

Ministério da Saúde



COORDENAÇÃO DE ENSINO

Programa de Residência Médica Anos Opcionais - Citopatologia

TATIANE TUNALA

**Citopatologia molecular no câncer pulmonar de não pequenas células:
aplicabilidade e perspectivas futuras.**

Rio de Janeiro

2018

TATIANE TUNALA

**Citopatologia molecular no câncer pulmonar de não pequenas células:
aplicabilidade e perspectivas futuras.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva como requisito parcial para a conclusão do Programa de Residência Médica Anos Opcionais – Citopatologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marilene Filgueira do Nascimento

Rio de Janeiro

2018

TATIANE TUNALA

**Citopatologia molecular no câncer pulmonar de não pequenas células:
aplicabilidade e perspectivas futuras.**

Avaliado e Aprovado por:

Professora. Dr^a. Marilene Filgueira do Nascimento

Ass. _____

Professora Dr^a. Luciana Carvalho Costa

Ass. _____

Professora Dr^a. Ana Lúcia Amaral Eisenberg

Ass. _____

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓDIA

Dedico esse trabalho a todos os meus familiares e amigos, aos colegas de residência do Instituto Nacional do Câncer, aos docentes vinculados ao serviço de Citopatologia, especialmente a Marilene Filgueira do Nascimento, a todos os funcionários da DIPAT, que foram essenciais para a manutenção do meu equilíbrio durante esse período.

AGRADECIMENTOS

“Desejo expressar a mais profunda gratidão e amor a Valmir Tunala e Maria Ângela da Silva Tunala, que me deram amor, a base e o suporte necessários para que eu chegasse até aqui, incentivando incansavelmente a minha busca por desenvolvimento intelectual e felicidade. Obrigada. Amo vocês profundamente.

Agradeço a Fabrício Tunala, Vítor Hugo Tunala e Valmir Tunala Júnior por serem os melhores; meus olhos quando não consigo enxergar, meu senso crítico e equilíbrio diante dos obstáculos e minha coragem quando temo avançar. Muito obrigada.

À minhas cunhadas Mari e Livia, gratidão por tanto amor ofertado. JV e PH são meu riso fácil, a alegria pura e genuína que brota nas horas mais simples da vida. Amo.

À Marilene Filgueira do Nascimento, gratidão eterna. Obrigada por resgatar meu fôlego de vida profissional. Por tanta generosidade, amor e interesse pelos seus. Por nos dar a chance de sermos melhores, por ter despertado em nós senso crítico, por acreditar em nossa capacidade e por mostrar que todos são capazes de colher frutos quando se esforçam. Obrigada por ser exemplo diário de profissionalismo, humanidade, humildade e amor.

Agradeço a Heitor Paiva, Maria Midori Piragibe e Norma Império, pela dedicação e ensinamentos preciosos durante a residência. Por contribuírem enormemente para o nosso crescimento profissional. Por serem exemplares, dedicados e por plantarem em nós a vontade de ir além.

Aos colegas de residência do Inca, que deixaram a caminhada muito mais leve e alegre. Agradeço pela acolhida e amizade. Amo vocês.

RESUMO

TUNALA, Tatiane. A avaliação de um tumor, atualmente, em anatomia patológica, não se restringe aos achados morfológicos e imunohistoquímicos peculiares, mas aos mecanismos moleculares que permeiam seu desenvolvimento. Conhecer profundamente a base e o funcionamento biológicos da doença é crucial para buscar formas de combatê-la. E na expectativa de desvendar a gênese tumoral, as duas últimas décadas viram emergir significativamente o número de informações a respeito da genética dos tumores, especialmente do câncer de pulmão, o tipo mais incidente no mundo. Isso transformou a maneira de abordar o paciente, possibilitando aumentar a sobrevida, bem como melhorar sua qualidade, através do desenvolvimento de terapias-alvo. Nesse cenário, ganham destaque a citopatologia e o uso de amostras citológicas para a realização do estudo molecular das mutações. O uso de métodos minimamente invasivos e o aprimoramento das técnicas de estudo molecular possibilita que a pesquisa seja feita de modo satisfatório em uma quantidade pequena de material.

Palavras-chave: câncer de pulmão; citologia pulmonar; terapias-alvo; citopatologia molecular.

ABSTRACT

TUNALA, Tatiane. The evaluation of a tumor, currently in pathological anatomy, is not restricted to the peculiar morphological and immunohistochemical findings, but to the molecular mechanisms that permeate its development. A deep understanding of the biological basis and functioning of the disease is crucial to finding ways to combat it. And in the expectation of unveiling the tumor genesis, the last two decades have seen a significant increase in the number of information about the genetics of tumors, especially lung cancer, the most common type in the world. This has transformed the way of approaching the patient, making it possible to increase survival, as well as improve its quality, through the development of target therapies. In this scenario, cytopathology and the use of cytological samples for the molecular study of the mutations are highlighted. The use of minimally invasive methods and the enhancement of molecular study techniques allows the research to be satisfactory way.

Key Words: lung cancer; lung cytology; targeted therapies; molecular cytopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos mais incidentes de câncer	14
Figura 2. Sequenciamento direto do DNA	22
Figura 3. Pesquisa de mutação pela FISH	24
Figura 4. Técnica de microdissecção	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas para 2018 do numero de casos novos de câncer	14
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALK – quinase do linfoma anaplásico

CAP- colégio americano de patologistas

DNA – ácido desoxirribonucleico

EGFR - receptor do fator de crescimento epidérmico

FISH- hibridização in situ por fluorescência

HER- receptor epidérmico humano

INCA- Instituto Nacional do Câncer

RNA – ácido ribonucleico

SUMÁRIO

• 1 INTRODUÇÃO	12
• 2 REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO	13
• 2.1 CÂNCER E CÂNCER DE PULMÃO	13
• 2.2 GENÉTICA DO CÂNCER DE PULMÃO.....	15
• 2.3 TERAPIAS-ALVO.....	17
• 2.4 CITOPATOLOGIA PULMONAR.....	18
• 2.5 CITOPATOLOGIA MOLECULAR.....	20
• 2.5.1 AMOSTRAS.....	21
• 2.6 TÉCNICAS DE ESTUDO MOLECULAR UTILIZANDO MATERIAL CITOLÓGICO.....	22
• 2.6.1 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA.....	22
• 2.6.2 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA.....	24
• 2.6.3 SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO.....	25
• 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
• 4 REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de uma neoplasia maligna em anatomia patológica é cada vez mais baseado na combinação do que é tradicional – morfologia e estudo imunohistoquímico, com a análise molecular. O desenvolvimento de terapias que visam especificamente proteínas aberrantes presentes em células tumorais, faz do estudo molecular uma ferramenta importante para a condução do tratamento dos pacientes com câncer. Hoje, as decisões terapêuticas são cada vez mais pautadas nas peculiaridades moleculares do tumor e um número crescente de alvos dentro do mesmo tumor são descobertos, elevando a chance de combatê-lo com efetividade.

A era molecular está estabelecida e se consolida inquestionavelmente. O número de estudos e o desenvolvimento de novas tecnologias cresce e, entre as diversas possibilidades disponíveis, a citopatologia molecular mostra seu potencial no cenário diagnóstico pelas inúmeras vantagens que tem, especialmente quando o assunto é câncer de pulmão. Esse lidera o ranking mundial do número de mortes relacionadas ao câncer, vitimando cerca de 1,6 milhões de pessoas, anualmente, sendo um problema de saúde pública. Possivelmente, essa seja a razão pela qual os investimentos em pesquisa nessa área sejam massivos e os avanços das últimas décadas sejam tão notórios³⁴.

Dentre as diversas linhas de pesquisa, o foco tem sido os receptores de superfície celular que são alvos terapêuticos potenciais. Sabe-se que mutações nos genes do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e da quinase do linfoma anaplásico (ALK) são as mais comuns em um grupo seletivo de pacientes com adenocarcinoma pulmonar – mulheres, jovens, não tabagistas e asiáticas^{22,34}, e a melhor compreensão dos mecanismos biológicos do desenvolvimento dessa doença propiciou o surgimento dos inibidores de tirosina-quinase e anticorpos monoclonais, primeira linha em termos de terapias-alvo, com impacto importante sobre o prognóstico e a qualidade da sobrevivência desses doentes.

O trabalho a seguir, trata-se de uma revisão bibliográfica a respeito do papel da citopatologia no diagnóstico do câncer de pulmão não-pequenas células, do estudo molecular utilizando amostras citológicas e da ascensão e do futuro da citopatologia molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO

2.1. CÂNCER E CÂNCER DE PULMÃO

As doenças e agravos não transmissíveis já são os principais responsáveis pelas mortes por doenças no mundo, com destaque para as cardiovasculares e o câncer. Segundo a última estimativa mundial, em 2012, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos, sendo o câncer de pulmão o tipo mais incidente, responsável por 1,8 milhões de casos novos e 1,6 milhões de óbitos (FERLAY et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015)^{29, 30, 31}.

No Brasil, segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA)³⁰, no biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Os de próstata, em homens, e mama, em mulheres, serão os tipos mais incidentes. Todavia, chama a atenção que o câncer de pulmão também tem relevância expressiva, sendo estimados 18.740 casos novos entre homens e 12.530 entre mulheres, para cada ano do biênio.

Apesar de todo o aparato diagnóstico e terapêutico existentes, a sobrevida média dos pacientes com câncer de pulmão, em cinco anos, gira em torno de 15% e mais de 70 % desses pacientes são diagnosticados em estadios III ou IV^{27,33}, com doença localmente avançada e/ou metástase, o que muitas vezes significa irressecabilidade tumoral e dificuldade na coleta de material para a realização do diagnóstico. Nesses casos, biópsias pequenas e amostras citológicas são a única alternativa para a investigação e conclusão diagnósticas, dando àquelas sumária relevância, para garantir elegibilidade do paciente ao tratamento clínico.

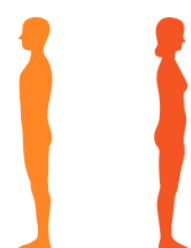
TABELA 1 :ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2018 DO NÚMERO DE CASOS NOVOS DE CÂNCER, SEGUNDO SEXO E LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA (INCA, 2018).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,81	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,88	51,29	19.920	80,88	68,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,48	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,88	21,05	12.530	11,81	9,22	8.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,88	20,08	5.680	25,84	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	8.240	14,55	10,95	7.750	7,82	5,96	2.210	8,92	5,84
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,88	12,08	8.500	8,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,81	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,80	0,92
Bexiga	6.690	6,48	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,68	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,78	1.450	6,46	7,04	2.550	2,88	1,67	540	1,85	1,88
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,48	1,14	550	2,19	1,98	1.050	0,96	0,92	400	1,88	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.870	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.840	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,68	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.870	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.520	2,82	2,69	800	3,84	3,81	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,82	48,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,89
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,82	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,38	-	17.020	76,80	-	80.410	75,84	-	17.230	69,80	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,32	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registre	324.330	314,33	-	-	-	-	310.800	292,74	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). / **Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 1 :DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES, ESTIMADOS PARA 2018 (INCA, 2018).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

2.2. GENÉTICA DO CÂNCER DE PULMÃO

Os adenocarcinomas de pulmão são caracterizados por mutações recorrentes no gene EGFR e rearranjos envolvendo o gene ALK, havendo predominância das mutações relacionadas ao EGFR. Essas são detectadas em 10 a 40 % dos tumores pulmonares e são mais características de um grupo seletivo de pacientes: mulheres jovens, não tabagistas e asiáticas³³. Alterações relacionadas ao ALK também dizem respeito, na maior parte das vezes, a pacientes jovens, sem história de tabagismo.

Os receptores de superfície celular desempenham papel fundamental no funcionamento celular e conseqüentemente tissular. Ao serem estimulados, esses receptores geram sinais que, por meio de transdução, disparam o gatilho de cascatas moleculares que ativam a transcrição gênica. O resultado desse processo é o controle de parâmetros como a proliferação e diferenciação celulares, angiogênese, capacidade de motilidade e adesão celulares, ciclo celular e, principalmente, diz respeito ao controle da morte celular e podem sofrer desregulação por uma série de processos patológicos.

Os receptores ligados à quinase são conhecidos como receptores do tipo III e respondem principalmente a mediadores proteicos. Tem um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um intracitoplasmático. Quando do contato entre o ligante e o receptor, ocorre por conseguinte fosforilação do domínio intracitoplasmático, que desencadeia cascatas de reações citoplasmáticas (vias de sinalização), que culmina em respostas celulares.

O EGFR é membro da família HER/*erbB*^{33,6} de receptores tirosina-quinase e teve sua estrutura descrita, pela primeira vez, em 1960, por Cohen. Essa família de receptores tem 4 proteínas com estruturas moleculares semelhantes (EGFR ou HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4)³³, sendo responsável por uma série de processos críticos da expressão gênica e da apoptose, o que justificaria a aquisição de características malignas nas células mutadas: resistência à morte celular, ao sistema imunológico, angiogênese, capacidade de proliferação e invasão de estruturas adjacentes, o potencial de metastatização, instabilidade gênica, aquisição de novas mutações, entre outras⁶.

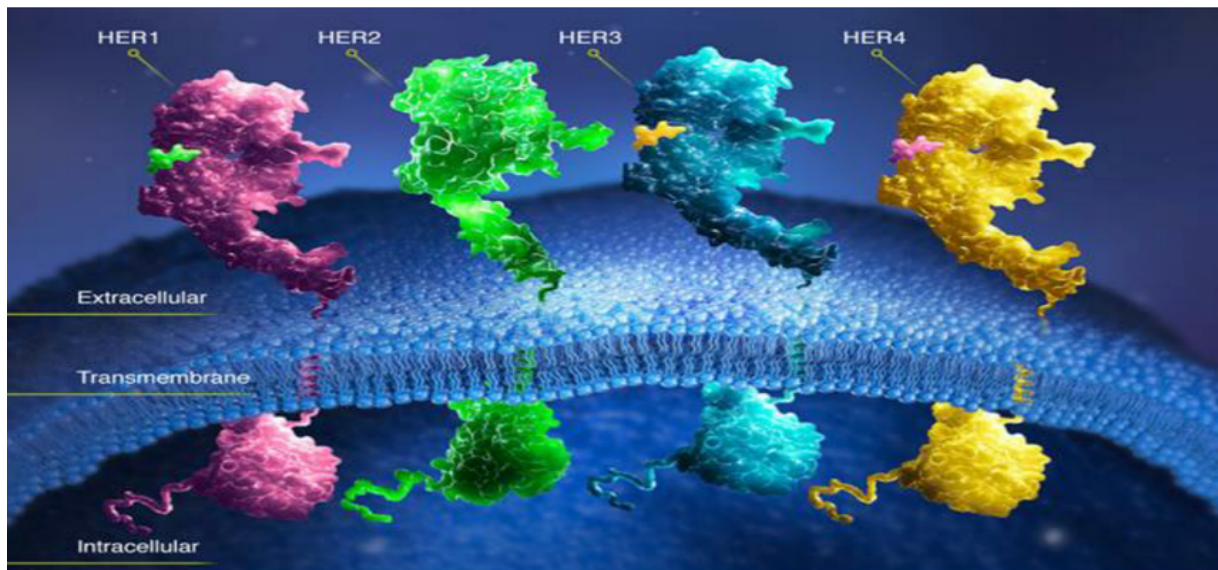


FIGURA 2: MEMBROS DA FAMÍLIA HER/ERBB DE RECEPTORES TIROSINA-QUINASE (SADEGHI ET AL, 2015).

O gene EGFR está localizado no braço curto do cromossomo 7 e as mutações ativadoras desse gene estão localizadas no domínio tirosina-quinase, que vai do exon 18 ao exon 21²⁷. Deleções no exon 19 e mutações no ponto L858R do exon 21 são os tipos mais frequentes de alterações genéticas, nesses casos. Mutações secundárias também podem ocorrer e geralmente estão relacionadas à resistência ao tratamento com inibidores tirosina-quinase, como é o caso da mutação T790M, no exon 20 do gene EGFR⁹.

Esses tipos de mutação (EGFR e ALK) não são detectados tipicamente em carcinomas de células escamosas do pulmão, os quais são caracterizados por alterações genômicas mais complexas com comprometimento dos seguintes genes: TP53, NFE2L2, KEAP1, BAI3, FBXW7, GRM8, MUC16, RUNX1T1, STK11, ERBB4, DDR2 e amplificação do FGFR1. Acredita-se que nesses casos, alterações na metilação do DNA estejam envolvidas na carcinogênese¹².

2.3. TERAPIAS-ALVO

O conhecimento e a compreensão dos mecanismos de funcionamento das vias de sinalização, principalmente do EGFR, propiciaram o desenvolvimento de fármacos de ação “dirigida” e os primeiros inibidores tirosina-quinase do EGFR foram sintetizados na década de 90. O gefitinibe foi o primeiro a obter autorização nos USA, pela *US Food and Drug Administration* (FDA), em 2003, para ser utilizado no tratamento de pacientes com falha terapêutica do esquema tradicional (quimioterapia baseada em cisplatina). No ano seguinte, o erlotinibe foi aprovado e, em 2014, o afatinibe também entrou no *hall* de opções terapêuticas para pacientes com câncer pulmonar não-pequenas células^{4,11}.

Os dois primeiros fármacos tem ação inibitória reversível do receptor EGFR, ao contrário do afatinibe, que possui ação inibitória irreversível. Todos impedem que haja a fosforilação do domínio C-terminal, impedindo a transdução dos sinais a jusante da via^{11,27}.

Atualmente, as diretrizes para o uso dessas opções terapêuticas dizem que o rastreio das mutações do EGFR, deve ser direcionado a pacientes com adenocarcinoma avançado, independente da história de tabagismo. Por enquanto, pacientes com diagnóstico precoce não são candidatos a esse tipo de tratamento, pois há outras estratégias terapêuticas específicas para eles.

2.4. CITOPATOLOGIA PULMONAR

A citopatologia é o ramo da anatomia patológica que trata do estudo das alterações celulares vinculadas a um processo patológico, tenha ele origem neoplásica ou não. O citopatologista é médico especialista em anatomia patológica, treinado a reconhecer a natureza das alterações morfológicas celulares e subclassificá-las, em uma amostra relativamente pequena. Geralmente, esse tipo de avaliação baseia-se primariamente nas características celulares; no entanto, o uso de técnicas que gerem blocos celulares, possibilita a esses profissionais analisar algo a respeito das características tissulares do processo patológico, uma ferramenta a mais para a realização do diagnóstico^{18, 20, 23}.

A relação entre a citopatologia e o diagnóstico do câncer de pulmão é antiga. Em 1858, Lionel Beale reconheceu e descreveu células tumorais pulmonares em esfregaços obtidos de escarro. Em 1935, Dudgeon e Wrigley desenvolveram um método de processamento do escarro também com o intuito de aplicá-lo à investigação tumoral pulmonar. Woolner e McDonald, em 1949, na Mayo Clinic, estudavam as aplicações da citologia para o diagnóstico das neoplasias pulmonares²³. Inicialmente, o que se buscava com a análise dessas amostras, era responder se havia ou não sinais de malignidade no material²³. Posteriormente, começou-se a classificar essas neoplasias em não-pequenas células e pequenas células.

Durante muito tempo, isso bastou para dar continuidade ao tratamento do doente. Todavia, com o advento das técnicas imunohistoquímicas e com o aumento das opções terapêuticas específicas, houve uma mudança nas exigências em relação à qualidade do material ofertado.

A análise morfológica associada ao estudo imunohistoquímico depende da quantidade de células tumorais existentes no material. Além disso, o uso de anticorpos é uma tecnologia relativamente dispendiosa e exige uso racional do recurso, principalmente se a técnica for custeada pelo sistema de saúde e oferecida gratuitamente à população.

Estudos utilizando amostras citológicas^{8,10}, bem como o aprimoramento das técnicas de coleta do material, a participação do citopatologista²⁵ na ocasião do exame e a cooperação da radiologia intervencionista mostraram que é plenamente

aplicável e extremamente eficiente o estudo diagnóstico das neoplasias pulmonares em material citológico.

Como já citado anteriormente, o diagnóstico de mais de 70% dos pacientes com neoplasias não-pequenas células de pulmão é feito tardiamente. Nesses casos, não há outra opção de material que não os citológicos. Isso basicamente porque os pacientes não reúnem condições clínicas para serem submetidos a procedimentos invasivos. Além disso, o risco de complicações como sangramentos e pneumotórax, nesses pacientes é considerável, o que inviabiliza a opção por esses procedimentos. Por ser um método minimamente invasivo, a coleta de material citológico é possível.

O uso do termo “material citológico” refere-se a uma variedade de materiais obtidos por técnicas diversas entre os quais estão: escarro, lavado, escovado e aspirado brônquicos, efusões pleurais, produto de punção aspirativa por agulha fina, citologia pulmonar em meio líquido, entre outros. O material pode ser avaliado a fresco, em esfregaços secos ao ar, esfregaços fixados, corados por diversos tipos de colorações (cada uma indicada para ressaltar alguma característica específica), pode produzir blocos celulares, que serão confeccionados em parafina, assim como os materiais histológicos^{18, 20, 25,33}.

2.5. CITOPATOLOGIA MOLECULAR

Construir o diagnóstico de uma neoplasia maligna requer a interação de diversas esferas do conhecimento acerca do paciente a ser abordado, da doença em questão, bem como de todo o arsenal tecnológico disponível, para que se faça possível.

A avaliação de um tumor, não mais se restringe aos achados morfológicos e imunohistoquímicos peculiares, mas aos mecanismos moleculares que permeiam seu desenvolvimento. E, nesse sentido, a medicina molecular passou de promessa a determinante para certos tipos de câncer, com o advento das terapias-alvo. No *hall* de técnicas e metodologias disponíveis, a citopatologia molecular contribuiu para revolucionar o diagnóstico de precisão de algumas neoplasias.

No ano de 2004, o termo “diagnóstico molecular citopatológico” foi veiculado muito provavelmente para chamar a atenção para a possibilidade de se explorar mais o estudo molecular em pequenas amostras. Apesar de existir um paradigma quanto à opção por um material histológico ou citológico, evidências mostraram que ambos podem ser utilizados com sucesso^{14,15,16}.

Os motivos que fazem da avaliação citopatológica molecular um campo promissor, no que tange ao refinamento diagnóstico, são: metodologia barata, rapidez na obtenção de amostras, possibilidade de checagem da qualidade e quantidade de material na ocasião da obtenção do mesmo, baixo risco de gerar complicações e o fato de ser um procedimento minimamente invasivo^{12,13,32,33}.

A qualidade da amostra é fator crítico para a obtenção de um resultado satisfatório no estudo molecular, fato que muitas vezes coloca em cheque a opção de se trabalhar com amostras pequenas. Todavia, a obtenção ótima desse material é plenamente viável, mediante treinamento, orientação, estabelecimento de protocolos e a participação de um profissional especializado (citopatologista) no ato da coleta, sempre que possível^{14,15,16}.

Estabelecer um diagnóstico inequívoco em material citológico, significa eliminar a necessidade do uso de procedimentos invasivos para o seguimento terapêutico do paciente²⁵. A citopatologia diagnóstica molecular vem ampliar o número de pacientes elegíveis e contribuir para tornar viável que essa investigação seja feita de forma rotineira¹².

2.5.1 AMOSTRAS

Os testes moleculares baseiam-se principalmente na análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) e mais recentemente na do ácido ribonucleico (RNA). Para que isso seja feito, a integridade de ambos deve estar preservada e sua extração deve ser feita com cuidado e de forma direcionada. Por esse motivo, os cuidados pré-analíticos são importantes.

Todos os tipos de espécimes citológicos podem ser utilizados para a análise de biomarcadores tumorais: esfregaços, lavados, escovados, efusões, blocos celulares, citologia de base líquida, enfim. A qualidade do material genético extraído dessas amostras é semelhante ao extraído de amostras histológicas emblocados em parafina. Há estudos inclusive que demonstram superioridade qualitativa do material citológico em relação ao histológico.

2.6. TÉCNICAS DE ESTUDO MOLECULAR UTILIZANDO MATERIAL CITOLÓGICO

2.6.1 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA

O sequenciamento direto do DNA é um método que se baseia na reação didesoxi, em que didesoxinucleotídeos interrompem a replicação do material genético, gerando segmentos de DNA de diversos tamanhos. Uma vez marcados com fluorocromos, os didesoxinucleotídeos revelam a sequência de bases nitrogenadas por meio da análise da sequência de bandas.

É um método bem estabelecido e tem vantagens principalmente quanto ao custo-benefício. Necessita que pelo menos 20% do material coletado seja composto por células neoplásicas bem selecionadas, a fim de que a mutação seja detectada e que o resultado tenha confiabilidade. Além disso, a expertise do profissional que analisará a amostra é de suma importância. O aprimoramento da técnica, obtido nos últimos anos, tem tornado possível que o estudo seja realizado em material cada vez menor, solidificando a viabilidade da utilização de amostras citológicas. Pode ser feito a fresco, fixado ou parafinado.

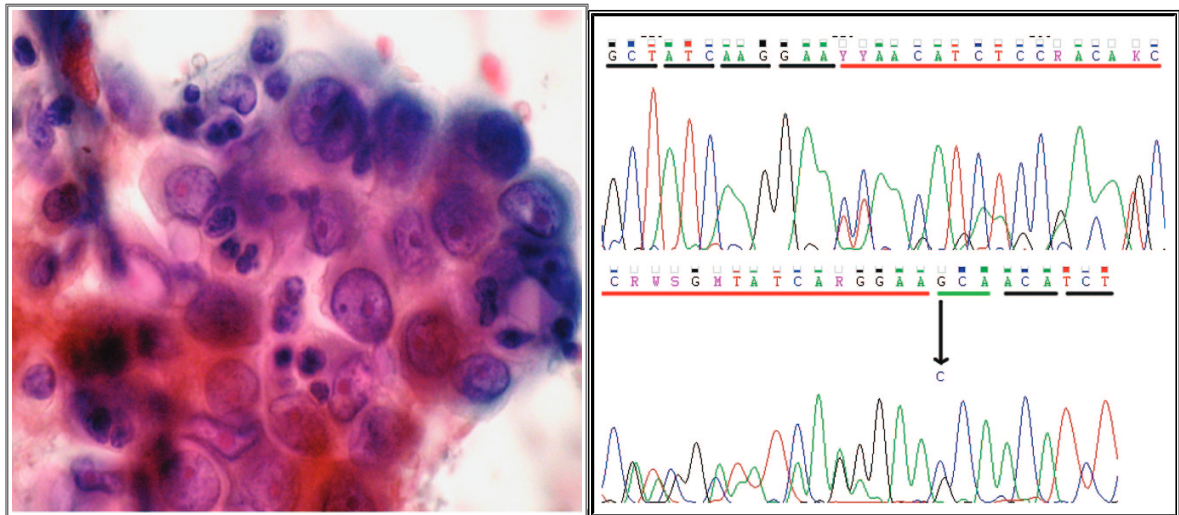


FIGURA 3: DIREITA: ADENOCARCINOMA DE PULMÃO; ESQUERDA: SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA, MOSTRANDO DELEÇÃO DO EXON 19. (LOZANO ET AL, 2011).

2.6.2 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA – FISH

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), representa um aprimoramento das técnicas de hibridização. Nessas, primeiramente, define-se o que será avaliado. Uma vez selecionado o alvo, pequenas sequências de fita simples de DNA marcadas são confeccionadas. A FISH diz respeito à confecção de sondas marcadas com fluorocromo e a leitura dos resultados requer um equipamento de microscopia contendo filtro específico para a fluorescência^{23,29,30}.

Parte-se do DNA, que é aquecido ou tratado com componente alcalino, sendo as fitas facilmente separadas. Desnaturadas, elas podem voltar à configuração de dupla-hélice, pela especificidade do pareamento, através do resfriamento ou do tratamento com componente ácido. Se, no momento da renaturação do DNA, houver oferta de sequências complementares previamente marcadas - probes, estas poderão ser incorporadas, ao invés da fita complementar original.

Posteriormente, o excesso de sondas é lavado e a lâmina preparada para a leitura e interpretação dos resultados, de acordo com as diretrizes do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana.

A versatilidade da FISH é tamanha, que quase todos os materiais obtidos são passíveis de análise, incluindo não fixados, fixados, parafinizados, corados e não corados ou até aqueles que já tenham sido utilizados para estudos anteriores, como imunocitoquímica^{29,30}. Todavia, esse método conta com algumas limitações como a necessidade de um microscópio adequado e o fato de possibilitar a análise mutacional apenas em poucos locus pré-definidos.

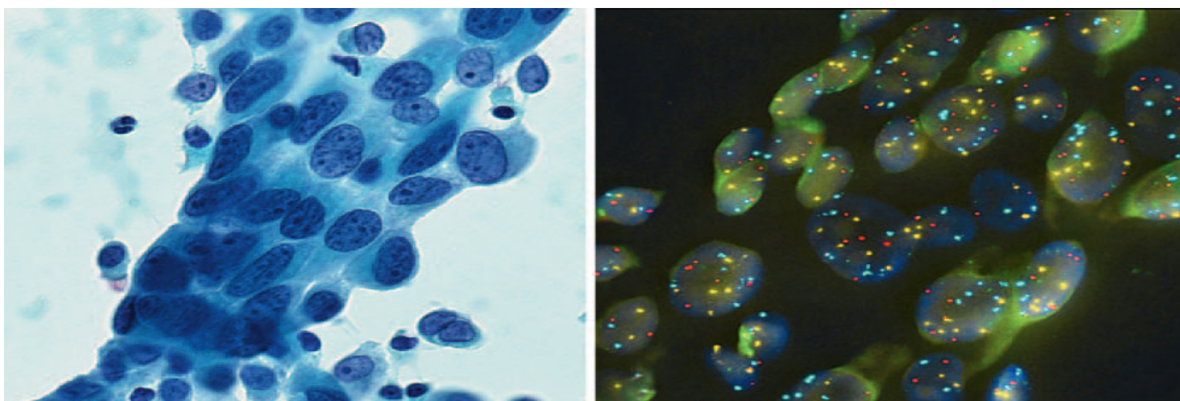


FIGURA 4: DIREITA: ADENOCARCINOMA; ESQUERDA: PESQUISA DE MUTAÇÕES UTILIZANDO A FISH (SAVIC, 2012).

Em 2010, o Colégio Americano de Patologistas (CAP) destacou a importância do uso de amostras citológicas para o diagnóstico das neoplasias pulmonares, frisando os dois métodos “padrão-ouro” de pesquisa do *status* do gene EGFR: PCR e FISH. Enfatizou, ainda, que a FISH tem sido utilizada com maior frequência para a análise do rearranjo do gene ALK.

O rearranjo do ALK está presente em cerca de 3 a 7% dos casos de câncer pulmonar de não pequenas células e é tipicamente encontrado em pacientes com adenocarcinoma positivo para TTF-1.

Com relação à utilização dessa técnica para a pesquisa das mutações relacionadas ao EGFR, a positividade é definida de acordo com os critérios de Colorado, que levam em conta principalmente a presença de polissomia ou a chamada amplificação, ambas relacionadas ao número de cópias do gene aberrante por núcleo, nas células neoplásicas.

Em grandes centros de pesquisa ou diagnóstico, o citopatologista avalia previamente todas as lâminas pertencentes ao caso, marca as áreas de maior concentração de células claramente neoplásicas, selecionando-as para a microdissecção (manual ou a laser). Essa etapa é de suma importância pois determinará a qualidade do material a ser testado. O material genético é então extraído e submetido à hibridização.

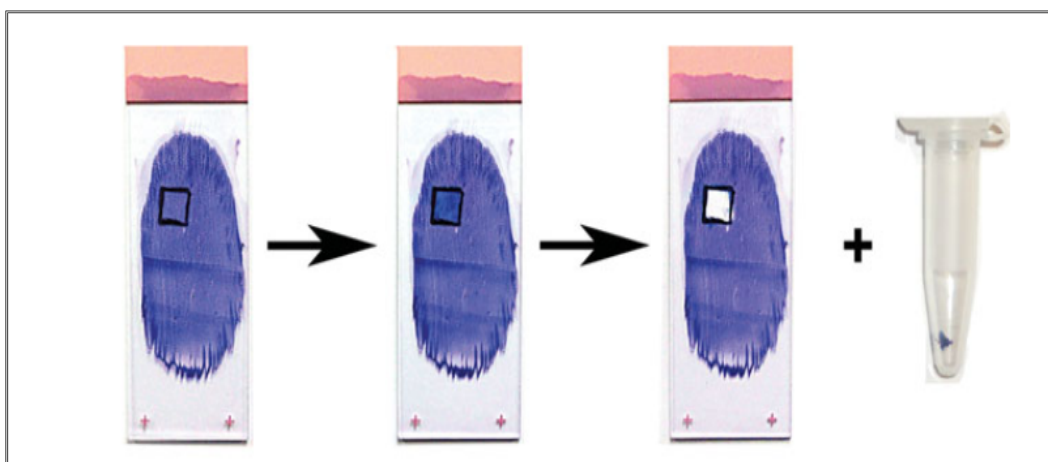


FIGURA 5: TÉCNICA DE MICRODISSECÇÃO APLICADA A ÁREAS PREVIAMENTE SELECIONADAS E MARCADAS PELO CITOPATOLOGISTA (KNOEPP, 2013).

2.6.3 SEQUENCIAMENTO PARALELO MASSIVO

O sequenciamento paralelo massivo, também conhecido como *Next-generation sequencing* (NGS), é uma tecnologia de alto rendimento que permite realizar o sequenciamento simultâneo de múltiplas regiões genômicas (codificadas e não codificadas)¹², em múltiplas amostras, com quantidades mínimas de DNA, ao contrário dos demais métodos. Além de DNA, aplica-se também à detecção de alterações em RNA^{1,2,33}.

Os resultados obtidos em amostras histológicas e citológicas são semelhantes, mais uma vez demonstrando a viabilidade do uso de amostras pequenas para o estudo molecular. Uma série de pesquisas mostra que esse tipo de sequenciamento tem excelente sensibilidade e especificidade^{1,2}, sendo perfeitamente aplicável inclusive a material genético livre em plasma ou outros líquidos.

Dentre os principais fatores limitantes dessa técnica estão o alto custo e a produção de grande quantidade de dados a serem armazenados, o que requer o uso de plataformas e *softwares* adequados (geralmente Windows ou Linux), isto é, equipamentos e servidores adequados, que também tem custo alto.

O aperfeiçoamento desse tipo de sequenciamento é tendência mundial. Representa o desejo de tornar rotineiro e acessível o estudo molecular para as neoplasias, principalmente as que já contam com terapias-alvo disponíveis. Além disso, o estudo de regiões diferentes do material genético, propiciará refinar ainda mais a personalização da terapia, o que talvez futuramente gere ainda mais impacto sobre o prognóstico da doença.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada à extrema relevância que o câncer de pulmão tem no cenário mundial, no que se refere ao número de casos novos e ao de mortes, buscar desenvolver tecnologias para seu diagnóstico e tratamento significa poupar milhares de vidas, anualmente.

Em consonância com os avanços expressivos alcançados nas últimas décadas, a citopatologia molecular pulmonar ganha força quando traz a possibilidade da realização de um diagnóstico completo em amostras pequenas, frutos de procedimentos minimamente invasivos.

A investigação de mutações gênicas através de métodos que utilizam cada vez menos material genético torna-se cada vez mais cotidiana, agora não somente para as neoplasias pulmonares, mas para quase todos os materiais de interesse.

A citopatologia molecular é um campo promissor e a tendência é que se faça presente cada vez mais frequentemente.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SERRATI, S.; DE SUMMA, S; PILATO, B.; et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. **Onco Targets Ther.** 2016; 9:7355-7365.
2. GONZALEZ-GARAY ML. The road from next-generation sequencing to personalized medicine. **Per Med.** 2014; 11(5): 523-544.
3. HIRSCH FR.; HERBST RS.; OLSEN C.; et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. **J Clin Oncol.** 2008;26:3351-3357.
4. SEQUIST LV.; BELL DW.; LYNCH TJ.; Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol.** 2007;25:587-595.
5. HAN SW.; KIM TY.; HWANG PG.; et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. **J Clin Oncol.** 2005;23:2493-2501.
6. HOLBRO T.; CIVENNI G., HYNES NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. **Exp Cell Res.** 2003;284:99-110.
7. MALAPELLE U.; MAYO DE-LAS-CASAS C.; ROCCO D.; et al. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. **Br J Cancer.** 2017;116(6):802–810.
8. BELEVICINE C.; MALAPELLE U.; VIGLIAR E.; LUCA C.; TRONCONE G. Epidermal growth factor receptor test performed on liquid-based cytology lung samples: experience of an academia referral center. Naples, **Acta Cytologica.** 2014, 58: 589-594.
9. AISNER D. L.; DESHPANDE C.; BALOCH Z.; et al. Evaluation of Egfr mutation status in cytology specimens: an institutional experience. **Diagnostic Cytopathology.** 2011, vol. 00. nº 00.
10. KANAGAL-SHAMANNA R.; PORTIER BP.; SINGH RR.; et al. Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. **Mod Pathol.** 2014;27(2):314–327.

11. LOZANO MD.; ZULUETA JJ.; ECHEVEST JI., et al. Assessment of epidermal growth factor receptor and K-ras mutation status in cytological stained smears of non-small cell lung cancer patients: correlation with clinical outcomes. **Oncologist**. 2011;16(6):877–885.
12. LOZANO MD.; ECHEVEST JI., ABENGOZAR M., et al. Cytology smears in the era of molecular biomarkers in non-small cell lung cancer. **Arch Pathol Lab Med**, Napoly, Italy, v. 142, p.291-298, 2018.
13. KNOEPP SM.; ROH MH.; Ancillary techniques on direct-smear aspirate slides: a significant evolution for cytopathology techniques. **Cancer Cytopathol**. 2013; 121(3):120–128.
14. SALTO-TELLES M. A case for integrated morphomolecular diagnostic pathologists. **Clin Chem**. 2007;53(7):1188–1190.
15. SALTO-TELLES M.; KOAY ES. Molecular diagnostic cytopathology: definitions, scope and clinical utility. **Cytopathology**. 2004;15(5):252–255.
16. SALTO-TELLES M. Diagnostic molecular cytopathology—a further decade of progress. **Cytopathology**. 2015;26(5):269–270.
17. SALTO-TELLES M. More than a decade of molecular diagnostic cytopathology leading diagnostic and therapeutic decision-making. **Arch Pathol Lab Med**, Napoly, Italy, v. 142, p.443-445, 2018.
18. BARAM, D.; GARCIA, R. B.; RICHMAN, P. S. Impact of rapid on-site evaluation during transbronchial needle aspiration. **Chest**, New York, v. 128, p. 869-875, 2005.
19. DOMAGALA-KULAWIK J.; GÓRNICKA B.; KRENKE R.; MICH S.; CHAZAN R. The value of cytological diagnosis of small cell lung carcinoma. **Pneumonol. Alergol. Pol**. 2010 78(3): 203-210.
20. CHANDRA, S.; CHANDRA, H.; SINDHWANI, G. Role of rapid on-site evaluation with cyto-histopathological correlation in diagnosis of lung cancer. **J Cytol**, Uttarakhand, v. 31, n. 4, p. 189-193, 2014.
21. ROSSI E. D.; GERARD R.; CIRNES L.; MACGADO J. C.; SCHMITT F. Detection of common and less frequent Egfr mutations in cytological samples of lung cancer. **Acta Cytologica**. 2014; 58: 275-280.
22. CRUZ, C. S. D.; TANOUE, L. T.; MATTHAY, R. A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology and Prevention. **Clin Chest Med**, New Haven, Dez, v. 32, n. 4, 2011.

23. DEMAY, Richard M. **The Art & Science of Cytopathology**. 2. ed. Chicago: American Society of Clinical Pathology, 2012. 2076 p.
24. IDOWU, M. O.; POWERS, C. N. Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics – a review. **Int J Clin Exp Pathol**, vol. 3, n. 4, p. 367-385, 2010.
25. NASCIMENTO, M. F. **Citopatologia intraoperatória: análise comparativa entre os achados citopatológicos e histopatológicos**. 2010. Tese (Doutorado em Patologia) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.
26. RUDIN, C. M.; AVILA-TANG, E.; SAMET, J. M. Lung cancer in never smokers: a call to action. **Clin Cancer Res**, vol. 15, n. 18, p. 5622–5625, 2009.
27. SANTOS, G. C.; SAIEG, M. A.; GEDDIE W.; LEIGHL N. EGFR Gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer cytopathology**, 119: 80-91, 2011.
28. SANTOS, G. C.; KO, H. M.; SAIEG, M. A. et al. The Petals and Thorns of ROSE (Rapid On-site Evaluation). **Cancer cytopathology**, vol. 121, n. 4, p. 4-8, 2012.
29. SAVIC S.; BUBENDORF L. Common fluorescence in situ hybridization applications in cytology. **Arch Pathol Lab Med**. 2016;140(12):1323–1330.
30. SAVIC S.; BUBENDORF L. Role fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. **Arch Pathol Lab Med**. 2012; 56:611-621.
31. SAVIC S.; TAPIA C.; GRILLI B. et. al. Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. **British Journal of Cancer**. 2008; 98: 154-160.
32. SEKHON, H. S.; SOUZA, C. A.; GOMES, M. M. Advances in Cytopathology for lung cancer: the impact and challenges of new technologies. **Thorac Surg Clin**, vol. 23, p. 163-178, 2013.

33. SMOUSE J. H.; CIBAS E. S.; JANNE P. A.; et al. Egfr mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer. **Cancer Cytopathology**, 2009; 117:67-72.
34. SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. Lung cancer in never smokers - a different disease. **Nat Rev Cancer**, vol. 7, n. 10, p. 778–790, 2007.
35. TRAVIS, W. D.; BRAMBILLA, E.; NICHOLSON, A. G. et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. **J Thorac Oncol**, vol. 10, p. 1243-1260,2015.
36. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.