a host response to invasive MM and that this collagen was synthesized by MM cells. While the precise origin of Col V is, in general, still controversial, Col V is thought to be present adjacent to the basement membranes of mesothelial cells (MCs) and occur as a pericellular collagen. In fact, MCs are epithelial-like cells that are embryologically derived from the mesoderm and express mesenchymal features, including vimentin and desmin³⁶. MCs are pluripotent cells capable of

synthesizing cytokines/chemokines, growth factors, ECM molecules (including collagen types I, III, and IV), elastin, fibronectin, laminin, and proteoglycans^{19, 37–41}. Therefore, we hypothesized that MCs have the ability to synthesize Col V. Our present observation of increased Col V in the ECM microenvironment raises the possibility that infiltrating MM stimulates malignant cells to secrete Col V. Our observations of increased Col V in MM are similar to previous findings in breast cancer³⁵, colorectal cancer⁴², lung cancer⁴³ and primary pancreatic ductal carcinoma⁴⁴.

Col V has also been reported as an autoantigen in chronic inflammatory diseases⁴⁵, acute and chronic lung transplants⁴⁶ and lung cancer²⁵. As a minor collagen in the ECM, Col V is normally sequestered within the ECM and is therefore hidden from the immune system. ECM remodelling induced by malignant cells may cause Col V exposure and overexpression, which may in turn lead to the development of anti-Col V immunity facilitating tumour progression. Additionally, in antitumour immunity, CD8+ cytotoxic T-lymphocytes and natural killer cells play a role as effectors, inducing tumour cell apoptosis⁴⁷ and thus inhibiting tumour growth¹². Furthermore, previous reports suggest that asbestos might gradually impair antitumour immunity⁴⁸. Kumagai-Takei and colleagues⁴⁹ demonstrated that MM patients present features of impairment in the stimulation-induced cytotoxicity of peripheral blood CD8+ lymphocytes, possibly related to asbestos exposure. Moreover, asbestos exposure is associated with the production of MC autoantibodies and induces collagen deposition by cultured MCs¹¹. In our cohort of patients exposed to asbestos, we also showed that low CD8+ T-lymphocyte infiltration in the MM environment was associated with aggressive behaviour, in agreement with previous reports^{50, 51}.

Thus, for all the above reasons, we should not be surprised to learn that combining immune matricial factors may provide important prognostic information about MM. Our results have confirmed the prognostic importance of Col V and CD8+ T-lymphocytes in this malignancy. In the Cox regression analysis, we found that asbestos exposure, sarcomatoid subtype, biopsy (vs surgical resection) and adjuvant chemotherapy were significantly related with increased risk of death in the absence of cluster groups; moreover, when cluster groups were present as covariates, their relationship to increased risk of death was much stronger.

Our analysis has a number of limitations that could not be addressed in this first quantitative study. A major limitation was the relatively small cohort of 82 retrospectively collected cases with a maximum follow-up of 40 months. Another limitation was the TMA format, which could have induced under- or overrepresentation of variables due to intratumoral heterogeneity. Furthermore, we lacked data regarding responses to immune checkpoint inhibitor therapies in our patient population. In the future, we hope to be able to perform similar studies on samples from patients treated with such therapy.

We conclude that in our cohort, asbestos-related MM were characterized by a low mutational burden and a distinct tumour microenvironment rather than genetic abnormalities. Col V fibre density and CD8+ T-lymphocytes in tumours with high cellularity might be potential targets for therapies that control tumour growth rate, motility, and invasion in MM.

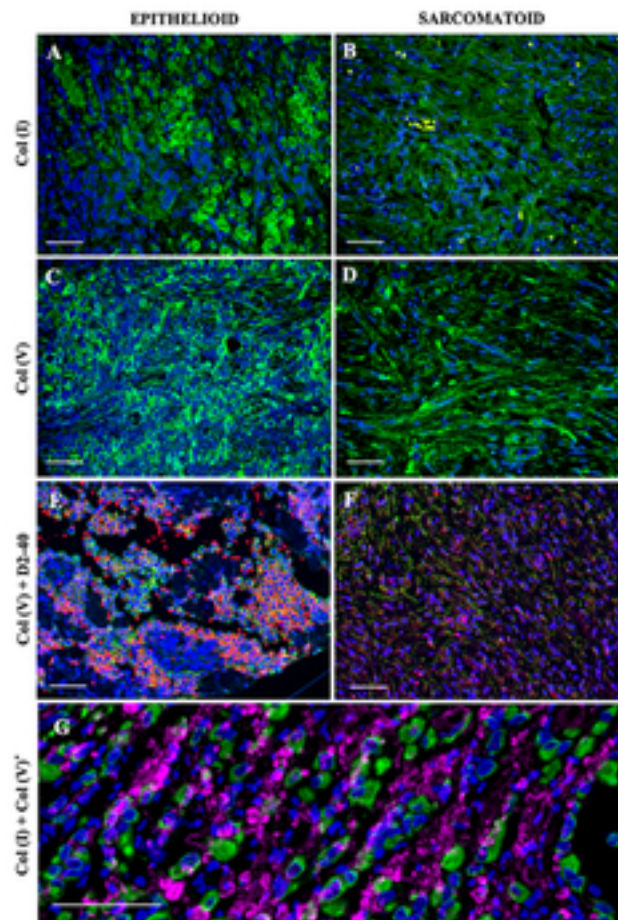
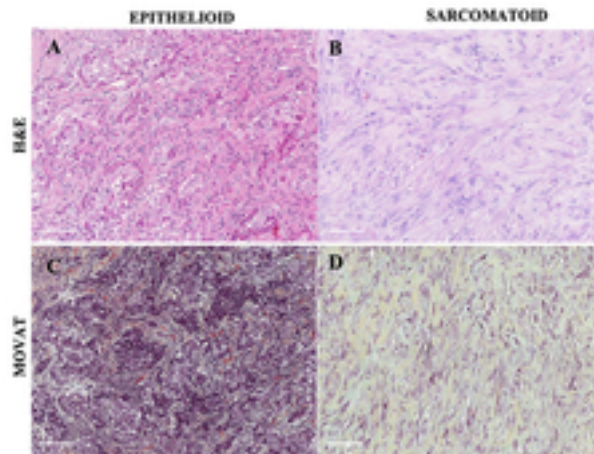
References

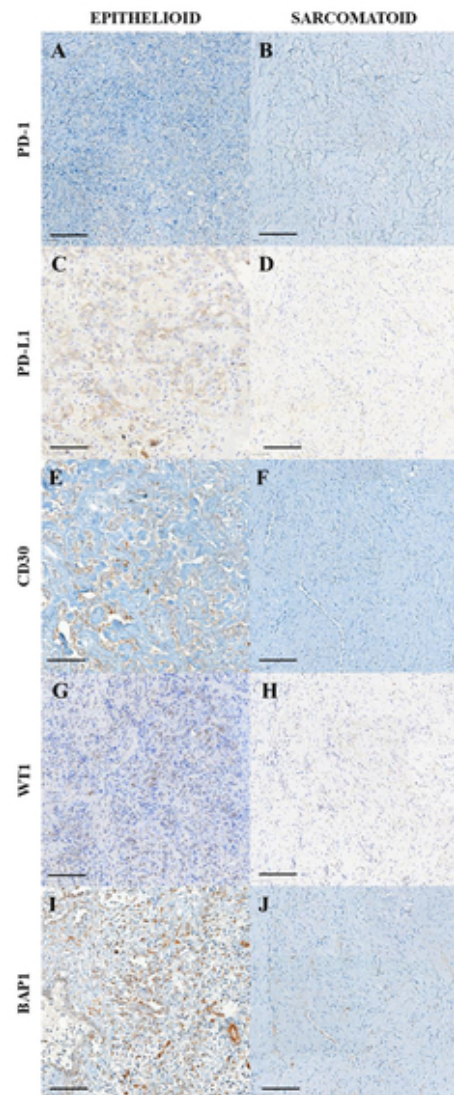
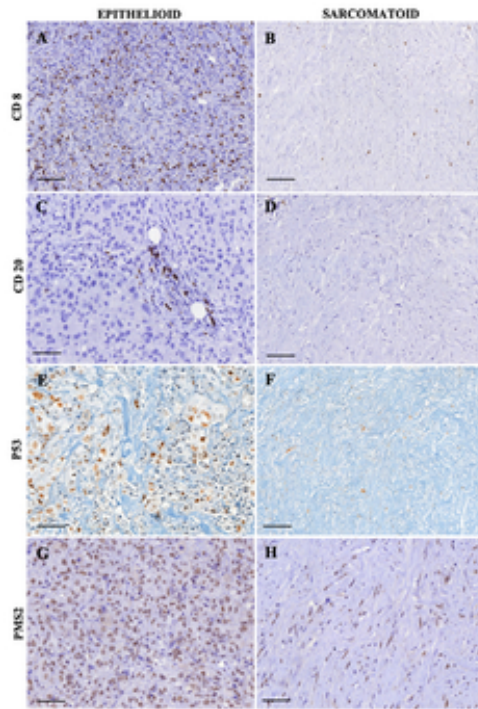
- 1 Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, et al. Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**; 2081-2090.
- 2 Ascoli V. Pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: chronological prospect and advent of recommendations and guidelines. *Ann. Ist. Super. Sanita* 2015; **51**; 52-59.
- 3 Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, et al. The 2015 world health organization classification of tumors of the pleura: Advances since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol.* 2016; **11**; 142-154.
- 4 Sugarbaker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT, et al. Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural

- mesothelioma: results in 183 patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1999; **117**; 54-63; discussion 63-5.
- 5 Sugarbaker DJ, Strauss GM, Lynch TJ, et al. Node status has prognostic significance in the multimodality therapy of diffuse, malignant mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 1993; **11**; 1172-1178.
 - 6 Rusch VW, Venkatraman ES. Important prognostic factors in patients with malignant pleural mesothelioma, managed surgically. *Ann. Thorac. Surg.* 1999; **68**; 1799-1804.
 - 7 National Lung Cancer Audit. National Lung Cancer Audit Report 2014. Report for the period 2008-2012.
 - 8 National Lung Cancer Audit. National Lung Cancer Audit Report 2014 Mesothelioma Report. Report for the Period 2008-2012.; 2014.
 - 9 Panou V, Vyberg M, Weinreich UM, et al. The established and future biomarkers of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat. Rev.* 2015; **41**; 486-495.
 - 10 Carbone M, Yang H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* 2012; **18**; 598-604.
 - 11 Gilmer J, Harding T, Woods L, et al. Mesothelial cell autoantibodies upregulate transcription factors associated with fibrosis. *Inhal. Toxicol.* 2017; **29**; 10-17.
 - 12 Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010; **59**; 1543-1549.
 - 13 Ujiie H, Kadota K, Nitadori J-I, et al. The tumoral and stromal immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma: A comprehensive analysis reveals prognostic immune markers. *Oncoimmunology* 2015; **4**; e1009285.
 - 14 Burt BM, Rodig SJ, Tilleman TR, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cells predict survival in human pleural mesothelioma. *Cancer* 2011; **117**; 5234-5244.
 - 15 Pasello G, Zago G, Lunardi F, et al. Malignant pleural mesothelioma immune microenvironment and checkpoint expression: Correlation with clinical-pathological features and intratumor heterogeneity over time. *Ann. Oncol.* 2018; **29**; 1258-1265.
 - 16 Kauppila S, Stenbäck F, Risteli J, et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J. Pathol.* 1998; **186**; 262-268.
 - 17 Lewko WM, Liotta LA, Wicha MS, et al. Sensitivity of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors to cis-hydroxyproline, an inhibitor of collagen production. *Cancer Res.* 1981; **41**; 2855-2862.
 - 18 Gilkes DM, Chaturvedi P, Bajpai S, et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013; **73**; 3285-3296.
 - 19 Zhang L, Wang Y, Xia T, et al. Suppression for lung metastasis by depletion of collagen I and lysyl oxidase via losartan assisted with paclitaxel-loaded pH-sensitive liposomes in breast cancer. *Drug Deliv.* 2016; **23**; 2970-2979.
 - 20 Karousou E, D'Angelo ML, Kouvidi K, et al. Collagen VI and hyaluronan: the common role in breast cancer. *Biomed Res. Int.* 2014; **2014**; 606458.
 - 21 Klominek J, Sumitran Karuppan S, Hauzenberger D. Differential motile response of human malignant mesothelioma cells to fibronectin, laminin and collagen type IV: the role of beta1 integrins. *Int. J. cancer* 1997; **72**; 1034-1044.
 - 22 Fang M, Yuan J, Peng C, et al. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol.* 2014; **35**; 2871-2882.
 - 23 Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019; **38**.
 - 24 Larsen M, Tremblay ML, Yamada KM. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; **4**; 700-711.
 - 25 Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Kraut MJ, et al. Autoimmunity to collagen in human lung cancer. *Cancer Res.* 1996; **56**; 121-126.
 - 26 Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma,

- Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv. Anat. Pathol.* 2017; **24**; 311-335.
- 27 Kadota K, Suzuki K, Colovos C, et al. A nuclear grading system is a strong predictor of survival in epitheloid diffuse malignant pleural mesothelioma. *Mod. Pathol.* 2012; **25**; 260-271.
 - 28 Russell Jr HK. A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch. Pathol.* 1972; **94**; 187-191.
 - 29 Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 2017; **7**.
 - 30 Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG, et al. Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology* 2018; **73**; 327-338.
 - 31 Arganda-Carreras I, Kaynig V, Rueden C, et al. Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics* 2017; **33**; 2424-2426.
 - 32 Chapel DB, Churg A, Santoni-Rugiu E, et al. Molecular pathways and diagnosis in malignant mesothelioma: A review of the 14th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group. *Lung Cancer* 2019; **127**; 69-75.
 - 33 Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* 2006; **4**.
 - 34 Luparello C, Sheterline P, Pucci-Minafra I, et al. A comparison of spreading and motility behaviour of 8701-BC breast carcinoma cells on type I, I-trimer and type V collagen substrata. Evidence for a permissive effect of type I-trimer collagen on cell locomotion. *J. Cell Sci.* 1991; **100**; 179-185.
 - 35 Barsky SH, Rao CN, Grotendorst GR, et al. Increased content of Type V Collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 1982; **108**; 276-283.
 - 36 Batra H, Antony VB. The pleural mesothelium in development and disease. *Front. Physiol.* 2014; **5**; 284.
 - 37 Rennard SI, Jaurand MC, Bignon J, et al. Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; **130**; 267-274.
 - 38 Laurent GJ, Harrison NK, McAnulty RJ. The regulation of collagen production in normal lung and during interstitial lung disease. *Postgrad. Med. J.* 1988; **64 Suppl 4**; 26-34.
 - 39 Owens MW, Grimes SR. Pleural mesothelial cell response to inflammation: tumor necrosis factor-induced mitogenesis and collagen synthesis. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**; L382-8.
 - 40 Milligan SA, Owens MW, Henderson RJ, et al. Characterization of proteoglycans produced by rat pleural mesothelial cells in vitro. *Exp. Lung Res.* 1995; **21**; 559-575.
 - 41 Yung S, Coles GA, Williams JD, et al. The source and possible significance of hyaluronan in the peritoneal cavity. *Kidney Int.* 1994; **46**; 527-533.
 - 42 Fischer H, Stenling R, Rubio C, et al. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis* 2001; **22**; 875-878.
 - 43 Souza P, Rizzardi F, Noleto G, et al. Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* 2010; **41**; 239-248.
 - 44 Berchtold S, Grünwald B, Krüger A, et al. Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 2015; **356**; 721-732.
 - 45 Dart ML, Jankowska-Gan E, Huang G, et al. Interleukin-17-dependent autoimmunity to collagen type V in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2010; **107**; 1106-1116.
 - 46 Bobadilla JL, Love RB, Jankowska-Gan E, et al. Th-17, monokines, collagen type V, and primary graft dysfunction in lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; **177**; 660-668.
 - 47 Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; **5**; 296-306.
 - 48 Maeda M, Nishimura Y, Hayashi H, et al. Decreased CXCR3 expression in CD4 + T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; **45**; 795-803.
 - 49 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, et al. Functional properties of CD8+ lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. *J. Immunol. Res.* 2014; **2014**.

- 50 Suzuki K, Kadota K, Sima CS, et al. Chronic inflammation in tumor stroma is an independent predictor of prolonged survival in epithelioid malignant pleural mesothelioma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 2011; **60**; 1721-1728.
- 51 Cornelissen R, Lievens LA, Robertus J-L, et al. Intratumoral macrophage phenotype and CD8+ T lymphocytes as potential tools to predict local tumor outgrowth at the intervention site in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 2015; **88**; 332-337.





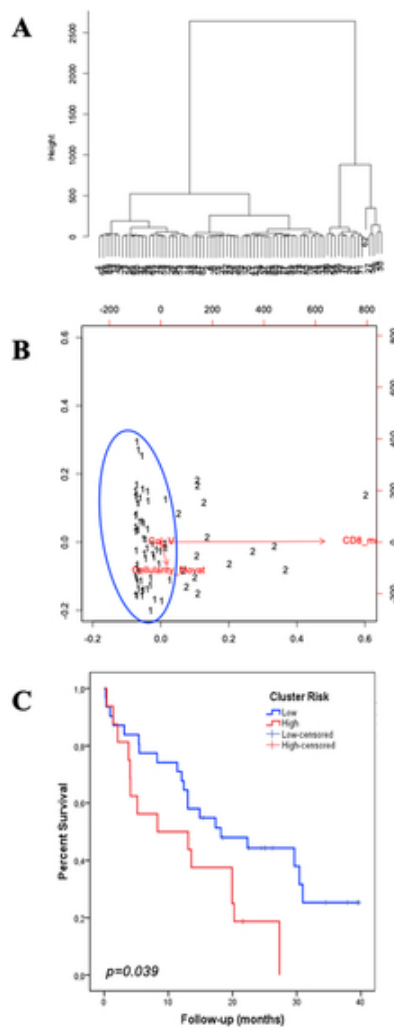


Figure legends:

Figure 1. A representative epithelioid MM section showing blocks of epithelioid cells infiltrating a stromal element (A), correlated with Movat histochemical staining highlighting the matrix constituents surrounding neoplastic cells (C). A representative sarcomatoid MM section composed of malignant spindle-cells contrasted by cellular densities and matrix-forming elements, as explored with Movat staining (D).

Figure 2. Immunofluorescence for Collagen type I and V in epithelioid and sarcomatoid subtypes of MM. Type I collagen shows a fibrillar pattern for both MM subtypes (A, B), while type V collagen surrounds the malignant cellular component (C, D). Double D2-40 (red) and type V collagen (green) staining (E, F). shows overlap of both stainings highly suggestive of deposition of collagen V in the membranes of tumour cells. A computer-assisted Collagen I and V image reconstruction is shown in G, highlighting the fibrillar (Collagen I) vs the surrounding pattern of Collagen V.

Figure 3. CD8+ T-lymphocytes (A, B), CD20+ B lymphocytes (C, D), P53 immunoexpression (E, F) and PMS2 positivity (G, H) are compared between the epithelioid and sarcomatoid subtypes.

Figure 4. PD-1 (A, B), PD-L1 (C, D), CD30 (E, F), WT1 (G, H) and BAP1 (I, J) immunoexpression in epithelioid and sarcomatoid types.

Figure 5. The dendrogram distribution of cases by the clustering model shows two risk groups (A). A distinct low-risk cluster (B, blue circle) can be seen in the dispersion graph and is correlated with the Kaplan-Meier survival curve (C).

Table 1. Clinical Characteristics of Patients with Malignant Mesothelioma

Characteristic	Epithelioid (N=73)	Sarcomatoid (N=9)	<i>p</i> value
Age, median	60 years	56 years	0.51
Sex, n (%)			
Male	52 (63%)	6 (7.3%)	0.52
Female	21 (25.6%)	3 (3.7%)	
Asbestos exposure*, n (%)			
No	35 (42.7%)	3 (3.7%)	0.32
Yes	38 (46.3%)	6 (7.3%)	
Site of malignant mesothelioma, n (%)			
Pleura	54 (65.9%)	8 (9.8%)	0.57
Extrapleural	19 (23.2%)	1 (1.2%)	
Stage† III/IV	73 (100%)	9 (100%)	
Specimen type			
Biopsy	11 (13.4%)	1 (1.2%)	0.60
Surgical resection	62 (75.6%)	8 (9.8%)	
Treatment, n (%)			
Surgery	62 (75.6%)	8 (9.8%)	0.54
Chemotherapy	13 (15%)	2 (2.3%)	0.55
Follow-up, median	22 months	18 months	0.56

*Asbestos unknown: 9 Epithelioid MM

†Per International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) criteria (31).

Table 2. Morphologic features and expression of various proteins as evaluated by immunohistochemistry according to histological subtype of malignant mesothelioma (n=82).

	Epithelioid (n=73)	Sarcomatoid (n=9)	P value*
Tumour Factors			
<i>Nuclear grade, n (%)</i>			
1	4 (4.9%)	2 (2.4%)	
2	45 (54.9%)	7 (8.5%)	0.01
3	24 (29.3%)	0	
	71.14	53.22	<0.005
<i>Cellularity as mean # of cells/mm²</i>			
<i>BAP-1, n (%)</i>			
Loss of expression	56 (68.3%)	6 (7.3%)	0.38
<i>P53</i> mean # of positive cells/mm ²	2.74	0.66	<0.005
<i>Ki-67</i>	1.86	1.98	0.89
<i>TUNEL</i>	20.20	14.48	0.35
<i>MCs PD-L1</i>	0.76	4.43	0.32
<i>MLH1</i>	48.87	35.22	0.13
<i>MSH2</i>	47.92	41.28	0.51
<i>MSH6</i>	55.85	52.80	0.76
<i>PMS2</i>	41.99	23.35	0.01
Microenvironment Factors			
Hyaluronic acid mean density/mm ³	6.57	10.73	0.05
Elastin mean density/mm ³	6.08	2.30	<0.005
Total collagen fibres mean density/mm ³	12.05	32.71	<0.005
Collagen I mean density/mm ³	1.10	0.16	<0.005
Collagen V mean density/mm ³	4.41	4.45	0.97
CD4 mean # of cells/mm ²	135.65	161.45	0.83
CD8 mean # of cells /mm ²	62.40	6.54	<0.005
CD20 mean # of cells /mm ²	110.02	5.79	<0.005
CD68 mean # of cells /mm ²	21.70	16.14	0.26

MCs, malignant cells

*The chi-square test and *t* test were used to detect differences in categorical and continuous variables, respectively, between groups of patients. A *P* value ≤0.05 was considered statistically significant.

Table 3. Hierarchical cluster analysis identified two clusters of patients with malignant mesothelioma

Cluster I Low Risk	Cluster II High Risk
Cellularity < 80.6 cells/mm ²	Cellularity > 80.6 cells/mm ²
Collagen V < 7.75 fibres/mm ³	Collagen V > 7.75 fibres/mm ³
CD8 > 99.77 cells/mm ²	CD8 < 99.77 cells/mm ²

Table 4. Multivariate analysis of studied variables in malignant mesothelioma

Variable	Risk of Death OR (95% CI)	P value
Cellularity > 80.6 cells/mm ²	1.63 (0.45-2.89)	0.02
Col V > 7.75 fibres/mm ³	2.60 (0.98-3.33)	0.04
CD8 < 99.77 cells/mm ²	1.001 (0.995-1.007)	<0.005
Cluster analysis		
Low risk	0.48 (0.12-1.84)	<0.005
High risk	2.19 (0.54-3.03)	0.006

Table 5 Hazard ratios (HRs) of clinicopathological characteristics for risk of death at 40 months for patients with malignant mesothelioma

Variable	Univariate Analysis HR (95% CI)	P value	Multivariate Analysis HR (95% CI)	P value
Cluster				
High risk vs Low risk	1.32 (0.68-2.58)	0.01	1.28 (0.60-2.75)	0.01
Asbestos exposure				
Yes vs No	1.88 (1.004-3.52)	0.04	1.02 (0.51-2.05)	0.95
Histologic type				
Sarcomatoid vs Epithelioid	1.12 (0.46-2.72)	0.05	1.86 (0.69-5.007)	0.21
Treatment				
Surgical resection				
No vs Yes	3.04 (1.37-6.74)	0.006	2.83 (1.14-7.009)	0.02
Chemotherapy				
No vs Yes	2.41 (0.85-6.84)	0.05	3.47 (1.01-11.83)	0.04

ANEXO III
TABELAS DE DADOS ORIGINAIS

ID	Sex	Topography	Asbestos	Status	Age	OS (M)	Treatment
1	0	0	1	0	64,564384	22,366667	0
2	0	0	1	1	60,479452		0
3	0	0	1	1	55,421918	59,733333	0
4	0	0	1	1	61,827397	59,166667	0
5	0	0	1	1	64,441096	37,9	0
6	0	0	1	1	70,430137		1
7	0	0	1	1	70,430137		1
8	0	0	1	1	57,887671	25,1	1
9	0	0	1	1	67,09589	24,5	0
10	0	0	1	1	57,887671	25,1	0
11	0	1	1	1	44,438356	22,566667	0
12	0	0	1	1	55,871233	26,266667	0
13	0	1	1	0	70,550685	30,433333	0
14	0	0	1	0	49,947945	12,066667	0
15	0	1	1	0	56,663014	68,633333	0
16	0	0	1	0	61,550685	4,0333333	0
17	0	2	1	0	62,345205	5,4	0
18	0	0	1	0	68,032877	2,1	0
19	0	0	1	0	67,846575	17,366667	0
20	0	0	1	0	87,263014	46,366667	0
21	0	0	1	0	36,424658	69,8	1
22	0	0	1	0	63,405479	12,433333	0
23	0	0	1	0	55,652055	5,4666667	0
24	1	0	1	0	55,336986	20,266667	0
25	1	1	0	0	68,109589	11,4	0
26	0	0	0	0	71,065753	0,3	0
27	0	2	0	0	44,876712	14,9	0
28	0	0	0	0	58,967123	29,666667	0
29	0	0	0	0	65,767123	27,3	0
30	0	1	0	0	45,452055	0,9	0
31	1	0	0				0
32	1	0	1	0	73,454795		0
33	0	0	1				0
34	0	0	1	0	52,153425	8,2666667	0
35	0	0	1	0	59,375342	8,3333333	0
36	0	0	1	0	61,350685	0,4	0
37	0	0	1	0	57,416438		0
38	0	0	1	0	66,556164		1
39	0	0	1	0	57,416438		1
40	0	0	1	0	77,917808	1,4666667	0
41	1	0	1	0	68,531507	3,8	0
42	1	0	1	0	47,027397	13,566667	0

43	1	0	1	0	55,476712		0
44	1	0	1	0	56,312329	4,1	0
45	0	0	1	0	79,241096	30,966667	0
46	0	0	1	0	59,378082	5,1666667	0
47	1	0	1	0	61,320548		0
48	1	0	1	0	81,657534		0
49	0	0	1	0	62,79726		0
50	0	0	1	0	88,106849		0
51	0	0	1	1	70,430137		0
52	0	0	0	1	41,147945	63,3	0
53	1	1	0	0	80,421918	44,566667	0
54	0	0	0	0	48,915068	19,933333	0
55	1	1	0	0	48,915068	1,4	0
56	1	0	0	0	48,915068	1,4	1
57	0	2	0	0	91,939726	13,1	0
58	1	1	0	0	59,358904	0,2666667	0
59	0	0	0	0	48,915068	19,933333	1
60	1	1	0	0	44,975342	18,2	0
61	0	0	0	0	61,961644	13,033333	0
62	0	0	0	0	61,961644	13,033333	1
63	1	1	0	0	58,945205	0,2333333	0
64	1	1	0	1	63,682192	52,633333	0
65	0	0	0	1	56,019178	52,166667	1
66	0	0	0	0	63,09589	3,1333333	0
67	1	1	0	1	63,682192	52,633333	1
68	0	0	0	1	41,147945	63,3	1
69	1	1	0	1	61,882192	47,3	0
70	0	0	0	1	61,827397	59,166667	1
71	1	1	0	1	41,323288	42,233333	0
72	0	0	0	1	58,136986	39,7	0
73	0	0	0	1	55,506849	39,466667	0
74	0	0	0	1	38,361644	41,666667	0
75	0	0	0	1	70,156164	37,333333	0
76	0	0	0	1	77,090411	34,533333	0
77	1	0	0	1	71,712329	32,333333	0
78	0	0	0	1	58,136986	39,7	1
79	1	1	0	1	35,887671	21,6	0
80	1	0	0	1	67,6	18,5	0
81	1	1	0	1	35,887671	21,6	1
82	0	2	0	1	41,50137	15,433333	0

Sex: 0 = male, 1 = female. Topography: 0 = pleural; 1,2 = extrapleural. Asbestos: 0 = no exposure; 1 = exposure.
Status: 0 = dead; 1 = alive. Treatment: 0 = no; 1 = yes.

ID	E nonE	Hist	MOC31	BerEP4	D2-40	WT1	BAP1	Necrosis	TIL	Nuclear Grade
1	0	5	0	0	1	1	0	0	1	2
2	0	1	0	0	1	0	0	1	1	2
3	0	2	0	0	1	1	0	1	1	2
4	0	6	0	0	1	1	0	0	2	2
5	0	1	0	0	1	1	1	0	1	2
6	0	3	0	0	1	1	0	0	1	2
7	0	3	0	0	1	1	0	0	1	2
8	0	7	0	0	1	1	0	0	2	2
9	0	3	0	0	1	1	0	0	1	2
10	0	1	0	0	1	1	0	0	2	2
11	0	3	0	0	1	1	1	0	1	2
12	0	3	0	0	1	1	1	0	2	2
13	0	3	0	0	1	1	0	1	2	2
14	0	6	0	0	1	1	0	0	2	2
15	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2
16	1	11	0	0	0	0	0	0	1	1
17	0	1	0	0	1	0	0	0	2	2
18	1	10	0	0	0	0	0	0	2	2
19	1	12	0	0	1	1	0	1	2	2
20	0	15	0	0	1	1	0	0	2	3
21	0	3	0	0	1	0	0	0	2	2
22	0	2	0	0	0	1	0	0	2	2
23	0	3	0	0	1	1	0	0	1	2
24	1	12	0	0	1	0	0	0	2	2
25	0	7	0	0	1	0	0	0	2	2
26	0	1	0	0	1	0	0	1	1	3
27	0	2	0	0	0	1	0	1	2	3
28	0	3	0	0	1	0	0	0	2	3
29	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1
30	0	7	0	0	1	1	0	0	2	3
31	0	2	0	0	0	0	0	0	2	3
32	0	2	0	0	0	1	1	0	3	3
33	0	8	0	0	1	0	0	0	3	2
34	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2
35	0	2	0	0	1	1	1	0	1	2
36	1	10	0	0	1	1	1	0	2	2
37	0	3	0	0	1	1	0	0	1	2
38	0	3	0	0	1	0	0	1	2	2
39	0	3	0	0	1	1	0	0	2	2
40	0	1	0	0	1	1	0	1	2	1
41	0	3	0	0	1	1	0	0	1	3
42	0	6	0	0	1	1	1	0	1	2

43	0	2	0	0	1	1	1	0	2	3
44	0	2	0	0	0	0	0	1	2	1
45	0	2	0	0	1	1	0	0	2	2
46	0	15	0	0	1	1	0	1	1	3
47	0	3	0	0	1	1	1	0	1	2
48	0	1	0	0	1	1	0	1	2	3
49	1	12	0	0	0	1	1	0	2	2
50	0	3	0	0	1	1	1	1	1	3
51	0	1	0	0	1	1	0	0	3	2
52	0	4	0	0	1	1	0	0	3	2
53	0	9	0	0	0	1	0	0	2	2
54	0	1	1	0	1	1	1	0	1	3
55	0	2	0	0	1	1	0	1	2	3
56	1	11	0	0	1	1	1	0	2	2
57	0	1	0	0	1	1	0	0	2	3
58	0	2	0	0	1	0	0	0	2	3
59	0	4	1	0	1	1	0	0	1	2
60	0	1	1	1	0	0	0	0	2	3
61	0	1	0	0	0	1	0	1	2	2
62	0	2	0	0	0	1	1	0	2	2
63	0	2	0	0	1	1	0	1	3	3
64	0	7	0	0	1	1	0	0	2	2
65	1	10	0	0	0	1	0	0	2	2
66	0	1	0	0	1	1	0	1	3	3
67	0	2	0	0	1	1	0	0	2	3
68	0	5	0	0	1	1	0	0	1	2
69	0	6	0	0	0	1	1	0	2	1
70	0	5	0	0	1	1	0	0	3	3
71	1	10	0	0	0	1	0	0	2	1
72	0	1	0	0	1	1	0	0	2	2
73	0	2	0	0	1	1	0	0	2	3
74	0	2	0	0	1	1	0	0	2	2
75	0	2	0	0	1	1	1	1	1	3
76	0	3	0	0	1	1	0	0	3	2
77	0	1	0	0	1	1	0	1	1	2
78	0	1	0	0	1	1	1	0	2	2
79	0	3	0	0	1	1	1	0	1	2
80	0	1	0	0	1	1	0	0	2	3
81	0	3	0	0	1	1	1	0	1	2
82	0	2	0	0	0	1	1	0	2	2

E_nonE: 0 = epithelioid, 1 = sarcomatoid; MOC31, BerEP4, D2-40, WT1, BAP1, Necrosis: 0 = negative, 1 = positive.

ID	Col (I)	Col (V)	Elastin Movat	Collagen Movat	Fibrin Movat	Hyaluronic Movat	Cellularity Movat
1	2,5369763	8,8467281	9,8383333	3,1146667	5,4116667	6,8896667	74,745667
2	1,1176269	1,2218757	2,5453333	12,219333	3,455	7,7126667	74,067667
3	0,1452772	2,8466808	4,1893333	15,554333	5,608	7,2003333	67,448
4	4,9626978	2,9650666	6,7286667	17,652333	1,4663333	4,476	69,677
5	5,6119426	2,1793171	3,47075	12,8895	1,3445	7,11075	75,18425
6	2,5744841	0,8374126	5,7563333	3,6763333	11,413333	1,7243333	77,429333
7	2,4544948	6,7114023	1,9226667	35,777333	1,0156667	10,786	50,497667
8	6,6992929	6,5757862	6,0603333	10,611333	1,258	19,620667	62,449667
9	6,8566778	1,8296872	2,4113333	32,379667	1,5326667	13,47	50,205667
10	4,7850224	0,444071	7,784	9,9875	3,5065	3,557	75,1655
11	0,233486	0,7455352	7,201	2,132	1,78	1,4775	87,41
12	1,3746751	14,135872	3,0823333	4,7626667	4,874	5,4293333	81,852333
13	2,5659893	0,8742754	6,178	2,895	1,707	2,618	86,603
14	3,4867292	4,4378412	5,0373333	11,196667	3,2936667	9,7353333	70,736667
15	0,0658746	1,7787018	7,2406667	2,8776667	1,3936667	5,9333333	82,554667
16	0,2545352	10,187409	0,8653333	34,554667	0,039	28,417333	36,124
17	3,3661679	3,4824111	21,736667	9,5746667	10,776667	5,1606667	52,751333
18	0,1465269	1,1766408	3,495	26,963667	0,4983333	7,322	61,721
19	0,0197011	8,0353819	2,606	10,217	2,852	0,9316667	83,393333
20	0,3287964	4,812536	19,812667	4,0936667	24,347333	0,595	51,151
21	0,9422461	0,1448318	0,626	26,628333	0,0553333	21,137333	51,553333
22	0,0054037	7,1589751	10,129	2,2746667	4,4996667	2,3436667	80,753
23	1,6081923	0,5258268	11,904	5,216	3,1	3,313	76,467
24	0,0790566	4,6286449	5,8926667	21,215667	1,1716667	11,193333	60,526667
25	0,8382823	4,4458007	2,057	6,4196667	0,406	18,253667	72,864
26	0,0303115	12,382843	5,7843333	1,938	12,513	0,9126667	78,852
27	0,003269	2,5000338	1,0503333	14,883667	0,3946667	2,7243333	80,946333
28	0,1591973	1,5824878	16,134167	4,1443333	6,2851667	1,7415	71,695
29	0,4858945	2,2022156	2,782	17,259333	0,4766667	7,5683333	71,913667
30	0,0086777	0,1162667	13,268	2,949	0,57	4,479	78,733
31	8,3493407	2,581732	9,3263333	0,792	9,7856667	1,045	79,051
32	0,5386671	0,3362944	3,5813333	6,867	1,474	2,583	85,495
33	0,2763739	0,5016876	4,4315	11,702	1,789	3,2895	78,788
34	0,0866058	0,1697956	3,088	12,185	0,677	3,2356667	80,815
35	1,3855326	0,283627	3,2536667	19,145333	1,799	10,671333	65,130667
36	0,1166035	0,4339434	0,32	47,273333	0,0323333	14,323667	38,051333
37	0,75879	0,6172618	1,1793333	33,809667	0,241	15,751333	49,019
38	0,0403941	1,1886182	2,618	28,0155	0,3035	15,7685	53,294
39	1,2389418	0,0970213	1,473	22,972667	0,4253333	4,2723333	70,856667
40	0,0088531						
41	0,3342205	0,0531593	3,7415	14,505	2,223	14,1945	65,336
42	0,3918086	0,0105508	1,8915	19,328	2,3975	23,363	53,0205

43	0,0325369	0,4304233	12,783	1,1	6,296	1,3283333	78,492667
44	0,286203	1,0752336	4,759	20,562333	1,2586667	5,152	68,267667
45	0,1918602	0,5002429	3,383	7,4136667	2,0086667	4,3073333	82,887667
46	0,0997048	0,5584394	1,4533333	30,053333	0,839	11,030667	56,623667
47	0,0519071	0,1871567	1,792	27,036	0,5195	13,616	57,037
48	0,3835801		22,496	0,592	3,844	0,668	72,399
49	0,0502735	0,5089028	0,7513333	36,669667	0,4516667	11,449	50,678667
50	0,6596236		2,5453333	8,9156667	0,5056667	2,678	85,355667
51	0,8659526	0,0459202	9,102	3,9233333	4,7383333	1,6416667	80,594333
52	0,366148	6,3046324	3,3546667	29,181	1,0503333	11,853	54,561667
53	0,2648093	3,0259091	2,7906667	6,6433333	2,6106667	5,9933333	81,962333
54	0,1670551	9,9384212	5,1896667	18,212	3,5883333	13,328333	59,681667
55	0,5673038	4,0489796	9,7916667	1,9593333	16,797	1,4836667	69,968
56	0,4075864	3,6142075	0,7243333	56,648667	0,1396667	9,173	33,313667
57	0,6107211	2,0343842	2,0216667	27,986333	1,7746667	8,1023333	60,115333
58			3,0593333	0,2436667	1,246	0,1886667	95,261333
59	1,1842771	11,984889	5,5296667	30,144	5,2793333	10,005333	49,041667
60	0,2290408	11,234934	4,7321667	8,4491667	11,9765	4,8593333	69,983333
61	1,6993934	1,8592906	7,301	0,524	3,879	0,558	87,738
62	0,1771113	20,77988	1,2686667	9,0723333	3,3476667	3,8176667	82,494
63	0,0894416	8,236279	20,459333	6,6333333	10,299333	2,46	60,148667
64	0,0443646		1,728	11,015	0,264	5,843	81,15
65	0,1605713	8,2868893	3,128	27,703	1,9665	5,132	62,0705
66	0,0906617	5,1664477	5,8783333	3,4596667	3,54	2,6713333	84,451
67	0,0130543	12,056555	3,2253333	9,049	6,944	2,1093333	78,672333
68	1,2333312	16,515743	3,907	21,135	2,9343333	12,384	59,639333
69	0,0493177	4,2747154	11,568333	5,885	6,2986667	17,551	58,697667
70	0,0252432	11,419688	2,062	18,524	1,695	6,843	70,8755
71	0,2357398	3,2558817	2,9646667	33,158	2,066	8,671	53,140333
72	0,014988		4,956	0,9113333	3,357	0,452	90,323333
73	0,3838743	0,8677106	18,077333	2,4173333	10,093333	0,986	68,425667
74	0,0579133	0,7605533	3,779	2,78	1,924	2,641	88,877
75			20,941333	0,269	14,709	0,378	63,702
76	0,0521705	3,713458	3,014	6,074	2,406	7,0785	81,4275
77			5,3	1,466	2,002	0,674	90,557
78	0,3152788	16,763433	0,686	20,164667	1,2896667	7,2723333	70,586667
79	0,0905625	7,2845471	0,5393333	37,646333	0,642	14,054667	47,117667
80	0,0650899	4,7780448	5,1663333	9,4536667	12,615333	2,415	70,349
81	0,2077012	9,5753791	2,3375	23,355	8,2255	4,0685	62,0135
82	0,0395602	10,170021	1,722	13,577	3,405	12,677333	68,618667

ID	CD4 %	CD4 /mm ²	CD8 %	CD8 /mm ²	CD20 %	CD20 /mm ²	CD68 %	CD68 /mm ²
1	0,5434	49,9519	0,7156	54,7784	0,102	7,1655	37,7828	2901,9792
2	0	0	0,0353	2,4457	0,1758	9,2349	15,4377	1110,309
3	4,0767	302,3274	0,632	39,6339	0,5578	37,4472	47,8284	4270,6339
4	2,5693	231,4777	0,7407	66,3498	3,7837	337,7879	20,0431	1789,2003
5	0,5985	36,2265	0,1209	7,4675	0,1134	6,9049	5,0865	320,9318
6			0,0406	2,4908	0,0325	1,7964	27,0733	1753,3943
7	0,3219	22,5939	0,0524	3,4718	0,014	0,8432	16,953	853,8883
8	1,3335	109,4697	0,4354	29,0341	0,0611	3,871	31,4724	2522,2964
9	3,0822	250,4779	0,3698	28,9795	0,1421	10,4447	28,4861	2207,4396
10	0,5798	43,9779	1,9792	143,5433	12,6739	740,0202	14,4634	1150,1285
11	9,8488	299,2059	1,8647	145,6635	0,1038	6,1032	21,3242	1875,4636
12	2,1202	112,8465	0,4012	27,2045	0,0161	0,9704	33,5441	3395,876
13	0,9132	56,6241	0,885	60,7219	2,6114	152,2053	8,0851	655,3715
14	0,3583	28,735	0,7864	57,5938	0,1533	10,9247	16,1584	1622,1119
15	0,3189	16,796	0	0	0,4747	31,3662	0,9325	88,7224
16	0,0201	1,7491	0,2114	8,2966	0	0	18,1119	1741,2249
17	0,3133	32,8954	1,3631	146,4524	0	0	5,3418	687,4076
18	0,3465	25,2191	0,1353	6,3229	0,0271	1,0305	6,0888	403,4788
19	1,059	93,6562	0,2037	14,8607	0,3046	21,8659	18,5825	1904,0353
20	4,8513	466,8936	1,7155	145,7431	0,0266	2,4694	36,098	4205,0495
21	0,2223	20,1301	0,1584	11,9111	0,1017	6,9804	12,8299	1285,107
22	0,6776	44,9694	0,4839	34,2056	0,0143	1,0076	47,836	6012,6004
23	0,1104	3,4808	0	0	0	0	4,0606	421,7635
24	0,0228	1,8061	0,0143	0,9342	0	0	9,7731	877,6886
25	2,0415	113,8508	0,0485	3,9833	0,6864	62,2421	10,1125	969,4805
26	0,0304	2,6664	0,0739	4,3613	0,011	0,9225	11,4044	934,009
27	0,0656	5,0218	0,078	6,6	0	0	14,8951	2043,4823
28	2,1516	147,8053	0,312	24,0695	1,0833	85,4211	0,6476	66,0334
29	7,9065	603,4182	0,6195	42,5518	24,405	1715,2321	8,5001	727,0845
30	8,1947	522,4274	3,8479	274,2989	0,3497	24,7721	20,4152	2041,52
31	2,9963	117,4513	3,9351	325,2415	0,0954	6,0154	68,2057	6820,57
32	0,1883	11,8066	0,6135	44,4068	0,2285	16,4117	35,3949	3930,5361
33	21,2291	603,4803	1,5149	111,6065	1,8511	134,6599	24,6705	2625,5036
34	0,2029	19,5547	2,5806	219,7378	0,0662	5,7556	52,9673	7003,1411
35	0,2476	19,8429	0,3025	18,7714	0,6989	51,8383	14,6416	1205,2505
36	0,0144	0,8436	0,581	16,62	0,0236	0,8836	20,5183	1480,1908
37	0,1347	10,7855	0,3114	17,621	0,1879	14,0318	10,1552	993,8157
38	0,7011	46,9879	0,5508	30,5009	0,1909	11,1254	12,7417	881,9571
39	0,3069	25,4361	0,5832	40,4558	0,9297	69,3196	25,1431	2809,6993
40	0	0	0	0	0,3797	19,5822	0,7901	30,6908
41	0,3166	23,9901	0,3431	23,3581	1,8115	130,7094	4,7981	443,5577
42	0,0261	1,779	0,1167	6,6678	0,0161	0,9426	8,3447	579,0005

43	0,3041	27,9481	0,138	12,8044	0,0475	4,5972	7,0544	860,0724
44	0,8753	25,8774	0,036	1,7501	0	0	32,7411	3003,6375
45	0,4822	32,1095	0,0602	3,1994	0,4154	30,7759	35,406	3838,1972
46	0,0105	0,8692	0,0381	2,3906	0,0858	4,8107	17,9602	1278,4967
47	0,0818	5,5894	0,024	0,9893	0,055	3,1133	17,3203	1231,6964
48	0,2364	7,9316	0	0	0	0	3,7736	132,4502
49	0,2397	20,458	0,026	0,943	0,0577	2,7861	17,123	1259,5945
50	0,7388	52,4628	0	0	0,2297	13,7223	1,1844	118,4953
51	9,1434	699,4106	1,1272	79,7909	20,2519	1682,5553	16,2557	1382,3959
52	2,9636	236,8613	1,2231	71,1434	2,1373	123,4065	11,869	772,7667
53	0,0856	5,5072	0,2473	15,1496	0,0442	2,8136	15,3707	1357,1671
54	7,2708	563,8568	0,282	16,3382	0,0628	4,5166	6,6483	570,3315
55	4,6089	282,2096	0,3816	20,8893	0,5214	30,3205	17,1408	1304,4055
56	0,044	2,5846	0,1182	5,2143	0,018	0,8853	9,4246	668,6924
57	0,4598	34,3018	0,2946	19,2033	0,071	3,3652	8,4587	744,1726
58	0,1924	13,2171	0,4065	29,0042	0,885	70,2497	3,1311	272,9337
59	0,1696	13,6461	0,0183	0,9011	0,0204	0,9609	7,7434	455,2337
60	7,60495	441,77315	0,90685	49,3921	0,371	23,3025	3,5038	309,1754
61	0,3775	34,2969	4,5781	350,6273	17,4022	956,2931	7,5478	737,4942
62	1,5062	56,1357	1,9171	138,655	0,0209	1,7197	21,4183	2760,3843
63	3,6328	316,1741	1,9914	101,4477	8,4161	445,9701	6,0601	556,5832
64	2,8444	177,4988	1,6854	108,1962	0,5587	38,4903	38,4903	3849,03
65	23,1605	247,1889	0	0	0,13	5,9003	11,2598	619,4383
66	0,7779	58,1766	1,5588	119,0357	0,1654	11,6219	22,6552	2785,1116
67	0,8622	54,9733	0,5929	35,1723	0,053	3,3496	23,6723	2278,8977
68	10,3519	594,4975	0,2657	10,3422	0,0264	1,8467	15,907	1451,221
69	1,5402	138,6618	2,1948	160,8627	0,34	23,9517	21,6756	2026,5359
70	0,853	68,3752	6,9088	538,8255	0,2097	16,1396	32,5348	3531,3362
71	27,0456	1059,5926	0,0868	5,7435	0,3103	18,7786	4,1885	333,8805
72	3,2931	273,6323	0,8899	62,8122	0,0938	6,6279	21,0465	1927,9847
73	1,493	99,6097	0,7337	69,0037	4,1463	363,334	7,5394	791,6504
74	1,9547	98,488	1,8433	34,5728	3,2313	170,1491	4,8639	330,214
75	0,4954	26,4084	0,0448	2,4225	0,2017	10,2562	14,6275	999,5831
76	5,4771	305,7367	0,5109	17,428	1,3538	81,1395	3,6847	283,7658
77	0,3339	27,9559	0,1147	6,5833	0	0	7,1429	714,29
78	0,7981	63,3204	0,9343	71,177	0,2287	16,058	11,4293	1104,7066
79	1,0526	42,7851	0,0988	4,2211	0,0123	0,8722	10,4364	760,3165
80	0,0661	4,809	1,7382	168,0425	1,1015	97,4462	27,8925	3100,0591
81	4,1102	328,3486	0,1036	4,1217	0,0503	3,284	20,9737	1811,2759
82	1,8558	148,6657	0,2621	27,287	1,0974	68,0215	20,9266	1808,1206

ID	Ki-67	Tunel	p53	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
1	0,1348	0	2,2352	69,2354	82,4929	81,905	83,1698
2	0,0448	2,333	0,5537	31,2819	60,1211	66,0377	44,6392
3	4,6146	4,4268	3,6821	39,4626	47,4862	50,2552	41,628
4	0,4635	4,698	0,3326	27,6058	36,2547	31,4839	40,666
5	7,3012	0,4776	3,4859	47,1098	42,0079	27,0588	24,7646
6	4,6157	1,9774	25,071	64,0253	68,0188	68,0166	66,0679
7	3,8511	0	14,3121	71,5555	85,8156	91,7354	76,1824
8	4,3678	8,6575	0,969	38,665	43,5985	57,4623	35,6633
9	3,6277	0	2,5398	64,5107	67,6934	71,7382	65,5303
10	2,7519	2,682	0,6816	40,2582	47,7027	39,7557	46,2159
11	4,8798	4,8387	0,6073	45,5815	50,0952	30,6374	72,5275
12	0,3703	18,7967	0,1643	23,0537	62,5588	95,0795	57,8044
13	0,3192	48,6333	0,2768	19,1939	17,6737	50,0766	0,6332
14	0,0927	9,1164	0,2171	47,3684	68,1137	27,8329	11,6032
15	1,7804	35,5734	4,1429	38,7195	43,6106	34,7826	1,8377
16	1,4327	41,023	0,0249	16,5691	52,2458	98,6967	27,1816
17	0,0369	4,6512	0,1015	68,0279	96,2933	26,6459	0,8328
18	1,2568	1,2605	0,1673	32,6801	27,5157	64,9375	20,5956
19	1,5038	7,5637	0,179	41,0331	67,7144	52,8093	15,9205
20	2,2516	2,1696	0,0506	57,7609	54,8266	11,2333	3,3622
21	0,1257	32,4665	0,2296	49,069	68,2156	2,4304	0,9987
22	0,7271	29,7046	1,3346	50,0883	47,5058	29,5171	14,631
23	0,1957	1,0782	0,1647	4,6594	21,0933	65,7117	9,2183
24	0,3596	0,4511	0,1194	3,1721	11,3673	56,573	0,7948
25	1,4872	44,0897	0,3803	35,6358	52,7551	35,7065	10,7069
26	0,0482	20,0923	0,151	82,596	96,7983	0,832	3,2068
27	0	92,5443	0,3376	21,1621	3,0802	22,9797	0,4975
28	0,2301	0,6832	0,0714	7,9607	7,9335	26,4244	12,8773
29	1,3374	31,4291	0,5843	26,3234	34,0426	14,1689	4,3922
30	0,9206	1,7473	0	49,5238	44,8505	97,8424	49,0647
31	3,9705	11,9244	1,2644	85,019	96,2131	99,7568	37,3408
32	18,7969	39,0713	4,6154	91,127	99,7988	67,4762	4,4725
33	1,6624	7,635	0,1968	28,9271	82,4887	73,4431	37,8284
34	2,3271	8,545	2,711	66,1055	87,6645	75,2402	32,6296
35	3,7998	10,2791	1,4606	64,0184	85,7531	63,1767	11,5628
36	3,6036	10,0861	1,1004	98,0293	99,9143	79,5488	35,3088
37	2,7052	11,957	1,3938	15,0297	23,9247	68,3659	27,3042
38	1,0741	32,2466	2,0178	50,3349	64,1068	45,2195	4,5272
39	0,9839	12,9756	0,3019	17,1517	61,7118	77,7324	18,3232
40	1,5625	49,7996	2,1228	59,1852	94,0852	13,4118	2,6611
41	1,0035	5,3364	0,0615	11,9698	23,3983	20,4389	3,0978
42	0,4341	5,3831	0,1705	11,334	11,4375	75,5993	20,5385

43	3,9933	5,5753	0,405	58,3126	77,9707	99,9361	76,0517
44	8,5189	68,5031	0,09	69,732	84,4735	92,9243	20,3999
45	6,5405	41,2158	4,3394	75,1276	95,7356	57,6028	19,247
46	4,5189	6,3649	1,2445	36,4793	73,5525	58,7608	3,1291
47	0,1753	10,5772	0,2257	40,395	44,4444	12,585	1,6266
48	2,7667	70,671	0,5644	14,9628	52,0744	80,7692	37,139
49	8,8323	7,7844	0,8782	61,8771	79,59	20	1,7191
50	0,572	45,4898	0,7742	7,2626	23,2877	40,8923	7,5053
51	0,9515	12,7748	1,3538	40,628	35,6067	44,6809	74,5391
52	0,5864	13,627	1,9448	37,1119	11,1453	35,2254	32,6376
53	0	12,2017	1,1169	48,0472	27,4496	77,686	84,8104
54	0,2707	1,2428	1,5935	64,5618	35,5307	87,6926	83,7528
55	0,4436	4,8362	0,6246	73,4282	56,4895	38,6386	27,706
56	0,5367	5,7143	0,3419	27,5968	21,8839	60,7746	46,4823
57	0,1139	23,8056	18,3441	42,5461	7,7615	29,5796	49,8841
58	0,3658	28,2243	2,3729	34,4314	10,2822	72,7467	70,2019
59	0,3043	4,8058	3,6381	65,3447	58,7076	83,6284	81,4323
60	0,0848	18,93315	0,94495	70,1857	42,7539	80,2432	79,1139
61	0,5453	37,8081	0,2478	4,4053	0,3085	94,5261	93,6149
62	0,1769	3,5002	3,041	90,8814	59,6206	58,146	43,9252
63	1,6909	18,763	15,3028	48,3395	11,2062	16,3043	28,1081
64	0,3824	19,4211					
65	0,402	14,5824	1,2276	26,4908	9,0251	29,7191	47,4463
66	0,2153	96,7093	1,1023	16,5192	0,248	25,9113	50,5986
67	1,2996	8,8991	0,9378	90,6699	47,2809	90,9212	95,0208
68	1,6322	38,2089	3,1167	75,045	45,597	76,8082	77,8171
69	0,0829	9,0922	1,4021	89,3115	55,7953	91,2609	96,3369
70	0,3911	3,4272	7,9411	90,4796	62,6288	89,1824	95,649
71	0,0615	41,8995	1,9392	9,5949	2,2818	12,1655	14,7695
72	0,6849	22,4558	4,9838	27,5676	8,3991	33,0323	29,6499
73	1,5775	3,0615	1,3858	48,0663	19,5096	62,9177	53,4082
74	1,1681	12,1134	2,1565	14,5566	6,5438	12,0203	31,4465
75	2,7241	3,2104	6,876	55,7022	19,546	40,4269	96,0806
76	0,2161	14,2076	1,7736	38,5126	24,3497	41,1475	42,4134
77	3,7436	52,5649		31,7808	6,1628	33,0864	26,7157
78	0,2837	65,2937	0,7212	91,5248	58,4642	91,8511	87,0839
79	0,3058	32,5068	4,6133	81,7034	47,3007	84,8069	74,0048
80	0,7723	2,0174	11,9419	73,5007	40,426	75,9779	90,7168
81	0,6967	3,4562	2,1217	83,6236	69,9071	86,3852	86,2845
82	2,7073	61,6667	6,8179	67,4744	48,4829	86,0656	96,3642

ID	CD30	CD30 status	PD-L1 CPS	PD-L1 status	PD-L1 TPS	PD-L1 MIDS	PD-1 CPS	PD-1 status	PD-1 TPS	PD-1 MIDS
5	0	0	0	0	0	0	11,3933	1	10,6538	0,7395
6	0	0	0	0	0	0	8,798	1	5,1152	3,6828
7	0	0	0	0	0	0	18,7744	1	15,2084	3,566
8	0	0	0,3805	0	0,3805	0	9,5556	1	7,065	2,4906
9	0	0	0	0	0	0	12,1457	1	8,5486	3,5971
10	0,0285	0	0	0	0	0	4,1213	1	1,815	2,3063
11	0	0	0	0	0	0	5,2632	1	4,3766	0,8866
12	0	0	0,2509	0	0,1043	0,1466	13,1084	1	10,0664	3,042
13	5,5421	1	1,5758	1	1,1456	0,4302	2,6521	1	1,9938	0,6583
14	0	0	0,4979	0	0,2166	0,2813	4,8477	1	2,0546	2,7931
15	2,2346	1	0,2874	0	0	0,2874	4,4334	1	1,6726	2,7608
16	0	0	2,7027	1	1,636	1,0667	0,4949	0	0,1843	0,3106
17	0,0484	0	0,0981	0	0,0818	0,0163	0,7413	0	0,3476	0,3937
18	0	0	0,2462	0	0	0,2462	2,1539	1	0,8859	1,268
19	0	0	4,9143	1	3,882	1,0323	2,3949	1	1,6832	0,7117
20	0	0	1,5825	1	0,9676	0,6149	3,1795	1	1,4552	1,7243
21	0	0	0,8841	0	0,7493	0,1348	0,8637	0	0,5452	0,3185
22	0	0	4,6556	1	4,3497	0,3059	8,0935	1	6,799	1,2945
23	0	0	8,9187	1	2,9181	6,0006	0,8099	0	0,4903	0,3196
24	0,1764	0	0,0365	0	0	0,0365	0,0798	0	0	0,0798
25	0	0	3,9443	1	3,2595	0,6848	17,6321	1	17,5163	0,1158
26	0,3392	0	3,1933	1	2,3037	0,8896	2,003	1	1,9071	0,0959
27	0	0	1,0672	1	0,6504	0,4168	0,1396	0	0,031	0,1086
28	0,1368	0	19,4883	1	14,4187	5,0696	0,1952	0	0,0677	0,1275
29	1,5801	1	2,7534	1	2,0776	0,6758	9,5157	1	7,7703	1,7454
30	0	0	2,0468	1	1,0786	0,9682	1,8063	1	1,6039	0,2024
31	0,253	0	2,2144	1	1,6816	0,5328	18,9843	1	14,0704	4,9139
32	0,0495	0	21,9905	1	18,6859	3,3046	7,7882	1	4,7675	3,0207
33	0,0354	0	0,4521	0	0,3073	0,1448	56,3633	1	56,3269	0,0364
34	0	0	0,0848	0	0,0696	0,0152	7,2765	1	2,435	4,8415
35	0	0	0,1761	0	0	0,1761	11,0598	1	10,5461	0,5137
36	0	0	0,2727	0	0	0,2727	2,143	1	1,1127	1,0303
37	0	0	0,2315	0	0	0,2315	19,885	1	15,6966	4,1884
38	0	0	2,4242	1	2,0952	0,329	11,2048	1	9,1165	2,0883
39	0	0	0,0559	0	0	0,0559	15,3906	1	14,5767	0,8139
40	0	0	6,2123	1	5,6925	0,5198	2,5126	1	1,6371	0,8755
41	0	0	0,5655	0	0,268	0,2975	1,1096	1	0,1753	0,9343
42	0	0	0	0	0	0	2,1251	1	1,3342	0,7909
43	0	0	0,0385	0	0	0,0385	3,0606	1	1,1944	1,8662
44	0	0	19,0033	1	18,6128	0,3905	1,8458	1	0,6849	1,1609
45	0,0717	0	3,1169	1	2,8302	0,2867	31,134	1	28,5975	2,5365

46	0,0188	0	0,076	0	0	0,076	0,4705	0	0,209	0,2615
47	0	0	7,8125	1	2,5677	5,2448	1,1287	1	1,1092	0,0195
48	0	0	4,0821	1	3,3359	0,7462	3,2456	1	2,162	1,0836
49	0,0154	0	0,4841	0	0,2173	0,2668	2,8704	1	1,676	1,1944
50	0	0	2,0548	1	0,8	1,2548	0,8143	0	0,5806	0,2337
51	0	0	1,2995	1	0,9037	0,3958	7,6064	1	5,1601	2,4463
52	0	0	2,7586	1	2,2117	0,5469	6,3888	1	4,5346	1,8542
53	0,0106	0	3,0648	1	1,6553	1,4095	0,3215	0	0,1414	0,1801
54	0	0	0,3568	0	0,0443	0,3125	0,3236	0	0,2696	0,054
55	0	0	0,1553	0	0	0,1553	0,2914	0	0,0354	0,256
56	0	0	0,2237	0	0,1757	0,048	0,0384	0	0,03	0,0084
57	0	0	0,6044	0	0,4695	0,1349	0,2168	0	0,0909	0,1259
58	0	0	0,3195	0	0,2361	0,0834	0,1771	0	0,1479	0,0292
59	0	0	0,1907	0	0,139	0,0517	0,1633	0	0,138	0,0253
60	0,00755	0	0,3107	0	0,1175	0,1932	0,4022	0	0,1041	0,2981
61	0,0574	0	2,3781	1	0,6605	1,7176	0,5923	0	0,4132	0,1791
62	0	0	0,1843	0	0,0665	0,1178	0,6981	0	0,3905	0,3076
63	0,2869	0	0,6336	0	0,0229	0,6107	0,3829	0	0,1925	0,1904
64	0	0	0,4274	0	0,3165	0,1109	0	0	0	0
65	0,0146	0	0,6698	0	0,3472	0,3226	2,4584	1	1,6404	0,818
66	0,1402	0	32,8297	1	29,6982	3,1315	2,4528	1	2,0576	0,3952
67	0,0168	0	0,2555	0	0,1998	0,0557	0,1649	0	0,1357	0,0292
68	0,0962	0	2,3468	1	1,7678	0,579	2,8806	1	2,2621	0,6185
69	0,6004	0	0,187	0	0,0974	0,0896	1,3153	1	1,0645	0,2508
70	0,0099	0	3,2545	1	2,0896	1,1649	31,1507	1	29,1429	2,0078
71	0,022	0	0,2005	0	0,1192	0,0813	1,3168	1	0,8078	0,509
72	0	0	3,4404	1	2,3333	1,1071	1,1881	1	1,044	0,1441
73	0,0105	0	0,2616	0	0	0,2616	0,3142	0	0,0504	0,2638
74	0	0	5,5556	1	3,9275	1,6281	1,8306	1	0,6192	1,2114
75	0,1772	0	55,3331	1	45,156	10,1771	11,648	1	6,7368	4,9112
76	0,0254	0	1,3413	1	0,6329	0,7084	3,0709	1	1,9471	1,1238
77	0	0	10,274	1	7,218	3,056	0	0	0	0
78	0,0103	0	0,0528	0	0	0,0528	0,9451	0	0,2332	0,7119
79	0,0304	0	0,6241	0	0,4695	0,1546	1,0358	1	0,5682	0,4676
80	0,0148	0	21,6142	1	15,0806	6,5336	14,0842	1	9,6843	4,3999
81	0,8897	0	78,7701	1	73,0334	5,7367	2,1092	1	0,8662	1,243
82	0,0249	0	9,1735	1	6,6176	2,5559	8,5948	1	6,2558	2,339

PD-1, PD-L1 status: 0 = target absent; 1 = possible target (>1%).

ID	Vimentin %	Vimentin H-SCORE	Vimentin STATUS	E-Caderin %	E-Caderin H-SCORE	E-Caderin STATUS	EMT STATUS
1	93,3045	190,1944	1	0,0498	0,0498	0	1
2	98,6041	218,4066	1	0,3891	0,3891	0	1
3	50,3731	89,0547	1	21,3211	23,3663	0	1
4	53,6056	82,9051	1	3,6	6,4	0	1
5	81,8091	128,1514	1	0,9858	1,0354	0	1
6	80,7255	140,4694	1	12,2697	12,4494	0	1
7	52,1053	80,7971	1	6,3016	6,4516	0	1
8	26,7311	40,4187	1	5,6861	5,6861	0	1
9	92,0424	187,0027	1	5,6507	5,7078	0	1
10	77,375	163,75	1	11,3915	12,3261	0	1
11	92,5208	165,928	1	32,045	35,8496	0	1
12	98,9862	231,5668	1	33,7029	33,9246	0	1
13	77,9051	128,4779	1	32,3024	34,3643	0	1
14	91,058	174,3769	1	22,6695	22,9873	0	1
15	59,3133	85,8255	1	0,5181	0,5181	0	1
16	53,7938	78,2101	1	0	0	0	1
17	92,1637	145,2843	1	18,9751	18,9751	0	1
18	77,6992	136,9416	1	0,7133	0,7133	0	1
19	90,8547	154,1026	1	27,6471	32,4731	0	1
20	59,1141	90,971	1	43,389	45,4001	0	1
21	35,1974	48,136	1	40,5704	41,5363	0	1
22	88,4918	176,454	1	0,1195	0,1195	0	1
23	82,8808	151,0558	1	10,0344	10,9278	0	1
24	92,8913	152,5784	1	0,1844	0,1844	0	1
25	51,0478	80,0953	1	11,7224	11,7224	0	1
26	94,6737	201,8414	1	0,0769	0,0769	0	1
27	68,7616	89,7959	1	0,9031	0,9031	0	1
28	53,0214	66,2768	1	29,2655	36,3794	0	1
29	91,042	187,081	1	4,1021	4,1021	0	1
30	100	141,1765	1	4,0404	4,0404	0	1
31	97,975	238,7043	1	0,5725	0,5725	0	1
32	98,7805	246,7988	1	0,2521	0,2521	0	1
33	87,9127	171,1675	1	20,8356	20,8356	0	1
34	65,8757	98,9831	1	49,9366	53,4181	0	1
35	64,7124	119,1329	1	47,0132	52,2886	0	1
36	85,2497	137,7468	1	0,1195	0,1195	0	1
37	66,9789	130,1575	1	56,9231	87,3626	1	2
38	47,4572	66,5081	1	20,9666	23,2131	0	1
39	87,7782	147,0389	1	42,1561	46,6914	0	1
40	31,3253	36,1446	1	14,5749	14,7498	0	1
41	36,2305	47,4143	1	18,3746	19,0813	0	1

42	87,2327	193,0189	1	15,7268	15,8521	0	1
43	80,8877	119,7389	1	0,6435	0,6435	0	1
44	47,0874	63,2686	1	0,3861	0,3861	0	1
45	94,4065	186	1	8,836	8,836	0	1
46	81,2616	141,744	1	9,6083	12,2616	0	1
47	80,6775	139,9275	1	1,4035	1,4035	0	1
48	38,8701	55,9097	1	5,1698	5,2558	0	1
49	97,7004	186,0783	1	24,055	30,0344	0	1
50	86,8579	156,7712	1	38,6815	73,884	0	1
51	54,3622	85,9815	1	30,0673	48,8407	0	1
52	33,3333	48,3333	1	0,1764	0,1764	0	1
53	58,8618	100,4878	1	12,3308	12,5313	0	1
54	78,1721	121,2386	1	0,0807	0,121	0	1
55	95,0876	174,6946	1	1,3165	1,3165	0	1
56	82,7415	127,1307	1	0	0	0	1
57	17,9533	25,8528	0	3,464	3,464	0	1
58	97,9798	133,0808	1	12,3699	12,3699	0	1
59	71,5103	98,7414	1	0,6652	0,6652	0	1
60	51,1324	68,9857	1	1,6105	1,6105	0	1
61	88,1963	144,1645	1	0	0	0	1
62	98,7505	196,3809	1	0	0	0	1
63	35,3204	49,7765	1	6,1485	6,1803	0	1
64			1			0	1
65	90,3804	134,6005	1	0	0	0	1
66	100	222,4138	1	2,0696	2,2578	0	1
67	98,6226	199,4737	1	1,004	1,004	0	1
68	33,8369	53,7764	1	0,2448	0,2448	0	1
69	94,4629	228,1285	1	0,7389	0,9852	0	1
70	92,2857	157,4286	1	16,4957	16,5812	0	1
71	93,0769	148,1197	1	0,1284	0,1284	0	1
72	83,8006	164,7975	1	0,2174	0,2174	0	1
73	93,404	173,1449	1	72,829	83,0253	1	2
74	53,125	87,5	1	0,0842	0,0842	0	1
75	86,6667	208,2155	1	0,4803	0,4803	0	1
76	54,6667	71,9298	1	0,7042	0,7042	0	1
77	89,8618	169,967	1	3	3	0	1
78	94,721	222,5322	1	0	0	0	1
79	90,93	155,3387	1	0	0	0	1
80	82,5637	129,2673	1	22,9707	24,6273	0	1
81	94,2308	173,3021	1	0,5889	0,5889	0	1
82	83,1217	181,6225	1	0,5435	0,5435	0	1

Vimentin status: 0 = negative; 1 = positive. E-Caderin status: 0 = retained expression; 1 = loss of expression.
EMT Status: 0 = no EMT; 1 = EMT.

Spot	Col V (%)	Pattern	Tissue	55	5,521	0	1	108	4,668	0	1
8	0,049	0	1	56	12,184	0	1	109	4,757	0	1
9	0,085	0	1	57	0,551	0	1	110	9,691	0	1
10	0,107	0	1	62	3,847	0	1	111	11,48	0	1
11	1,113	0	1	63	1,02	0	1	113	3,215	0	1
12	1,277	0	1	64	1,522	0	1	114	1,898	0	1
13	2,83	0	1	65	2,535	0	1	115	5,005	0	1
14	1,06	0	1	66	2,8	0	1	116	6,585	0	1
15	3,118	0	1	67	2,403	0	1	118	2,361	0	1
16	3,648	0	1	68	6,916	0	1	119	7,001	0	1
17	6,15	2	1	69	2,809	0	1	120	3,689	0	1
18	5,77	0	1	70	0,988	0	1	121	0,877	0	1
19	2,79	0	1	71	2,787	0	1	122	0,282	0	1
20	2,312	0	1	72	6,562	0	1	123	0,133	0	1
21	1,766	0	1	73	2,542	0	1	124	1,615	0	1
22	3,193	0	1	74	3,03	0	1	125	2,437	0	1
23	6,717	0	1	75	2,343	0	1	126	9,48	0	1
24	0,611	0	1	76	1,471	0	1	127	9,103	0	1
26	0,387	0	1	77	0,943	0	1	132	1,118	0	1
27	3,124	2	1	82	5,829	0	1	134	2,161	0	1
28	5,511	0	1	83	3,574	0	1	135	3,188	0	1
29	5,987	0	1	85	4,504	2	1	136	3,156	0	1
30	1,808	0	1	86	3,129	0	1	138	6,847	2	1
31	2,08	0	1	87	5,116	2	1	139	1,032	0	1
32	2,43	0	1	88	5,117	0	1	140	0,598	0	1
33	4,569	0	1	89	3,868	0	1	142	5,522	0	1
34	2,918	0	1	91	6,138	0	1	143	4,904	0	1
35	2,174	0	1	92	6,507	2	1	144	3,976	0	1
36	2,343	0	1	93	6,278	0	1	145	2,655	0	1
37	1,507	0	1	94	4,033	0	1	146	2,118	0	1
38	0,64	0	1	95	0,873	0	1	150	0,44	0	1
39	2,751	0	1	96	4,779	0	1	151	2,402	0	1
40	0,898	0	1	97	3,617	0	1	153	1,653	0	1
41	0,063	0	1	98	4,555	0	1	154	1,857	0	1
42	0,014	0	1	99	5,526	0	1	155	5,621	0	1
43	0,146	2	1	100	7,911	0	1	157	5,989	0	1
44	0,832	0	1	101	5,951	0	1	158	3,776	0	1
45	6,809	0	1	102	6,038	0	1	159	2,744	0	1
46	0,376	0	1	103	0,087	0	1	160	4,09	0	1
47	10,473	0	1	104	0,234	0	1	161	7,147	0	1
48	4,986	2	1	105	0,48	0	1	162	5,31	0	1
49	8,578	0	1	106	6,172	2	1	16	8,118	0	2
54	6,621	0	1	107	4,557	0	1	17	4,513	0	2

18	3,071	0	2	83	7,995	0	2	134	15,427	0	2
22	9,491	0	2	84	3,845	0	2	135	5,524	0	2
23	2,29	0	2	85	7,774	0	2	136	9,085	0	2
25	8,225	0	2	86	3,986	0	2	137	10,346	0	2
26	4,328	0	2	87	13,261	0	2	138	3,639	0	2
28	7,51	0	2	88	17,236	0	2	142	14,719	0	2
29	0,956	0	2	89	37,513	0	2	143	11,538	0	2
30	1,284	0	2	92	19,907	0	2	144	12,294	0	2
32	10,318	0	2	95	10,239	0	2	145	7,409	0	2
33	11,858	2	2	96	14,157	0	2	146	0,89	0	2
34	16,056	2	2	97	7,942	0	2	147	0,338	0	2
36	5,814	0	2	98	12,551	0	2	148	13,079	0	2
37	4,287	0	2	99	15,256	0	2	149	10,954	0	2
38	13,57	0	2	100	8,171	0	2	150	9,552	0	2
42	16,104	0	2	104	16,99	0	2	5	16,671	1	0
44	8,442	0	2	105	40,388	0	2	6	32,206	0	0
45	22,764	0	2	106	17,553	0	2	7	15,885	1	0
46	10,703	0	2	107	31,435	0	2	8	35,361	1	0
50	16,296	0	2	108	32,884	0	2	10	7,627	1	0
51	17,147	0	2	109	30,694	0	2	11	13,191	1	0
52	18,728	0	2	110	11,42	0	2	12	9,299	1	0
53	12,556	0	2	111	10,584	0	2	13	14,094	1	0
54	12,875	0	2	112	11,607	0	2	15	29,987	1	0
55	7,778	0	2	113	11,371	0	2	17	7,214	1	0
58	4,68	0	2	114	4,928	0	2	18	30,528	1	0
60	6,436	0	2	115	10,882	0	2	19	37,319	1	0
61	5,537	0	2	116	6,968	0	2	20	39,298	1	0
62	8,975	0	2	117	28,49	0	2	21	9,576	1	0
63	7,271	0	2	118	14,869	0	2	22	12,331	1	0
64	11,763	0	2	119	12,425	0	2	23	14,702	1	0
67	17,365	0	2	120	5,96	0	2	25	18,361	1	0
68	8,319	0	2	121	0,537	0	2	26	17,265	1	0
69	10,525	0	2	123	11,749	0	2	27	11,702	1	0
71	1,275	0	2	124	8,996	0	2	28	34,796	1	0
72	1,811	0	2	125	5,527	0	2	29	22,31	1	0
74	11,127	0	2	126	2,819	0	2	30	19,308	1	0
76	22,399	0	2	127	15,011	0	2	31	5,954	1	0
77	19,688	0	2	128	21,46	0	2	32	14,715	1	0
78	22,563	0	2	129	30,212	0	2	33	9,025	1	0
79	9,216	0	2	130	29,316	0	2	34	11,638	1	0
80	6,638	0	2	131	29,623	0	2	35	22,505	1	0
81	3,673	0	2	132	9,138	0	2	36	15,98	1	0
82	19,198	0	2	133	12,061	0	2	7	11,815	1	0

8	18,188	1	0	59	19,116	0	0	10	16,861	1	0
9	16,857	1	0	60	4,046	1	0	11	6,362	1	0
10	6,621	1	0	61	4,767	0	0	13	0,454	1	0
11	21,744	1	0	62	10,621	1	0	14	0,206	1	0
12	21,227	1	0	63	9,913	1	0	16	0,316	1	0
16	3,616	1	0	64	11,85	1	0	17	7,889	1	0
17	3,836	1	0	65	15,389	1	0	18	15,656	1	0
18	6,391	1	0	66	19,432	1	0	19	13,614	1	0
19	13,529	1	0	67	9,902	1	0	20	10,612	1	0
20	17,519	1	0	68	13,257	1	0	21	9,509	1	0
21	19,766	1	0	69	13,827	1	0	22	16,225	1	0
23	11,933	1	0	70	14,931	1	0	23	0,471	1	0
24	8,133	1	0	71	8,958	0	0	24	0,894	1	0
25	15,041	1	0	73	17,384	1	0	25	1,047	1	0
26	9,796	1	0	74	11,017	1	0	26	3,167	1	0
27	16,616	1	0	75	15,041	1	0	27	1,905	1	0
28	23,037	1	0	76	13,593	1	0	28	3,711	1	0
29	7,688	1	0	83	11,817	1	0	31	13,867	1	0
30	14,012	1	0	84	9,029	1	0	32	2,785	1	0
31	19,127	1	0	85	18,213	1	0	33	11,688	1	0
32	6,199	1	0	89	16,377	1	0	34	4,882	1	0
33	27,165	1	0	91	9,206	1	0	35	10,369	1	0
34	28,011	1	0	95	1,404	1	0	37	25,965	1	0
35	30,715	1	0	96	0,678	1	0	38	15,35	1	0
38	9,595	1	0	97	0,365	1	0	40	10,062	1	0
39	3,214	1	0	98	11,439	1	0	41	9,172	1	0
40	7,274	1	0	99	17,74	1	0	42	8,953	1	0
41	0,377	1	0	101	6,746	1	0	43	7,122	1	0
43	2,574	0	0	104	10,784	1	0	44	13,412	1	0
44	8,342	1	0	105	11,264	1	0	45	12,705	1	0
45	16,022	1	0	107	21,452	1	0	46	5,023	1	0
46	19,423	1	0	108	2,263	1	0	47	3,476	1	0
47	23,805	1	0	109	0,544	1	0	49	0,935	1	0
48	18,344	1	0	110	11,743	1	0	50	1,573	1	0
49	17,284	1	0	111	17,549	1	0	51	2,367	1	0
50	9,04	1	0	112	13,685	1	0	53	3,226	1	0
51	11,978	1	0	4	2,801	1	0	59	11,116	1	0
52	14,066	1	0	5	15,656	1	0	60	7,474	1	0
53	19,159	1	0	5	1,195	1	0	61	13,413	1	0
54	17,137	1	0	6	4,169	1	0	62	5,515	1	0
56	11,814	1	0	7	3,701	1	0	63	10,915	1	0
57	11,015	1	0	8	9,554	1	0	64	8,75	1	0
58	15,946	1	0	9	15,376	0	0	67	5,239	1	0

68	5,426	1	0
69	2,825	1	0
70	1,302	1	0
71	2,453	1	0
72	0,989	1	0
73	5,075	1	0
74	6,618	1	0
75	13,808	1	0
77	2,164	1	0
78	2,453	1	0
79	3,841	1	0
83	3,696	1	0
84	2,24	1	0
85	4,795	1	0
88	1,494	0	0
89	3,461	0	0
90	2,894	1	0
91	0,045	1	0
92	3,9	1	0
93	5,119	1	0
95	6,352	0	0
96	1,725	1	0
97	0,625	1	0
98	0,982	1	0
99	1,822	1	0
100	3,775	1	0
101	1,257	1	0
102	2,125	1	0
103	1,189	1	0
104	2,793	1	0
105	0,378	1	0
106	0,062	1	0
107	0,141	1	0

Pattern: 0 = isolated; 1 = block;
2 = mixed. Tissue/Disease: 0 =
MM; 1 = breast; 2 = lung.
Interpretation: 0 = absent; 1 =
weak; 2 = moderate; 3 = strong

TMA	Pattern	Disease	Histology	Subtype	Col V %	Col V H-S	Interpretation
437	0	0	0	0	71,3974	130,3493	2
437	0	0	0	1	74,9084	119,1336	2
437	1	0	0	2	93,2745	176,8679	2
437	0	0	0	4	63,8763	91,2593	1
437	1	0	0	1	78,4512	150,1155	2
437	0	0	0	3	74,8503	170,5389	2
437	0	0	0	6	69,0583	140,5381	2
437	0	0	0	3	92,6342	173,7828	2
437	0	0	0	1	58,121	100,7962	2
437	1	0	0	3	97,5723	210,8671	3
463	0	0	0	3	43,4806	64,1221	1
463	1	0	0	4	84,7899	152,5017	2
463	1	0	0	1	46,5116	60,4651	1
463	1	0	1	1	79,1225	101,7398	2
463	1	0	0	1	3,1579	3,75	0
463	1	0	1	1	27,0073	33,9416	1
463	1	0	1	1	75,1857	141,3076	2
463	1	0	0	3	18,9238	24,843	0
463	0	0	0	7	8,2992	9,7127	0
463	1	0	1	1	54,2533	77,3157	1
463	1	0	0	2	89,9219	211,0007	3
463	1	0	0	6	87,0131	207,0089	3
463	1	0	0	1	84,2437	198,7395	2
463	0	0	0	2	82,1272	144,0114	2
463	1	0	0	3	27,853	47,5822	1
463	1	0	0	1	87,1429	212,381	3
463	1	0	0	6	54,7692	76,9231	1
463	0	0	0	2	40,1786	57,9241	1
463	2	0	0	2	18,6644	21,2329	0
463	0	0	0	8	88,6404	175,2517	2
463	0	0	0	2	68,5393	92,8839	1
463	0	0	0	2	86,9013	201,7958	3
463	1	0	0	3	78,7016	186,9467	2
463	0	0	0	3	56,741	101,1219	2
463	0	0	0	3	72,2394	142,595	2
463	2	0	0	1	20	23,3333	0
463	0	0	0	4	49,2078	79,8713	1
463	1	0	0	2	22,2689	27,395	0
463	0	0	1	1	79,3765	99,2806	1
463	0	0	0	2	25,0162	40,1517	1
463	1	0	0	2	54,7155	80,9072	1

463	1	0	0	7	61,194	88,4993	1
463	0	0	0	3	62,6113	119,5183	2
463	1	0	0	1	41,1765	76,4706	1
463	1	0	1	1	85,8235	114,4545	2
463	1	0	0	1	71,9095	165,0081	2
464	0	0	0	9	38,5949	51,0036	1
464	1	0	0	1	70,5669	120,55115	2
464	1	0	0	2	40,2229	46,5552	1
464	1	0	1	1	14,7541	15,082	0
464	1	0	0	1	1,8721	2,3401	0
464	0	0	0	5	39,8537	63,6643	1
464	1	0	0	2	10	15	0
464	1	0	0	5	62,1689	94,5364	1
464	0	0	0	1	47,00905	86,6689	1
464	1	0	0	1	70,7865	118,7266	2
464	0	0	0	2	38,5659	48,4496	1
464	1	0	0	2	40,6926	56,5743	1
464	1	0	1	1	26,3559	32,5428	1
464	1	0	0	1	63,9831	110,8051	2
464	0	0	0	2	64,3564	119,544	2
464	0	0	0	0	54,2857	113,545	2
464	0	0	0	0	73,0198	95,1114	1
464	1	0	1	1	17,0279	24,3836	0
464	1	0	0	1	82	188	2
464	0	0	0	2	61,4744	87,382	1
464	1	0	0	2	71,6274	108,8763	2
464	0	0	0	1	72,00965	114,00725	2
464	1	0	0	3	32,0866	37,1063	1
464	0	0	0	1	92,782	225,4135	3
464	0	0	0	3	43,4783	58,4708	1
464	1	0	0	2	57,9869	134,5837	2
479	1	2	5		45,1701	56,8057	1
479	0	2	5		68,2057	90,8185	1
479	2	2	5		34,3944	50,1304	1
479	2	2	5		58,9305	95,1727	1
479	0	2	5		48,5356	67,7824	1
479	2	2	5		62,0218	72,70955	1
479	2	2	5		25,4377	30,484	1
479	2	2	6		38,403	56,6667	1
479	0	2	5		47,087	92,6747	1
479	0	2	6		24,5962	31,9809	1
479	2	2	7		36,2282	78,0314	1
479	2	2	5		19,2597	20,0125	0

479	1	2	5		44,1718	73,4272	1
479	2	2	5		64,0041	105,2424	2
479	2	2	5		52,9781	72,1003	1
479	2	2	5		32,1351	40,305	1
479	1	2	8		31,0263	49,8807	1
479	2	2	5		3,2333	3,2333	0
479	2	2	5		7,5342	8,9041	0
479	2	2	5		10,1473	14,1925	0
479	2	2	5		31,6253	37,47	1
479	2	2	5		75,502	150,9237	2
479	2	2	5		61,9247	118,8285	2
479	2	2	5		34,3052	36,9291	1
479	1	2	5		39,9823	64,1659	1
479	2	2	5		65,453	118,8828	2
479	2	2	5		35,6557	41,9057	1
479	1	2	5		63,5135	84,6847	1
479	2	2	5		48,4623	60,6647	1
479	0	2	5		31,6159	45,1991	1
479	2	2	6		73,6422	139,0575	2
479	2	2	5		35,6436	60,177	1
479	2	2	5		34,5064	47,3118	1
479	2	2	5		29,052	35,2701	1
479	1	2	5		60,3535	104,5455	2
479	2	2	5		69,2308	105,7799	2
479	2	2	5		63,8201	108,0553	2
479	1	2	5		3,8462	4,244	0
479	2	2	5		13,8801	20,715	0
479	1	2	5		91,4634	168,9312	2
479	1	2	6		50,4478	68,5572	1
479	2	2	5		30,8683	37,867	1
479	2	2	5		36,0073	43,1176	1
479	2	2	5		41,7077	77,9967	2
479	2	2	5		89,8533	191,5253	2
479	0	2	6		16,2162	22,973	0
479	2	2	9		20,7331	21,4204	0
479	2	2	5		96,3018	232,728	3
479	0	2	6		42,0202	55,3535	1
480	2	1	3	3	68,743	152,394	2
480	2	1	3	3	13,7131	16,1765	0
480	2	1	2	2	33,9942	47,1745	1
480	1	1	2	2	30,0719	43,5971	1
480	1	1	2	1	7,0715	8,2363	0
480	2	1	2	2	50,6066	93,0676	1

480	2	1	2	2	10,3048	11,4659	0
480	1	1	2	0	42,7918	50,1907	1
480	2	1	2	0	34,1137	47,6589	1
480	1	1	4	4	6,3019	7,3278	0
480	1	1	3	3	9,7462	10,7614	0
480	1	1	2	0	2,8986	2,8986	0
480	2	1	3	3	26,7055	36,9384	1
480	1	1	3	3	4,142	4,4379	0
480	1	1	2	3	12,3989	19,9461	0
480	0	1	2	0	37,7153	48,9574	1
480	2	1	2	3	47,0611	84,9826	1
480	2	1	2	5	15,4401	19,3691	0
480	1	1	2	2	32,0628	47,6934	1
480	1	1	2	1	26,9656	32,4053	1
480	1	1	2	2	30,8656	42,9385	1
480	0	1	2	3	38,68	55,9733	1
480	2	1	2	1	53,3079	77,8387	1
480	1	1	2	0	29,0694	37,4145	1
480	1	1	4	4	4,8	6,1333	0
480	1	1	2	2	63,1229	175,2492	2
480	2	1	2	1	73,2431	115,3449	2
480	1	1	3	3	39,2756	49,847	1
480	1	1	2	0	73,0353	117,0483	2
480	2	1	3	3	3,0645	3,4943	0
480	2	1	2	3	75,0369	94,2393	1
480	1	1	2	0	4,5039	5,554	0
480	1	1	2	2	7,4737	11,4737	0
480	2	1	2	0	33,2781	50,8278	1
480	2	1	2	2	12,3188	13,7681	0
480	1	1	2	2	4,7269	5,5672	0
480	2	1	2	0	51,9886	87,3581	1
480	1	1	4	4	31,7291	42,246	1
480	1	1	4	4	9,776	13,3791	0
480	2	1	2	0	39,3905	50,9886	1
480	2	1	2	3	53,2164	92,5439	1
480	1	1	3	3	2,2556	2,924	0
480	1	1	3	3	4,3841	5,5324	0
480	1	1	2	2	3,7915	4,8578	0
480	2	1	2	2	44,7368	65,4762	1
480	0	1	2	2	18,6986	24,3586	0
480	1	1	2	0	63,07	100,749	2
480	1	1	2	2	0,4651	0,9302	0
480	1	1	3	3	10,6299	17,2244	0

480	1	1	2	0	29,9406	34,0967	1
480	1	1	2	4	3,3333	3,3333	0
480	1	1	3	3	13,9417	18,251	0

Pattern: 0 = isolated; 1 = block; 2 = mixed. Tissue/Disease: 0 = MM; 1 = breast; 2 = lung. Interpretation: 0 = absent; 1 = weak; 2 = moderate; 3 = strong.