

Nicole Castiglione<sup>1</sup>

# Patologia do Câncer de Pulmão

## Lung Cancer Pathology

### >>> RESUMO

Em 2020, no Brasil, o câncer de pulmão foi a maior causa de morte e ocupou o terceiro lugar em número de casos novos diagnosticados no mesmo período entre todas as neoplasias malignas. No câncer de pulmão, os avanços da biologia molecular, terapia alvo e imunoterapia tem estimulado a realização de biópsias menos invasivas e com pequenas amostras obtidas, tornando um grande desafio o seu manejo diagnóstico histopatológico. Isso porque é necessário, cada vez mais, a realização de testes moleculares para a pesquisa de alvos terapêuticos em uma amostra contendo poucas células tumorais viáveis. O objetivo desse artigo, é expor pontos relevantes e atualizados da abordagem das amostras para o diagnóstico anatomopatológico e molecular do carcinoma não pequenas células de pulmão (CNPCP), incluindo as pequenas amostras e os tumores ressecados pós-terapia neoadjuvante.

### >>> PALAVRAS-CHAVE

Patologia molecular, câncer de pulmão.

### >>> ABSTRACT

In 2020, in Brazil, lung cancer was the leading cause of death and ranked third in the number of new cases diagnosed in the same period among all malignant neoplasms. In lung cancer, advances in molecular biology, targeted therapy and immunotherapy have encouraged the performance of less invasive biopsies and with small samples obtained, making its histopathological diagnostic management a major challenge. This is because it is increasingly necessary to carry out molecular tests to search for therapeutic targets in a sample containing few viable tumor cells. The objective of this article is to expose relevant and updated aspects of the sample approach for the anatomopathological and molecular diagnosis of non-small cell lung carcinoma (NSCLC), including small samples and resected tumors after neoadjuvant therapy.

### >>> KEY WORDS

Molecular pathology, lung cancer.

---

<sup>1</sup> Médica Patologista, Rede D'Or São Luiz  
Rua Ministro Raul Fernandes 43/908, Botafogo, CEP: 22260040

## »» INTRODUÇÃO

Em 2020, no Brasil, o câncer de pulmão foi a maior causa de morte e ocupou o terceiro lugar em número de casos novos diagnosticados no mesmo período entre todas as neoplasias malignas. Na última década, o diagnóstico do câncer de pulmão mudou drasticamente, sendo imprescindível, além da classificação histopatológica, o perfil molecular e a identificação de possíveis marcadores preditivos e prognóstico.

As pequenas amostras, decorrentes de biópsias menos invasivas, estão cada vez mais frequentes nos laboratórios, tornando um grande desafio o seu manejo diagnóstico histopatológico. Isso porque é necessário, cada vez mais, a realização de testes moleculares para a pesquisa de alvos terapêuticos em uma amostra contendo poucas células tumorais viáveis.

Desde 1967, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publica recomendações no manejo diagnóstico anatomopatológico dos tumores de pulmão. Da última atualização (2021 – 5ª edição) destacam-se os principais pontos: (1) novo modelo de graduação histológica dos adenocarcinomas, (2) a avaliação da disseminação pelos espaços aéreos (STAS) em outros subtipos histológico além do

adenocarcinoma, (3) maior destaque nos testes moleculares, (4) e um capítulo dedicado ao manejo das pequenas amostras (biópsias e citologia). O objetivo desse artigo, é expor pontos relevantes e atualizados da abordagem das amostras para o diagnóstico anatomopatológico e molecular do carcinoma não pequenas células de pulmão (CNPCP), incluindo as pequenas amostras e os tumores ressecados pós-terapia neoadjuvante.

## GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ADENOCARCINOMAS <<

O adenocarcinoma invasivo não mucinoso de pulmão usualmente exibe uma mistura de padrões arquiteturais. A graduação histológica está relacionada ao prognóstico do paciente. Nas amostras de ressecção, os adenocarcinomas são graduados histologicamente de acordo com o padrão predominante ou na presença de mais de 20% de um padrão de alto grau (Tabela 1). Cada padrão deve ser relatado no laudo histopatológico e quantificado em incrementos de 5 a 10% até totalizar 100%. Em pequenas amostras, deve-se relatar apenas o(s) subtipo(s) presente(s), uma vez que o tumor não está totalmente representado.

**Tabela 1.** Graduação histopatológica da OMS 2021 para adenocarcinoma não mucinoso pulmonar

Grau histopatológico	Característica histopatológica	Prognóstico
Bem diferenciado (G1)	predominantemente lepidico com nenhum ou menos de 20% de padrões de alto grau	Bom
Moderadamente diferenciado(G2)	predominantemente acinar ou papilar, com nenhum ou menos de 20% de padrões de alto grau	Intermediário
Pouco diferenciado (G3)	20% ou mais de padrões de alto grau: sólido, micropapilar, cribriforme e/ou glandular complexo	Ruim

## »» STAS (SPREAD THROUGH AIR SPACES – DISSEMINAÇÃO ATRAVÉS DOS ESPAÇOS AÉREOS)

STAS foi reconhecido pela primeira vez pela OMS em 2015, quando foi relacionado apenas aos adenocarcinomas não mucinosos. Estudos mais recentes mostraram a sua presença em outros tipos histológicos, como carcinoma de células

escamosas, adenocarcinoma mucinoso, tumores neuroendócrinos, entre outros. O STAS é definido como a presença de tumor nas formas de grupamentos micropapilares, ninhos sólidos ou células únicas soltas nos espaços aéreos presentes além da borda do tumor e é considerada uma forma de invasão tumoral.

A presença de STAS se correlaciona com pior prognóstico no CNPCP e está associada com maior

incidência de recorrência tumoral em amostras de ressecção cirúrgica limitada, pior sobrevida global e pior sobrevida livre de doença. *STAS* é mais frequente em homens, pacientes idosos (acima de 65 anos), tabagistas, níveis séricos de CEA elevados, subtipos histológicos de alto grau, invasão neoplásica da pleura visceral, invasão linfovascular, presença de metástases linfonodal e à distância e estadiopatológico mais alto.

Algumas condições podem gerar artefatos e, conseqüentemente, um diagnóstico falso positivo de *STAS*. Forças mecânicas, como a própria respiração do paciente, manipulação cirúrgica da peça (como a palpação e tração feita pelo cirurgião) e deslocamento de células tumorais para os espaços aéreos por faca ou bisturi no plano de corte do tumor (na clivagem durante a macroscopia ou pelo cirurgião). Esse último, é denominado como *STAKS* (*Spreading Through A Knife Surface*). Sendo assim, é importante frisar que quanto mais as peças cirúrgicas são manipuladas antes da análise do patologista, como palpações e cortes inadequados, maior a chance de um diagnóstico falso positivo de *STAS*.

## »»» PATOLOGIA MOLECULAR

O estudo molecular em um CNPCP é de extrema importância uma vez que orienta a escolha da terapia alvo potencialmente eficaz e/ou evita terapias com baixa probabilidade ou sem benefícios clínicos. A lista de biomarcadores clinicamente relevantes no CNPCP está em constante atualização e expansão. A versão mais recente da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network® - v5.2022*) lista oito genes que devem ser avaliados no CNPC não escamoso (EGFR, ALK, ROS1, MET, RET, NTRK1/2/3, KRAS, BRAF, HER2), além dos TMB, MSI/MMR e PD-L1. Algumas características clínico-patológicas, como tabagismo, etnia e histologia, estão associadas à presença de mutação de determinados genes, porém não devem ser utilizadas na seleção de pacientes para os testes. Não há nenhuma modalidade de teste que pesquise todos os biomarcadores de uma só vez.

É importante o conhecimento das metodologias dos testes utilizados, suas principais limitações e quais alterações pesquisadas (e não pesquisadas) em cada um deles. A maioria das metodologias

disponíveis nos laboratórios é baseada em amostras de tecidos em blocos de parafina (TBP), porém amostras citológicas (emblocadas – *cellblock* - ou não) também podem ser utilizadas. Apesar de vários testes baseados em amostras de *cellblock* não terem sido aprovados pelo FDA, eles são recomendados quando é o único ou o melhor material disponível.

A análise genética pode ser feita de duas formas: através do painel amplo (todos os biomarcadores em um único painel ou em um número limitado de ensaios) ou painel faseado, já que a maioria das mutações é mutuamente exclusiva, ocorrendo simultaneamente em apenas 1% a 3% dos casos. A escolha entre essas deve se levar em conta, além da urgência clínica, a disponibilidade dos métodos no laboratório, a história clínica e o custo. Importante frisar que a avaliação pelo sequenciamento genético (geralmente NGS) é o método preferível, já que preserva mais a amostra e com menor tempo de liberação do resultado. Caso o painel faseado for escolhido, os testes devem ser iniciados pelos genes preditivos de terapia alvo, seguindo a seguinte ordem: EGFR seguido do ALK, ROS1 e NTRK, seguidos dos demais genes se houver um contexto clínico apropriado. Na avaliação faseada, podem ser utilizados diferentes métodos, como o PCR (reação em cadeia da polimerase), FISH (*fluorescent in situ hybridization*), IHQ (imunohistoquímica) e NGS. A análise da expressão da proteína PD-L1 é feita somente pela IHQ.

### *Tipos de testes moleculares*

Várias técnicas podem ser utilizadas na detecção de alterações genéticas. No contexto dos testes moleculares no CNPCP, as mais utilizadas são: IHQ, FISH, PCR e sequenciamento genético pelo método de NGS. Em todos os métodos, é necessário garantir a qualidade e a quantidade da amostra analisada. No caso da avaliação da quantidade necessária de células tumorais, principalmente para os métodos de NGS e PCR, o patologista deve selecionar a área tumoral mais adequada na lâmina para extração do material parafinado (mínimo de 20 a 30% de células tumorais em relação a células não tumorais para minimizar resultados falso-negativos e área do tumor com a menor quantidade de necrose, sangue, mucosa ou inflamação).

**Tabela 2.** Atuais biomarcadores preditivos para CNPCP e métodos de análise molecular correspondentes.

Biomarcador	Tipo	Tipos de testes moleculares
EGFR ex 18, 19, 21	Mutação	DNA-SEQ (PCR/NGS)
KRAS p.G12C	Mutação	DNA-SEQ (PCR/NGS)
ALK	Fusão	IHC & FISH, DNA-SEQ, RNA-SEQ (PCR/NGS)
MET exon 14 skipping	Mutação/rearranjo	DNA-SEQ (PCR/NGS)/RNA-SEQ/FISH
EGFR ex 20	Mutação	DNA-SEQ (PCR/NGS)
BRAF p.V600E	Mutação	DNA-SEQ (PCR/NGS)
ERBB2/HER2	Mutação	DNA-SEQ (PCR/NGS)
RET	Fusão	FISH, DNA-SEQ, RNA-SEQ (PCR/NGS)
ROS1	Fusão	IHC & FISH, DNA-SEQ, RNA-SEQ (PCR/NGS) FISH
NTRK1, 2, 3	Fusão	IHC & FISH, DNA-SEQ, RNA-SEQ (PCR/NGS) IHC
PD-L1	Expressão	IHC

ALK anaplastic lymphoma kinase, BRAF B-Raf proto-oncogene, EGFR epidermal growth factor receptor, ERBB2 Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2, FISH fluorescent in situ hybridisation, HER2 human epidermal growth factor receptor 2, IHQ imuno-histoquímica, KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, MET hepatocyte growth factor receptor, NGS next-generation sequencing, NRG1 neuregulin-1, NSCLC non-small cell lung cancer, NTRK neurotrophic tyrosine receptor kinase, PCR polymerase chain reaction, PD-L1 programmed cell death ligand 1, RET rearranged during transfection, ROS1 ROS proto-oncogene 1, SEQ sequencing.

O NGS pode ser feito a partir da análise de DNA e/ou RNA. O NGS baseado em DNA é mais amplamente utilizado para detectar mutações sensíveis (mutações pontuais, deleções e inserções), variações no número de cópias e rearranjos estruturais, porém pode apresentar resultados falso negativos na pesquisa de fusão. Isso porque esse exige limitação na leitura das regiões intrônicas dos genes, diminuindo, assim, a sensibilidade na detecção de fusões, já que as quebras geralmente ocorrem dentro dessas regiões. O sequenciamento baseado em RNA permite a transcrição e a identificação de genes parceiros de fusão, porque não exige limitações na leitura das regiões intrônicas. Sendo assim, é recomendado o uso de NGS baseado simultaneamente em DNA e RNA para aumentar a sensibilidade na detecção e identificação de fusões de genes, diminuindo o desgaste da amostra e o tempo de obtenção do resultado. Caso o primeiro painel seja baseado em DNA e não for encontrada mutação alvo de terapia, recomenda-se que o teste seja repetido baseado em RNA.

*Principais alterações genéticas e tipos de testes moleculares utilizados*

O EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) é um receptor tirosina quinase normalmente encontrado na superfície das células epiteliais. São descritos inúmeros tipos de mutações do gene EGFR, sendo os mais frequentes a deleção do exon 19 e mutação pontual p.L858R no exon 21 e estão associadas à capacidade de resposta a terapia oral com inibidor de tirosina quinase (TKI) de EGFR. A mutação em p.T790M é mais comumente observada após a resposta à terapia anti-TKI de EGFR, sendo considerada um mecanismo de resistência. A mutação de EGFR é avaliada através do sequenciamento genético e está presente em torno de 20% dos adenocarcinomas do pulmão, sendo que 85% ocorrem no exon 19. Apesar de existir um anticorpo para este alvo, a IHQ não deve ser utilizada. Nas mutações do EGFR no exon 20, é importante o conhecimento da sequência específica, já que algumas podem ser sensíveis a inibidores de primeira e terceira geração. Logo, caso não haja a especificação da sequência no laudo do teste molecular, é

necessário testes adicionais para esclarecer melhor a sequência alterada. Abordagens direcionadas baseadas em PCR-RT para detecção de variantes de EGFR podem subdetectar eventos de inserção de EGFRex20. Portanto, o NGS baseado em DNA e RNA é o método preferível.

O ALK (linfoma quinase anaplásico) é um receptor de tirosina quinase. O rearranjo de ALK pode gerar uma desregulação e sinalização inadequada através do domínio ALK quinase e está presente em torno de 4 a 5% dos adenocarcinomas. O EML4 (proteína tipo 4 associada a microtúbulos do equinodermo) é o gene mais comum dentre os parceiros já identificados na fusão com ALK. A presença de um rearranjo ALK está associada à capacidade de resposta a TKIs ALK. Pode ser detectado pelas técnicas de NGS, PCR, FISH e IHQ. Essa última, mais barata e disponível nos laboratórios brasileiros, apresenta ótima correlação com o método molecular, podendo ser utilizada como um teste independente, quando utilizado o clone D5F3. Testes de PCR-RT são usados com ressalva, uma vez que são direcionados para parceiros conhecidos, podendo exibir resultados falsos negativos nos casos de fusão com novos parceiros.

ROS1 (ROS proto-oncogene 1) é um receptor de tirosina quinase. O rearranjo de ROS1 pode resultar em desregulação e sinalização inadequada através do domínio quinase ROS1 e está presente em 1 a 2% dos adenocarcinomas. Vários parceiros de fusão com ROS1 foram identificados, sendo os mais comuns: CD74, SLC34A2, CCDC6 e GOPC. A presença de rearranjo em ROS1 está associado à capacidade de resposta a TKIs ROS1. Pode ser pesquisado através das técnicas de NGS, PCR, FISH e IHQ. A IHQ com o clone D4D6 tem uma ótima correlação com os métodos moleculares, porém deve ser utilizada como método de triagem, uma vez que exibe baixa especificidade, ou seja, caso haja imunopositividade para o anticorpo ROS1, é necessária a confirmação do resultado por outro método. O FISH, o PCR-RT e o NGS baseado em DNA podem subdetectar fusões ROS1, principalmente na detecção de fusões com novos parceiros.

BRAF (proto-oncogene B-Raf) é uma serina/treonina quinase que faz parte da via canônica de sinalização MAP/ERK. Mutações ativadoras em BRAF

resultam em sinalização desregulada através da via MAP/ERK e estão presentes em 1.5% a 2.8% dos adenocarcinomas. Várias mutações no BRAF são observadas no CNPCP, porém os valores preditivos ainda não foram bem compreendidos, exceto a mutação específica pV600E, que está associada à resposta à terapia combinada com inibidores orais de BRAF e MEK. O PCR-RT e o NGS são os mais utilizados. A IHQ com anticorpo monoclonal específico anti-BRAF p.V600E não costuma ser utilizada, pois necessita de extensa validação.

KRAS (proto-oncogene KRAS) é uma proteína G com atividade GTPase intrínseca. Mutações ativadoras resultam em sinalização desregulada através da via MAP/ERK. Mutações no KRAS está presente em 20 a 40% dos adenocarcinomas e está associada a um prognóstico de sobrevida ruim. Várias mutações de KRAS foram identificadas no CNPCP, sendo a mais frequente a p.G12C, a qual está associada à boa resposta ao inibidor oral de KRAS G12C. As mutações no KRAS foram associadas à capacidade de resposta reduzida à terapia com EGFR TKI. O PCR-RT e NGS são os mais utilizados para a detecção de mutação em KRAS.

MET (transição mesenquimal-epitelial) é um receptor de tirosina quinase codificado pelo exon 14 (METex14). A mutação associada a esse gene é do tipo *skipping*, que resulta na perda do exon 14, levando a desregulação e sinalização inadequada nessa via. A presença da mutação *skipping* METex14 está associada à resposta aos TKIs MET orais. Várias alterações moleculares podem levar ao *skipping* do METex14. O teste baseado em NGS baseado em DNA e RNA é o principal método de detecção.

RET (reorganizado durante a transfecção) é um receptor de tirosina quinase. O rearranjo de RET resulta em desregulação e sinalização inadequada através do domínio RET quinase. Dentre os vários parceiros de fusão já identificados, os mais comuns são KIF5B, NCOA4 e CCDC6. O rearranjo de RET está associado à resposta aos TKIs RET orais, independentemente do parceiro de fusão. FISH, PCR-RT e o NGS baseado em DNA podem subdetectar fusões de RET, principalmente na detecção de novos parceiros. O NGS baseado em DNA e RNA tem alta especificidade e é o método de escolha.

NTRK1/2/3 (receptor de tirosina quinase neu-

rotrofico) são receptores de tirosina quinase que raramente são rearranjados em CNPCP (menos de 1%). A presença de fusões de genes NTRK1/2/3 resulta em desregulação e sinalização inadequada e está associada à resposta a inibidores orais de TRK. Inúmeros parceiros de fusão foram identificados. Mutações pontuais em NTRK1/2/3, diferentemente das fusões, geralmente não são ativadoras e não foram estudadas em associação com a terapia direcionada. FISH, IHC, PCR e NGS podem ser usados para detectar fusões de genes NTRK1/2/3. Porém, o FISH pode exigir pelo menos 3 conjuntos de sondas para análise completa, tornando o custo do teste bem elevado, além de um maior desgaste da amostra. A IHQ é utilizada como método de triagem, necessitando de confirmação por outro método nos casos imunopositivos. O NGS tem alta especificidade, porém o baseado em DNA pode subdetectar as fusões NTRK1 e NTRK3, sendo o baseado em RNA preferível em relação ao em DNA para detecção de fusão.

PD-L1 (ligante de morte programada 1) é uma molécula co-reguladora que pode ser expressa em células tumorais e que inibe a morte celular mediada por células T. As células T expressam PD-1 e na presença de PD-L1, a atividade das células T é suprimida. A IHQ é o único teste para avaliação do PD-L1 e é utilizada para identificar os casos com maior probabilidade de responder à terapia com anti-PD-1/PD-L1 de primeira linha. Vários clones de

anticorpos foram desenvolvidos para a avaliação da expressão de PD-L1 e a interpretação varia de acordo com cada um. A aprovação de alguns clones pelo FDA é baseada em indicações específicas, plataforma de teste e droga. Embora tenham sido aprovados para indicações específicas, o uso de vários testes de IHQ não é necessário, desde que teste utilizado tenha sido validado internamente no laboratório, garantindo a comparabilidade de resultados entre os clones.

*Teste de DNA de tumor circulante (ctDNA) – biópsia líquida:*

O uso ctDNA não deve ser usado no lugar de um diagnóstico histológico de tecido e é indicado em situações específicas: quando o paciente não exibe condições clínicas para a realização de procedimentos de biópsia, quando não houver material suficiente para análise molecular completa após a confirmação patológica de um diagnóstico de CNPCP e para acompanhamento clínico com pesquisa de mutação de resistência pós-terapia.

Estudos demonstraram que O teste ctDNA exibe alta especificidade, porém com uma baixa sensibilidade (taxa de falso-negativo de até 30%). Além disso, pode exibir resultados falso positivos, como na presença de alterações moleculares não relacionadas ao tumor conforme ocorre no fenômeno de hematopoiese clonal de indeterminado potencial (CHIP).

**Tabela 3.** Resumo das recomendações sobre os principais aspectos da análise molecular

<b>Metodologias de teste de biomarcadores</b>
Testes multiplex e de gene único
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quando vários alvos precisam ser testados, o NGS é mais econômico do que o teste de gene único faseado</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• O DNA/RNA NGS combinado é uma abordagem confiável e eficiente para a detecção abrangente de todos os biomarcadores aprovados e emergentes em CNPCP avançado (excluindo detecção de PD-L1 por IHQ)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• NGS baseado em RNA em paralelo com NGS baseado em DNA oferece maior sensibilidade para a detecção de genes de fusões</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• O NGS baseado em RNA permite a identificação de transcrições de genes, permitindo conclusões sobre fusões de genes no quadro e identificação de genes parceiros de fusão</li> </ul>

continua

continuação tabela 3

<b>Teste de IHQ para fusões de genes</b>
• IHC pode ser complementar e/ou um método alternativo ao sequenciamento ou teste FISH
• A detecção da superexpressão de produtos gênicos por IHQ é uma ferramenta de triagem útil para avaliar as fusões ALK, ROS1 e NTRK em CNPCP
• Nos casos de ROS1 e NTRK positivos na IHQ, a confirmação por outro método molecular (por exemplo, FISH, qPCR, NGS) é obrigatória de acordo com as diretrizes ESMO
• Para fusões RET, IHQ não é recomendada como uma ferramenta de triagem, pois casos falsos positivos e negativos foram relatados
<b>Biópsia líquida e tecidual</b>
• O sequenciamento de ctDNA circulante no plasma via biópsia líquida é uma abordagem complementar ao teste de biomarcador baseado em tecido
• As técnicas analíticas devem ser altamente sensíveis para detectar ctDNA específico do tumor, que representa apenas uma pequena fração do total ctDNA circulante
• Existem dados limitados sobre o uso de fluidos biológicos alternativos para biópsia líquida na caracterização genômica de CNPCP para orientar a terapia
• Dadas as limitações atuais de biópsias líquidas (por exemplo, falsos negativos), o teste baseado em tecido deve ser realizado sempre que possível, e um detalhado protocolo para utilização de tecido e biópsia líquida deve ser estabelecido em cada laboratório para avaliação de biomarcadores preditivos
• Os resultados negativos da análise de ctDNA devem ser confirmados por teste de tecido (incluindo uma nova biópsia de tecido, se necessário) devido à variabilidade na perda de DNA tumoral e o alto risco de falsos negativos
• Os resultados positivos da análise de ctDNA devem ser considerados com cautela devido ao potencial de falsos positivos atribuíveis a hematopoiese clonal e outros fatores

## »» MANEJO DAS PEQUENAS AMOSTRAS (BIÓPSIAS E CITOLOGIA):

Dentre as diversas formas de obtenção de amostras dos CNPCP, as pequenas amostras (biópsia ou citologia) estão cada vez mais frequentes nos laboratórios, superando os materiais oriundos de ressecção cirúrgica total do tumor. Esse fenômeno pode ser justificado por diversas mudanças no cenário do diagnóstico do câncer de pulmão: avanços das técnicas de imagem e de biópsias intervencionistas, programas de rastreamento (com maior detecção de lesões iniciais), tendência da abordagem cirúrgica cada vez menos invasiva e mais segura e a maior frequência dos diagnósticos iniciais de doença em estágio avançado inoperável (principalmente após a última pandemia).

O manejo diagnóstico, de tumores primários ou metastáticos, a partir dessas pequenas amostras torna-se cada vez mais desafiador, uma vez que é necessário a realização de mais testes complementares em uma amostra que contém poucas células neoplásicas viáveis e/ou subamostragem de áreas tumorais heterogêneas (histológicas e biológicas). Visando diminuir esse desafio, o IAS-LC/ATS/ERS (2011) e da OMS (2015) publicaram recomendações para o manejo o diagnóstico e a subclassificação das neoplasias malignas pulmonares em pequenas amostras. Não somente os patologistas, mas todos os profissionais envolvidos no diagnóstico do câncer de pulmão, devem estar cientes de tais recomendações, uma vez que vários fatores pré-analíticos interferem diretamente na qualidade e quantidade da amostra (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumo das principais recomendações para o manejo diagnóstico completo de CNPCP em pequenas amostras

<b>Principais opiniões e recomendações</b>
<b>As opções de técnicas de biópsia dependem do local da doença e incluem:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biópsia com agulha grossa (local transtorácico ou metastático): 2 a 6 fragmentos com uma agulha de calibre 18 a 20</li> <li>• Biópsia endobrônquica/transbrônquica com fórceps broncoscópico: pelo menos cinco fragmentos</li> <li>• Criobiópsias: dois fragmentos, quando viável</li> <li>• PAAF transbrônquica com ou sem EBUS radial: pelo menos quatro passagens por lesão-alvo com agulha calibre 21 ou 22</li> <li>• Amostras citológicas, como derrames pleurais ou escovados, são consideradas uma fonte de material suplementar do paciente</li> </ul>
<b>Considerações sobre qualidade/quantidade de tecido:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para teste molecular por NGS, a amostra deve ser composta por no mínimo 10% de células neoplásicas para minimizar resultados falsos negativos</li> <li>• Se a amostra de tecido for insuficiente ou de baixa qualidade, considerar o uso de amostras citológicas e/ou biópsia líquida</li> </ul>
<b>ROSE</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ROSE é recomendado pelas Diretrizes da NCCN® para o diagnóstico CNPCP nas técnicas de biópsia transbrônquica, biópsia transtorácica e EBUS, por aumentar a adequabilidade da amostra para diagnóstico e testes moleculares</li> </ul>
<b>Processamento de tecidos (amostras de biópsia)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• O processamento do tecido deve ser otimizado para maximizar a qualidade do DNA (por exemplo, fixar em formalina tamponada neutra a 10% por 6 a 48 h; usar formalina tamponada, evitar fixadores contendo ácidos ou metais pesados; realizar a descalcificação apenas como último recurso e usando EDTA)</li> <li>• Os fragmentos de tecido obtidos por biópsia devem ser separados em blocos individuais (ou seja, abordagem de “uma amostra por bloco”), reduzindo o desgaste do material</li> </ul>
<b>Processamento de amostras citológicas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• As amostras de citopatologia (por exemplo, cell blocks, esfregaços, imprints) podem ser utilizadas como substitutas nos casos em que o tecido é inadequado, e em alguns casos, podem ser o material de primeira escolha</li> <li>• Os fluidos corporais (líquidos pleural ou pericárdico) podem ser utilizados para diagnóstico molecular. Aproximadamente 10–15 mL devem ser enviados para análise bioquímica e cultura e o restante do volume enviado para citopatologia para processamento</li> </ul>
<b>Análise morfológica</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minimizar a frequência de recortar os blocos</li> <li>• Promover uma atitude proativa na clínica, com comunicação ativa entre a equipe multidisciplinar, otimizando o planejamento do manejo da amostra desde o início, inclusive com a definição de todos os testes que deverão ser feitos</li> <li>• Considerar o uso de amostras morfológicas e citológicas pareadas para maximizar a quantidade de amostra tumoral disponível para análise diagnóstica e molecular</li> </ul>

EBUS endobronchial ultrasound, EDTA ethylenediaminetetraacetic acid, NGS next-generation sequencing, ROSE rapid on-site evaluation.

## »» PAPEL DA IMUNO-HISTOQUÍMICA NO MANEJO DAS PEQUENAS AMOSTRAS (BIÓPSIAS E CITOLOGIA):

A IHQ é uma técnica que avalia a presença de proteínas específicas nas células (normais ou neoplásicas) em diferentes localizações (núcleo, citoplasma ou membrana). É um exame complementar ao diagnóstico histopatológico. Em pequenas amostras, o painel de IHQ deve ser o menor possível para preservação do material para testes moleculares adicionais, além de redução do custo e do tempo de liberação do laudo histopatológico. No contexto do CNPCP, a IHQ pode ser utilizada com objetivo diagnóstico (classificação do tipo histológico – adenocarcinoma x carcinoma de células escamosas) ou preditivo (avaliação de biomarcadores relevantes para terapias moleculares direcionadas. No primeiro, a IHQ é utilizada quando não é possível a classificação histológica apenas na morfologia vista na lâmina de HE. Os marcadores TTF-1 e Napsina são utilizados no diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão e apresentam boa sensibilidade (cerca de 75%), sendo a Napsina discretamente mais sensível em tumores pouco diferenciados. Os marcadores p40, p63 ou CK5/6 são utilizados no diagnóstico de carcinoma de células escamosas. Em pequenas amostras, é recomendado pela OMS que sejam utilizados inicialmente, somente os marcadores TTF1 e p40. A IHQ também é utilizada na definição do sítio primário de uma neoplasia metastática no pulmão, sendo essencial que a história clínica completa (em especial a presença de neoplasias extra-pulmonares) seja fornecida ao patologista antes da sua análise, otimizando a escolha dos marcadores corretos e precisos.

Na pesquisa de fatores preditivos em CNPCP, a IHQ representa um método mais econômico e amplamente disponível nos laboratórios brasileiros. Podem ser avaliados por IHQ os rearranjos de ALK e ROS1 e a expressão de PD-L1. A avaliação do ROS1 (clone D4D6) é considerada como triagem, ou seja, quando o resultado é positivo, é necessário a confirmação por outra técnica, como FISH ou NGS. Já a avaliação do ALK (clone D5F3) é diretamente diagnóstica, sem necessidade de confirmação do resultado por outro método. Para pesquisa de ex-

pressão de PD-L1 há diferentes clones (22C3, 28-8, SP263, SP142 e 73-10). Um resultado é considerado válido somente na presença de pelo menos 100 células tumorais na lâmina. O resultado é expresso em percentual no score TPS (*Tumor Proportion Score*), que é calculado pelo número de células tumorais positivas (em membrana citoplasmática parcial ou completa) dividido pelo número total de células tumorais na lâmina.

## MANEJO DAS AMOSTRAS PÓS-TERAPIA NEOADJUVANTE

Com as aprovações e o aumento das opções de tratamento de neoadjuvância, amostras de ressecção pós-terapia neoadjuvante (TN) estão cada vez mais frequentes nos laboratórios de anatomia patológica. A avaliação da resposta patológica principal (RPP) pós-TN está diretamente relacionada ao prognóstico e deve ser baseada apenas em peças provenientes de ressecção cirúrgica. Em 2020, a IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) publicou recomendações, baseadas em um consenso multidisciplinar, para avaliação patológica dessas amostras de ressecção de câncer de pulmão após TN sistêmica (quimioterapia, quimiorradiação, terapia de alvo molecular, imunoterapia ou qualquer nova terapia futura). O objetivo principal dessas recomendações foi tornar a avaliação consistente e padronizada na avaliação das amostras em ensaios clínicos, porém recomenda-se sua utilização fora desse contexto, uma vez que contribuem para uma boa prática clínico-patológica.

A RPP pós-TN deve ser determinada baseada nos achados macroscópicos e microscópicos (histológicos). Primeiramente, deve ser identificado no exame macroscópico o leito tumoral (LT), que é definido como a área considerada onde se localizava o tumor original pré-TN. Muitas vezes a localização pode ser difícil, e os cirurgiões podem ajudar, marcando a peça ou colocando pontos de identificação e suas respectivas descrições no pedido médico, além de fornecer exames de imagens pré e pós-tratamento. O tamanho do maior diâmetro macroscópico deve ser reavaliado/confirmado no exame microscópico. Após cortes seriados, o LT deve ser amostrado para avaliação

microscópica: na sua totalidade caso meça até 3 cm e pelo menos uma área de maior dimensão do LT se medir mais que 3 cm. Se houver estruturas adjacentes relevantes para o estadiamento patológico (com ou sem suspeita de invasão tumoral), é importante que o patologista seja informado.

Na análise microscópica, devem ser avaliados a presença dos componentes do LT: (1) tumor viável, (2) necrose e (3) estroma (incluindo inflamação e fibrose). Esses devem ser quantificados em porcentagem, em incremento de 10%, com soma final de um total de 100%. A porcentagem de tumor viável tem consistentemente demonstrado ser o único indicador histológico significativo para o prognóstico. A RPP é definida como a redução de tumor viável em quantidade menor ou igual a 10% de tumor viável no LT, independentemente do subtipo histológico ou do tipo de TN, uma vez que esse ponto de corte se correlaciona com uma sobrevida significativamente maior. Alguns trabalhos sugerem que o ponto de corte ideal para prever a sobrevida pode ser diferente de acordo com o tipo histológico (com pontos de corte de 10% para carcinoma de células escamosas e 65% para adenocarcinoma). No entanto, essa informação precisa ser validada e investigada em amostras tratadas com outros tipos TN.

Apesar de não haver comprovação de importância clínica da avaliação da RPP em metástases linfonodais em o cenário neoadjuvante, é recomendado pelo IALSC que os linfonodos sejam manejados de forma especial. Na maioria das vezes os linfonodos são pequenos o suficiente para serem analisados inteiramente. Porém, se houver suspeita clínica de uma metástase ou LT maior que 2 cm, o linfonodo deve ser cortado ao meio antes de análise microscópica. Os mesmos componentes do LT também devem ser avaliados nos linfonodos. A avaliação microscópica é a mesma usada para o LT, relatando a porcentagem de tumor viável, necrose e estroma.

As mesmas alterações histológicas vistas nas amostras pós-TN, também podem ser observadas em cerca de 3% de CNPCP em amostras sem história de pós-TN, correspondendo ao fenômeno de regressão tumoral. Além disso, o reconhecimento de estruturas adjacentes e do LT pode ser muito

difícil devido à fibrose e inflamação, principalmente quando há uma boa resposta terapêutica, tornando ainda mais importante o fornecimento dos dados clínicos e de imagem para a identificação segura do leito tumoral, como por exemplo, a informação que o paciente fez TN e qual tipo, se há mais de um tumor, o seu tamanho e a sua localização.

## CONCLUSÃO <<<

A detecção cada vez mais precoce do CNPCP e o aumento da frequência de métodos de obtenção de amostras menos invasivos geraram um aumento de pequenas amostras nos laboratórios, tornando desafiador a abordagem diagnóstica. Isso porque é necessário realizar, em uma amostra contendo menos células tumorais viáveis, diversos testes diagnósticos e moleculares preditores de terapia alvo-molecular personalizada e prognóstico, interferindo diretamente na conduta terapêutica do paciente. O manejo diagnóstico no contexto brasileiro exhibe diversas questões que dificultam um seguimento padrão-ouro em todas as especialidades envolvidas no cuidado do paciente com CNPCP: escolha do método de obtenção da amostra (disponibilidade e condições clínicas do paciente), escolha dos testes utilizados (metodologia e disponibilidade nos laboratórios) e a cobertura do custo. Além disso, diversos fatores pré-analíticos interferem na qualidade da amostra e na análise anatomopatológica e molecular. Sendo assim, é de suma importância, que todos os médicos de diversas especialidades envolvidos, compreendam os principais pontos que podem interferir diretamente no diagnóstico anatomopatológico do CNPCP para que haja uma otimização dos resultados.

**>>> REFERÊNCIAS**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries CA: A Cancer Journal for Clinicians (2021) 71(3) 209-249 doi: 10.3322/caac.21660
2. Butnor KJ, Roden AC, Tazelaar, HD, Wang J et al. WHO Classification of Thoracic Tumours. (2021 – 5ª edição).
3. Moreira, A. L. et al. A Grading System for Invasive Pulmonary Adenocarcinoma: A Proposal From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. J Thorac Oncol 15, 1599-1610, doi:10.1016/j.jtho.2020.06.001 (2020).
4. Travis, W. D. et al. IASLC Multidisciplinary Recommendations for Pathologic Assessment of Lung Cancer Resection Specimens After Neoadjuvant Therapy. J Thorac Oncol 15, 709-740, doi:10.1016/j.jtho.2020.01.005 (2020).
5. Rusch, V. W. et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: A Proposal for a New International Lymph Node Map in the Forthcoming Seventh Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology 4, 568-577, doi:10.1097/jto.0b013e3181a0d82e (2009).
6. Marshall, T., Kalanjeri, S. & Almeida, F. A. Lung cancer staging, the established role of bronchoscopy. Curr Opin Pulm Med, doi:10.1097/MCP.0000000000000843 (2021).
7. Brainard, J. & Farver, C. The diagnosis of non-small cell lung cancer in the molecular era. Mod Pathol 32, 16-26, doi:10.1038/s41379-018-0156-x (2019).
8. Penault Llorca F, Keith M. Kerr, Pilar Garrido et al. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing - Part 1: Tissue collection and management. Virchows Archiv (2022) 481:335–350. doi: 10.1007/s00428-022-03343-2
9. Penault Llorca F, Keith M. Kerr, Pilar Garrido et al. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing — Part 2: Analysis, reporting, and quality assessment. doi: 10.1007/s00428-022-03344-1
10. Junker K, Langner K, Klinker F, Bosse U, Thomas M. Grading of tumor regression in non-small cell lung cancer: morphology and prognosis. Chest. 2001;120:1584–1591.
11. Pataer A, Kalhor N, Correa AM, et al. Histopathologic response criteria predict survival of patients with resected lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. J Thorac Oncol. 2012;7:825–832.
12. Hellmann MD, Chaft JE, William WN Jr, et al. Pathological response after neoadjuvant chemotherapy in resectable non-small-cell lung cancers: proposal for the use of major pathological response as a surrogate endpoint. Lancet Oncol. 2014;15:e42– e50.
13. William WN Jr, Pataer A, Kalhor N, et al. Computed tomography RECIST assessment of histopathologic response and prediction of survival in patients with resectable non-small-cell lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. J Thorac Oncol. 2013;8:222– 228.
14. Junker K, Thomas M, Schulmann K, Klinker F, Bosse U, 926. Müller KM. Tumour regression in non-small-cell lung cancer following neoadjuvant therapy. Histological assessment. J Cancer Res Clin Oncol. 1997;123:469–477.
15. Dooms C, Verbeken E, Stroobants S, Nackaerts K, De Leyn P, Vansteenkiste J. Prognostic stratification of stage IIIA-N2 non-small-cell lung cancer after induction chemotherapy: a model based on the combination of morphometric-pathologic response in mediastinal nodes and primary tumor response on serial 18-fluoro-2-deoxy-glucose positron emission tomography. J Clin Oncol. 2008;26:1128–1134.
16. Srigley J, McGowan T, Maclean A, et al. Standardized synoptic cancer pathology reporting: A population-based approach. Journal of Surgical Oncology, (2009), 517-524, 99(8)
17. Qu Y, Emoto K, Eguchi T, et al. Pathologic assessment after neoadjuvant chemotherapy for NSCLC: importance and implications of distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma. J Thorac Oncol.

201;14:482–493.

18. Kerr KM, Johnson SK, King G, et al. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology*. 1998;33:55–63.
19. Pataer A, Weissferdt A, Vaporciyan A, et al. Evaluation of Pathologic Response in Lymph Nodes of Patients With Lung Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy *Journal of Thoracic Oncology*. Vol. 16 No. 8: 1289–129
20. Blumenthal G, Bunn P, Chaft J, et al. Current Status and Future Perspectives on Neoadjuvant Therapy in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* Vol. 13 No. 12: 1818-1831
21. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Non-Small Cell Lung Cancer Versão 5.2022 — September 26, 2022. [www.nccn.org/patients](http://www.nccn.org/patients)
22. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers* 2018, 10(3), 72; doi:10.3390/cancers10030072