

# Biomarcadores de câncer de pulmão. Uma revisão de literatura

## *Lung cancer biomarkers. a literature review*

Amanda Angelo Soares Costa<sup>1</sup>; Glauca Luciano da Veiga<sup>2</sup>; Beatriz da Costa Aguiar Alves<sup>2</sup>; Thaís Moura Gascón<sup>2</sup>; Edimar Cristiano Pereira<sup>1</sup>; Ligia Ajajime Azzalis<sup>1</sup>; Fernando Luiz Affonso Fonseca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP- Diadema, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de Medicina do ABC - Santo André, Brasil.

### RESUMO

O câncer de pulmão é o primeiro em incidência e mortalidade, sendo responsável mundialmente por cerca de 1,8 milhão de mortes. No Brasil, 31.270 casos novos foram diagnosticados em 2018, sendo 18.740 em homens e 12.350 em mulheres. Um dos principais desafios do câncer de pulmão é o diagnóstico precoce, na maioria das vezes a doença é detectada em fases tardias, o que implica em mau prognóstico. Os biomarcadores tumorais são extremamente relevantes no diagnóstico precoce, compreensão da carcinogênese, determinação do prognóstico e escolha terapêutica. O presente trabalho revisa biomarcadores de câncer de pulmão de células não pequenas descritos na literatura e suas aplicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas, intervenção e controle terapêutico para terapia individualizada. Embora ainda exista um vasto universo a ser explorado, estudos revelam um futuro promissor para o tratamento do câncer de pulmão com terapias cada vez mais personalizadas e assertivas que aumentam as chances de sobrevida livre de progressão.

**Palavras-chave:** neoplasias pulmonares; biomarcadores tumorais; humanos.

### ABSTRACT

*Lung cancer is the first in terms of incidence and mortality, being responsible worldwide for about 1.8 million deaths. In Brazil 31,270 new cases were diagnosed in 2018, 18,740 in men and 12,350 in women. One of the main challenges about lung cancer is performing an early diagnosis, in most cases the disease is detected in the late stages, which implies in poor prognoses. Tumor biomarkers are hugely relevant in early diagnosis, understanding of carcinogenesis, prognostic determination and therapeutic choice. The present paper reviews non-small cell lung cancer biomarkers described in the literature and their diagnostic, prognostic and therapeutic applications, intervention and therapeutic control for individualized therapy. Although there is still a vast universe to be explored, studies reveal a promising future for lung cancer treatment with increasingly personalized and assertive therapies that increase the chances of progression-free survival.*

**Key words:** lung neoplasms; biomarkers; tumor; humans.

### INTRODUÇÃO

Segundo a OMS, o câncer é a principal causa de morte no mundo e estima-se que seja responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. O câncer de pulmão (CL) é o primeiro em termos de

incidência e mortalidade, com aproximadamente 2,1 milhões de casos diagnosticados em no ano anterior, e devido ao seu mau prognóstico, foi responsável por 1,8 milhão de mortes em todo o mundo<sup>(1)</sup>.

No Brasil, estima-se que 31.270 novos casos foram

diagnosticados em 2018, sendo 18.740 em homens e 12.530 em mulheres. Em 2017, o número de mortes por LC atingiu 27.833, representando a maior taxa de morte por câncer em homens (15,9%) e a segunda maior taxa em mulheres (11,4%), perdendo apenas para o câncer de mama (16,2%) que é mais prevalente nessa população<sup>(2,3)</sup>.

Os LC podem ser classificados em dois tipos principais, de acordo com as células que os iniciam, sendo eles: LC de células não pequenas e LC de células pequenas. O CL de células não pequenas é o tipo mais prevalente e dentro desse grupo estão o carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células grandes e o adenocarcinoma. O LC de células pequenas é menos comum e tende a se espalhar mais rapidamente do que o LC de células não pequenas. A maioria dos casos de CL é causada pelo tabagismo, porém existem outros fatores que podem influenciar no desenvolvimento da doença, como história familiar, tabagismo passivo, radiação ou exposição ocupacional a determinados produtos químicos e poluentes<sup>(4)</sup>.

O diagnóstico da doença é feito por meio da radiografia de tórax na maioria das vezes, exame de fácil execução e relativamente baixo custo, mas também pode ser feito por meio de tomografia computadorizada, tomografia por emissão de pósitrons, broncoscopia e biópsia<sup>(5)</sup>. Um dos principais desafios do CL é o diagnóstico precoce, na maioria dos casos a doença é detectada já em fase tardia, o que implica um mau prognóstico. Portanto, é necessário compreender os biomarcadores moleculares, que definidos de forma geral e simplificada, são componentes que distinguem entre o estado normal e o estado anormal de uma célula, auxiliando no diagnóstico precoce, compreensão da carcinogênese, determinação do prognóstico e a escolha da terapia. Para iniciar o tratamento com CL, é necessário avaliar o tipo histológico do câncer, seu tamanho e localização, seu estágio e as condições gerais de saúde do paciente. A escolha da terapia é individualizada para cada paciente e nem sempre é uma tarefa simples, o processo de decisão deve contar com a participação de uma equipe multiprofissional em conjunto com o paciente<sup>(6)</sup>.

A gama de tratamentos inclui cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia alvo e / ou uma combinação dessas modalidades, dependendo do tipo de câncer e de quão avançado está o estágio. As cirurgias podem ser de três tipos, segmentectomia e ressecção em cunha (quando uma pequena parte do pulmão é removida), lobectomia (todo o lobo pulmonar afetado pelo tumor é removido) e pneumectomia (remoção completa do pulmão).

Levando em conta as informações acima, o presente trabalho revisa os principais biomarcadores de CL de células não pequenas e suas aplicações em diagnóstico, prognóstico e intervenção, além

do controle terapêutico para terapias individualizadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esta revisão bibliográfica busca compreender o papel dos biomarcadores na população de pacientes com CL de células não pequenas, pois podem auxiliar no diagnóstico precoce, na avaliação da progressão da doença, na escolha da intervenção terapêutica e no que esperar no futuro.

Para elucidar as questões desta revisão, foi utilizada a base de dados eletrônica PubMed, que compreende mais de 29 milhões de citações da literatura biomédica MEDLINE, periódicos de ciências da vida e livros online. A pesquisa foi realizada em abril / 2019 e foram selecionadas pesquisas realizadas em seres humanos e publicadas nos últimos 5 anos (2014-2019) em português ou inglês.

Os termos utilizados como descritores da pesquisa foram: “biomarcadores”, “câncer de pulmão não pequeno” e “humanos”. A busca seguiu a estratégia *MeSH (Medical Subject Headings)*, resultando nos seguintes títulos: (“Biomarcadores” [Mesh]) AND “Carcinoma, Non-Small-Cell Lung / diagnostico” [Mesh] AND “Humans” [Mesh].

Os estudos resultantes foram submetidos aos seguintes critérios de inclusão: estudos clínicos envolvendo seres humanos, publicados nos últimos 5 anos, em inglês ou português, com resumo e textos completos. Foram excluídos estudos de revisão, meta-análises, editoriais, cartas, estudos de caso e estudos clínicos em animais.

Como resultado da pesquisa, foram obtidos 1.317 estudos. Após a aplicação dos critérios de inclusão, foram incluídos 17 estudos, sendo um deles em francês, ao final do processo foram selecionados 16 estudos. Após o processo de seleção, os resumos foram lidos e os estudos que não estavam relacionados aos biomarcadores biológicos foram excluídos, totalizando o número de estudos incluídos para 8.

Os artigos selecionados estão organizados na Tabela 1 a seguir de acordo com o autor, ano de publicação, objetivo, metodologia, resultados e existência ou não de financiamento.

### Mutação EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico)

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também conhecido como: ERBB; HER1; mENA; ERBB1; ERBB2; PIG61; NISBD2, codifica uma glicoproteína transmembrana da família da proteína quinase. Essa proteína é um receptor de

Tabela 1: Tabela-resumo dos artigos selecionados.

Autor/ano	Objetivo	Metodologia	Desfechos	Patrocínio
Marchetti A, et al -2014	Investigar a viabilidade de detecção de mutações de EGFR em células tumorais circulantes de pacientes com CP de células não pequenas acoplando o sistema CellSearch com sequenciamento de próxima geração (NGS) no sistema 454 GS Junior (454 Life Sciences, Branford, CT e Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN).	Amostras de sangue foram coletadas de 37 pacientes inscritos no estudo TRIGGER, um ensaio prospectivo multicêntrico fase II, do tratamento com erlotinib em doentes com CP de células não pequenas em estágio avançado com mutações ativadoras do EGFR no tecido tumoral. 10 células tumorais circulantes (CTC) foram preparadas de pacientes com câncer de mama sem mutações do EGFR em seus tumores primários e 12 amostras de sujeitos saudáveis foram analisadas como controles negativos. As preparações de CTC, obtidas pelo VeridexCellSearch System, foram submetidas ao sequenciamento ultra profundo de última geração (NGS) na plataforma júnior 454 GS da Roche.	Foi relatado que o sistema CellSearch, juntamente com o NGS, é muito sensível e específico como ferramenta diagnóstica para análise de mutação de EGFR em preparações de CTC com potencial impacto clínico, podendo ser particularmente útil nos casos com quantidade muito limitada de material biológico ou para acompanhar o status mutacional do tumor durante o tratamento, com especial ênfase na presença de mutações envolvidas na aquisição de resistência a TKIs.	Roche Indústria Farmacêutica
Sun M, et al - 2014	Explorar o padrão de expressão de SPRY4-IT1 em tecidos de CP de células não pequenas (CPCNP) e linhagens celulares, e investigar os efeitos da expressão SPRY4-IT1 em fenótipos de células de CPNPC tanto in vitro como in vivo.	Expressão SPRY4-IT1 foram investigados em 121 amostras pareadas de CPCNP e tecidos histologicamente normais adjacentes utilizando o PCR (qPCR)	A expressão de SPRY4-IT1 foi regulada negativamente e correlacionada com um mau prognóstico de CP de células não pequenas.	National Natural Scientific Foundation of China
Yamamoto S, et al - 2014	Fornecer uma caracterização radiogenômica de tomografia computadorizada de CPCNP rearranjado ALK (ALK + CPCNP) a partir de dados em uma coorte multi-institucional.	Neste estudo retrospectivo, estudos tomográficos, status ALK e dados clínico-patológicos em 172 pacientes com CPCNP de três instituições foram analisadas. Utilizou-se 24 características de tomografia computadorizada mais seis covariáveis clínico-patológicas para identificar um preditor radiogenômico do status ALK +. Este preditor foi então validado em uma coorte independente (n = 113). Análises de teste para precisão e subconjuntos foram realizadas. Uma análise semelhante foi realizada para identificar um biomarcador associado com menor sobrevida livre de progressão (SLP) após terapia com o inibidor da ALK crizotinib.	ALK + CPCNP tem características distintas na imagem por tomografia computadorizada que, quando combinadas com covariáveis clínicas, discriminam ALK + de tumores não-ALK e pode potencialmente identificar pacientes com uma resposta durável mais curta ao crizotinib.	Não declarado

Bar j, et al - 2015	Avaliar o significado prognóstico e preditivo dos níveis séricos da enzima conversora de angiotensina (ECA) e aldosterona, reguladores da pressão arterial, em pacientes com câncer avançado de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) inscritos no NCIC Ensaio de Grupo de Ensaio Clínicos BR.24.	Enzima conversora de angiotensina e a aldosterona foram medidas retrospectivamente utilizando ensaios de imunoabsorção enzimática no início e durante o tratamento, em amostras de soro de 226 e 176 de 296 pacientes inscritos, respectivamente. A regressão de Cox foi realizada para correlacionar biomarcadores e características do paciente com sobrevida global (SG) e sobrevida de progressão livre (SPL).	Baixos níveis iniciais de ECA foram prognósticos de baixa taxa de sobrevida total e preditivo de benefício da sobrevida total do cediranibe. Um aumento do nível de aldosterona com o tratamento também pode ser preditivo do benefício de sobrevida total do cediranib. Esses biomarcadores devem ser validados em ensaios antiangiogênicos adicionais em CPCNP e outros câncers.	Ottawa Regional Câncer Center e a Ottawa Regional Câncer Foundation
Chen X, et al - 2015	Investigar o desempenho diagnóstico dos receptores-positivos de folato células tumorais circulantes em distinguir CP de células não pequenas (CPCNP) de doença benigna do pulmão uma nova detecção de reação em cadeia da polimerase (PCR) dirigida ao ligante técnica.	Células tumorais circulantes foram enriquecidas a partir de 3 mL sangue por depleção imunomagnética de leucócitos e, em seguida, marcado com um conjugado de um ácido fólico ligante específico do tumor e um oligonucleotídeo sintetizado. Após a lavagem dos conjugados livres, os conjugados de ligantes removidos foram analisados por PCR quantitativa.	A técnica de PCR direcionada por ligante foi viável e confiável para a detecção de células tumorais circulantes positivos para receptores de folato em pacientes com CPCNP, e níveis de células tumorais circulantes poderiam ser usados como um biomarcador útil para o diagnóstico de CPCNP.	Esta pesquisa foi parcialmente apoiada pelo Guia Projeto da Comissão de Ciência e Tecnologia de Município de Xangai (concessão 124119a8000); o Forefront e projetos tecnológicos emergentes de Shanghai Shengkang Centro de Desenvolvimento Hospitalar (concessão SHDC12013102); e o principal projeto apoiado pela Shanghai Science and Technology Comissão (concessão 13441902200).
Shimizu T, et al - 2016	O objetivo deste estudo é determinar se número de cópias do gene TYMS prevê o resultado de pacientes recebendo pemetrexede (PMT). Investigou-se a associação entre o número de cópias do gene TYMS e a eficácia terapêutica do PMT mais carboplatina (CBDCA) em pacientes com CPCNP avançado em um estudo de fase II.	Os participantes eram pacientes nunca tratados com quimioterapia, com CP de células não pequenas avançado, tratados com pemetrexede mais carboplatina (CBDCA), estudo clínico prospectivo de fase II. A expressão do TYMS (Timidilato sintase) foi avaliada em 40 pacientes por número de cópias do gene e expressão proteica usando FISH e IHC. A eficácia terapêutica foi avaliada através da investigação da taxa de resposta (TR), taxa de controle da doença (TCD), progressão sobrevida livre (PSL) e sobrevida global (SG).	A análise do número de cópias do gene TYMS é mais adequado que a expressão da proteína TYMS para avaliação da expressão TYMS. Amplificação do gene TYMS prediz resultados de pacientes com CPCNP que recebem pemetrexede.	Não declarado

Niemeijer AN, et al - 2018	Mostrar que a expressão do tumor PD-L1 e PD-1 pode ser quantificado não invasivamente usando PET-CT em pacientes com CP de não-pequenas células.	Todo corpo dos pacientes participantes foram scaneados para PD- (L) 1 através de PET-CT. Treze pacientes foram incluídos neste estudo de biomarcador exploratório de um único centro, braço único, aberto, primeiro em humano.	A expressão do tumor PD-L1 e PD-1 pode ser quantificado não invasivamente usando PET-CT em pacientes com CP de células não-pequenas. Todo corpo PD- (L) 1 PET-CT revela heterogeneidade significativa na captação do traçador de tumores tanto entre pacientes, como no próprio pacientes entre diferentes lesões tumorais.	Bristol-Myers Squibb (BMS)
Villalobos M, et al - 2018	O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do ERCC1 na sobrevida de pacientes com estádio não-escamoso de estádio IIIB / IV CPCNP (NS-NSCLC) inscrito no ensaio INNOVATIONS, recebendo assim como tratamento erlotinib / bevacizumab (EB) ou cisplatina / gemcitabina / bevacizumab (PGB)	Análise retrospectiva do tecido tumoral de 72 pacientes utilizando imunohistoquímica para avaliar a expressão do ERCC1. A distribuição entre os braços de tratamento foi igual (36 pacientes cada). Dois diferentes escores H foram calculados e correlacionados com a sobrevida.	Os achados apoiam a hipótese de que pacientes cujos tumores têm uma expressão baixa de ERCC1 beneficiar da quimioterapia à base de cisplatina. Em pacientes tratados com erlotinib e bevacizumab, um efeito positivo na progressão de vida livre foi encontrada para os tumores positivos para ERCC1 baseados em pontuação H, mas não com o sistema de pontuação modificado.	Roche Indústria Farmacêutica

superfície celular, que se liga ao fator de crescimento epidérmico, e essa ligação induz a dimerização do receptor e a autofosforilação do domínio da tirosina quinase, levando à ativação de cascatas de sinalização para crescimento, diferenciação, migração, proliferação celular e apoptose<sup>(7)</sup>.

O gene que codifica EGFR está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p11.2), a proteína transmembrana EGFR é composta por 28 exons e três domínios: domínio extracelular N-terminal, domínio lipofílico e o domínio C-terminal de tirosina quinase intracelular, e codifica uma proteína de 1210 aminoácidos<sup>(7,8)</sup>.

EGFR é geralmente superexpresso em muitos tipos de câncer epitelial, como no LC de células não pequenas. Mutações no gene EGFR, por exemplo, a deleção no exon 19 ou exon 21 (L858R), são consideradas ativadoras e são preditivas de bom prognóstico em terapias com inibidores da tirosina quinase (erlotinibe e gefinitib), outros, como uma mutação do exon 20 (T790M), geralmente aparecem após algum tempo durante o tratamento e caracterizam resistência à terapia. Ambas as mutações são consideradas biomarcadores farmacogenéticos em CL de células não pequenas e ajudam a prever os resultados do tratamento<sup>(7)</sup>.

O sangue periférico de indivíduos com câncer contém moléculas de DNA livres de células tumorais, também conhecidas como células tumorais circulantes (CTCs). Foi demonstrado que

as CTCs são detectáveis em pacientes com LC avançada de células não pequenas<sup>(9)</sup>.

Um grupo de pesquisa avaliou mutações ativadoras de EGFR de preparações de CTC, extraídas de amostras de sangue de pacientes com LC de células não pequenas. As preparações de CTC foram obtidas pelo Veridex Cell Search System e submetidas ao sequenciamento ultra-profundo de última geração (NGS) na plataforma 454 GS junior da Roche<sup>(10)</sup>.

A possibilidade de detectar mutações genéticas em CTCs em vez da biópsia de tecido convencional tem algumas vantagens: primeiro, as amostras de sangue podem ser obtidas mais fácil e repetidamente, enquanto as biópsias de tecido são procedimentos invasivos e as biópsias são desafiadoras; Em segundo lugar, a tomografia computadorizada (CTC) representa o estado atual do crescimento neoplásico e é importante no monitoramento de recorrências e no desenvolvimento de resistência tumoral; Terceiro, as CTCs podem representar todo o processo neoplásico (tumor primário / metástase), enquanto a biópsia em um único local não pode refletir os vários locais do tumor.

O estudo demonstrou pela primeira vez que é possível detectar mutações de EGFR por meio de sequenciamento ultra-profundo de última geração de preparações de CTC e a nova abordagem de diagnóstico pode ser particularmente útil em casos com quantidades limitadas de material biológico ou para avaliar o

estado mutacional do tumor durante o tratamento, especialmente em mutações desenvolvidas na aquisição de resistência a terapias inibidoras da tirosina quinase.

### Expressão de SPRY4-IT1 em RNAs não codificantes longos

Embora o genoma humano seja 75% transcrito, uma grande fração desse genoma é não codificante e produz longos RNAs não codificantes chamados lncRNAs, apenas 2% do genoma codifica proteínas<sup>(11)</sup>.

Esses lncRNAs participam de diversos processos biológicos, incluindo modulação da apoptose, invasão e reprogramação da pluripotencialidade das células-tronco e imprinting parental, por esses motivos, são de grande interesse em doenças oncológicas<sup>(12)</sup>.

SPRY4-IT1 lncRNA é um derivado intrônico dentro do SPRY4 (RTK pulverizado sinalizador antagonista 4), que é um gene codificador de proteína localizado no cromossomo 5, amplamente expresso no pulmão, tecido adrenal e outros<sup>(13)</sup>.

O grupo de pesquisa SUN et al., 2014 explorou a expressão de SPRY4-IT1 em tecidos e linhas celulares de NSCLC e quais efeitos essa expressão teve nos fenótipos de células de NSCLC tanto in vitro quanto in vivo<sup>(13)</sup>. Para avaliar se a expressão de SPRY4-IT1 afetaria a tumorigênese, células da linhagem SPC-A1 (células de adenocarcinoma pulmonar) contendo pCDNA-SPRY4-IT1 e vetores vazios (apenas células SPC-A1) foram inoculadas em camundongos fêmeas. Dezoito dias após a injeção, os tumores formados no grupo pCDNA-SPRY4-IT1 eram menores do que os obtidos no grupo controle.

O estudo demonstrou que a baixa expressão de SPRY4-IT1 está relacionada a mau prognóstico em pacientes com NSCLC, com baixa sobrevida e alto risco de metástases. Por outro lado, foi demonstrado que a alta expressão de SPRY4-IT1 inibe a proliferação, migração e invasão de células NSCLC e induz apoptose.

Esses achados são importantes na compreensão da patogênese do NSCLC e no direcionamento de alvos para novas terapias e para o diagnóstico, sugerindo que SPRY4-IT1 poderia ser um biomarcador para mau prognóstico em NSCLC.

### Gene ALK Radiogenômico (Anaplastic Lymphoma Kinase)

Localizado no cromossomo 2, esse gene codifica um receptor de tirosina quinase. Esta proteína é composta por um domínio extracelular, um alongamento hidrofóbico que corresponde a uma região de passagem transmembrana e um domínio quinase

intracelular. É de grande importância no desenvolvimento do cérebro e exerce seus efeitos em neurônios específicos do sistema nervoso.

Descobriu-se que esse gene foi rearranjado, mutado ou amplificado em uma série de tumores, incluindo LC de células não pequenas, que representam até 5% de todos os diagnósticos primários e tendem a ocorrer em crianças e em pacientes sem histórico de tabagismo ou ex-fumantes leves (10 maços / ano). Os rearranjos cromossômicos são as alterações genéticas mais comuns nesse gene e resultam na criação de múltiplos genes de fusão na tumorigênese (conhecido como translocação *EML4-AKL*)<sup>(14,15)</sup>.

amamoto et al., Grupo de pesquisa de 2014 avaliaram uma forma de caracterizar o radiofenótipo ALK por meio de tomografia computadorizada. Foi criado um escore quantitativo, com a criação e validação desse escore ocorrendo em duas etapas: a primeira consistiu na definição de um biomarcador radiogenômico do estado de ALK em tomografia computadorizada em um conjunto de treinamento, a segunda fase consistiu na validação deste biomarcador de forma independente conjunto de pacientes<sup>(16)</sup>. Um total de 172 pacientes foram incluídos neste estudo, 47 ALK +, 65 com mutação EGFR, 41 com EGFR de tipo selvagem, 6 com mutação KRAS e 13 com mutação TP53. Quatro características foram selecionadas como preditivas do estado de ALK +, sendo elas: localização central do tumor, derrame pleural, ausência de sinal da cauda pleural e idade inferior a 60 anos.

A vantagem de utilizar um escore de imagem para identificar o fenótipo ALK + em dados de tomografia computadorizada é, além da facilidade de cálculo, evidenciada pela confiabilidade interobservador testada no estudo, ser facilmente detectada em quase todos os pacientes por meio de avaliação clínica de rotina, sem sendo invasivo.

O objetivo de usar o escore de imagem não é substituir o teste molecular, mas sim fornecer aos radiologistas uma ferramenta para melhor compreender os achados distintos associados aos tumores ALK + e levantar a suspeita clínica para este subtipo molecular, quando apropriado, por meio de um uso mais profundo de informações de imagem clínica associadas a covariáveis clínicas. Além de discriminar tumores ALK + de tumores não ALK, um biomarcador de imagem também pode identificar pacientes com resposta curta à terapia com inibidor de ALK (crizotinibe), auxiliando na determinação do estágio.

A angiotensina II formada pela enzima conversora de angiotensina (ACE) ativa os receptores AT1 e AT2, com a ativação do receptor AT1 aumentando a produção endotelial de espécies reativas de oxigênio por meio de adenina e dinucleotídeo fosfato

de nicotinamida (NADP), reduzindo os níveis de óxido nítrico localizado e causando endotélio disfunção. Além disso, a ativação do AT1 pode induzir fibrose tecidual em algumas situações e aumentar a pressão do tecido intersticial (PTI) nos órgãos afetados. Essa disfunção endotelial e o aumento da PTI podem limitar a entrega de nutrientes pelo sistema vascular<sup>(17-25)</sup>.

Bar et al., 2015, testaram a hipótese de que a alta atividade do SRAA indica um ambiente desfavorável para a angiogênese, juntamente com disfunção endotelial e aumento da ITP e, portanto, pode estar relacionada a um prognóstico favorável e / ou inibição da via de sinalização do endotélio vascular fator de crescimento, um alvo terapêutico promissor para células NSCLC, sendo um desses inibidores cediranib®. A ECA e a aldosterona foram escolhidas por serem relativamente estáveis em amostras de soro<sup>(26)</sup>. Os resultados do estudo apoiaram a hipótese de que uma maior atividade do SRAA está associada a um bom prognóstico, porém a alta atividade foi inversamente correlacionada com a eficácia antiangiogênica. Pacientes com níveis basais de ACE (menor ou igual a 115 ng / mL) se beneficiaram da combinação de cediranibe® + quimioterapia e níveis aumentados de aldosterona (acima de 250 pg / mL) durante o tratamento com cediranibe revelaram um prognóstico positivo e é possivelmente um bom marcador da eficiência do tratamento antiangiogênico. Os baixos níveis séricos de ECA (<115 ng / mL) foram preditivos de melhora na taxa de sobrevida geral após o tratamento com cediranibe®.

O papel dos níveis séricos de ECA e de aldosterona como biomarcadores preditivos e prognósticos para tratamentos antiangiogênicos precisa ser explorado em estudos futuros.

### **Células tumorais circulantes positivas para receptor de folato**

Receptores de folato (FRs) são glicoproteínas da superfície celular, altamente expressas em NSCLC (aproximadamente 72% a 83% sobre a FR expressa na superfície celular)<sup>(27,28)</sup>.

O grupo de pesquisa Chen et al., 2015 testou o desempenho positivo do receptor de folato em células tumorais circulantes, a fim de distinguir pacientes com NSCLC daqueles com doenças pulmonares benignas (pneumonia, tuberculose pulmonar, bronquiectasia ou pneumotórax), usando reação em cadeia da polimerase direcionada ao ligante (LT-PCR) técnica. Além disso, os rendimentos diagnósticos entre CTCs e outros marcadores tumorais (antígeno carcinoembrionário [CEA], enolase específica de neurônio [NSE] e Cyfra 21-1) em pacientes com NSCLC foram comparados<sup>(29)</sup>. Este estudo incluiu 756 participantes, dos quais 56 eram voluntários saudáveis, 227 tinham doença pulmonar

benigna e 473 com diagnóstico inicial de NSCLC. A especificidade e a sensibilidade do modelo de diagnóstico CTC em combinação com marcadores tumorais e apenas com marcadores tumorais (CEA em combinação com NSE e Cyfra 21-1) foram testadas usando análise de regressão logística binária para determinar se CTC pode melhorar a precisão do diagnóstico.

Com base na curva de característica do operador do receptor (ROC), o ponto de corte ideal para diferenciar pacientes com NSCLC e doença pulmonar benigna foi de 8,93 unidades, com uma sensibilidade de 74,4% e especificidade de 86,6%. Os pacientes com NSCLC apresentaram um valor de curva de 12,41 ± 9,02 unidades, um número significativamente maior do que pacientes com doença pulmonar benigna com 6,95 ± 5,45 unidades e pacientes saudáveis com 5,95 ± 4,57 unidades.

A técnica de LT-PCR utilizada neste estudo foi baseada na depleção de leucócitos negativa seguida de marcação com oligonucleotídeo ligado ao folato e quantificação com PCR quantitativo. O estudo demonstrou que os níveis de CTC em pacientes com NSCLC estão aumentados em comparação com pacientes com doenças pulmonares benignas e voluntários saudáveis.

A técnica de LT-PCR mostrou-se viável e confiável na detecção de CTCs folato-positivos em pacientes com NSCLC, os níveis de CTC podem ser usados como biomarcadores no diagnóstico de NSCLC, principalmente quando combinados com outros marcadores tumorais séricos. Mais estudos são necessários para investigar o valor prognóstico ou de “biópsia líquida” das CTCs quando detectadas pelo método LT-PCR em pacientes com NSCLC; no entanto, os resultados são promissores.

### **Timidilato Sintase (TYMS)**

A timidilato sintase (TYMS) é uma enzima dependente de folato que está envolvida na síntese de DNA, reparo de DNA e proliferação de células cancerosas<sup>(30,31)</sup>.

O pemetrexedo é um agente antineoplásico antifolato que inibe de forma seletiva e potente o TYMS, sendo este o principal alvo terapêutico da droga. A superexpressão de TYMS se correlaciona com a resistência e a diminuição da sensibilidade ao pemetrexedo em linhagens de células cancerígenas.

O grupo de pesquisa de Shimizu et al., 2016 avaliou como o número de cópias do gene TYMS prediz os resultados da terapia com pemetrexedo e como ele interfere na eficácia terapêutica da combinação de pemetrexedo com carboplatina em pacientes com NSCLC em um ensaio clínico aberto de fase II<sup>(32)</sup>.

Quarenta pacientes com NSCLC avançado (estágio IIIB ou

estágio IV), que nunca haviam feito quimioterapia, com idades entre 20 e 75 anos, foram avaliados quanto à expressão de TYMS (gene e proteína) em tecido canceroso. Os pacientes foram separados em dois grupos de acordo com o número de cópias do gene TYMS: o grupo TYMS amplificado e o grupo TYMS não amplificado. Avaliando as taxas de: resposta, controle da doença, sobrevida livre de progressão e sobrevida geral, o grupo TYMS não amplificado teve melhor desempenho do que o grupo com TYMS amplificado. Nenhum paciente no grupo TYMS amplificado obteve uma resposta completa ou parcial à terapia. A expressão da proteína TYMS não foi significativamente correlacionada com o número de cópias do gene TYMS.

Os resultados mostraram que o número de cópias do gene TYMS é um biomarcador preditivo melhor para a resposta à terapia com pemetrexedo do que a expressão da proteína TYMS. A amplificação do gene TYMS pode ser medida em tecido LC a baixo custo, utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que além de ser mais sensível e específica, é aparentemente mais adequada na prática clínica quando comparada ao mRNA e à proteína TYMS expressão<sup>(32)</sup>.

Em resumo, a análise do número de cópias do gene TYMS provou ser um método útil para a avaliação da expressão de TYMS em tecido LC e a amplificação do gene TYMS é um preditor de resultados na terapia com pemetrexedo.

### Expressão de PD-1 e PD-L1

O receptor-1 de morte celular programada (PD-1) é expresso na superfície das células T ativadas. PD-L1 e PD-L2 são ligantes para o receptor PD-1 e são comumente expressos na superfície de células dendríticas ou macrófagos.

Tanto o receptor quanto os ligantes pertencem à família das proteínas do ponto de controle imunológico e atuam como co-inibidores que podem inibir ou limitar a resposta das células T. O sistema PD-1 / PD-L1 garante que o sistema imunológico seja ativado apenas no momento certo, para minimizar as inflamações autoimunes crônicas<sup>(33,34)</sup>.

A expressão de PD-L1, medida por imuno-histoquímica, está relacionada à taxa de sobrevida livre de progressão após terapia com anticorpos monoclonais. Aproximadamente 10% dos pacientes cujas células não expressam PD-L1, detectado por imuno-histoquímica, têm uma resposta favorável à terapia PD- (L) 1. Esse fato pode ser explicado pela heterogeneidade da expressão de PD-L1 por tumores de pulmão de pequenas células<sup>(34)</sup>.

Controvérsias na expressão de PD-L1 em tumores, detectadas por imuno-histoquímica, questionam se este poderia ser um bom

biomarcador para terapias com anticorpos monoclonais.

Niemeijer et al., 2018, quantificou a expressão de PD-1 PD-L1 em pacientes com NSCLC, usando tomografia por emissão de pósitrons de corpo inteiro (PET Scan), uma técnica não invasiva, usando os radiotraçadores 18F-BMS-986192 e 89Zr-nivolumabe. O estudo demonstrou que o uso do PET Scan com os radiotraçadores 18F-BMS- 986192 e 89Zr-nivolumabe é viável e seguro na quantificação de PD-1 e PD-L1. Isso implica que esses marcadores podem ser usados para quantificar a expressão de PD- (L) 1 de forma não invasiva em estudos imunoterapêuticos futuros. Por se tratar de um estudo pequeno, conjuntos de dados maiores são necessários para validar esses resultados<sup>(34)</sup>.

### Expressão ERCC1

A proteína do grupo 1 de complementação cruzada do reparo por excisão (ERCC1) está envolvida na via de reparo por excisão de nucleotídeos e é necessária para reparar lesões de DNA. O gene codificante localizado no cromossomo 19q, é expresso em todos os tecidos em níveis relativamente elevados. O gene codificante, localizado no cromossomo 19q, é expresso em todos os tecidos em níveis relativamente elevados<sup>(35)</sup>.

Estudos demonstraram uma correlação entre os níveis de ERCC1 e os resultados da quimioterapia à base de platina em pacientes com NSCLC. Villalobos et al., 2018 conduziram um estudo para avaliar o impacto dos níveis de ERCC1 na sobrevida de pacientes com NSCLC não escamoso avançado (estágios IIB / IV) participantes do ensaio INNOVATIONS (estudo aberto, multicêntrico randomizado de fase II), que recebeu erlotinibe / bevacizumabe (EB) ou cisplatina / gencitabina / bevacizumabe (CGB) como tratamento. Um total de 72 pacientes foram avaliados, igualmente distribuídos em cada braço de tratamento (36 pacientes), a técnica de imuno-histoquímica foi usada para avaliar a expressão de ERCC1 e dois escores: H e H modificado foram calculados e relacionados à taxa de sobrevivência<sup>(36)</sup>.

A porcentagem de núcleos tumorais positivos foi calculada para cada amostra e uma pontuação proporcional foi atribuída (0 se 0%, 0,1 se 1-9%, 0,5 se 10-49% e 1,0 se 50% ou mais) esta proporção foi multiplicada pela intensidade de coloração do núcleo para obter um escore H semiquantitativo final, no escore H modificado o escore H foi adicionalmente calculado usando a fórmula usual:  $[1 \times (\% \text{ células } 1+) + 2 \times (\% \text{ células } 2+) + 3 \times (\% \text{ } 3+ \text{ células})]$ . Os valores médios de todos os escores H / H modificado foram escolhidos como os pontos de corte para a separação entre tumores ERCC1-positivos de tumores ERCC1-negativos<sup>(36)</sup>.

As análises realizadas mostraram maior sobrevida livre de



progressão em pacientes com ERCC1 negativo tratados com CGB (em ambos os escores), o que apóia a hipótese de que pacientes com baixos níveis de ERCC1 que têm um prognóstico ruim podem ser tratados com quimioterapia à base de cisplatina para obter melhores resultados. Em pacientes tratados com erlotinibe e bevacizumabe, um efeito positivo na sobrevida livre de progressão foi encontrado para tumores ERCC1 positivos com base no escore H, mas não no escore H modificado.

Os resultados inconsistentes entre os dois sistemas de pontuação, segundo os autores, reforçam a importância de um consenso internacional para exigir uma metodologia de avaliação homogênea.

## DISCUSSÃO

---

Nesta revisão foi possível notar que o mecanismo de carcinogênese pulmonar ainda não está totalmente elucidado, embora tenha sido amplamente estudado. Ainda existem inúmeras contradições.

Os biomarcadores podem ser classificados em várias categorias: diagnóstico, previsão de estágio, prognóstico e escolha / evolução terapêutica. Notadamente, há um grande nicho de estudos sobre o diagnóstico precoce do CPNPC, por outro lado, os estudos sobre avaliação e predição da resposta terapêutica têm crescido exponencialmente<sup>(10,13)</sup>.

CTCs são células promissoras para o diagnóstico de NSCLC, conhecidas por serem expressas no sangue de tumores sólidos. Eles têm um papel importante no desenvolvimento de metástases e melhorias nas técnicas de detecção de CTC, como o sistema Cell Search associado a NGS, têm mostrado grande potencial como “biópsia líquida”, especialmente em LC onde a acessibilidade ao tecido é frequentemente um desafio, e têm valor na avaliação da eficácia diagnóstica e terapêutica.

Biomarcadores auxiliares são necessários no diagnóstico por imagem, uma vez que há um alto índice de falsos positivos no processo de triagem por tomografia computadorizada, o que leva a múltiplas rodadas de triagem, exposição à radiação e aumento de tempo e custos. Portanto, o desenvolvimento de biomarcadores complementares não invasivos pode ser de grande utilidade para um melhor estadiamento do paciente. No caso do biomarcador radiogenômico do estado ALK, apresentado nesta revisão, também

há sua utilidade em discriminar a melhor escolha da terapia a ser empregada em cada caso (ALK + e não ALK)<sup>(16)</sup>.

A avaliação da expressão de ACE e aldosterona, timidilato sintase, PD-1 / PD-L1 e ERCC1 mostrou-se importante na análise da eficácia terapêutica e está em consonância com a estratégia terapêutica personalizada de combate ao NSCLC.

A abordagem inovadora para quantificar a expressão de SPRY4-IT1 em RNA não codificante longo desempenhou um papel relevante na compreensão da carcinogênese pulmonar e na análise do prognóstico, sendo, portanto, um alvo considerável para estudos futuros<sup>(13)</sup>.

## CONCLUSÃO

---

Atualmente, apenas 16% dos cânceres são diagnosticados em estágio inicial (câncer localizado), quando há maiores chances de tratamento. Melhorias no diagnóstico facilitam a detecção precoce da doença e direcionam para uma intervenção efetiva, sendo medidas necessárias para reduzir as taxas de mortalidade por CL.

Dentre os biomarcadores apresentados nesta revisão, os receptores de folato em células tumorais circulantes, acessados por meio do sangue periférico, foram eficientes na diferenciação entre doenças pulmonares benignas e NSCLC. Os demais biomarcadores aqui apresentados mostraram eficácia na avaliação da resposta terapêutica, auxiliando na predição prognóstica e direcionando para a melhor intervenção. A expressão de SPRY4-IT1 em RNA não codificante longo precisa ser mais estudada como um alvo terapêutico e como um preditor de prognóstico.

Apesar de alguns vieses presentes nos estudos, como número insuficiente de pacientes, conclusões por vezes controversas, conflito de interesses ou falta de randomização, eles representam o início de uma nova era e revelam um futuro promissor para o tratamento das CL, com cada vez mais personalizado e terapias precisas, que aumentam as chances de sobrevida livre de progressão. Ainda há um vasto universo a ser desvendado, sendo necessária a realização de novos estudos que confirmem os achados aqui descritos e explorem mais a carcinogênese pulmonar de células não pequenas.

**Conflito De Interesses:** Todos os autores renunciam a qualquer conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

---

1. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Câncer de pulmão. *Med Clin North Am.* 2019; 103(3): 463-73.
2. De Sa VK, Coelho JC, Capelozzi VL, et al. Câncer de pulmão no Brasil: Epidemiologia e Desafios do Tratamento. *Câncer de pulmão (Auckl).* 2016; 7: 141-8.
3. Araujo LH, Baldotto C, de Castro Jr G, et al. Câncer de pulmão no Brasil. *J Bras Pneumol.* 2018; 44(1): 55-64.
4. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 893: 1-19.
5. Collins LG, Haines C, Perkel R, et al. Câncer de pulmão: Diagnóstico e gerenciamento. *Am Fam Physician.* 2007; 75(1): 56-63.
6. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, et al. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, et al. Lung cancer: Biologia e opções de tratamento. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1856(2): 189-210.
7. Jurišić V, Obradovic J, Pavlović S, et al. Receptor do Fator de Crescimento da Epiderme em Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células: A Importância da Investigação do Polimorfismo Promotor. *Pathol Cellular Anal (Amst).* 2018: 6192187.
8. Hodoglugil U, Carrillo MW, Hebert JM, et al. PharmGKB resumo: informações farmacogênicas muito importantes para o receptor do fator de crescimento epidérmico. *Pharmacogenet Genomics.* 2013; 23(11): 636-42.
9. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and Prognostic significance of Circulating Tumor cells in patients with non-small-cell Lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(12): 1556-63.
10. Marchetti A, Grammasro MD, Felicioni L, et al. Avaliação das mutações EGFR em preparações de células tumorais circulantes de pacientes com NSCLC por sequenciamento de próxima geração: em direção a uma biópsia líquida em tempo real para tratamento. *PLoS Um.* 2014; 9(8): e103883.
11. Mekahli D, Bultynck G, De Smedt H, et al. Endoplasmic-reticulum Depleção de cálcio e doença. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(6): a004317.
12. Fatica A, Bozzoni I. RNAs longos não codificadores: novos atores na diferenciação e desenvolvimento celular. *Nat Rev Genet.* 2014; 15(1): 7-21.
13. Sun M, Liu XH, Lu KH, et al. EZH2-mediated epigenetic supressão de RNA SPRY4-IT1 longo não codificado promove a proliferação celular NSCLC e Metástase, afetando a transição epitelial-mesenchimal. *Dis. de morte celular.* 2014; 5: e1298.
14. Hallberg B, Palmer RH. Perspectiva mecanicista do receptor ALK tirosina quinase na biologia do câncer humano. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13(10): 685-700.
15. Hallberg B, Palmer RH. O papel do receptor ALK na biologia do Câncer. *Ann Oncol.* 2016; 27(3): iii4-iii15.
16. Yamamoto S, Korn RL, Oklu R, et al. Fenótipo molecular ALK no câncer de pulmão de células não pequenas: Caracterização radiogenômica da TC. *Radiol.* 2014; 272(2): 568-76.
17. Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, et al. Duplo efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina na angiogênese em camundongos diabéticos tipo 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(1): 65-70.
18. Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, et al. O bloqueio imediato do receptor mineralocorticóide melhora a cura do infarto do miocárdio através da modulação da resposta inflamatória. *Hipertensão arterial.* 2008; 51(4): 905-14.
19. Jain RK. Barreiras vasculares e intersticiais à administração de agentes terapêuticos em tumores. *Cancer Metastasis Rev.* 1990; 9(3): 253-66.
20. Prud'homme GJ. Patobiologia do fator de crescimento transformador beta em câncer, fibrose e doença imunológica, e considerações terapêuticas. *Laboratório Invest.* 2007; 87(11): 1077-91.
21. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, et al. A dimetilarginina assimétrica produz lesões vasculares em camundongos com óxido nítrico de síntese endotelial: envolvimento do sistema renina-angiotensina e estresse oxidativo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(9): 1682-8.
22. Van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JWW, et al. Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer: the Rotterdam Study. *Câncer.* 2008; 112(4): 748-57.
23. Veresh Z, Debreczeni B, Hamar J, et al. A dimetilarginina assimétrica reduz a dilatação de arteríolas mediada por óxido nítrico, ativando o sistema renina-angiotensina vascular e espécies reativas de oxigênio. *J Vasc Res.* 2012; 49(4): 363-72.
24. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Aumento da produção de superóxido mediado por NADH-oxidase nos estágios iniciais da aterosclerose: evidência do envolvimento do sistema renina-angiotensina. *Circ.* 1999; 99(15): 2027-33.
25. Williams JS, Williams GH. 50th Anniversary of Aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(6): 2364-72.
26. Bar J, Ding K, Zhao H, et al. Angiotensin-Converting Enzyme and Aldosterone Serum Levels as Prognostic and Predictive Biomarkers for Cediranib in NCIC Clinical Trials Group Study BR.24. *Lata Pulmonar Clin Lung.* 2015; 16(6): 189-201.
27. Christoph DC, Asuncion BR, Hassan B, et al. Significância da expressão da proteína receptor de folato alfa e timidilato sintase em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas tratados com pemetrexia. *J Thorac Oncol.* 2013; 8(1): 19-30.
28. O'Shannessy DJ, Yu G, Smale R, et al. Expressão do receptor de folato alfa no câncer de pulmão: Significância diagnóstica e prognóstica. *Oncotar.* 2012; 3(4): 414-25.

29. Chen X, Zhou F, Li X, et al. Receptor de Folato - Célula Tumoral Circulante Positiva Detectada pelo Método LT-PCR como um Biomarcador de Diagnóstico para Câncer de Pulmão de Não-Células Pequenas. *J Thorac Oncol.* 2015; 10(8): 1163-71.
30. Ferguson PJ, Collins O, Dean NM, et al. Antisense down-regulation of thymidylate synthase to suppress growth and enhance cytotoxicity of 5-FUdR, 5-FU e Tomudex in HeLa cells. *Br J Pharmacol.* 1999; 127(8): 1777-86.
31. Lin SB, Ts'o PO, Sun SK, et al. Inibição da atividade timidilato sintetase por oligodeoxinucleotídeo antisense e possível papel no tratamento sem timina. *Mol Pharmacol.* 2001; 60(3): 474-9.
32. Shimizu T, Nakagawa Y, Takahashi N, et al. A amplificação do gene timidilato sintase prevê a resistência pemetrexada em pacientes com câncer pulmonar avançado de células não pequenas. *Clin Transl Oncol.* 2016; 18(1): 107-12.
33. Barclay J, Creswell J, León J. Imunoterapia contra o câncer e a via do ponto de controle PD-1/PD-L1. *Arch Esp Urol.* 2018; 71(4): 393-9.
34. Niemeijer AN, Leung D, Huisman MC, et al. Tomografia por emissão de pósitrons PD-1 e PD-L1 em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 4664.
35. Núñez F, Chipchase MD, Clarke AR, et al. A deficiência do gene de reparação da excisão de nucleotídeos (ERCC1) causa a parada de G(2) nos hepatócitos e uma redução na binucleação hepática: o papel dos p53 e p21. *FASEB J.* 2000; 14(9): 1073-82.
36. Villalobos M, Czapiewski P, Reinmuth N, et al. ERCC1 Avaliação no tratamento inicial com e sem quimioterapia cisplatina na fase IIIB/IV, câncer de pulmão não-químico de células não pequenas. *Med Oncol.* 2018; 35(7): 106.

#### AUTOR CORRESPONDENTE

---

Fernando Luiz Affonso Fonseca  0000-0003-1223-1589  
profferfonseca@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.