



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANTONIO CARLOS GOMES DE BARROS JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS
ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES DO
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (*EGFR*) EM
ADENOCARCINOMA DE PULMÃO**

CAMPINAS-SP

2022

ANTONIO CARLOS GOMES DE BARROS JUNIOR

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS
ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES DO
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (*EGFR*) EM
ADENOCARCINOMA DE PULMÃO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área
de concentração eficácia e efetividade de testes diagnósticos e
protocolos de tratamento em saúde.

ORIENTADOR: PROF. DR. LAIR ZAMBON

COORIENTADOR: PROF. DR. MAURÍCIO WESLEY PERROUD JUNIOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO ANTONIO CARLOS GOMES DE BARROS JUNIOR,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. LAIR ZAMBON.

CAMPINAS-SP

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

B278a Barros Junior, Antonio Carlos Gomes de, 1988-
Avaliação da técnica imuno-histoquímica com anticorpos específicos para a detecção das mutações mais frequentes do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em adenocarcinoma de pulmão / Antonio Carlos Gomes de Barros Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Lair Zambon.
Coorientador: Maurício Wesley Perroud Junior.
Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imuno-histoquímica. 2. Genes erbB-1. 3. Neoplasias pulmonares. 4. Adenocarcinoma de pulmão. I. Zambon, Lair, 1956-. II. Perroud Junior, Maurício Wesley, 1971-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of the immunohistochemical technique with specific antibodies for the detection of the most frequent mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung adenocarcinoma

Palavras-chave em inglês:

Immunohistochemistry

Genes, erbB-1

Lung neoplasms

Adenocarcinoma of lung

Área de concentração: Eficácia e Efetividade de Testes Diagnósticos e Protocolos de Tratamento em Saúde

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Lair Zambon [Orientador]

Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Paulo Eduardo Pizao

Data de defesa: 15-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciência Aplicada à Qualificação Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4950-6868>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4354208440972680>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANTONIO CARLOS GOMES DE BARROS JUNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. LAIR ZAMBON

COORIENTADOR: PROF. DR. MAURÍCIO WESLEY PERROUD JUNIOR

MEMBROS TITULARES:

1. Prof. Dr Lair Zambon
2. Profa. Dra Albina Messias de Almeida Milani Altemani
3. Prof. Dr Paulo Eduardo Pizao

Programa de Pós-Graduação em Ciência Aplicada à Qualificação Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 15/12/2022

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr Lair Zambon e ao meu coorientador Prof. Dr Maurício Wesley Perroud Jr por terem acreditado no meu trabalho e por me guiarem de forma assertiva e com entusiasmo nesta trajetória. Agradeço por terem me fornecido todo o suporte para a conclusão desse projeto.

À Dra Helen Naemi Honma que me apoiou na concepção desta dissertação, sendo uma peça ativa e fundamental para que esse estudo atingisse seu objetivo. Agradeço a ela pelas horas dedicadas a este projeto e a todos os conselhos e ensinamentos fornecidos.

Ao Dr Guilherme Rossi que esteve presente durante a operação dos resultados deste trabalho. Agradeço pela disponibilidade e dedicação. Ao Prof Dr. André Moreno que contribuiu diretamente para a obtenção desses resultados.

Aos meus pais, Antonio Carlos Barros e Rosa Maria Barros, por terem me dado sempre a oportunidade de priorizar estudos e por me impulsionarem a me dedicar à medicina e ao desempenho ético da profissão. Meu muito obrigado. À minha noiva, Mariana Peccia, por ser o apoio diário e por ser parceira desde o início para a conclusão dessa etapa. À minha irmã, Luciana Barros e por sua família, que juntamente aos meus pais sempre compuseram a base de tudo.

À minha amiga de residência em pneumologia, Raquel Baldini, por esses anos de trabalho e incentivo, inclusive na pós-graduação. Aos meus amigos, que hoje trago com muita consideração, que estiveram sempre ao meu lado, nas mais diversas situações.

Agradeço a Deus.

RESUMO

Introdução: O câncer de pulmão é a segunda neoplasia mais incidente no mundo (excluindo-se o câncer de pele não-melanoma) e a com maior mortalidade. Tem uma carcinogênese complexa, com comportamento biológico agressivo e baixa taxa de resposta à quimioterapia citotóxica. O estudo e avanço de terapias moleculares para mutações específicas, como o *EGFR*, mudaram paradigmas no diagnóstico e nas linhas de tratamento. **Objetivos:** Projetou-se com o presente estudo comparar a tradicional técnica de sequenciamento de gene do *EGFR* éxons 19 e 21, confrontado com os da expressão de antígenos pela imuno-histoquímica (IHQ). **Justificativa:** Conseguir detectar as mutações mais frequentes por meio de técnica amplamente disponível, facilitando a abordagem, reduzindo custos operacionais e tempo total para o diagnóstico. **Métodos:** As amostras foram obtidas retrospectivamente no arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sendo as mesmas submetidas à extração de DNA para PCR e sequenciamento do gene. Os mesmos espécimes foram então submetidos à técnica imuno-histoquímica. **Resultados:** Após análise de 160 casos de adenocarcinoma de pulmão, foram identificadas 10 reações de IHQ positivas para a mutação da deleção do éxon 19, com sensibilidade de 47% e especificidade de 99%. Já para a mutação do éxon 21 foram avaliadas 21 reações positivas na IHQ, com sensibilidade de 55% e especificidade de 89%. Ambos os anticorpos específicos foram comparados à reação de PCR para mutações realizadas nas mesmas amostras. **Conclusão:** Os dados deste trabalho

permitem concluir que a aplicação de IHQ como *screening* com anticorpo específico permite identificar 47% das mutações no éxon 19 do *EGFR*. No entanto, os resultados apenas modestos do anticorpo específico para mutação do éxon 21 dependem de outros trabalhos para estimular seu uso sistemático.

Palavras-chaves: *Imuno-histoquímica. Genes erbB-1. Neoplasias Pulmonares. Adenocarcinoma de pulmão.*

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer is the second most frequent neoplasm (excluding non-melanoma skin cancer) with the highest mortality worldwide. It has a complex carcinogenesis, with aggressive biological behavior and low response rate to cytotoxic chemotherapy. The study and advance of molecular therapies for specific mutations, such as EGFR, have changed paradigms in diagnosis and treatment lines. **Objectives:** The present study aimed to compare the traditional technique of gene sequencing of EGFR exons 19 and 21, compared with those of antigen expression by immunohistochemistry (IHC). **Rationale:** Detect the most frequent mutations through a widely available technique, facilitating the approach, reducing operational costs and total time for diagnosis. **Methods:** The samples were obtained retrospectively from the file of the Laboratory of Pathological Anatomy of the Hospital de Clínicas from UNICAMP, and they were submitted to DNA extraction for PCR and gene sequencing. The same specimens were then submitted to the immunohistochemical technique. **Results:** After analyzing 160 cases of lung adenocarcinoma, 10 positive IHC reactions for the exon 19 deletion mutation were identified, with a sensitivity of 47% and specificity of 99%. As for the mutation of exon 21, 21 positive reactions were evaluated in the IHC, with a sensitivity of 55% and specificity of 89%. Both specific antibodies were compared to the PCR reaction for mutations which were performed in the same samples. **Conclusion:** The data from this presentation allow us to conclude that the application of IHC as a

screening with specific antibody detects 47% of the mutations in exon 19 of the EGFR. However, the weak results of the exon 21 mutation-specific antibody depend on other researches to encourage its systematic use.

Keywords: *Immunohistochemistry. Genes, erbB-1. Lung neoplasms. Adenocarcinoma of Lung.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mutações <i>driver</i> do adenocarcinoma de pulmão.....	16
Figura 2: Fluxograma da seleção de pacientes	31
Figura 3: Apresentação de marcação por IHQ considerada positiva, com anticorpo clone 6B6 (<i>Cell Signaling</i>) específico para a deleção do éxon 19 do <i>EGFR</i>	38
Figura 4: Apresentação de marcação por IHQ considerada positiva, com anticorpo clone SP125 (<i>Abcam</i>) específico para a mutação L858R do éxon 21 do <i>EGFR</i>	39
Figura 5: Exemplos de controles negativos para as reações de IHQ da deleção do éxon 19 e mutação L858R do éxon 21.....	40
Figura 6: Possível algoritmo para o uso de anticorpo da mutação <i>EGFR</i> éxon 19 específico.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores e a temperatura de anelamento usados na técnica de PCR.....	24
Tabela 2: Padronização do resultado de Imuno-histoquímica (IHQ).....	28
Tabela 3: Distribuição de idade.....	32
Tabela 4: Distribuição de sexo.....	32
Tabela 5: Distribuição de cor de pele.....	33
Tabela 6: Distribuição de idade em relação ao sexo.....	33
Tabela 7: Resultados da técnica molecular e de IHQ da mutação éxon 19	34
Tabela 8: Avaliação IHQ para a deleção do éxon 19.....	34
Tabela 9: Resultados da técnica molecular e de IHQ de mutação do éxon 21	35
Tabela 10: Avaliação IHQ para mutação do éxon 21.....	36
Tabela 11: Resultados da avaliação global de mutação éxons 19 e 21 por técnica molecular e de IHQ.....	37
Tabela 12: Avaliação global de mutação éxons 19 e 21 por técnica IHQ.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK	Linfoma anaplásico quinase
ATP	Adenosina trifosfato
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i> (gene)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CPNPC	Carcinoma pulmonar de não pequenas células
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HC	Hospital de Clínicas
HER1	Receptor 1 do fator de crescimento epidérmico humano
IHQ	Imuno-histoquímica
MET	<i>receptor tyrosine kinase</i> (gene)
NTRK	<i>neurotrophic tyrosine receptor kinase</i> (gene)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino ou <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNA-LNA PCR	<i>Peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR</i>
RET	<i>rearranged during transfection</i> (gene)

ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1</i> (gene)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TKI	Inibidor da tirosina quinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
4	MÉTODOS	20
4.1	DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO	20
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	21
4.4	ASPECTOS ÉTICOS	21
4.5	AMBIENTE DO ESTUDO.....	22
4.6	COLETA DO MATERIAL E TÉCNICAS UTILIZADAS	22
4.6.1	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO (<i>método SANGER</i>)	23
4.6.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ).....	26
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
4.7.1	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA	29
4.7.2	ANÁLISE DE RESULTADOS	29
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO.....	49
8	REFERÊNCIAS	50
9	ANEXO 1.....	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é a quarta neoplasia de maior incidência no Brasil e a segunda mais incidente no mundo, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, entre homens e mulheres. É o câncer com maior mortalidade, com mais de 1.796.000 casos de óbitos no mundo no ano de 2020, conforme relatório da *International Agency for Research on Cancer* da Organização Mundial de Saúde (OMS). (1) De maneira geral, sua relação marcante com o tabagismo torna sua prevalência passível de redução a partir de políticas públicas de cessação de derivados do tabaco. (2,3)

As neoplasias de pulmão dividem-se essencialmente em não pequenas células (80-85%) e pequenas células (10-15%), sendo os demais subtipos minoritários em incidência. (4) No primeiro grupo, insere-se o adenocarcinoma e toda a sua variabilidade genética, histopatológica e clínica. Na atualidade, considera-se a pesquisa de mutações genéticas como uma alteração de paradigma na história do câncer de pulmão, configurando um pilar diagnóstico para o estabelecimento de terapias alvo moleculares e inserindo a doença dentro da medicina personalizada, na qual cada indivíduo com câncer de pulmão deve ser avaliado e tratado de maneira particularizada, conforme características individuais e de expressão genética. (2,5) O sequenciamento de DNA dos genes é o método primariamente utilizado em espécimes de biópsias de tecidos ou nos significativos esforços de aprimoramento das técnicas de biópsia líquida. (6) O gene *EGFR*, que codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (*EGFR*, *erbB-1*, *HER1*), merece especial atenção pela sua frequência e pela disponibilidade de terapia-alvo com medicamentos inibidores de tirosina-quinase (TKI).

Em uma grande série de casos de adenocarcinomas pulmonares do Brasil, foram encontrados uma frequência mutacional de 22,7% para o *EGFR* e 20,4% para o *KRAS*. (7) Conforme dados da literatura dos Estados Unidos e Europa, a frequência das mutações-alvo no adenocarcinoma de pulmão é estimada nas seguintes

proporções: mutações no *KRAS* presente em 25%, mutações no *EGFR* aparecem em segundo com cerca de 20% e mutações e translocações do *ALK* ocorrem em cerca de 5%. Outras mutações *driver* ocorrem com *ROS1* em torno de 2%, *BRAF* em 2%, *MET* e *NTRK* com frequência estimada como sendo menor que 1%. Mutações em genes diferentes dos citados representam cerca de 38% das mutações acionáveis. (2,4,8,9) Esses dados estão representados no gráfico a seguir.

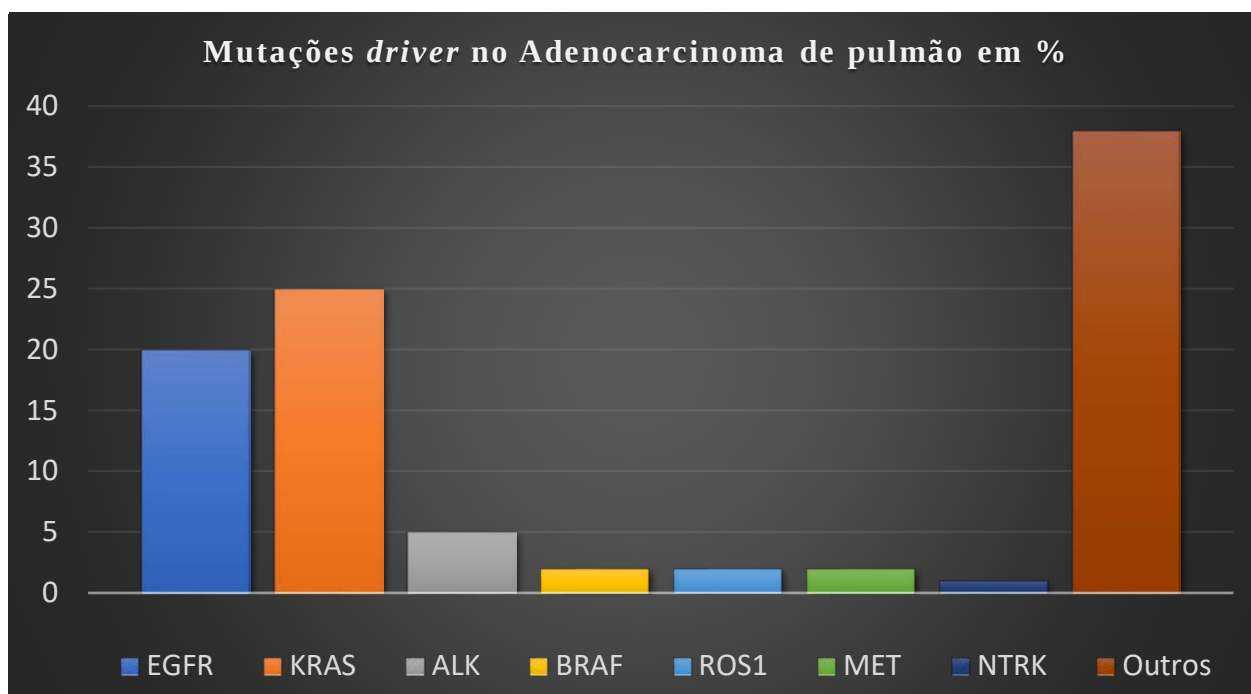


Figura 1. Porcentagem de mutações acionáveis do adenocarcinoma de pulmão.

Desde 2004, com o descobrimento da relação da mutação do *EGFR* com a possibilidade de uso de medicamentos TKI, houve enorme avanço nesse tema e, atualmente, há terapias já com largo uso na prática clínica, sendo eles os de primeira-geração: erlotinib e gefitinib; segunda-geração: afatinib; e terceira-geração: osimertinib. (10–12) Mutações em genes como *ALK*, *ROS1* e *BRAF* também foram objetos de pesquisas em terapias moleculares e possuem papel estabelecido para a introdução de tratamentos oncológicos baseados em terapia-alvo. (8) Mais recentemente, com

aprovação de drogas inibidoras pelo FDA em 2020, mutações nos genes *MET* e *RET* passaram também a fazer parte do painel necessário na investigação do status mutacional após o diagnóstico de câncer de pulmão. (9) Outros avanços na área seguem em constante atualização. Ainda interessante destacar que a IHQ, considerando um paralelo com este presente trabalho, representa um teste validado na pesquisa de alteração no *ALK* e como rastreamento na avaliação de *ROS1*, devendo este último ser submetido à análise por outro teste confirmatório. (2,13,14)

Quando estudamos particularmente as mutações *EGFR*, observamos que essas são mais prevalentes em mulheres asiáticas e não fumantes com adenocarcinoma e essas abrangem os éxons 18 a 21 que são responsáveis, em parte, pela codificação do domínio tirosina quinase. (4,9,15) O domínio completo compreende os éxons 18 a 24. (16) Embora os dados da *figura 1* mostrem uma frequência de cerca de 20% de mutações no *EGFR*, esses valores aumentam em percentual quando analisados diferentes universos populacionais, podendo chegar a até 60% em populações asiáticas, sendo que os mecanismos que justifiquem tal diferença entre raças permanecem desconhecidos. (15) Deve-se salientar que as mutações *drivers* são consideradas mutuamente exclusivas e a testagem simultânea de todo o espectro de mutações não é sempre necessária. (9) Entre 80 e 90% das mutações detectáveis no *EGFR* compreendem deleções no éxon 19 e uma mutação específica de ponto no códon 858 do éxon 21. Essas alterações ocorrem no sítio de ligação com o ATP (13, 14) e, geralmente, são referidas como mutações ativadoras, porque parecem resultar em aumento da atividade quinase do receptor. (16) A inibição por drogas, de maneira reversível ou irreversível, ocorre por competição com essas moléculas de ATP nos sítios de ligação do domínio C-terminal do receptor. Dessa forma, com o bloqueio da fosforilação e das vias de sinalização, há redução da proliferação e angiogênese de células tumorais. (18)

Nos laboratórios de patologia, a imuno-histoquímica é a principal técnica auxiliar diagnóstica, sendo método amplamente disponível, rápido e de menor custo em relação às técnicas moleculares de sequenciamento de DNA. (19) Desenvolver

anticorpos que detectam especificamente a proteína mutante do *EGFR* por imuno-histoquímica é de valiosa importância para os protocolos atuais utilizados no diagnóstico e no tratamento de câncer de pulmão. (20) Existem três tipos principais de avaliação IHQ do *EGFR*: IHQ para o *EGFR* total, IHQ para o *EGFR* fosforilado e IHQ para anticorpos específicos das mutações. Os dois primeiros possuem experiência e dados limitados na literatura e não são recomendados para uso na prática clínica. A avaliação do *EGFR* total, por exemplo, tem baixa correlação com as mutações do *EGFR* e não configura um método adequado para a seleção de tratamento com inibidor de tirosina-quinase. (21) Contudo, mais recentemente, anticorpos monoclonais específicos para as deleções no éxon 19 (E746_A750) ou mutações de ponto no éxon 21 (L858R) estão em estudo pela técnica de imuno-histoquímica e possuem sensibilidade e especificidade divergentes na literatura (sensibilidade variando de 44 – 100%; especificidade entre 70 – 100%). Cumpre-se ressaltar que, por enquanto, não existe qualquer consenso na sua utilização. (19,22–27) Com o propósito de explicar essa grande margem de resultados, em um estudo de revisão de Rossi *et al.* (2017) (19), foram selecionados resultados de trabalhos com a comparação das técnicas baseadas em PCR com a técnica imuno-histoquímica. Um primeiro ponto a ser ressaltado é de que há razoável variabilidade de sensibilidade das técnicas de mutação *EGFR* usadas nos diferentes estudos (Sequenciamento direto, PNA-LNA PCR; Pirosequenciamento; Sequenom Cobas-Roche, NGS), embora tradicionalmente todos sejam métodos de aceitação universal. (19) Dessa forma, o teste diagnóstico padrão-ouro empregado para comparar a sensibilidade e especificidade da técnica imuno-histoquímica não apresenta dados de performance totalmente homogêneos na literatura. Não há recomendação exclusiva de um método em detrimento de outro, embora aqueles com maior sensibilidade e com capacidade de analisar amostras com menor porcentagem de células tumorais tenham seu uso encorajado. (21) Um segundo ponto é que alguns estudos reuniram apenas adenocarcinomas, enquanto outros selecionaram neoplasias pulmonares de não pequenas células. (28–31)

Importante diferença entre as técnicas é que mutações em amostras que têm uma baixa porcentagem de células tumorais com *EGFR* mutante são muitas vezes perdidas por sequenciamento de DNA pela necessidade da técnica de espécimes de biópsia com tamanho adequado para análise molecular. (20) No entanto, podem ser detectadas por imuno-histoquímica com anticorpos específicos para as mutações mais frequentes no gene *EGFR*. Outra diferença que caracteriza potencial vantagem é que é possível realizar o estudo imuno-histoquímico sem a necessidade de grandes conteúdos tumorais, em tecidos escassos ou em amostras de citologia em materiais como lavado brônquico e punção aspirativa. (19)

No âmbito do Mestrado Profissional, a presente dissertação tem como justificativa a obtenção de dados de um serviço de oncopneumologia brasileiro quanto à eficácia e efetividade de testes diagnósticos imuno-histoquímicos, a fim de que possam suprir a demanda da dificuldade de acesso a testes de mutações genéticas no Sistema Único de Saúde para a avaliação dos subtipos de neoplasias pulmonares, especificamente o adenocarcinoma, com mutações *driver*.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: Detectar mutação do gene *EGFR* nos éxons 19 e 21 por meio de diferentes técnicas e caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes atendidos na oncopneumologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2021.

Objetivos específicos:

- A) Determinar a frequência de mutação do gene *EGFR* nos éxons 19 e 21 por meio das técnicas de sequenciamento de DNA (baseada em PCR) e imuno-histoquímica.
- B) Verificar a frequência de concordância das duas técnicas.

- C) Avaliar a distribuição dos pacientes com adenocarcinoma de pulmão quanto ao sexo, idade e cor da pele.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para a revisão da presente literatura, foram pesquisados os termos *Immunohistochemistry* e *Genes erbB-1* e *Lung Neoplasms* ou *Adenocarcinoma*, sendo todos os vocábulos consultados e estruturados por meio da plataforma DeCS – Descritores em Ciências da Saúde.

A pesquisa foi realizada pelo Portal Regional da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e pelo portal PubMed, com acesso às bases de dados da área da saúde: LILACS, MEDLINE, ADOLEC, BBO, BDENF, LEYES, MEDCARIB, REPIDISCA, OPAS, WHOLIS e DESASTRES.

Encontrado um total de 495 resultados, não se limitando a pesquisa por tipo de desenho de estudo. Destes, foram selecionados 26 trabalhos adequados e pertinentes à revisão bibliográfica proposta avaliados pelo resumo / *abstract*, com estudos e resultados direcionados à avaliação imuno-histoquímica na pesquisa das mutações mais frequentes do gene *EGFR*. Não encontrado nenhum trabalho na literatura nacional relativo ao tema.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão, independente do estágio clínico, atendidos pelas Disciplinas de Pneumologia e Cirurgia Torácica do ambulatório de Oncopneumologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com adenocarcinoma de pulmão, com diagnóstico histopatológico realizado ou revisto no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, independentemente do estágio clínico, da terapêutica realizada e do desfecho clínico.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão cujo material apresentou-se escasso ou degenerado, impossibilitando avaliação de sequenciamento genético e imuno-histoquímica.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido para apreciação e devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) UNICAMP, sob o número CAAE 13197019.7.0000.5404.

A maioria dos pacientes cujas espécimes de biópsia foram estudadas são falecidos e quase a totalidade se encontra fora de seguimento clínico com a oncopneumologia. Independentemente do exposto acima, a identidade dos participantes será mantida em sigilo e os resultados da pesquisa serão apresentados como retrato de um grupo e não de uma pessoa. Os dados coletados foram utilizados unicamente para o propósito de validação de técnica diagnóstica e, posteriormente, publicação científica.

Aqueles pacientes e/ou seus responsáveis legais que eventualmente estão em seguimento clínico com a pneumologia foram apresentados ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) que foram assinados após informações fornecidas, de maneira clara, por membro da equipe, explicando objetivos, métodos,

risco e potenciais benefícios individuais ou coletivos da pesquisa. Dessa forma, busca-se manter o compromisso de assegurar os direitos dos sujeitos e com o respeito devido à dignidade humana.

4.5 AMBIENTE DO ESTUDO

As amostras foram obtidas no arquivo do Laboratório da Anatomia Patológica do HC Unicamp. Foram realizados cortes histológicos destinados à extração de DNA e imuno-histoquímica com anticorpos específicos clone 6B6 (del 19) e clone SP125 (L858R). A extração de DNA da biópsia em parafina foi realizada com o kit de extração: FormaPure (Backman Coulter). A quantidade e pureza do DNA foram avaliados pelo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) e foi realizada a PCR seguida do sequenciamento pelo método de SANGER. O objetivo inicial era de totalizar 174 amostras para a pesquisa.

4.6 COLETA DO MATERIAL E TÉCNICAS UTILIZADAS

Para o diagnóstico de câncer de pulmão as amostras de tecido obtidas na rotina por broncoscopia, via percutânea por radiointervenção ou toracotomia (ie, casos cirúrgicos) foram encaminhadas para a análise histopatológica no Laboratório de Anatomia Patológica do HC / Unicamp, onde foram processadas e armazenadas em blocos de parafina. Após o diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão, as amostras foram obtidas retrospectivamente, sendo realizados cortes destinados à extração de DNA para amplificação e sequenciamento do *EGFR* e para a realização da técnica de imuno-histoquímica com anticorpos específicos clone 6B6 (del 19) e clone SP125 (L858R).

4.6.1 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO (método SANGER)

I) PCR do gene *EGFR* 19 e 21

O kit *FormaPure* (*Beckman Coulter*) foi usado para a extração do DNA das amostras histológicas das neoplasias, com posterior avaliação da quantidade e pureza do DNA pelo *Nanodrop Lite* (*Thermo Fisher Scientific*). Essa última é determinada pela razão de absorbância 260/280nm, sendo adequadas para o uso das referidas amostras quando apontarem valores entre 1,7 e 1,9. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a análise dos genes *EGFR*, especificamente os éxons 19 e 21. A mistura padronizada é composta de:

- 100mM de Tris-HCl, pH 8,4;
- 2,0mM de MgCl₂;
- 1μl (0,2mM) de cada nucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 15 a 20pmol dos iniciadores para o gene *EGFR*;
- 50-100ng de DNA genômico;
- 1U de Taq Polimerase (*Invitrogen- Life Technologies*) em um volume total de 50μl .

As temperatura de anelamento para os éxons 19 e 21 foram de 63°C e 51°C respectivamente. A reação de PCR foi então realizada no termociclador SIMPLIAMP *THERMAL CYCLER* (*Life Tech*) por aproximadamente 35 ciclos. O DNA amplificado foi verificado em gel de agarose 1,5%, configurando produtos amplificados de 184pb e 225pb para os éxons 19 e 21 nesta ordem.

Estão listados na Tabela 1 os iniciadores e a temperatura de anelamento que foram usados para os éxons 19 e 21 do gene *EGFR*.

Tabela 1. Iniciadores e temperatura de anelamento

	Temperatura Anelamento	Sense (5'-3')	AS (5'-3')
EGFR éxon 19	63° C	GCC AGT TAA CGT CTT CCT TCT C	GGG CCT GAG GTT CAG AGC CAT G
EGFR éxon 21	51°C	GCAGAGCTTCTTCCCA TGATG	GCCACCTCCTTACTTTG CCTC

II) Sequenciamento (método de Sanger)

Para o procedimento de purificação da reação de PCR utilizamos o kit - *Exosapit Express 500 RXN Reagent (Life Tech)*.

Na sequência, a quantificação do produto da PCR purificada foi realizada em gel de agarose 1,5%. Foram adicionados 2µl do *Low DNA Mass Ladder (Fermentas, Life Sciences)* a 2µl do azul de bromofenol (*MERCK*) no primeiro poço. Nos demais poços a aplicação foi composta de 2µl das amostras adicionadas a 2µl do azul de bromofenol (*MERCK*). A eletroforese ocorreu em 100ml de tampão TEB a 90 volts por um tempo total de 20 minutos.

Obtivemos como resultado a quantificação de cada banda em ng/µl, e, a seguir, procedemos com a reação de sequenciamento usando-se:

- 30ng da PCR purificada;
- 1µl do iniciador na concentração de 1,6pmol;
- 1µl do tampão;
- 1µl de *BigDye (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.0 with AmpliTaq DNA Polymerase, FS- Applied Biosystems)* que contém: dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂, tampão Tris-HCl;

- Quantidade necessária de água para completar 10µl;
- Primers utilizados foram os mesmos da reação de PCR, exceto pela concentração de 1,6pmol.

Ciclos sequenciais a temperaturas e tempos específicos foram procedidos para a reação de sequenciamento:

- 1 ciclo de 96°C por 10 segundos;
- 25 ciclos de 96°C por 20 segundos; 63°C por 20 segundos; 60°C por 4 minutos;
- Um ciclo prolongado de 60°C por 10 minutos no aparelho termociclador SIMPLIAMP THERMAL CYCLER (Life Tech).

Terminado o processo de ciclos, a reação de sequenciamento foi finalmente purificada com etanol 100% e 70% e, posteriormente, aplicada no sequenciador automatizado *SeqStudio Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Todos os fragmentos migraram no interior dos capilares de maneira organizada. Como foram marcados com fluorescência, após serem estimulados por um feixe de *laser*, passaram a emitir diferentes comprimentos de onda, os quais foram detectados por um aparelho fotomultiplicador. A partir disso, a informação coletada foi transmitida a um computador, sendo processada e recondicionada no formato de eletroferograma.

O *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), o qual contém um robusto banco de dados de sequências, foi usado para a comparação de cada eletroferograma obtido no presente trabalho, admitindo-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência.

As amostras que apresentaram mutações do tipo *frameshift* no sequenciamento, com exceção da mutação pontual, foram clonadas com o Kit *p-Gem Easy System II* (Promega) para análise confirmatória.

4.6.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

A análise da expressão da proteína EGFR foi feita pela técnica imuno-histoquímica (IHQ) em cortes de tecidos de neoplasia obtidos a partir dos blocos de parafina, após liberação definitiva do diagnóstico pelo serviço de anatomia patológica.

Os cortes histológicos foram realizados a partir dos tumores emblocados por meio de um micrótomo a uma espessura de três micrômetros e, então, colocados em banho-maria a 42°C, somente com água deionizada. A pescagem dos cortes em suspensão no banho-maria foi realizada com lâminas histológicas silanizadas (organosilano a 8%).

Após a pescagem, as lâminas foram direcionadas para estufa (60°C) por no mínimo 1 hora (período estipulado de 1 a 2 horas), antes de ser iniciado o processo de desparafinização.

Neste momento, as lâminas foram imersas em uma bateria de xilol em temperatura ambiente por quatro vezes e em seguida em álcool absoluto por cinco vezes, para concluir o processo de desparafinização e reidratação dos cortes.

Por último, deu-se sequência com a lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos. Concluída a lavagem, foi procedido o bloqueio da peroxidase endógena, em um procedimento com duração total de 15 minutos, trocando-se a água oxigenada- H_2O_2 - 10% em intervalos de 5 minutos.

Procedeu-se uma nova lavagem em água corrente por 5 minutos e, logo após, a recuperação antigênica na panela de vapor, com a incubação das lâminas por 30 minutos em tampão citrato 10mM, pH 6,0 a 95°C ou Tris-EDTA 1Mm pH8,9.

Após a incubação, as lâminas foram colocadas para esfriarem à temperatura ambiente por um período de 20 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas em tampão PBS.

Foi usado leite desnatado 3% (3g de leite em pó diluído em 100 ml de água) para realizar o bloqueio da proteína por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a

incubação, executaram-se lavagens em água destilada e PBS com duração de 5 minutos em cada etapa.

Os anticorpos para *EGFR* (anticorpo monoclonal clone 6B6 da *Cell Signaling Technology* e SP125 da *Abcam*), foram diluídos com diluente da *Dako/Agilent* e as incubações das lâminas foram realizadas em câmara úmida a 37°C por uma hora em estufa e depois deixadas *overnight* em geladeira.

As lâminas foram retiradas da incubação com anticorpo primário e foram realizadas três lavagens com PBS, no agitador, por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram secas com papel de filtro para retirar o excesso de PBS.

Em seguida, as lâminas foram incubadas com *Mouse Linker (DAKO)* à temperatura ambiente por 15 minutos. Após essa incubação, as lâminas foram lavadas por três vezes com PBS.

A incubação com anticorpo secundário (*ADVANCE- HRP Enzyme- Dako*) foi realizada por 30 minutos a 37°C (estufa). Após, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS à temperatura ambiente.

Finalizadas as lavagens, as lâminas foram colocadas em tampão PBS e, neste momento, o substrato cromógeno foi preparado: 1gota de DAB cromógeno + 1ml de tampão substrato- *Dako*.

A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer, por 10 a 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada, e incubadas por 3 segundos em água amoniacal, com nova lavagem em água corrente.

As lâminas, então, foram desidratadas e montadas com resina apropriada (*entellan-Merck*).

Finalmente, as lâminas foram elencadas para avaliação por IHQ, considerando a normatização da tabela a seguir e explicada com detalhamento adiante. A classificação foi realizada com o uso de microscópio óptico comum, com lente

objetiva de 40x. Para a pontuação dos escores foi utilizado o esquema proposto na tabela abaixo – **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação imuno-histoquímica (IHQ).

% de células tumorais positivas	Resultados de IHQ
Marcação negativa	Negativo
Até 10% das células	Negativo
> 10% das células	Positivo
Extensa reação de fundo	Indeterminado

As lâminas com as reações imuno-histoquímicas foram independentemente analisadas por 2 observadores treinados – Dra Helen Naemi Honma e Dr Guilherme Rossi – junto a controles positivos e negativos adequados para cada reação. Cada caso foi, então, classificado em “**positivo**”, “**negativo**” ou “**indeterminado**”. A primeira categoria foi considerada caso houvesse 10% ou mais das células marcadas, por estimativa visual. Por sua vez, um caso foi considerado negativo na completa ausência de positividade nas células neoplásicas ou na positividade em porcentagem inferior a 10% nessas células. Todos os casos nos quais houve dificuldade de leitura e interpretação, houve repetição da reação para posterior reavaliação. Por fim, a classificação como “indeterminado” deu-se apenas em casos com reação de fundo inespecífica com imposição de dificuldade na avaliação ideal, mesmo após repetição da reação. Os dois únicos casos classificados como indeterminados foram removidos do cálculo estatístico.

O padrão de marcação valorizado, para ambos os anticorpos estudados, foi em membrana e/ou citoplasma, de acordo com as ilustrações na ficha técnica dos

anticorpos. Eventuais marcações nucleares fracas foram interpretadas como reação de fundo.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o programa IBM SPSS *version* 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL), incluindo o teste de qui-quadrado. Em todos os casos adotou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.7.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado a partir da sensibilidade da técnica, com referencial de dados de publicação já existente.

Considerando que a sensibilidade relatada por Xiong et al. foi 59% (deleção do éxon 19) e 81% (L858R), com tamanho amostral para três possíveis valores de sensibilidade: 60%, 70% e 80%. Adotando-se $\alpha=0,05$, $\beta=0,20$ e diferença aceitável de 0,05 ($d=0,05$), temos o valor de $N = 174$.

4.7.2 ANÁLISE DE RESULTADOS

Os dados foram analisados com o software SPSS versão 16.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Determinou-se as frequências relativas e absoluta das variáveis qualitativas. Determinou-se a média, o desvio padrão, a mediana, os valores mínimo e máximo e a amplitude máxima das variáveis quantitativas.

Para avaliar a associação entre duas variáveis qualitativas empregou-se o teste qui-quadrado ou os testes exatos de Fisher e de Fisher-Freeman-Halton quando indicado.

Para comparação das distribuições da idade em relação a dois grupos independentes empregou-se o teste de Mann-Whitney e, para três ou mais grupos

independentes, o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Comparações Múltiplas não paramétrica quando necessário.

Determinou-se as prevalências e intervalos de confiança da presença de deleção e mutação por PCR e IHQ.

A concordância entre os resultados das IHQ e PCR foi avaliada pelo Coeficiente de Concordância de Kappa.

Determinou-se a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo e a acurácia dos resultados da imuno-histoquímica e respectivos intervalos de confiança tendo como referência os resultados do PCR.

Adotou-se o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

A população inicial de blocos de anatomia patológica selecionada consistiu em 180 casos, selecionados em banco de dados do serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Unicamp, escolhidos aleatoriamente, a partir do ano de 2009. Desse montante, 2 amostras foram excluídas após verificação de não apresentarem definição de adenocarcinoma, caracterizando-se como carcinoma pulmonar de não pequenas células. Outros 2 casos não puderam ser avaliados, por não apresentarem imuno-histoquímica e/ou técnica de PCR conclusivos. E 16 casos não apresentaram material suficiente para todas as análises (2 reações de imuno-histoquímica e 2 reações de PCR), constando apenas resultados parciais, sendo, portanto, excluídos da análise amostral.

A população final deste estudo consistiu em 160 casos elegíveis, conforme pode ser visualizado no fluxograma de seleção de casos, identificado pela figura 2 a seguir.

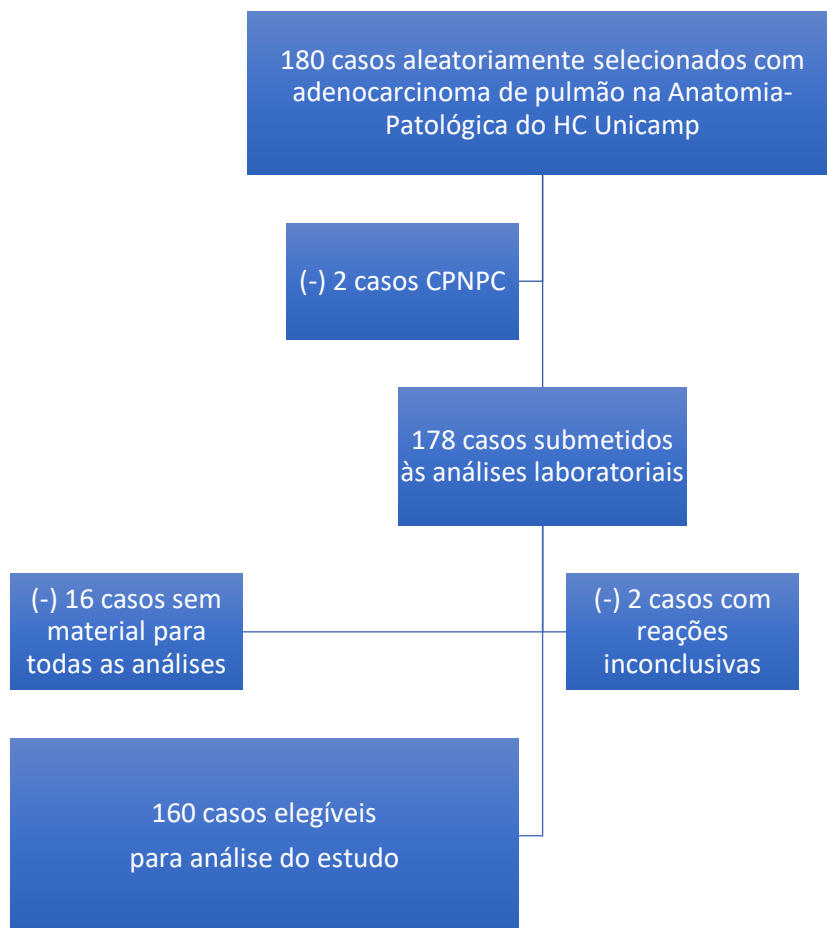


Figura 2. Fluxograma da seleção de casos.

Dentre os 160 casos elegíveis, a mediana de idade é de 64 anos no momento do diagnóstico, com idade mínima de 27 e a máxima de 84 anos, não havendo informação disponível sobre 4 casos. Desse total, pequena maioria de homens, sendo que 50,6% correspondem ao sexo masculino e 49,4% ao sexo feminino. Ainda no sexo masculino, a mediana da idade ao diagnóstico é de 64 anos, enquanto nas mulheres é de 62,5 anos. O homem mais jovem com diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão na presente amostra é de 30 anos, sendo a mulher mais jovem com 27 anos. Quanto à cor da pele, 82,7% apresentam autorreferência de cor

branca, 16.7% como negros e pardos e apenas 1 caso autorreferido como amarelo, havendo 4 casos com ausência de informação. Todas essas informações clínico-epidemiológicas estão discriminadas nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3. Distribuição dos 160 casos elegíveis por idade, com valores mínimo, máximo e a mediana.

DISTRIBUIÇÃO DE IDADE

VÁLIDOS	156
SEM REGISTRO	4
MEDIANA	64
MÍNIMO	27,0
MÁXIMO	84,0

Tabela 4. Distribuição dos 160 casos elegíveis por sexo masculino e feminino, em frequência absoluta e percentual.

SEXO	FREQUÊNCIA (N)*	(%)
FEMININO	79	49,4
MASCULINO	81	50,6
TOTAL	160	100

*N: valor absoluto

Tabela 5. Distribuição de cor da pele, em frequência absoluta e percentual.

COR DA PELE	FREQUÊNCIA (N)*	(%)
BRANCA	129	82,7
PRETA OU PARDA	26	16,7
AMARELA	1	0,6
SEM DADOS	4	
TOTAL	160	

*N: valor absoluto

Tabela 6. Distribuição da idade em relação ao sexo.

SEXO	N	MÉDIA	MÍNIMO	MEDIANA	MÁXIMO
FEMININO	76	61,6	27,0	62,5	84,0
MASCULINO	80	63,2	30,0	64,0	79,0
TOTAL	156				

p =0,321 (probabilidade do teste de Mann-Whitney)

Na avaliação da deleção do éxon 19, foram realizadas 160 reações de imuno-histoquímica (IHQ), seguidas por reações de PCR. Na primeira análise, houve 10 reações com positividade e 150 reações consideradas negativas. Pela técnica de PCR, considerada padrão-ouro, houve identificação da deleção em 19 reações, sendo 141 negativas. Dasquelas positivas para IHQ, apenas 1 não foi positiva também na avaliação molecular. Procedendo com análise Kappa, com valor de $p < 0,001$, obtivemos sensibilidade de 47,36% (IC95% - 26,13 – 69,36) e especificidade de 99,29% (IC95% -

96,55 – 99,96), com valor preditivo positivo de 90% (IC95% - 59,65 – 99,50) e valor preditivo negativo de 93,33% (IC95% - 88,44 – 99,56). Pode-se calcular a acurácia do método de IHQ como sendo de 93,12% (IC95% - 88,37 – 96,33). Os dados completos podem ser analisados nas tabelas 7 e 8 abaixo.

Tabela 7. Resultados da pesquisa molecular por PCR e de IHQ da deleção do éxon 19.

		PCR DELEÇÃO ÉXON 19		
		Presente	Ausente	Total
IHQ DELEÇÃO ÉXON 19	IHQ +	9	1	10
	IHQ -	10	140	150
	Total	19	141	160

Tabela 8. Análise de resultados da avaliação por IHQ com anticorpo específico para a deleção do éxon 19.

IHQ para deleção do éxon 19

	Estimativa	IC 95%	p-valor
Kappa	0,587	0,351 – 0,822	< 0,001
Sensibilidade (%)	47,36	26,13 – 69,36	
Especificidade (%)	99,29	96,55 – 99,69	
Valor Preditivo Positivo (%)	90,00	59,65 – 99,50	

<i>Valor Preditivo Negativo (%)</i>	93,33	88,44 – 99,56	
<i>Acurácia (%)</i>	93,12	88,37 – 96,33	

Na análise da mutação do éxon 21 (L858R), também foram realizadas 160 reações de IHQ, seguidas por análises de PCR. A técnica de IHQ identificou positividade em 21 casos, sendo 139 casos negativos. A técnica de PCR, por sua vez, constatou 9 casos positivos, enquanto 151 apresentaram-se como negativos. Dos 21 casos positivos pela técnica IHQ, apenas 5 também foram positivos pela técnica molecular. Por meio de análise Kappa, com $p = 0,001$, obteve-se sensibilidade da IHQ de 55,56% (IC95% - 24,04 – 83,95) e especificidade de 89,40% (IC95% - 83,71 – 93,60), com valor preditivo positivo de 23,80% (IC95% - 9,29 – 45,15) e valor preditivo negativo de 97,12% (IC95% - 93,21 – 99,08), atingindo um valor de acurácia de 87,50% (IC 95% - 81,68 – 91,97). Os dados foram reunidos nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Resultados da pesquisa molecular por PCR e de IHQ da mutação do éxon 21.

		PCR MUTAÇÃO ÉXON 21 (L858R)		
		Presente	Ausente	Total
IHQ MUTAÇÃO ÉXON 21	IHQ +	5	16	21
	IHQ -	4	135	139
	Total	9	151	160

Tabela 10. Resultados da avaliação por IHQ com anticorpo específico para a mutação do éxon 21.

IHQ para mutação do éxon 21 (L858R)

	<i>Estimativa</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p-valor</i>
<i>Kappa</i>	0,276	0,054 – 0,498	p = 0,001
<i>Sensibilidade (%)</i>	55,56	24,04 – 83,95	
<i>Especificidade (%)</i>	89,40	83,71 – 93,60	
<i>Valor Preditivo Positivo (%)</i>	23,80	9,29 – 45,15	
<i>Valor Preditivo Negativo (%)</i>	97,12	93,21 – 99,08	
<i>Acurácia (%)</i>	87,50	81,68 – 91,97	

Após as análises individuais, procedeu-se a avaliação global dos resultados, considerando as duas mutações mais comuns do *EGFR* – deleção do éxon 19 ou mutação do éxon 21. Neste caso comparou-se resultados positivos de IHQ (mutação e/ou deleção) com resultados positivos por PCR (mutação e/ou deleção). Foram encontradas 31 reações de IHQ positivas e 129 negativas, totalizando 160 casos examinados. Para a reação de PCR houve 28 mutações e/ou deleções identificadas, com 132 casos sem alterações. Pela análise Kappa, com valor de $p < 0,001$, atingiu-se uma sensibilidade de 53,57% (IC95% 35,21 – 71,23), especificidade de 87,88% (IC95% 81,45 – 92,66), valor preditivo positivo 48,39% (IC95% 31,34 -65,72) e valor preditivo negativo de 89,92% (IC95% 83,79 – 94,28). Na avaliação global de resultados, obteve-se uma acurácia de 81,88% (IC95% 75,33 – 87,27). Os dados estão reunidos nas tabelas a seguir – 11 e 12.

Tabela 11. Distribuição de resultados de PCR e IHQ para mutação éxon 21 e/ou deleção éxon 19 (avaliação global).

PCR DELEÇÃO E/OU MUTAÇÃO				
		Presente	Ausente	Total
IHQ (DELEÇÃO ÉXON 19 E/OU MUTAÇÃO ÉXON 21)	IHQ +	15	16	31
	IHQ -	13	116	129
	Total	28	132	160

Tabela 12. Análises de resultados da avaliação por IHQ para mutação éxon 21 e/ou deleção éxon 19 (avaliação global).

IHQ para presença de deleção e/ou mutação

	Estimativa	IC 95%	p-valor
Kappa	0,398	0,199 – 0,596	< 0,001
Sensibilidade (%)	53,57	35,21 – 71,23	
Especificidade (%)	87,88	81,45 – 92,66	
Valor Preditivo Positivo (%)	48,39	31,34 – 65,72	
Valor Preditivo Negativo (%)	89,92	83,79 – 94,28	
Acurácia (%)	81,88	75,33 – 87,27	

Adiante, exemplares de marcação de imuno-histoquímica com anticorpos específicos clone 6B6 (deleção 19), *Cell Signaling* e clone SP 125 (L858R), *Abcam*, podem ser visualizados nas **Figuras 3 e 4**. Todas as reações contaram com controles negativos e positivos, sendo avaliadas e interpretadas conforme descrito previamente em Métodos – 4.6.2 Imuno-histoquímica, e seguindo a classificação definida em Tabela 2. Exemplos de controles negativos estão representados na Figura 5.

Figura 3.

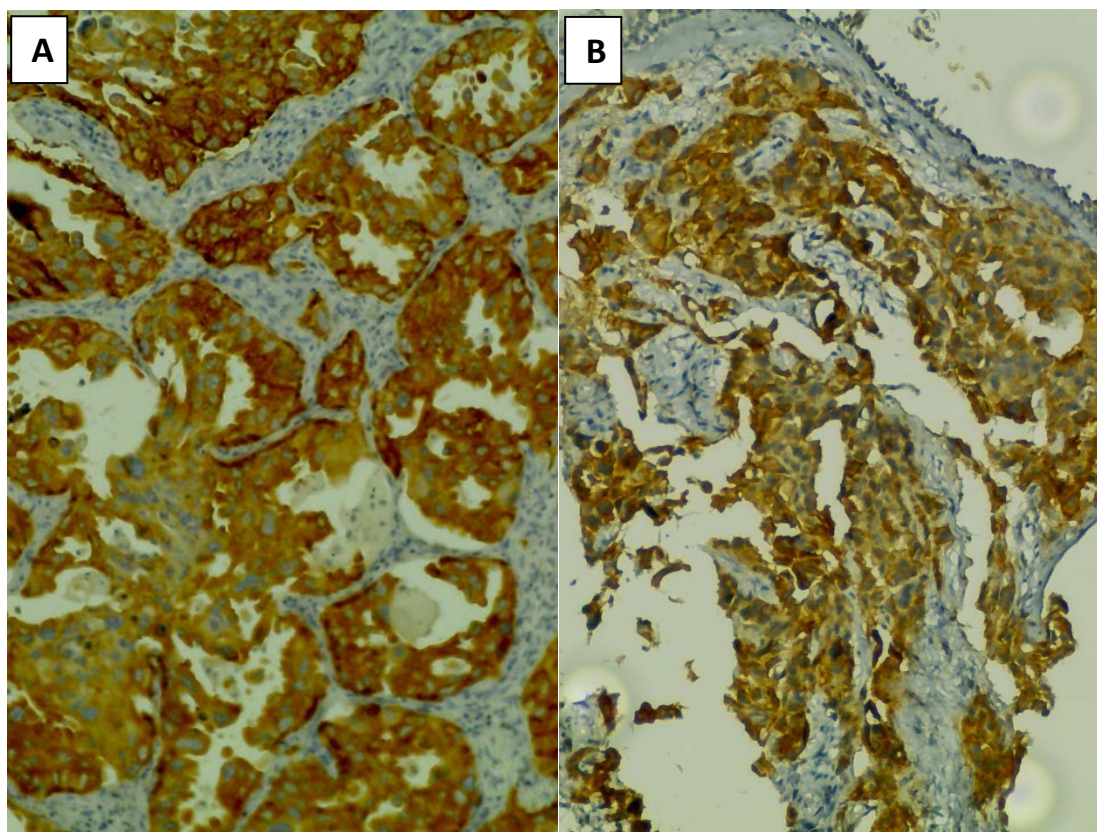


Figura 3 - (A) e (B): Apresentação de marcação por IHQ considerada positiva, com anticorpo clone 6B6 (*Cell Signaling*) específico para a deleção do éxon 19 do *EGFR*. Ambas com visualização em microscopia óptica com magnificação de 20x.

Figura 4.

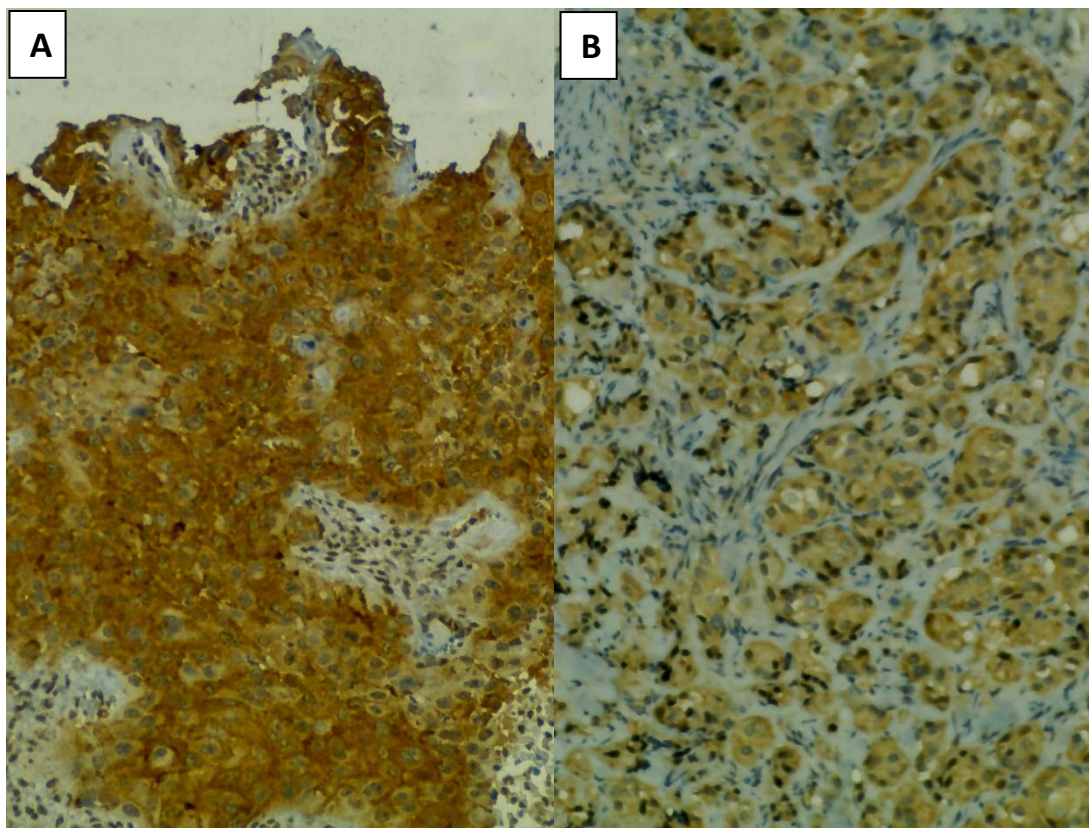


Figura 4 - (A) e (B): Apresentação de marcação por IHQ considerada positiva, com anticorpo clone SP125 (*Abcam*) específico para a mutação L858R do éxon 21 do *EGFR*. Ambas com visualização em microscopia óptica com magnificação de 20x.

Figura 5.

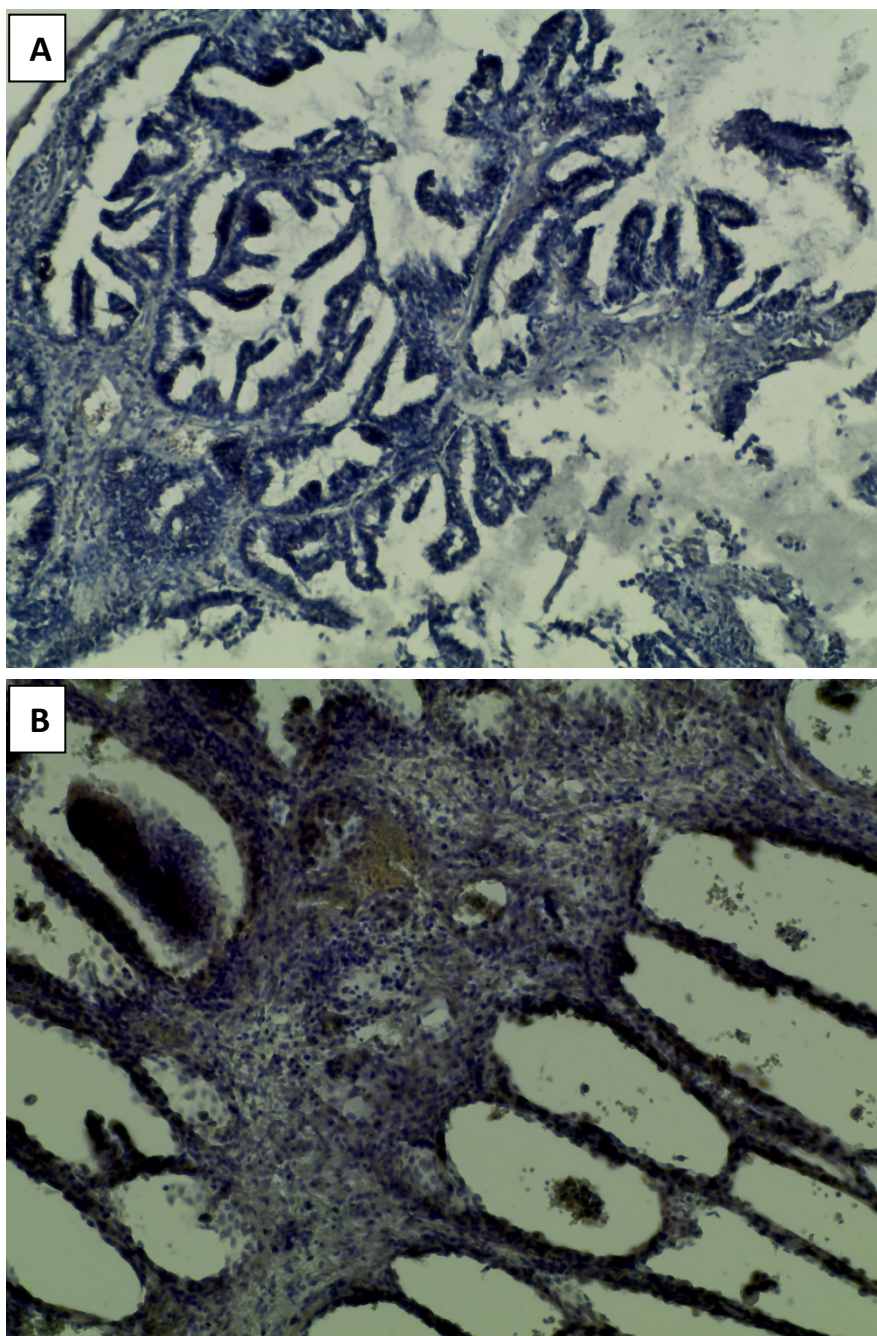


Figura 5 - (A) e (B): Apresentação de exemplos de controles negativos para as reações de IHQ da deleção do éxon 19 e mutação L858R, respectivamente. Ambas com magnificação de 20x, em microscopia óptica.

6 DISCUSSÃO

Desde a introdução dos anticorpos monoclonais contra mutações específicas do *EGFR* desenvolvidos por Yu *et al.* em 2009 (32) e com a apresentação de excelentes resultados de sensibilidade e especificidade, houve grande interesse em trabalhos posteriores para a reprodução e validação dos mesmos. No entanto, por uma série de motivos, os resultados encontrados foram predominantemente inferiores àqueles inicialmente apresentados.

Na literatura, foram encontrados resultados de sensibilidade de IHQ para a deleção do éxon 19 que variaram de 40 – 100%, com especificidade de 90 – 100%. Já para o éxon 21, há a publicação de sensibilidade com margem de 24 – 100% e especificidade de 77 – 100%. (19) No presente trabalho, conforme resultados detalhados anteriormente nas **tabelas 8 e 10**, constatou-se sensibilidade abaixo daquela predominantemente encontrada na literatura, porém com resultados de especificidade semelhantes.

Dentre os motivos que explicam a grande variabilidade nos resultados previamente publicados, podemos destacar as diferenças de critérios na análise de positividade da imuno-histoquímica, com alguns pesquisadores considerando um ponto de corte maior de marcação de células neoplásicas, (29,33) enquanto outros consideram um ponto de corte mínimo para a classificação de resultado positivo da técnica. (32,34,35) Outros autores ainda usaram modelos menos comuns na marcação e interpretação da reação por IHQ. (36,37) Desse modo, é de grande importância uma padronização do protocolo da técnica, do kit aplicado e do escore utilizado para a devida interpretação de resultados.

Outro fator importante é de que não há homogeneidade entre os diferentes trabalhos na técnica molecular utilizada e definida como padrão-ouro para a confirmação da mutação. Portanto, diferentes técnicas podem apresentar resultados sensivelmente distintos – Sequenciamento direto, ARMS (*amplification refractory*

mutation system), PNA-LNA PCR (*peptide nucleic acid / locked nucleic acid amplification*), Pirosequenciamento, COLD PCR, Sequenom Cobas-Roche, NGS (*Next Generation-Sequencing*), dentre outros. Também não há recomendação mandatória de uma técnica exclusiva em detrimento de outra, embora haja preferência por aquelas que apresentem maior sensibilidade e capazes de detectar mutações em espécimes com carga de células neoplásicas de ao menos 10%. (21)

O trabalho atual considerou apenas diagnósticos de Adenocarcinoma de pulmão, sendo excluídos aqueles considerados como Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células (CPNPC), uma vez que essa generalização na padronização pode trazer resultados divergentes e conflitantes, sobretudo na comparação de diferentes trabalhos. Importantes pesquisas também consideraram apenas Adenocarcinoma de Pulmão na avaliação como Kozu *et al.* (36) 2011, Cooper *et al.* (38) 2013 e Allo *et al.* (39) 2014.

Ainda importante destacar também que 80-90% das mutações do *EGFR* estão compreendidas nas deleções do éxon 19, sendo a principal E746-A750 (p.Glu746_Ala750del), e na mutação do éxon 21 L858R (p.Leu858Arg). Outras mutações estão presentes nos éxons 18 e 20. Na coorte do trabalho australiano de Cooper *et al.* (38) de 2013, com 204 pacientes analisados e 34 mutações *EGFR* identificadas, 29% apresentavam mutações as quais não correspondiam aos éxons 19 e 21. Não obstante, o anticorpo monoclonal – E746-A750 específico não detecta adequadamente outras mutações menos comuns no éxon 19. De acordo com o banco de dados COSMIC, as mutações com deleção do 15-bp do éxon 19 correspondem a 68,1% das deleções do éxon 19, para o qual o anticorpo E746-A750 é especificamente direcionado. Isto posto, trabalhos com amostras com maior número de deleções menos prevalentes do éxon 19 apresentam piores resultados. (40) Na mesma coorte de Cooper *et al.* (38) de 2013, por exemplo, das 13 deleções de éxon 19 identificadas, 6 eram diferentes da E746-A750 buscada pelo anticorpo específico.

Em nossa amostra, foram identificadas 7 mutações *EGFR* diferentes daquelas dos éxons 19 e 21, sendo quatro no éxon 20 e três no éxon 18. Na avaliação

restrita da deleção do éxon 19 de nossa amostra, duas eram diferentes da E746-A750 (sendo essas E746-S752 Ins V e Leu 747_Ala750), ambas apresentando-se com IHQ também negativa na análise. Como não é objetivo deste trabalho, não houve análise estatística individualizada de outras formas menos comuns de mutação no *EGFR* para avaliação da técnica proposta.

Diante do apresentado, pode-se concluir que quando esses anticorpos monoclonais são colocados para avaliação mais ampla de mutações no *EGFR*, o rendimento diagnóstico apresenta redução expressiva nos valores de sensibilidade e especificidade. No entanto, quando comparados exclusivamente com mutações específicas nos éxons 19 e 21, há incremento nas médias dos resultados obtidos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. No trabalho realizado no Japão por Kato *et al.* (37) de 2010, por exemplo, há registro de sensibilidade de 78% para mutações específicas dos anticorpos, com redução acentuada nos valores para 43,9% de sensibilidade quando avaliadas todas as possíveis mutações dos éxons 19 e 21.

Até o presente momento, os anticorpos para reação imuno-histoquímica de mutações *EGFR* não apresentam validação clínica. Conforme a revisão de Rosi *et al.* (19) de 2017 e Imyanitov *et al.* (9) de 2021, ambos os anticorpos utilizados para as principais mutações do *EGFR* – deleção éxon 19 e mutação do éxon 21, não encontraram importância estatística para uso rotineiro na prática clínica.

A revisão de literatura revela enorme heterogeneidade de valores, conforme descrito previamente. No entanto, com o estabelecimento de critérios de inclusão de apenas adenocarcinomas diagnosticados de pulmão, com amostras de biópsia preservadas, desconsiderando-se materiais degenerados ou espécimes de citologia, obtivemos valores que acreditamos trazer números relevantes para a evolução da técnica.

Tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, com os anticorpos combinados apresentando uma sensibilidade bastante reduzida quando comparados ao método padrão-ouro, porém com razoável especificidade, é possível

elaborar um plano organizacional que seja capaz de melhorar o fluxo assistencial e possibilitar um retorno imediato à instituição na qual o trabalho foi realizado, uma das premissas pilares do programa de mestrado profissional – ciência aplicada à qualificação médica.

Em consonância com alguns trabalhos publicados na literatura (Brevet *et al.* (33) 2010, Fan *et al.* (41) 2013, Kim *et al.* (42) 2015), embora nenhum com resultados brasileiros até onde temos conhecimento, acreditamos que os anticorpos podem ser incorporados à prática clínica, promovendo a técnica imuno-histoquímica na pesquisa de mutação *EGFR* do adenocarcinoma de pulmão.

Como descrito e elaborado previamente por Brevet *et al.* (33) 2010 e corroborado pelo estudo chinês de Wang *et al.* (43) de 2014, uma proposta do uso da técnica seria a aplicação imediata a todos os diagnósticos de adenocarcinoma de pulmão, sendo já considerados com mutação *EGFR* presente todos os que apresentarem resultado de imuno-histoquímica positiva. Esses pacientes estariam rapidamente com o diagnóstico de mutação *driver* estabelecido, com a possibilidade de uso de medicamentos inibidores de tirosina quinase, os quais têm benefício demonstrado nos resultados de tratamento oncológico quando comparados à quimioterapia citotóxica para sobrevida livre de progressão de doença e redução de eventos adversos graves. (8,11) No entanto, em razão da reduzida sensibilidade, todos os casos com resultados de imuno-histoquímica negativos deverão ser submetidos à análise molecular para pesquisa de mutação, do contrário, muitos casos ficariam sem ter seu devido diagnóstico estabelecido. Finalmente, em contraste com o proposto por Brevet *et al.* (33) 2010, acreditamos que o rendimento do anticorpo para mutação do éxon 21 foi muito reduzido e sensivelmente abaixo do encontrado na literatura. Desta forma, o presente trabalho reforça o uso rotineiro para a identificação de mutação do éxon 19 como forma de ampliar o arsenal diagnóstico, otimizar e acelerar a identificação de mutação, reduzindo custos para os diversos serviços de saúde e garantindo que a assistência possa ser direcionada para esse perfil de pacientes.

Quando usamos os resultados globais – anticorpos para mutações dos éxon 19 e éxon 21 – na avaliação das mutações mais frequentes do *EGFR*, obtemos resultados apenas modestos de sensibilidade e especificidade. Os reduzidos valores preditivos positivo e negativo na avaliação geral da mutação parecem em grande parte contaminados pelo desempenho ruim do anticorpo do éxon 21. Em razão do exposto, o presente trabalho endossa o uso apenas da pesquisa imuno-histoquímica do éxon 19, de modo que mais estudos e trabalhos em território nacional seriam necessários para conferir adequada acurácia dos anticorpos para imuno-histoquímica do éxon 21, seja por refinamento da técnica, ajuste de vieses ou, se necessário, aplicação de novos modelos de anticorpos. Na análise deste anticorpo em particular, foi encontrada frequente atividade de reação de fundo, com marcação moderada a forte de células não tumorais, estroma e núcleos de células neoplásicas, o que levou à divergência de análise e reprodutibilidade do método. Algumas dessas colorações foram submetidas à repetição da técnica para nova leitura, uma vez que as marcações de reação de fundo imputaram em alguns casos acentuada dificuldade de avaliação e interpretação. Esses obstáculos não foram encontrados na realização e análise das marcações do anticorpo para o éxon 19.

É importante salientar que mutações no éxon 21 (L858R) correspondem a um terço das mutações *EGFR*, sendo menos comuns que as deleções no éxon 19. Além disso, é um tipo de mutação mais encontrado em pacientes de idade avançada com câncer de pulmão e têm pior resposta documentada aos inibidores de tirosina quinase, embora as mutações no L858R também sejam elegíveis para terapia-alvo. (9)

Na conjuntura do mestrado profissional, e diante dos resultados expostos, reforçamos fortemente que a unidade do Hospital de Clínicas da Unicamp, na assistência de Oncopneumologia, possa beneficiar-se diretamente da técnica relatada. Além disso, os mais diversos serviços de saúde, sobretudo aqueles atrelados ao Sistema Único de Saúde (SUS), podem ter à disposição uma excelente ferramenta no diagnóstico mutacional em oncologia pulmonar.

A técnica imuno-histoquímica, vastamente presente nos diversos laboratórios de patologia de modo bastante capilarizado, com recursos e profissionais habilitados, pode ser capaz de elevar a robustez diagnóstica, encurtando prazos e facilitando acessos a tratamentos individualizados. É importante também destacar que a técnica é capaz de reduzir a necessidade de procedimentos invasivos desnecessários na busca por mais material anátomo-patológico, muitas vezes demandados para um adequado sequenciamento genético, técnica padrão-ouro na análise de mutações *EGFR*, a qual exige espécimes de tamanho maior. A decisão de obtenção de mais material é quase sempre complexa, e influenciam nessa conduta o estado geral do paciente, a acessibilidade da lesão, a aparência radiológica e a possibilidade de agendamento de procedimentos. Pacientes com câncer de pulmão estágio IV têm uma expectativa média de vida de 16 semanas, quando não submetidos a nenhum tratamento. (21) Ocupar esse reduzido tempo de sobrevida com agendamento de novos métodos invasivos ou aguardando resultados de análise molecular – os quais podem demandar períodos superiores a uma semana – parece inadequado nessas situações clínicas. Quando assumimos que uma parcela importante desses pacientes apresenta rápida deterioração clínica e de performance status, o ganho em tempo e em procedimentos menos invasivos podem ser decisivos na morbidade e na história natural da doença. Ainda dentro desse panorama, deve-se ressaltar que há dados crescentes e testes aprovados quanto à avaliação de mutação de câncer de pulmão e do *EGFR*, em particular, por métodos menos invasivos como biópsia líquida, embora com resultados gerais de reduzida sensibilidade em relação à avaliação por técnica molecular em tecido. (6) No entanto, essa ferramenta diagnóstica não fez parte do escopo de estudo do presente trabalho.

Um dos casos submetidos à análise imuno-histoquímica, o qual não foi incluído na amostragem para análise estatística por não cumprir critérios de inclusão, apresentou material de citologia com demarcada positividade por IHQ para a mutação no éxon 19. Esse achado fala a favor de relatos de outros autores que assumem a possibilidade de uso da técnica em materiais de citologia por aspiração, derrame

pleural, dentre outros, o que tornaria o procedimento bastante simples e exequível em diversos serviços de saúde com diferentes níveis de complexidade, ampliando horizontes de aplicabilidade. (29,44)

Assim como previsto e já relatado na literatura (11,18, 43), a sensibilidade reduzida da técnica não permite um *screening* usual. Dessa maneira, confiando na elevada especificidade do anticorpo para avaliação do éxon 19, e fazendo uso da proporção de cada mutação obtida neste estudo, cerca de 47% dos casos com deleção do éxon 19 e 32% dos casos com mutação *EGFR* podem dispensar a necessidade de sequenciamento genético. Na prática, cerca de 5% dos casos confirmados de adenocarcinoma de pulmão já teriam seus diagnósticos mutacionais estabelecidos com agilidade, baixa necessidade de material histopatológico e custos reduzidos, colocando nesta situação favorável de medicina de precisão cerca de um terço dos casos com mutação *EGFR*. Entretanto, os outros 95% de casos negativos deverão ser submetidos a técnicas moleculares para elucidação dos demais casos de mutação, sobretudo aqueles com mutação do éxon 21, dos quais nossos dados desencorajam o uso rotineiro de IHQ.

A seguir, elaboramos um possível fluxograma de estratégia de modelo assistencial para uso de anticorpo de IHQ para identificação de mutação *EGFR* no éxon 19, embasado nos resultados e limitações obtidos e apresentados neste trabalho. Esse fluxograma pode ser visualizado na figura 6.

Figura 6.

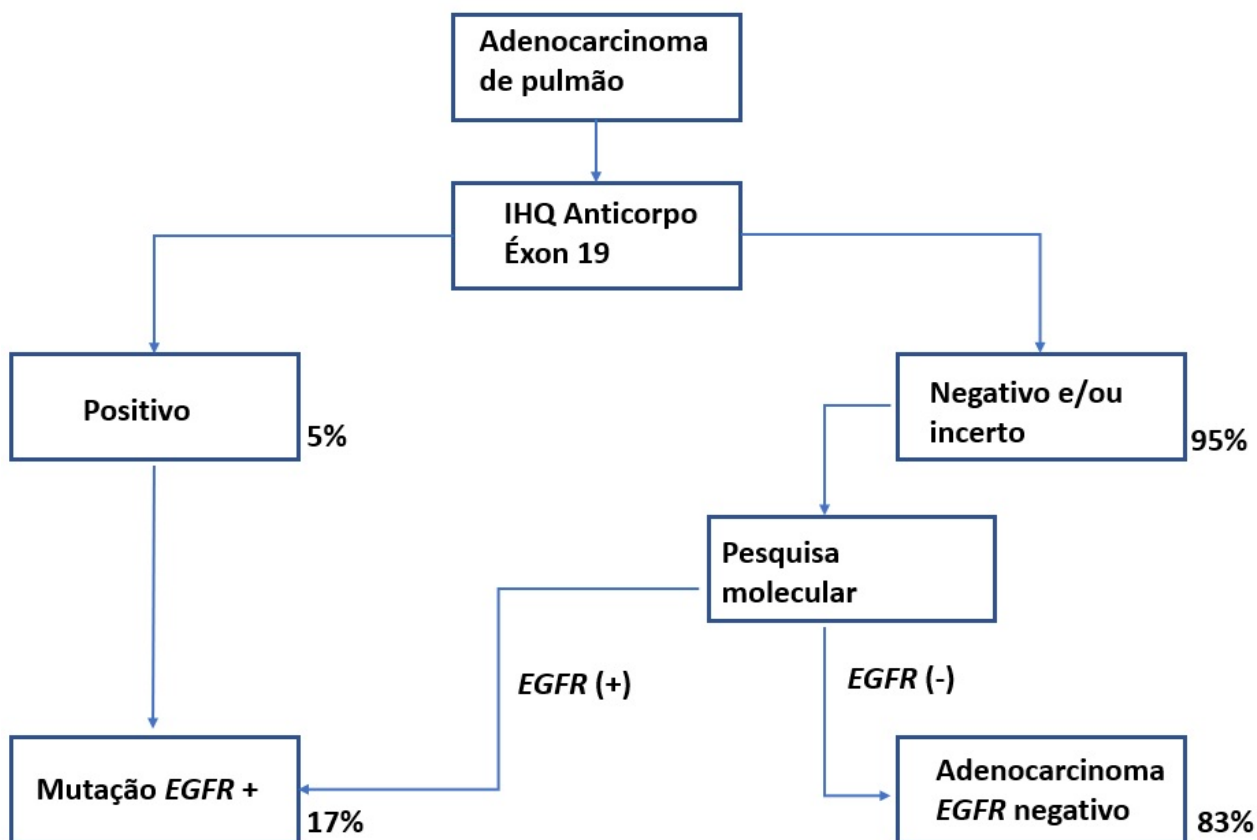


Figura 6. Possível fluxograma para o uso de anticorpo para mutação *EGFR* éxon 19 específico para todos os diagnósticos de adenocarcinoma de pulmão. Identificação de aproximadamente 47% das mutações no éxon 19 e de 32% dos casos com mutação *EGFR*.

7 CONCLUSÃO

Em virtude do tamanho amostral atingido, consideramos que os dados obtidos pelo trabalho corroboram o modelo exposto de *screening* com imuno-histoquímica para avaliação de mutação do éxon 19 do *EGFR* para todos os diagnósticos de adenocarcinoma de pulmão. Essa abordagem permite potencialmente ampliar acesso diagnóstico para medicina personalizada, reduzir tempo operacional, custos de assistência e tamanho de material de biópsia para 47% dos pacientes com mutação de *EGFR* com deleção no éxon 19.

Apesar disso, ainda são necessários novos estudos para a aquisição de resultados que possibilitem uma proposta de avaliação global de mutação do *EGFR*, com o refinamento da avaliação da mutação do éxon 21 e de outras mutações menos comuns do *EGFR* por IHQ. Ainda de maneira otimista, novos anticorpos podem ser desenvolvidos para fortalecer o uso da IHQ no *screening* das diferentes mutações.

A aplicação IHQ, até o presente momento não validada na prática clínica, possivelmente poderia ampliar a avaliação de materiais considerados inadequados para serem submetidos à técnica padrão-ouro e reduzir a necessidade de abordagens invasivas para a coleta de novas amostras de tecidos tumorais. A aplicação da técnica em carcinomas pulmonares de não pequena células (não restrito a adenocarcinoma), materiais escassos ou de citologia, no entanto, ainda carecem de mais estudos.

8 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Estimated number of new cases in 2020, Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer 2022. [acesso em 12/10/2022] Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>.
2. Ahmad A, Gadgeel S. Lung cancer and personalized medicine: novel therapies and clinical management [Internet]. Cham: Springer; 2016 [citado 31 de dezembro de 2018] Disponível em: <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4206894>
3. Flanagan EL. Tobacco smoking in China: a pulmonary health crisis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2018;1.
4. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2019;94(8):1623–40.
5. Inal C, Yilmaz E, Piperdi B, Perez-Soler R, Cheng H. Emerging treatment for advanced lung cancer with *EGFR* mutation. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2015;20(4):597–612.
6. Pisapia P, Malapelle U, Troncone G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta Cytologica*. 2018;1–8.
7. Leal LF, de Paula FE, De Marchi P, de Souza Viana L, Pinto GDJ, Carlos CD, et al. Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of *EGFR* mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of *KRAS* mutations. *Sci Rep*. 2019;9(1):3209.
8. Murugesan S, Murugesan J, Palaniappan S, Palaniappan S, Murugan T, Siddiqui SS, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Lung Cancer Treatment: A Comprehensive Analysis. *CCDT*. 2021;21(1):55–69.
9. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2021;157:103194.
10. Greenhalgh J, Dwan K, Boland A, Bates V, Vecchio F, Dundar Y, et al. First-line treatment of advanced epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutation positive non-squamous non-small cell lung cancer. Cochrane Lung Cancer Group, organizador. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2016 [citado 31 de dezembro de 2018]; Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD010383.pub2>

11. Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, Tanaka F. Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with *EGFR*-mutations. *J UOEH*. 2019;41(2):153–63.
12. Sukrithan V, Deng L, Barbaro A, Cheng H. Emerging drugs for EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2018;1–12.
13. Spagnuolo A, Maione P, Gridelli C. Evolution in the treatment landscape of non-small cell lung cancer with ALK gene alterations: from the first- to third-generation of ALK inhibitors. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2018;23(3):231–41.
14. Morris TA, Khoo C, Solomon BJ. Targeting ROS1 Rearrangements in Non-small Cell Lung Cancer: Crizotinib and Newer Generation Tyrosine Kinase Inhibitors. *Drugs*. 2019;79(12):1277–86.
15. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of Global Health*. 2019;85(1):8.
16. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169–81.
17. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(5):339–46.
18. Lopes GL, Vattimo EF de Q, Castro Junior G de. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J bras pneumol*. 2015;41(4):365–75.
19. Rossi G, Ragazzi M, Tamagnini I, Mengoli M, Vincenzi G, Barbieri F, et al. Does Immunohistochemistry Represent a Robust Alternative Technique in Determining Drugable Predictive Gene Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer? *CDT*. 2016;18(1):13–26.
20. Xiong Y, Bai Y, Leong N, Laughlin TS, Rothberg PG, Xu H, et al. Immunohistochemical detection of mutations in the epidermal growth factor receptor gene in lung adenocarcinomas using mutation-specific antibodies. *Diagn Pathol*. 2013;8(1):740.
21. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15(4):415–53.
22. Kao HL, Yeh YC, Lin CH, Hsu WF, Hsieh WY, Ho HL, et al. Diagnostic algorithm for detection of targetable driver mutations in lung adenocarcinomas: Comprehensive

analyses of 205 cases with immunohistochemistry, real-time PCR and fluorescence in situ hybridization methods. *Lung Cancer*. 2016;101:40–7.

23. Gaber R, Watermann I, Kugler C, Vollmer E, Perner S, Reck M, et al. Preselection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer patients by immunohistochemistry: comparison with DNA-sequencing, EGFR wild-type expression, gene copy number gain and clinicopathological data. *Rom J Morphol Embryol* 2017, 58(4):1175–1184.
24. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers*. 2018;10(3):72.
25. Seo AN, Park TI, Jin Y, Sun PL, Kim H, Chang H, et al. Novel EGFR mutation-specific antibodies for lung adenocarcinoma: Highly specific but not sensitive detection of an E746_A750 deletion in exon 19 and an L858R mutation in exon 21 by immunohistochemistry. *Lung Cancer*. 2014;83(3):316–23.
26. Ambrosini-Spaltro A, Campanini N, Bortesi B, Azzoni C, Naldi N, Ardizzoni A, et al. EGFR Mutation-specific Antibodies in Pulmonary Adenocarcinoma: A Comparison With DNA Direct Sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(4):7.
27. Wu SG, Chang YL, Lin JW, Wu CT, Chen HY, Tsai MF, et al. Including Total EGFR Staining in Scoring Improves EGFR Mutations Detection by Mutation-Specific Antibodies and EGFR TKIs Response Prediction. Navarro A, organizador. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23303.
28. Bondgaard AL, Høgdall E, Mellempgaard A, Skov BG. High specificity but low sensitivity of mutation-specific antibodies against EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol*. 2014;27(12):1590–8.
29. Kawahara A, Yamamoto C, Nakashima K, Azuma K, Hattori S, Kashiwara M, et al. Molecular Diagnosis of Activating EGFR Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer Using Mutation-Specific Antibodies for Immunohistochemical Analysis. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(12):3163–70.
30. Simonetti S, Molina M, Queralt C, de Aguirre I, Mayo C, Bertran-Alamillo J, et al. Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med*. 2010;8(1):135.
31. Jiang G, Fan C, Zhang X, Dong Q, Wang L, Liu Y, et al. Ascertaining an Appropriate Diagnostic Algorithm Using EGFR Mutation-Specific Antibodies to Detect EGFR Status in Non-Small-Cell Lung Cancer. Suzuki H, organizador. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59183.
32. Yu J, Kane S, Wu J, Benedettini E, Li D, Reeves C, et al. Mutation-Specific Antibodies for the Detection of *EGFR* Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(9):3023–8.

33. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR Mutation Status in Lung Adenocarcinoma by Immunohistochemistry Using Antibodies Specific to the Two Major Forms of Mutant EGFR. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010;12(2):169–76.
34. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical Detection of EGFR Mutation Using Mutation-Specific Antibodies in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(13):3349–55.
35. Hofman P, Ilie M, Hofman V, Roux S, Valent A, Bernheim A, et al. Immunohistochemistry to identify EGFR mutations or ALK rearrangements in patients with lung adenocarcinoma. *Annals of Oncology*. 2012;23(7):1738–43.
36. Kozu Y, Tsuta K, Kohno T, Sekine I, Yoshida A, Watanabe S, et al. The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2011;73(1):45–50.
37. Kato Y, Peled N, Wynes MW, Yoshida K, Pardo M, Mascaux C, et al. Novel Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Specific Antibodies for Non-small Cell Lung Cancer: Immunohistochemistry as a Possible Screening Method for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010;5(10):1551–8.
38. Cooper WA, Yu B, Yip PY, Ng CC, Lum T, Farzin M, et al. *EGFR* mutant-specific immunohistochemistry has high specificity and sensitivity for detecting targeted activating *EGFR* mutations in lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2013;66(9):744–8.
39. Allo G, Bandarchi B, Yanagawa N, Wang A, Shih W, Xu J, et al. Epidermal growth factor receptor mutation-specific immunohistochemical antibodies in lung adenocarcinoma. *Histopathology*. 2014;64(6):826–39.
40. Chen Z, Liu H, Bing, Yu C, Hua, Wang Y, Wang L, Song Y. Diagnostic Value of Mutation-Specific Antibodies for Immunohistochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. de Mello RA, organizador. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e105940.
41. Fan X, Liu B, Xu H, Yu B, Shi S, Zhang J, et al. Immunostaining with EGFR mutation-specific antibodies: a reliable screening method for lung adenocarcinomas harboring EGFR mutation in biopsy and resection samples. *Human Pathology*. 2013;44(8):1499–507.
42. Kim CH, Kim SH, Park SY, Yoo J, Kim SK, Kim HK. Identification of *EGFR* Mutations by Immunohistochemistry with *EGFR* Mutation-Specific Antibodies in Biopsy and

Resection Specimens from Pulmonary Adenocarcinoma. *Cancer Res Treat.* 2015;47(4):653–60.

43. Wang X, Wang G, Hao Y, Xu Y, Zhang L. A comparison of ARMS and mutation specific IHC for common activating EGFR mutations analysis in small biopsy and cytology specimens of advanced non small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Jun 15;7(7):4310-6.
44. Hasanovic A, Ang D, Moreira AL, Zakowski MF. Use of mutation specific antibodies to detect EGFR status in small biopsy and cytology specimens of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2012;77(2):299–305.

9 ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES MAIS PREVALENTES DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EM ADENOCARCINOMA DE PULMÃO.

Tipo de estudo: Estudo transversal, retrospectivo.

Pesquisador responsável: Antonio Carlos Gomes de Barros Jr

Número do CAAE: 13197019.7.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Por que são conduzidos estudos de métodos diagnósticos?

Estudos de métodos diagnósticos são necessários para descobrir sobre a eficácia e a segurança de novos procedimentos que tragam maior possibilidade para o esclarecimento de doenças e suas especificidades.

É exigido por lei e padrões internacionais que Comissões de Ética independentes forneçam seu parecer favorável e que autoridades competentes independentes aprovem a condução do estudo.

O presente estudo é conduzido de acordo com as orientações mencionadas acima e a legislação local.

Por que o presente estudo está sendo realizado?

Carcinoma de pulmão (ou câncer de pulmão) é uma doença grave e no nosso país menos de 10% dos pacientes alcançam a cura. Existem três modalidades de tratamento para um paciente com câncer de pulmão que são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Destes, o tratamento mais efetivo é a cirurgia. Entretanto, no momento do diagnóstico somente 1 em 5 pacientes tem indicação de realizar o tratamento cirúrgico e este é um dos motivos da alta taxa de mortalidade desta doença.

Alguns tipos de câncer de pulmão apresentam uma mutação (alteração no conteúdo genético) em uma classe de receptores – proteínas presentes na célula – conhecido como EGFR. Essas proteínas ajudam as células do câncer a crescer e se dividir rapidamente. A descoberta dessas mutações levou ao surgimento de novos medicamentos que buscam direcionar o tratamento para o “erro genético” das células tumorais. É sabido que a resposta a esses medicamentos, quando a mutação está presente, é melhor do que o tratamento convencional com quimioterapia e radioterapia, além de possuir efeitos colaterais mais bem tolerados e menos graves.

O achado dessas mutações depende de exames caros e pouco disponíveis – pesquisa genética de sequenciamento de DNA. O presente estudo objetiva estudar a correlação dessas mutações com a presença de proteína identificadas por um método mais barato e acessível – chamado de técnica imuno-histoquímica. Portanto, as amostras de biópsia serão estudadas pelo método de pesquisa genética e pela técnica imuno-histoquímica com o objetivo de validar um método diagnóstico para a pesquisa dessas mutações.

Quais são os aspectos experimentais deste estudo?

A parte experimental deste estudo é a implementação de um novo protocolo de método diagnóstico para a mutação EGFR no adenocarcinoma de pulmão. Acreditamos que o reconhecimento por técnica imuno-histoquímica de proteínas expressas por genes com mutação no EGFR pode beneficiar no diagnóstico, reduzindo tempo, facilitando o acesso e diminuindo custos.

PROCEDIMENTOS

O que acontece durante o estudo? Uma descrição do estudo.

Se o Senhor(a) foi convidado(a) a participar desse protocolo é porque preenche todos os critérios de inclusão no estudo. Portanto, já realizou todos os exames iniciais que são necessários. Não serão realizados exames outros para fins da pesquisa, sendo todo o presente projeto conduzido com amostras e exames já coletados para o seguimento médico habitual.

As amostras de biópsia serão obtidas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Serão obtidos cortes de tecidos tumorais retirados dos blocos de parafina, após o diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão conferido pela anatomia patológica. A partir disso, os cortes de tecidos tumorais serão submetidos à pesquisa genética de sequenciamento de DNA pela técnica SANGER (método tradicional), e posteriormente à técnica imuno-histoquímica – objetivo principal do presente estudo. Não haverá necessidade de procedimentos adicionais ou coleta de novos materiais que não sejam procedimentos exclusivamente atrelados à indicação médica de diagnóstico, seguimento e tratamentos clínicos. A indisponibilidade de material adequado ou que não permita avaliações

satisfatórias no presente estudo automaticamente excluirá a participação dessa pesquisa.

O material biológico será armazenado em forma de DNA extraído dos tecidos fixados em parafina e também cortes histológicos até a realização da técnica de imuno-histoquímica (IHQ). As amostras serão armazenadas em equipamentos de congelamento (Freezers -20°C) específicos e utilizados somente para este fim, conforme consta no regulamento de biorrepositório.

Será assegurado ao senhor, doador do material, a garantia de que resultados obtidos e que sejam de seu interesse lhes seja comunicada.

DESCONFORTOS E RISCOS

Não há riscos atrelados a essa pesquisa, uma vez que ela não prevê procedimentos adicionais àqueles que já seguem a normativa de indicações médicas para o diagnóstico, seguimento e tratamento do câncer de pulmão.

BENEFÍCIOS

Esperamos que o presente estudo propicie novas possibilidades para métodos diagnósticos para o câncer de pulmão.

Entretanto, fica explícito que o(a) Senhor(a) não receberá qualquer benefício adicional de saúde pela sua participação. O seu estado de saúde será acompanhado de maneira habitual pela equipe médica de pneumologia do HC UNICAMP. Não haverá qualquer diferença de conduta e tratamento relacionado a essa pesquisa para o caso do senhor(a).

A informação derivada do presente estudo pode beneficiar outras pessoas com câncer de pulmão no futuro.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Os pacientes que participarem deste estudo serão acompanhados no Serviço de Oncopneumologia do hospital seguindo os protocolos de atendimento da instituição. Este serviço é formado por médicos e docentes das Disciplinas de Pneumologia e Cirurgia Torácica e trabalha com o apoio de outras áreas, por exemplo, enfermagem, nutrição, serviço social, radiologia, medicina nuclear, radioterapia e quimioterapia, sempre buscando prestar um cuidado seguro e eficaz aos pacientes de acordo com as suas necessidades.

Os pacientes que participarem deste estudo terão o mesmo acompanhamento e receberão o mesmo tratamento que os pacientes não incluídos. Caso o(a) senhor(a) expresse o desejo de não participar do estudo, será mantido o acompanhamento no Serviço de Oncopneumologia com acesso a todos os recursos da instituição necessários ao seu cuidado.

SIGILO E PRIVACIDADE

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores.

Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

Não haverá ressarcimento de despesas (por exemplo, passagem, alimentação e diárias) durante a realização da pesquisa. Você terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

A guarda e a autorização do uso do referido material estará sob a responsabilidade exclusiva do Prof. Dr. Lair Zambon (matrícula UNICAMP 69353), Docente do Departamento de Clínica Médica/ FCM-UNICAMP.

O(a) senhor(a), sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

O prazo de armazenamento do material biológico humano no Biorrepositório será até o final dessa pesquisa.

CONTATO

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o seguinte pesquisador:

Antonio Carlos Gomes de Barros Jr Endereço:

Secretaria da Disciplina de Pneumologia - 2º andar do Hospital de Clínicas

Rua Vital Brasil, 251 - Cidade Universitária "Zeferino Vaz". Campinas - SP -

Brasil - CEP 13083-888. Telefone: (19) 3521-8281

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 35217187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.b](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante:

Contato telefônico:

e-mail (opcional):

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL).

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

(Assinatura do pesquisador)

Data: ____/____/____.