

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE PD-L1 COM FATORES CLÍNICO-  
PATOLÓGICOS E PROGNÓSTICOS NO CARCINOMA PAPÍLIFERO DA  
TIREOIDE**

VITOR BARRETO SANTANA

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE PD-L1 COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS E PROGNÓSTICOS NO CARCINOMA PAPÍLIFERO DA TIREOIDE**

VITOR BARRETO SANTANA

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Silveira Graudenz

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

SANTANA, VITOR BARRETO  
AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE PD-L1 COM FATORES  
CLÍNICO-PATOLÓGICOS E PRÓGNÓSTICOS NO CARCINOMA  
PAPILIFERO DA TIREOIDE / VITOR BARRETO SANTANA. --  
2022.  
77 f.  
Orientadora: MÁRCIA SILVEIRA GRAUDENZ.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. PD-L1. 2. carcinoma papilífero da tireoide. 3.  
imuno-histoquímica. 4. variáveis clínico-patológicas.  
5. tireoidite linfocítica crônica. I. GRAUDENZ, MÁRCIA  
SILVEIRA, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Não se deixe vencer pelo mal, mas vença o mal com o bem” –  
Romanos, Capítulo 12, Versículo 21.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Aline e José Gival, pelo amor, educação e suporte irrestrito durante toda a minha jornada.

A minha namorada, Vitória, pelo amor, compreensão e ajuda na parte burocrática deste projeto.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Silveira Graudenz, por estar sempre presente mesmo antes do início formal do mestrado e pelos inúmeros ensinamentos que foram trazidos neste período.

Aos membros da banca examinadora que disponibilizaram seu tempo para poder participar.

Aos colegas de trabalho Pietro Cantu, Maria Cristina Abrahão, Rosicler Brackmann, Gisele Pandolfi, Gabriela Remonato, Luciana Adolfo, Ana Paula Biason pelo apoio operacional durante o meu projeto.

Aos demais profissionais do Hospital de Clínicas que proporcionaram uma estrutura fantástica que me permitiu desenvolver e concluir o meu mestrado.

## RESUMO

**Base teórica:** O câncer de tireoide é o tumor endócrino maligno mais comum e o carcinoma papilífero da tireoide (CPT) representa aproximadamente 90% de todos os cânceres de tireoide. Cerca de 20-30% dos pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide desenvolvem recorrência da doença, usualmente em linfonodos locorreionais, e 5-10% metástase à distância, o que pode requerer disseção cirúrgica cervical agressiva e radioterapia. O ligante 1 do programa de morte celular (PD-L1), o qual é expresso em uma variedade de tumores malignos, é intimamente relacionado com características clínico-patológicas e de prognóstico. Todavia, os dados sobre as características clínico-patológicas e o significado prognóstico da expressão de PD-L1 no câncer de tireoide são limitados e permanecem controversos.

**Objetivo:** O nosso estudo avaliou os níveis de expressão do PD-L1 e a associação com variáveis clínico-patológicas no carcinoma papilífero de tireoide (CPT).

**Métodos:** Neste estudo transversal, realizamos estudo imuno-histoquímico (IHQ) para o PD-L1 em amostra de tecido de 121 casos de CPT primário. As correlações entre as expressões de PD-L1 e variáveis clínico-patológicas foram analisadas.

**Resultados:** O PD-L1 foi expresso positivamente em 33.1% dos CPT, com intensidade fraca (1+) ou moderada (2+) e TPS < 50% em 36 casos. A expressão de PD-L1 não apresentou correlação significativa com nenhuma das variáveis clínico-patológicas. Após a análise da regressão logística multivariada, a tireoidite linfocítica crônica foi o único fator independente a prever a expressão de PD-L1 ( $p=0.028$ ). Existe também uma tendência da extensão extratireoidiana (ETE) influenciar a expressão de PD-L1 ( $p=0.053$ ).

**Conclusão:** Os nossos resultados indicam que a expressão de PD-L1 pode ser influenciada pela tireoidite linfocítica crônica e ETE, sugerindo a interação entre tumor e microambiente tumoral (resistência imune adaptativa) e potencial benefício clínico da terapia anti-PD-1/PD-L1.

**Palavras-chave:** PD-L1, carcinoma papilífero da tireoide, imuno-histoquímica, variáveis clínico-patológicas, tireoidite linfocítica crônica, extensão extratireoidiana, prognóstico.

## ABSTRACT

**Background:** Thyroid cancer is the most common malignant endocrine tumor, and papillary thyroid carcinoma (PTC) accounts for approximately 90% of thyroid cancers. About 20-30% of patients with differentiated thyroid carcinoma develop disease recurrence, usually in locoregional lymph nodes, and 5-10% distant metastases, which may require aggressive cervical surgical dissection and radiotherapy. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1), which is highly expressed in a variety of malignant tumors, is closely related to clinicopathological features and prognosis. However, the significance of PD-L1 expression in thyroid cancer is limited and remains controversial.

**Objectives:** Our study aimed to evaluate the expression levels of PD-L1 and the association with clinicopathological variables in papillary thyroid carcinoma (PTC).

**Methods:** In this cross-sectional study, we performed immunohistochemistry (IHC) for PD-L1 on whole-tissue sections of 121 primary PTC cases. The correlations between PD-L1 expression and clinicopathologic variables were analyzed.

**Results:** PD-L1 was positively expressed in 33.1% PTCs which showed weak (1+) or moderate (2+) intensity with TPS < 50% in 36 cases. PD-L1 expression was not significantly correlated with any of the clinicopathologic variables. After multivariate logistic regression analysis, chronic lymphocytic thyroiditis was the only independent factor to predict PD-L1 expression ( $p=0.028$ ). There is also a trend for extrathyroidal extension (ETE) to influence PD-L1 expression ( $p=0.053$ ).

**Conclusion:** Our results indicate that PD-L1 expression may be influenced by chronic lymphocytic thyroiditis and ETE, suggesting the interaction between tumor and tumor microenvironment (adaptive immune resistance) and potential clinical benefit to therapy anti-PD-1/PD-L1.

**Keywords:** PD-L1, Papillary thyroid carcinoma, immunohistochemistry, clinicopathological features, chronic lymphocytic thyroiditis, ETE, prognosis

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Patogênese molecular do carcinoma de tireoide

**Figura 2** – Estrutura das proteínas PD-L1 e PD-1

**Figura 3** – Várias vias de regulação da expressão de PD-1/ PD-L1

**Figura 4** – *Checkpoint* imune presente nas superfícies das células T, da célula apresentadora de antígeno e da célula tumoral

**Figura 5** – Testes validados em *trials*, com suas plataformas “*companion*”, seus métodos de escore e agentes farmacêuticos

**Figura 6** - Cálculo do TPS e CPS

**Figura 7** – Marco conceitual da avaliação do PD-L1 no carcinoma papilífero da tireoide



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Estratégia para localizar e selecionar referências bibliográficas para fundamentar este estudo.

**Tabela 2 -** Visão geral dos estudos analisando o “status” da expressão de PD-L1 e associação com fatores clínico-patológicos nos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATA	Associação Americana de Tireoide
AUS/FLUS	Atipia/Lesão Folicular de Significado indeterminado
BSRTC	<i>The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology</i>
CAT	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
CCECP	Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CCR	Carcinoma de Células Renais
CDT	Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CFT	Carcinoma Folicular da Tireoide
CI	<i>Checkpoint</i> Imune
CMT	Carga Mutacional Tumoral
CMTN	Carcinoma Mamário Triplo Negativo
CNPC	Carcinoma não Pequenas Células do Pulmão
CPDT	Carcinoma Pouco Diferenciado da Tireoide
CPS	<i>Combined Positive Score</i>
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
CRC	Carcinoma Colorretal
CT	Câncer de Tireoide
CTLA-4	Proteína 4 do Linfócito Citotóxico (CTLA-4)
EI	Escore de Imunorreatividade
EET	Extensão Extratireoidiana
EUA	Estados Unidos da América

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN/SFN	Neoplasia folicular ou Suspeito para Neoplasia Folicular
ICI	Inibidores de <i>Checkpoint</i> Imune
ICS	<i>Immune Cell Score</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IHQ	Imuno-Histoquímica
IRA	Iodo Radioativo
LITs	Linfócitos Infiltrantes Tumorais
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mCPT	Microcarcinoma Papilífero da Tireoide
MT	Microambiente Tumoral
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PD-1	Receptor de morte celular 1
PD-L1	Ligante 1 do programa de morte celular
PD-L2	Ligante 2 do programa de morte celular
qRT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLR	Sobrevida Livre de Recorrência
TERT	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TH	Tireoidite de Hashimoto
TI-RADS	<i>Thyroid Imaging Reporting and Data System</i>

TLC	Tireoidite Linfocítica Crônica
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
TNM	Tumor (T), Linfonodo (N) e Metástase (M)
TPS	<i>Tumour Proportion score</i>
Tregs	Células T regulatórias
TT	Tireoidectomia Total
US	Ultrassonografia
WTS	<i>Whole-Tissue Section</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Estratégia para localizar e selecionar as informações</b> .....	16
<b>2.2 Introdução e epidemiologia do câncer de tireoide:</b> .....	17
<b>2.3 Diagnóstico</b> .....	17
<b>2.4 Alterações moleculares</b> .....	19
<b>2.5 Terapia</b> .....	20
<b>2.6 Estadiamento</b> .....	21
<b>2.7 Prognóstico</b> .....	22
<b>2.8 Visão introdutória da imunoterapia</b> .....	23
<b>2.9 Estrutura molecular e expressão do PD-1 e PD-L1</b> .....	23
<b>2.10 Interação PD-1/PD-L1 e as bases da imunoterapia</b> .....	25
<b>2.11 Terapia com inibidores da via PD-1/PD-L1 no câncer</b> .....	29
<b>2.12 Imunoterapia no carcinoma de tireoide</b> .....	32
<b>2.13 Imuno-histoquímica do PD-L1</b> .....	32
<b>2.14 Interpretação do PD-L1 na imuno-histoquímica</b> .....	34
<b>2.16 Estudo brasileiro de PD-L1 no CPT em 2013</b> .....	41
<b>3. MARCO CONCEITUAL</b> .....	45
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	46
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	47
5.1 Objetivo primário .....	47
5.2 Objetivos Secundário: .....	47
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>7. ARTIGO</b> .....	56
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	58
<b>10. ANEXO E/OU APÊNDICES</b> .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide (CT) é o tumor maligno endócrino mais comum compondo aproximadamente 1% de todas as malignidades humanas <sup>1</sup>. A incidência do CT tem aumentado em diferentes partes do mundo <sup>2</sup>. O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é responsável por aproximadamente 90% dos cânceres de tireoide. Embora o prognóstico do CT seja geralmente bom (taxa de sobrevivência global de 5 anos de 98%) <sup>3</sup>, aproximadamente 10% dos pacientes com câncer diferenciado de tireoide (CDT) desenvolvem doença primária progressiva invasiva, 5% desenvolvem metástase à distância e 20-30% apresentam recorrência da doença <sup>4</sup>. Os tratamentos de rotina para o CT incluem terapia de supressão hormonal, cirurgia e terapia de iodo radioativo (IRA). A taxa de sobrevida de 10 anos com IRA é de aproximadamente 19% <sup>5</sup>, com a quimioterapia e a radioterapia externa sendo apenas paliativo para o tratamento dos cânceres de tireoide avançados <sup>6</sup>. Portanto, a descoberta de novos biomarcadores moleculares que podem prever prognóstico e comportamento agressivo é essencial para aumentar a sobrevida de pacientes com doenças progressivas, recorrentes e refratárias à IRA e se tornaram um grande tema na pesquisa clínica.

Nesse momento, um dos potenciais alvos que tem estado sob escrutínio é o ligante 1 do programa de morte celular (PD-L1) <sup>7 8</sup>. O PD-L1 tem sido usado como um marcador prognóstico no melanoma, no carcinoma não pequenas células do pulmão (CNPC), carcinoma mamário e outros cânceres <sup>9</sup>. O PD-L1 (B7H1;CD274) é uma molécula reguladora imune que é expressa constitutivamente nas células dendríticas, células T, células B, macrófagos, mastócitos além de uma variedade de células tumorais; sendo ainda regulado positivamente após estimulação específica das células por citocinas incluindo interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) <sup>10</sup>. O receptor de morte celular 1 (PD-1;CD279), o receptor do PD-L1, é uma glicoproteína de superfície celular normalmente expressa na superfície dos macrófagos, células dendríticas, células T incluindo células T CD8+, CD4+ e células T regulatórias (Tregs), células B, células *natural killer* (NK), células apresentadoras de antígeno e é uma molécula imunossupressiva <sup>11</sup>. A ligação do PD-L1 expresso nas células tumorais com o PD-1 diminui a resposta das células T ativadas por inibir a proliferação de células T, a produção de citocinas e a atividade citolítica, com isso levando a inativação funcional e “exaustão” das células T <sup>12</sup>. Isto gera escape imune tumoral, promoção da proliferação e desenvolvimento das células tumorais <sup>13</sup>. A inibição da interação entre PD-1/PD-L1 usando anticorpos específicos resulta na restauração da imunidade antitumoral do hospedeiro e forma

a base moderna da imunoterapia convencional no tratamento do câncer <sup>14</sup>. O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso de anticorpos monoclonais anti-PD-1/PD-L1 para o tratamento do melanoma, CNPC, carcinoma urotelial e outros cânceres <sup>9</sup>. Um recente *trial* (KEYNOTE-028, fase 1b) avaliou o pembrolizumab em monoterapia em 22 CPTs e carcinomas foliculares de tireoide (CFT) e reportaram uma resposta parcial (taxa de resposta global=9%) em dois pacientes <sup>15</sup>.

Existem alguns estudos investigando a expressão de PD-L1 no CT com dados conflitantes. Além disso, a frequência de positividade do PD-L1 variou em diferentes estudos de 6.1% a 82.5% dos pacientes com CPT <sup>16 17 18 19 4 20 21 22 23 24</sup>. Múltiplos fatores podem contribuir para esta marcada variabilidade, incluindo o desenho do trial clínico, diferenças nas plataformas de imuno-histoquímica (IHQ) do PD-L1, anticorpos primários monoclonais, interpretação e sistemas de escore incluindo o sítio de expressão do PD-L1 (membrana versus citoplasma), tipos de células (somente células tumorais versus células tumorais e linfócitos) e *cut-offs* que definem um resultado positivo (intensidade e extensão) <sup>23 24</sup>. Embora somente a marcação de membrana do PD-L1 seja considerado positivo, o valor otimizado do *cut-off* da marcação de PD-L1 não foi definitivamente validado <sup>17</sup> e isto pode ser responsável pelos resultados inconsistentes que foram reportados. O valor prognóstico do PD-L1 tem sido explorado na tireoide. Aghajani et al. <sup>22</sup> sugeriram que a expressão de PD-L1 pode ser usada para identificar pacientes com CPT mais agressivo e Chowdhury et al. <sup>4</sup> observaram a associação de PD-L1 com recorrência e encurtamento da sobrevida livre de doença (SLD). Por outro lado, Fadia et al. <sup>23</sup> não relataram associação entre marcação de membrana do PD-L1 e fatores prognósticos adversos. Contudo, um grau de incerteza permanece. Finalmente, o objetivo deste estudo é analisar a prevalência e os níveis de expressão do PD-L1 nos espécimes de CPT e a associação com fatores clínico-patológicos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégia para localizar e selecionar as informações

Sites consultados, estratégia de busca e número de artigos selecionados para sustentar a questão da pesquisa. A revisão da literatura foi concentrada nos trabalhos em língua inglesa que contivessem informações sobre o tema abordado. Utilizou-se o *Pubmed* como principal base de dados, com os resultados a seguir. Inicialmente, foram selecionados individualmente artigos com os termos escolhidos. A partir disso, houve também a seleção de artigos referências dos artigos gerados na minha busca, por serem relevantes e de capital importância para a revisão. Para a pesquisa, foram utilizados 112 artigos.

**Tabela 1.** Estratégia para localizar e selecionar referências bibliográficas para fundamentar este estudo.

<b>TERMO PESQUISADO</b>	<b>PUBMED</b>
Papillary Thyroid Carcinoma	21.817
Programmed Death-Ligand-1	4.989
Immunohistochemistry	225.001
(Programmed Death Ligand-1) and (Papillary Thyroid Carcinoma)	18
(Pd-11) and (Papillary Thyroid Carcinoma)	29
(Pd-11) and (Thyroid Cancer)	147
(Programmed Death Ligand-1) and (Thyroid Cancer)	86
(Programmed Death Ligand-1) and (Immunohistochemistry)	1344
(Immunohistochemistry) and (Thyroid Cancer)	2625
(Programmed Death Ligand-1) and (Thyroid Carcinoma) and (Immunohistochemistry)	23
(Pd-11) and (Prognostic Factors) and (Thyroid Cancer)	44



## 2.2 Introdução e epidemiologia do câncer de tireoide:

O câncer de tireoide (CT) é o tumor endócrino maligno mais comum <sup>25</sup>, ocorrendo mais comumente nas mulheres e é o quinto câncer mais comum na população feminina nos Estados Unidos (EUA) <sup>26</sup>. Uma revisão recente relatou uma incidência geral de todos os tipos de câncer de tireoide nos EUA de 7,7 por 100.000 pessoas/ano, com taxas de 11,3 por 100.000 mulheres/ano e 4,1 por 100.000 homens/ano. A incidência de carcinoma papilar de tireoide (CPT) é de 5,7 por 100.000 pessoas/ano, com taxas de 8,8 por 100.000 mulheres/ano e 2,7 por 100.000 homens/ano <sup>27</sup>. O CPT é responsável por cerca de 79% dos casos, seguido pelo carcinoma folicular com 13% dos casos, o carcinoma medular com 13% e o carcinoma anaplásico com 2% dos casos <sup>28</sup>. Uma escalada na incidência foi observada durante as duas últimas décadas ao redor do mundo <sup>29</sup>. Esse aumento é atribuído ao aumento da detecção do microcarcinoma papífero da tireoide (mCPT) como resultado do aumento da acurácia diagnóstica da ultrassonografia de pescoço (US) e da punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Contudo, mais recentemente, um aumento na incidência para todos os tamanhos dos tumores tireoidianos foi reportado nos EUA, sendo observado um aumento substancial para tumores > 4 cm entre homens e mulheres <sup>30</sup>. Os fatores de risco estabelecidos para o câncer de tireoide incluem exposição à radiação, história familiar de CT, tireoidite linfocítica crônica (TLC), ingestão reduzida de iodo e sexo feminino <sup>31 32</sup>. Apesar do aumento da incidência, a mortalidade do câncer de tireoide tem mostrado uma tendência de queda nas últimas três décadas. É incerto se o declínio da mortalidade é devido a um melhor diagnóstico, em vez de uma melhora no tratamento da neoplasia de tireoide. A taxa de morte ajustada para a idade é de 0,5/100.000 em homens e mulheres por ano, aumentando de 0,1% abaixo da idade para 20-30% na sétima e oitavas décadas <sup>33</sup>.

## 2.3 Diagnóstico

Nódulos de tireoide são muito comuns (4%-50% dependendo dos procedimentos diagnósticos e da idade do paciente) <sup>34</sup>, enquanto o câncer de tireoide é raro (cerca de 5% de todos os nódulos de tireoide). Portanto, a exclusão de malignidade por meio do US e PAAF é o principal objetivo no manejo clínico <sup>35 36</sup>. O US de tireoide é a técnica amplamente disseminada e usada como procedimento diagnóstico de primeira linha para detecção e

caracterização do nódulo da tireoide. Características ultrassonográficas associadas com malignidade são: hipocogenicidade, microcalcificações, ausência de halo periférico, bordas irregulares, aspecto sólido, fluxo sanguíneo intranodular e formato (mais alto que largo) <sup>2 37</sup>. Os parâmetros do US são incluídos no *Thyroid Imaging Reporting and Data System* (TI-RADS) score, que auxilia em uma maior acurácia na detecção de nódulos suspeitos a serem avaliados pela PAAF <sup>38</sup>. A PAAF representa o padrão ouro no diagnóstico dos nódulos de tireoide por causa da sua acurácia, reprodutibilidade e custo-benefício <sup>39</sup>. O diagnóstico da PAAF para os tumores de tireoide apresenta uma sensibilidade variando entre 65% e 98%, especificidade de 72-100% e acurácia entre 84-95% <sup>35 40 41</sup>. A PAAF é uma técnica importante que é usada adjunto ao US para o diagnóstico dos nódulos de tireoide. A PAAF é fortemente recomendada em nódulos  $\geq 1$  cm com padrão US altamente suspeito, nódulos  $\geq 1$  cm com suspeição intermediária e nódulos  $\geq 1,5$  cm com baixa suspeição. Além disso, a PAAF pode ser considerada nos nódulos  $\geq 2,0$  cm com muita baixa suspeição; porém, observação sem a realização da PAAF é também uma opção razoável <sup>35</sup>.

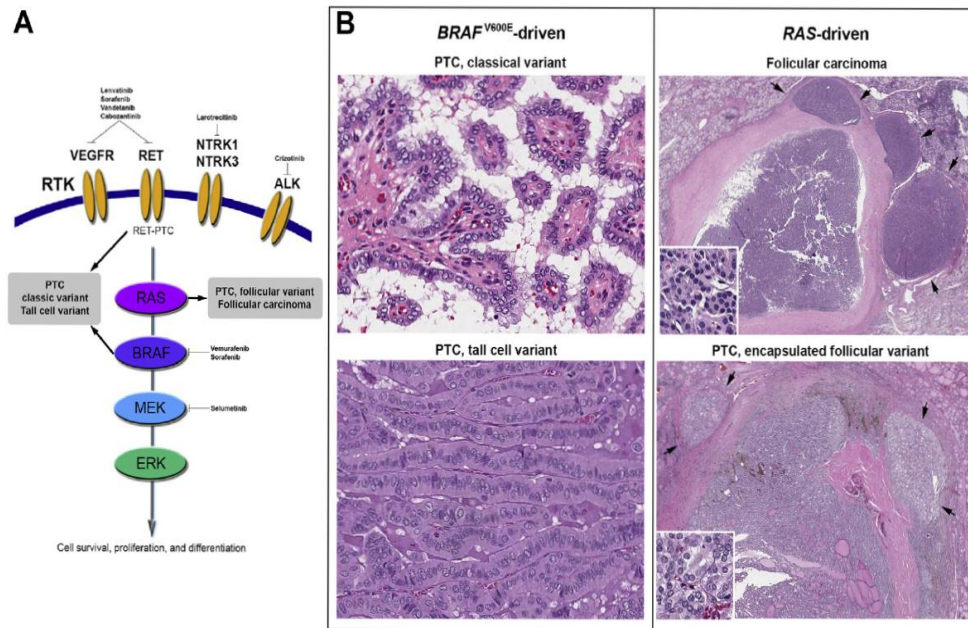
The *Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* (BSRTC) classifica os achados da PAAF em seis categorias diagnósticas com os seus respectivos riscos de malignidade em: (1) não diagnóstica; (2) benigno; (3) atipia/lesão folicular de significado indeterminado (AUS/FLUS); (4) neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular (FN/SFN); (5) suspeito para malignidade; (6) maligno <sup>42</sup>. Os achados da PAAF orientam o time clínico para o manejo dos pacientes de acordo com sua estratificação de risco <sup>42</sup>. Todavia, AUS/FLUS e FN/SFN representam uma zona “cinzenta” nos quais a citologia não consegue discriminar de forma acurada lesões benignas de malignas, apesar de exibirem risco de malignidade entre 5-15% e 15-35%, respectivamente. Por consequência, um considerável número de pacientes é submetido a procedimentos cirúrgicos desnecessários <sup>35 43</sup>.

Nesse contexto, um grande avanço na compreensão da nova patogênese molecular da progressão do câncer da tireoide tem levado à geração de novos testes moleculares capazes de aumentar a acurácia diagnóstica da PAAF e suportar decisões terapêuticas <sup>38</sup>. Em particular, dois testes moleculares para avaliar amostras de PAAF tem entrado na prática clínica para o manejo de nódulos tireoidianos <sup>44 45</sup>. Portanto, a avaliação e manejo de nódulos tireoidianos com citologia indeterminada (AUS/FLUS e FN/SFN) deve conter, além da citologia, informações clínicas (por exemplo: história pessoal ou familiar de câncer de tireoide, tamanho da lesão, características ultrassonográficas, e elastografia) e possivelmente informação molecular <sup>38</sup>.

## 2.4 Alterações moleculares

A década passada testemunhou um significativo progresso no conhecimento da patogênese molecular do carcinoma de tireoide, baseado nos estudos usando plataformas de sequenciamento de última geração (NGS) <sup>46</sup>. A ativação constitutiva da via de sinalização da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) desempenha um papel central na carcinogênese do carcinoma de tireoide. As proteínas essenciais nesta via são receptores tirosino-quinase (RTKs; incluindo receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), RET, quinase de linfoma anaplásico (ALK), receptor neutrófico tirosina-quinase (NTRK), RAS, *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF), proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A molécula RAS é uma pequena proteína G que é recrutada na ligação dos fatores de crescimento ao receptor RTK e ele, por sua vez, ativa à jusante a via serina/treonina quinase do BRAF. Em última análise, esta cascata de eventos leva a uma alteração da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência, resultando em várias formas de câncer de tireoide <sup>46</sup>.

O panorama genético do PTC é muito heterogêneo, apresentando mutações mutuamente exclusivas envolvendo a via MAPK <sup>47</sup>. Baseado nas variantes somáticas causadoras de doença, o PTC pode ser classificado como *BRAF V600E-like PTCs* e *RAS-like PTCs* <sup>47</sup>. O grupo *BRAF V600E-like* é caracterizado por robusta ativação da via de ativação MAPK, menos diferenciação, atenuada resposta à terapia de iodo radioativo (RAI) e é prevalente nas variantes clássica e de células altas. Por outro lado, o grupo *RAS-like* mostra ativação das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT, é altamente diferenciado e contém principalmente a variante folicular do PTC <sup>47</sup>. Outras alterações menos comuns incluem o rearranjo RET-PTC em 6% dos casos, fusão do NTRK3 em 1,5% dos casos, fusão do NTRK1 em 1,3% e fusão do ALK em 0,8% <sup>46</sup>. A presença de alterações moleculares únicas pode levar a decisões relacionadas à terapia alvo para o carcinoma de tireoide avançado ou metastático <sup>48 35</sup>. Recentemente, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomendou testagem molecular nos pacientes com carcinoma de tireoide avançado para identificar alvos ativos e selecionar pacientes elegíveis para ensaios clínicos <sup>48</sup>. A figura 1 ilustra a patogênese do carcinoma da tireoide.



**Figura 1.** Patogênese molecular do carcinoma de tireoide. (A) Ativação constitutiva da via MAPK através de mutações ou fusões dos seus componentes chaves, incluindo RTK (exemplo: RET, NTRK1, NTRK3 e ALK), RAS, e BRAF, tem um papel central na tumorigênese do carcinoma de tireoide. (B) Existe uma forte correlação entre o genótipo e o fenótipo, no qual as variantes clássica e de células altas do PTC apresentam mutação *hotspot* do BRAFV600E, enquanto os carcinomas de padrão folicular (carcinoma folicular e a variante folicular encapsulada do PTC) são usualmente RAS mutado. Referência: (Al Rasheed et al <sup>46</sup>).

## 2.5 Terapia

Os objetivos do tratamento do CDT incluem a minimização do risco de doença sintomática persistente/recorrente, redução do risco de morte relacionada ao câncer enquanto mantêm uma qualidade de vida otimizada, minimizando a morbidade relacionada ao tratamento <sup>33</sup>. A cirurgia da tireoide representa a primeira linha terapêutica na abordagem dos pacientes com carcinoma bem diferenciado da tireoide (CDT) <sup>38</sup>. Os tratamentos cirúrgicos mudaram após a introdução das novas diretrizes pela Associação Americana de Tireoide (ATA) em 2015 e pelo NCCN em 2018 <sup>35 48</sup>. Enquanto no passado a tireoidectomia total seguida pela terapia adjuvante com iodo era o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com CDT, de acordo com novas diretrizes a lobectomia pode ser oferecida a pacientes com CDT de baixo risco. Mais especificamente, a lobectomia é considerada para pacientes apresentando microcarcinoma (<1cm), unifocalidade, restrito à tireoide, ausência de

radiação prévia de cabeça e pescoço, história familiar de carcinoma de tireoide ou metástases linfonodais clinicamente detectáveis<sup>49</sup>. Nos casos em que oferece um tratamento adequado, a ablação unilateral oferece o benefício de evitar hipoparatiroidismo, um menor risco de lesão iatrogênica do nervo laríngeo recorrente e paralisia de cordas vocais com disфонia<sup>38</sup>. Após realização de tireoidectomia total (TT), a terapia com iodo radioativo (RAI) é recomendado para pacientes de alto risco segundo a ATA e devem ser considerados em casos de baixo e intermediário risco em casos individualizados. A terapia de substituição hormonal na tireoide deve ser provida na intenção de manter níveis de TSH abaixo de 0.1 mU/l em pacientes com PTC de alto risco, entre 0.1-0.5 mU/L nos casos de PTC com risco intermediário e 0.5-2mU/L nos de baixo risco<sup>35</sup>. O *follow-up* para estes pacientes consiste na avaliação periódica com US do leito tumoral e dos linfonodos cervicais, além da determinação dos níveis séricos de tireoglobulina estimulada pelo TSH basal ou recombinante<sup>35 49</sup>.

## 2.6 Estadiamento

Vários sistemas de estadiamento foram desenvolvidos por centros autorizados. Cada um desses sistemas de estadiamento oferece uma boa estratificação de risco com base em dados disponíveis logo após a terapêutica<sup>36</sup>. Entre estes todos, o mais amplamente utilizado é o sistema tumor-linfonodo-metástase (TNM) elaborado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)<sup>50</sup>. Concebido para prever a sobrevida específica da doença, o sistema TNM pouco informa sobre a previsão do desfecho de longo prazo da doença<sup>35 51 52</sup>. Isso porque o sistema só incorpora informações coletadas no período antes e após a intervenção, e fornece uma previsão aproximada da mortalidade do câncer ao longo do tempo, agrupando na mesma categoria pacientes com diferentes sobrevidas livre de doença (SLD) e sobrevidas específica da doença. A oitava edição da AJCC publicada em 2017 implementou substanciais mudanças no estadiamento do CDT. Estas mudanças incluem: (1) aumento do *cut-off* da idade de 45 para 55 anos no diagnóstico, estratificando pacientes com doença metastática em baixo versus alto risco de morte baseado na idade; (2) mudança na definição da doença T3, eliminando metástase linfonodal e a extensão extratireoidiana (ETE) mínima reportada na histologia como microscópica; (3) introdução de novas categorias para tumores T3 – T3a (> 4 cm e restritos a tireoide) e T3b (extensão extratireoidiana grosseira para músculos infra-hioideos); (4) N1 (metástase para linfonodos regionais) não aumenta o estágio para III ou IV em pacientes com

mais de 55 anos, permanecendo em estágio II; (5) mudanças nos níveis de linfonodos: nível VII é agora classificado como linfonodo central (N1a) ao longo com nível VI; (6) a presença de metástase distante em pacientes mais velhos com DTC é a agora considerado estágio IVB<sup>53 54</sup>.

Enquanto a oitava edição da AJCC avalia o risco de morte, o sistema de estratificação de risco da ATA prevê o risco de persistência/recorrência da doença. Em consonância com características clínicas, patológicas e moleculares, o câncer de tireoide é classificado como baixo, intermediário ou alto risco para recorrência. A estratificação de risco auxilia a individualizar a vigilância e tratamento<sup>35</sup>. Vale mencionar que nesta última edição da AJCC tem sido sugerido registrar no prontuário médico dados moleculares e demais parâmetros clínico-patológicos na tentativa de avaliá-los como potenciais fatores de estadiamento a serem incluídos na próxima edição<sup>53 55 56</sup>.

## **2.7 Prognóstico**

O CPT representa cerca de 90% dos cânceres de tireoide. Embora o prognóstico do câncer de tireoide é geralmente bom (taxa de sobrevida de 5 anos em 98%)<sup>3</sup>, aproximadamente 10% dos pacientes com CDT desenvolvem doença primária progressiva, 5% apresentam metástase à distância e cerca de 20-30% apresentam recorrência da doença<sup>4</sup>. Tem sido estimado que pacientes com doença avançada podem tornar-se resistente à terapia com iodo (doença refratária). Nesses casos, a taxa de sobrevida de 5 anos pode chegar 10% em comparação com casos de doença metastática ávidas por iodo radioativo (RAI)<sup>57</sup>. Outras terapias incluem terapia com carbonato de lítio, ácido retinóico e mais recentemente inibidores MAPK/ERK quinase (MEK)<sup>33</sup>.

Portanto, a identificação de novos biomarcadores moleculares que possam prever o prognóstico e o comportamento agressivo da neoplasia é essencial para aumentar a sobrevida dos casos avançados. Assim, é importante ampliar o entendimento sobre o PD-L1 no câncer de tireoide, envolvendo sua fisiologia, aspectos moleculares e associação com fatores clínico-prognósticos destes pacientes.

## 2.8 Visão introdutória da imunoterapia

O desenvolvimento de inibidores de checkpoint imune (ICI) é um marco revolucionário no campo da imuno-oncologia. As células tumorais escapam da vigilância imune e progredem através de diferentes mecanismos, incluindo a ativação das vias de *checkpoint* imune (CI) para suprimir respostas imunes antitumorais <sup>7</sup>. Os protótipos e principais atores dessas vias de CI são a proteína 4 do linfócito citotóxico (CTLA-4) e a proteína-1 da morte celular programada (PD-1) que são inibidores da função e proliferação das células T <sup>11</sup>. A interação do PD-1 com seus ligantes, ligante 1 da morte celular programada (PD-L1) e ligante 2 da morte celular programada (PD-L2), desencadeia o escape imune das células tumorais devido à inibição da ativação das células T e produção de citocinas, levando à atenuação das respostas de células T pelo bloqueio da proliferação, indução de apoptose e diferenciação das células T regulatórias (Tregs) <sup>58 59</sup>. Foi demonstrado que as respostas das células T podem ser estimuladas por direcionamento dessa via com ICIs que bloqueiam a interação do PD-1 com seus ligantes, superando assim a resistência intrínseca à vigilância imunológica através da montagem de respostas imunes antitumorais. Isto leva a um desfecho melhor e aumento da sobrevida dos pacientes <sup>11</sup>.

Recentemente, uma associação entre expressão de PD-L1, carga mutacional tumoral (TMB) e/ou instabilidade de microssatélite com resposta aos ICIs tem sido relatada em diferentes tumores incluindo: carcinoma não pequenas células de pulmão (CNPC), melanoma, carcinoma de células renais (CCR) e carcinoma colorretal (CRC) <sup>60 61</sup>. Posto isso, é importante ampliar o conhecimento acerca da fisiologia e dos mecanismos moleculares que diretamente ou indiretamente influenciam a expressão do PD-L1, com objetivo de melhorar a eficácia das imunoterapias direcionadas ao PD-1/PD-L1.

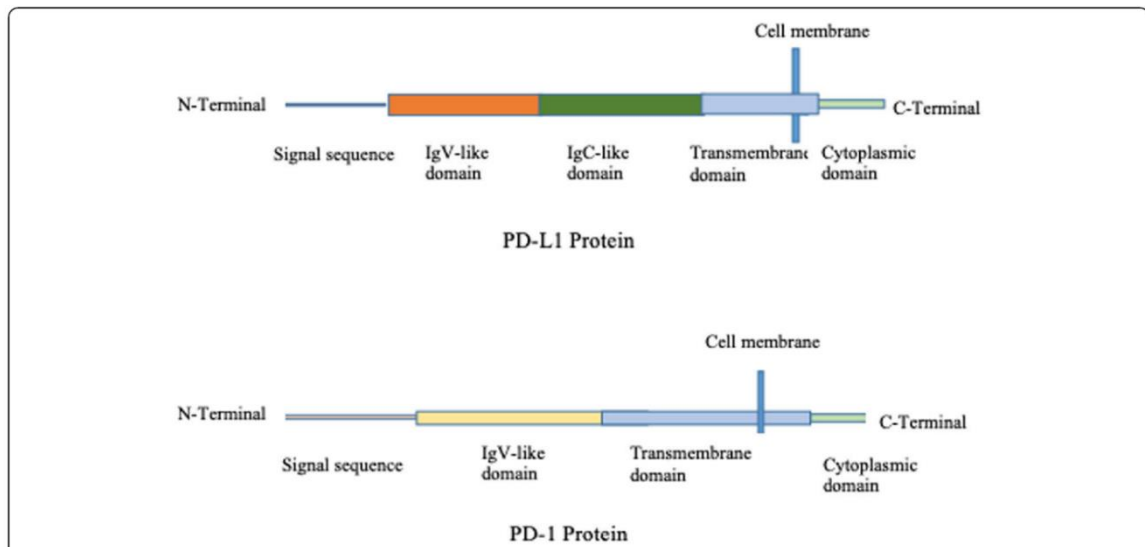
## 2.9 Estrutura molecular e expressão do PD-1 e PD-L1

O PD-1 também conhecido como CD279 é um receptor de proteína transmembrana que foi descoberto como uma molécula associada à apoptose por Tasuku Honjo e colaboradores após terem clonado o gene PD-1 de linhagens celulares imunes que sofreram

apoptose em 1992 <sup>62</sup>. O PD-1 é uma proteína transmembrana composta de um domínio da superfamília da imunoglobulina (Ig), um pedículo composto por aproximadamente 20 aminoácidos, um domínio transmembrana, um domínio intracelular de aproximadamente 95 resíduos que contêm dois sítio de fosforilação localizados no *motif inibidor* de imunoreceptor baseado em tirosina (ITIM) e um *motif* de comutação do imunoreceptor baseado em tirosina (ITSM), os quais após fosforilação, regulam negativamente a sinalização do receptor de células T (TCR) através de fosforilação do homólogo da fosfatase 1 SRC (SHP-1) e SHP-2 <sup>63 64</sup>. O PD-1 é codificado pelo gene *Pdcd1* no cromossomo 2 e é composto de 5 exóns. O exón 1 codifica um sinal de sequência curta, enquanto o exón 2 codifica o domínio de imunoglobulina. O pedículo e o domínio transmembrana compõem o exón 3 e o exón 4 codifica uma sequência curta de 12 aminoácidos que marca o início do domínio citoplasmático. O exón 5 contém o resíduo intracelular C-terminal e o 3'UTR longo <sup>63</sup>. O PD-1 é um inibidor das respostas imunes inata e adaptativa, sendo expresso nos linfócitos T ativados, células natural killer (NK) e linfócitos B, macrófagos, células dendríticas (CD) e monócitos, além de ser expresso nas células T específicas do tumor <sup>65</sup>. Fatores transcricionais como NFAT, NOTCH, FOX e IRF9 podem desencadear a transcrição do PD-1 <sup>66</sup>.

O PD-L1 também chamado de B7-H1 ou CD274 é membro da família B7 dos receptores de proteína transmembrana tipo I <sup>63</sup>. Dong et al. <sup>67</sup> identificaram e clonaram o gene humano B7-H1 em 1999 e reconheceram a molécula como tendo efeitos inibitórios nas células por induzirem a expressão de IL-10. Estruturalmente, o PD-L1 é um receptor de proteína transmembrana tipo I composto por 290 aminoácidos, codificado pelo gene *Cd274* localizado no cromossomo 9 nos humanos e composto por 7 exóns <sup>63 64 68</sup>. O primeiro exón é não codificante e contém a porção 5'UTR. Os próximos três exóns contém a sequência sinal, o domínio *IgV-like* e o domínio *IgC-like*, respectivamente. O domínio transmembrana e o domínio intracelular são codificados pelos dois próximos exóns (exóns 5 e 6). O último exón contém os resíduos do domínio intracelular e a porção 3'UTR. A figura 2 ilustra as estruturas das proteínas PD-1 e PD-L1. O PD-L1 é constitutivamente expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo células apresentadoras de antígenos, células T ativadas, células B, monócitos, mastócitos, placenta, endotélio vascular, ilhotas pancreáticas, músculo, hepatócitos e epitélio <sup>63 69</sup>. Esta proteína pode ser superegulada em diversos tipos celulares após ativação em resposta a citocinas pró-inflamatórias como IFN $\gamma$  e IL-4 através de transdução de sinal e ativação do STAT1 e IRF1 <sup>63 70</sup>.





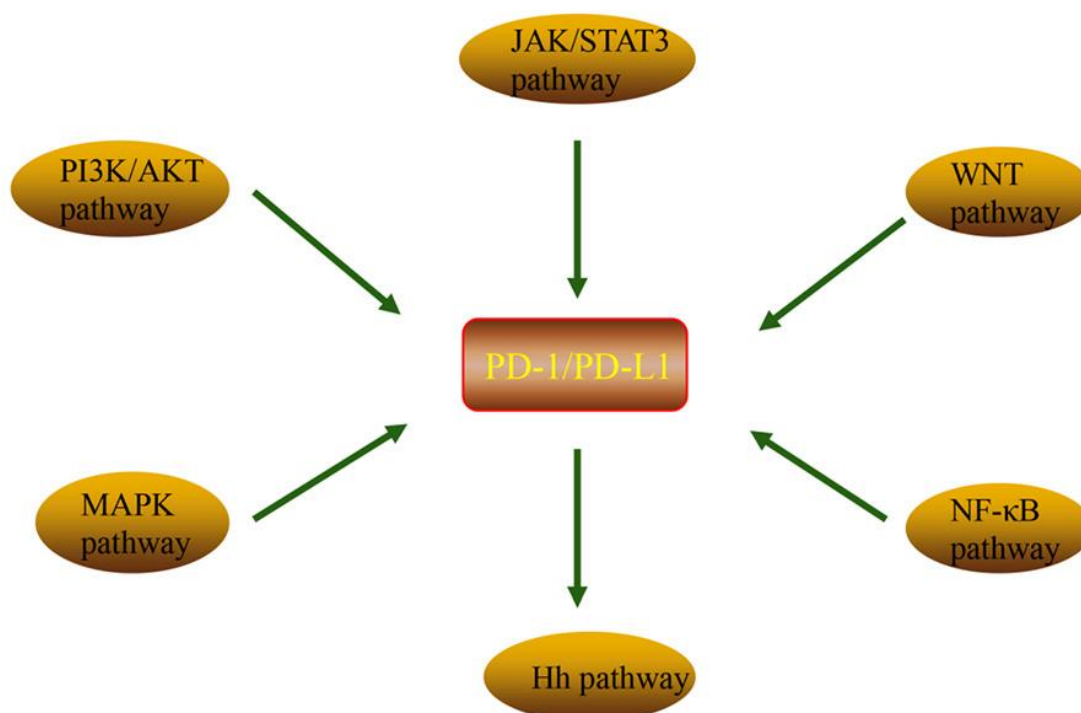
**Figura 2.** Estrutura das proteínas PD-L1 e PD-1. PD-L1 e PD-1 são ambas proteínas transmembrana que interagem entre si. PD-L1 contém o domínio citoplasmático, domínio transmembrana e dois domínios extracelulares *IgV-like* e *IgC-like*. Enquanto isso, a proteína PD-1 consiste somente de um domínio extracelular *IgV-like*, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. Referência: (Akinleye et al <sup>71</sup>).

## 2.10 Interação PD-1/PD-L1 e as bases da imunoterapia

Fisiologicamente, a função principal do sistema regulatório PD-1/PD-L1 e dos vários tipos de *checkpoint* imune para controlar as respostas das células T é manter a autotolerância periférica, isto é, a habilidade do sistema imune de reconhecer e ignorar, ou “tolerar” as próprias células e tecidos <sup>72 73</sup>. As células epiteliais podem ser induzidas a expressar PD-L1 em resposta as citocinas inflamatórias como IFN $\gamma$  <sup>74</sup>. Isto serve para proteção das células epiteliais em sítios de ativação imune, como sítios de infecção, inibir a atividade de linfócitos autorreativos <sup>14</sup>. A ligação do PD-1 com o PD-L1 amorteceria as respostas de células T de várias formas, principalmente na produção de citocinas do que na proliferação celular, com significativo efeito no IFN $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  e IL-2 <sup>63 70</sup>. A ligação do PD-1 inibe a indução do fator de sobrevivência Bcl-X1 assim como a expressão dos fatores de transcrição associado com função de células efetoras, incluindo GATA-3, Tbet e Eomes <sup>75</sup>. Além disso, o eixo PD-1 também inibe a atividade lítica nas células ativadas, incluindo células B e células NK <sup>71</sup>. Mais importante, o PD-1 é também altamente expresso nas Tregs que podem estar ativadas e

proliferar na presença de ligantes e inibir, ao invés de promover, respostas imunes pela expressão de FOXP3, pela ausência de expressão de citocinas efetoras como IFN $\gamma$  e produção de citocinas inflamatórias como TGF $\beta$ , IL-10, e IL-35<sup>76</sup>. A ligação do PD-L1 com o PD-1 desregula a resposta das células T ativadas por inibir a proliferação celular, a produção de citocinas e atividade citolítica, levando a uma inativação funcional ou “exaustão” dos linfócitos T<sup>12</sup>.

O PD-L1 é altamente expresso nos linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) e em grande proporção nos muitos tipos de câncer. As células epiteliais podem ser induzidas a expressar PD-L1 em resposta ao IFN- $\gamma$  o qual é produzido por células T ativadas e células NK<sup>77</sup>. O PD-L1 é expresso constitutivamente em diferentes tipos de tumores incluindo melanoma, carcinoma de pulmão, carcinoma de ovário e carcinoma renal<sup>78</sup>. O PD-L1 é somente ativo quando expresso na membrana celular e existem dois mecanismos de expressão dos ligantes do checkpoint imune: através da expressão constitutiva de PD-L1 pelas células tumorais por conta de alterações genéticas ou ativação de certas vias de sinalização, independente dos sinais inflamatórios do microambiente tumoral (TME) – (resistência imune intrínseca) ou de uma resposta induzida por sinais inflamatórios produzidos por uma resposta imune antitumoral ativa (resistência imune adaptativa)<sup>79 80 81</sup>. Células tumorais podem constitutivamente ativar a expressão de PD-L1 através de vias de sinalização oncogênica, tal como PIK/AKT, Erk/MAPK, ALK/STAT3, MYD88/TRAF6 ou a perda do gene supressor tumoral PTEN<sup>79 80 81 82</sup>. A figura 3 ilustra as vias de regulação envolvidas na expressão de PD-1/PD-L1.



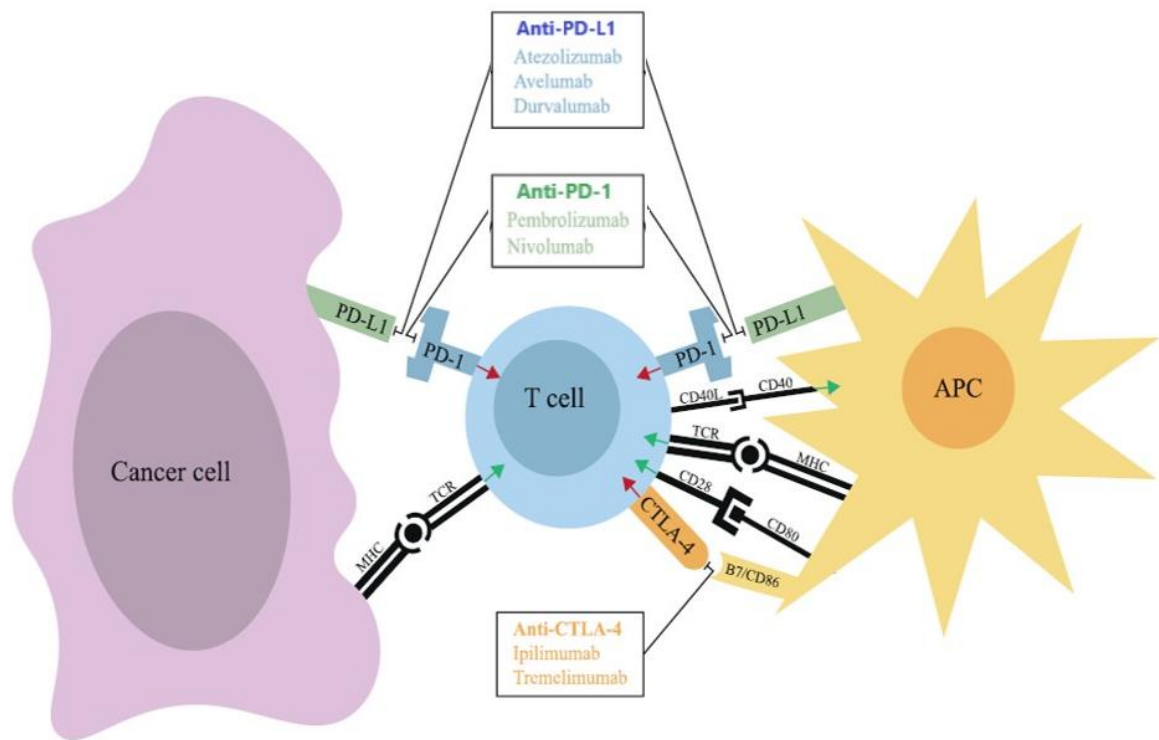
**Figura 3.** Várias vias de regulação da expressão de PD-1/PD-L1. As vias do PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT, WNT, NF-κB, Hh promovem a expressão do eixo PD-1/PD-L1. Referência: (Han et al <sup>83</sup>).

A ativação da via do EGFR no CNPC também leva a regulação positiva do PD-L1 em adição à superexpressão de outros fatos imunossupressivos, incluindo IL-6 e TGF-β <sup>84</sup>. A inibição do PD-1 neste modelo de camundongo quimérico EGFR-*driven* resultou em regressão tumoral e melhora da sobrevivência. No geral, um número crescente de vias de sinalização está associado à regulação do PD-L1, dando apoio à busca de terapias combinadas envolvendo inibidores tirosino-quinase (ITK) e imunoterapia <sup>85</sup>.

O segundo mecanismo, a resistência imune adaptativa, refere-se à indução dinâmica da expressão de PD-L1 nas células tumorais em resposta às citocinas específicas, em particular IFN-γ. A expressão de PD-L1 induzida pelo IFN-γ parece ser mais comum que a expressão constitutiva na maioria dos cânceres e resulta em uma restrita expressão de PD-L1 em áreas ricas em células T dos tumores, em particular na margem invasiva <sup>79 86</sup>. Este padrão de expressão sugere que o PD-L1 é adaptativamente induzido como consequência da presença de células T antígeno-específicas do tumor que reconhecem as células malignas, mas essas células cancerígenas (ou outras células do microambiente tumoral) se adaptam através da expressão de PD-L1 e desligam a resposta imune citotóxica específica <sup>87 86</sup>. Tumores nos humanos apresentam correlações significativas entre expressão de PD-L1, níveis de

infiltração de células T e INF-  $\gamma$  <sup>79 88</sup>. Evidências esmagadoras sugerem que a interação do PD-L1/PD-1 no microambiente tumoral promovem disfunção de células T, “exaustão”, apoptose, neutralização e elaboração de IL-10 na massa tumoral criando um estado de resistência às células T citotóxicas (CD8+) que medeiam a morte da célula tumoral. Esta ação promove o desenvolvimento e progressão do câncer aumentando a proliferação e sobrevivência das células tumorais <sup>71</sup>.

A inibição da interação PD-1/PD-L1 usando anticorpos específicos resulta na restauração da imunidade antitumoral do hospedeiro e forma a base moderna da imunoterapia convencional no tratamento do câncer. Anticorpos direcionados à via PD-1/PD-L1 induzem destruição do tumor pela restauração da atividade das células T (CD8+) efetoras “exaustas” <sup>58 72</sup>. As células T “exaustas” as quais expressam PD-1 e outras moléculas inibitórias como LAG3, TIM3 e TIGIT, representam uma subclasse de células T ativadas PD-1 positivas que ainda são funcionalmente ativas mas com capacidade reduzida <sup>72</sup>. A inibição PD-1/PD-L1 é capaz de “revigorar” uma parcela das células T “exaustas” (aquelas expressando T-bet) e funcionalmente restaurar as células T que então podem montar uma resposta antitumoral efetiva <sup>89</sup>. A figura 4 mostra o checkpoint imune PD-1/PD-L1 e os sítios de ação dos anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1.



**Figura 4.** *Checkpoint* imune presente nas superfícies da célula T, da célula apresentadora de antígeno e da célula tumoral, bem como os sítios de ação dos anticorpos anti-PD-L1, anti-PD-1 e anti-CTLA-4. Sinais inibitórios da célula T com setas em vermelho, sinais estimulatórios com setas em verde. Referência: (Paver et al <sup>14</sup>).

## 2.11 Terapia com inibidores da via PD-1/PD-L1 no câncer

Inibidores do checkpoint imune (ICI), especialmente o PD-1 e PD-L1 tem mostrado eficácia clínica contra muitos tumores malignos sólidos e hematológicos <sup>90</sup>. O desenvolvimento e o uso clínico de inibidores do PD-1 e PD-L1 na terapia anticâncer tem se ampliado. Pembrolizumab e nivolumab foram os primeiros da família anti-PD-1 dos ICI aprovados pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) para tratar pacientes com CNPC avançado no qual a doença progrediu durante uso da quimioterapia <sup>77</sup>. Existem atualmente 5 agentes terapêuticos aprovados no mercado que visam o alvo PD-1/PD-L1, dois deles (nivolumab e pembrolizumab) são anticorpos monoclonais IGg humanizados anti-PD-1 e os outros três (atezolizumab, durvalumab e avelumab) são anticorpos monoclonais anti-PD-L1

Correspondentemente, existe uma variedade de plataformas de imuno-histoquímica (IHQ) para detectar a presença da proteína PD-L1 nos tumores <sup>91</sup>. Estas plataformas são divididas em dois tipos: plataformas “*companion diagnostics*” que provêm informações que são essenciais para a segurança e efetividade do uso das drogas correspondentes, e plataformas “*complementary diagnostics*” que podem ser usadas na seleção do tratamento, mas não são consideradas essenciais para segurança e efetividade no uso da terapia correspondente <sup>91</sup>. O primeiro grande conjunto de dados demonstrando uma correlação positiva entre a expressão de PD-L1 e o resultado do tratamento em pacientes com CNPC avançado veio do estudo KEYNOTE-001 <sup>92</sup>. Cerca de 22% dos casos de CNPC testados expressaram PD-L1 em pelo menos 50% das células tumorais e estas tiveram uma taxa de resposta de 41% <sup>92</sup>. Além do mais, a aprovação do Nivolumab foi baseado nos resultados publicados do trial CheckMate 057 fase 3 no qual pacientes recebendo nivolumab viveram uma média de 12.2 meses comparados com 9.4 meses daqueles que receberam quimioterapia padrão <sup>93</sup>. Este resultado traduziu uma redução de 40% no risco de morte em relação à quimioterapia padrão com docetaxel <sup>93</sup>.

Nos *trials* clínicos envolvendo o melanoma, a superexpressão de PD-L1 pela IHQ foi detectada em aproximadamente 45-75% das amostras. Em um estudo com nivolumab, 45% dos pacientes foram positivos para PD-L1 baseado em um *cutoff* de 5% usando o anticorpo de detecção 28-8. A taxa de resposta dos pacientes PD-L1 positivo foi de 44%, comparado com 17% dos pacientes PD-L1 negativo. Pacientes com melanoma PD-L1 positivo tratados com nivolumab tiveram uma sobrevida global (SG) de 21 meses e uma sobrevida livre de progressão (SLP) de 9.1 meses contra 12.5 meses de SG e 2 meses de SLP nos pacientes PD-L1 negativo <sup>94</sup>. Pembrolizumab também foi estudado no melanoma avançado utilizando um *cutoff* de 1% <sup>95</sup>. Pacientes PD-L1 positivo (77%) tiveram uma taxa de resposta global (TRG) de 51%, enquanto pacientes PD-L1 negativo tiveram uma TRG de 6%. Além disso, pacientes PD-L1 positivo tratados com pembrolizumab tiveram uma SLP de 12 meses e taxa de SG de 84% em um ano, enquanto pacientes PD-L1 negativo tiveram uma SLP de 3 meses e uma taxa de SG de 69%. De significativo, aproximadamente 20% dos pacientes PD-L1 negativo tiveram resposta durável com pembrolizumab na SLP, e os dados da SG entre os grupos não foi estatisticamente significativo, com aproximadamente 65% dos pacientes em ambos os grupos apresentando respostas sustentadas <sup>95</sup>.

Schmid et al. <sup>96</sup> avaliaram a eficácia e a segurança do nab-paclitaxel com e sem atezolizumab em 451 pacientes com carcinoma mamário triplo negativo (CMTN) e virgens

de tratamento até a progressão da doença ou toxicidades não aceitáveis. Em um *follow-up* médio de 12.9 meses, a adição de atezolizumab ao paclitaxel levou a uma redução de 40% no risco de progressão ou morte comparado com somente nab-paclitaxel entre pacientes com tumores PD-L1 positivo <sup>96</sup>. Em março de 2019, o FDA aprovou a nova indicação para tratamento com atezolizumab em combinação com nab-paclitaxel para o tratamento de pacientes adultos com CMTN localmente avançado e irressecável ou metastático nos quais o tumor expressava PD-L1 (*immune cell score* (IC)  $\geq$  1% da área tumoral). Este foi o primeiro ICI aprovado para o tratamento de pacientes com câncer mamário, com significativo aumento na SLP comparado com placebo <sup>96</sup>.

Em 2019, uma indicação adicional para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) foi aprovada para pacientes nos quais os tumores expressavam PD-L1 com um *combined positive score* (CPS) maior que 1 (CPS  $\geq$  1) como determinado pelo FDA <sup>97</sup>. O CPS determina a quantidade de células PD-L1 positivas que estão dentro do tumor, incluindo as células tumorais, linfócitos e macrófagos relativo ao número total de células tumorais viáveis. Pacientes com expressão positiva de PD-L1 (CPS  $>$  1), apresentam benefício, e aqueles que expressam um CPS  $>$  20 foram os que apresentaram um maior benefício com o aumento na SG quando tratados com pembrolizumab combinado com quimioterapia comparado ao cetuximab e quimioterapia <sup>97</sup>. A figura 5 exhibe as plataformas validadas, seus respectivos métodos de escore e drogas.

Até agora, a terapia anti-PD-1/PD-L1 gerou significativo benefício clínico ao induzir regressão durável de tumores avançados e metastáticos e melhorar a sobrevivência. É importante ressaltar que os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 demonstraram respostas clínicas notáveis e duradouras, toxicidade controlada e são aplicáveis a um amplo espectro de tipos de câncer, especialmente tumores sólidos <sup>98</sup>.

Clone	Manufacturer	Platform	Scoring method	Companion drug
22C3 pharmDx	Agilent, Dako	Dako Autostainer Link 48	TPS or CPS	Pembrolizumab
28-8	Agilent, Dako	Dako Autostainer Link 48	TPS	Nivolumab
73-10	Agilent, Dako	Dako Autostainer Link 48	Not yet established	Avelumab
SP142	Ventana	BenchMark Ultra	IC for TNBC	Atezolizumab
SP263	Ventana	BenchMark Ultra	IC and TC for NSCLC	
			TPS	Durvalumab
			TC and IC for urothelial carcinoma	

**Figura 5.** Plataformas validadas em trials, com suas respectivas plataformas “*companion*”, seus métodos de escore e agentes farmacêuticos. Referência: (Paver et al <sup>14</sup>).

## 2.12 Imunoterapia no carcinoma de tireoide

Neste momento, faltam dados sobre a utilização de imunoterapia no CDT e existem vários *on-going clinical trials* para avaliar o papel da imunoterapia no CDT. Recentemente, Mehnert et al.<sup>15</sup>, em um estudo não randomizado fase 1b (KEYNOTE-028), avaliaram a segurança e eficácia do pembrolizumab, um inibidor PD-1, em pacientes com CDT avançado PD-L1 positivo. Foram recrutados 22 pacientes com diagnósticos de CPT ou CFT avançado com expressão imuno-histoquímica de PD-L1 nas células tumorais ou estromais e que apresentaram falha de tratamento. A droga pembrolizumab foi administrada em uma dose de 10mg/kg a cada duas semanas por até 24 semanas ou até confirmada progressão ou toxicidade intolerável. Dois pacientes tiveram resposta parcial confirmada para uma taxa de resposta global de 9% e a duração de resposta foi de 8 e 20 meses, respectivamente. Chama atenção no estudo a presença de uma alta taxa de eventos adversos relacionados ao tratamento (82% dos pacientes). O carcinoma anaplásico de tireoide (CAT) revelou extensiva expressão de PD-L1 nas células tumorais e PD-1 nas células inflamatórias como potencial alvo terapêutico no CAT<sup>99 100</sup>.

Em uma análise retrospectiva no MD Anderson Cancer Center, Iyer et al.<sup>101</sup> observaram entre os 12 pacientes tratados com pembrolizumab e ITKs uma resposta parcial de 42%, doença estável em 33% dos pacientes, enquanto 25% apresentaram progressão da doença. Os pesquisadores encontraram uma combinação de fadiga, anemia e hipertensão como os eventos adversos mais comuns. Em um relato de caso, nivolumab foi administrado em conjunto com vemurafenib em um homem de 62 anos com diagnóstico de CAT após tireoidectomia, dissecação linfonodal e quimioterapia<sup>102</sup>. O paciente foi tratado com vemurafenib e devido à positividade do PD-L1, nivolumab foi adicionado ao tratamento. Dois meses após o início de nivolumab, ocorreu substancial regressão dos linfonodos supraclaviculares e nódulos pulmonares. O paciente continuou em remissão completa 20 meses após a terapia com nivolumab<sup>102</sup>.

## 2.13 Imuno-histoquímica do PD-L1

A maioria do conhecimento atual sobre a expressão de PD-L1 e resposta ao ICI deriva dos resultados dos *trials* clínicos. Todavia, existe uma significativa variação nos desenhos



desses *trials* clínicos e nas comparações dos tratamentos utilizados. Além disso, o grau e a durabilidade da resposta aos inibidores de PD-1/PD-L1 parece ser afetado por múltiplos fatores biológicos além da expressão de PD-L1, muitos dos quais permanecem completamente desconhecidos <sup>14</sup>. Assim como a maioria das proteínas tissulares, a proteína PD-L1 pode ser detectada por IHQ em amostras de tecido fixados em formalina e embebidos em parafina. Anticorpos monoclonais contra o PD-L1 são direcionados ao domínio extracelular e coram células tumorais e células imunes com uma mistura de marcação de membrana ou citoplasma <sup>77</sup>.

A IHQ tem as seguintes vantagens: (1) visualização e localização do sinal e identificação das diferentes populações marcadas (nas células tumorais e/ou células imunes, nas células imunes em contato com células tumorais ou localizadas à distância); (2) rapidez de resultado permitindo entrega dos resultados ao médico em curto espaço de tempo; (3) baixo custo, em geral, comparado com a biologia molecular e (4) amplamente disseminada em laboratórios de patologia. Todavia, a IHQ do PD-L1 tem os seus limites, os quais estão relacionados à sua complexidade biológica assim como os desafios tecnológicos <sup>77</sup>. Além disso, vários anticorpos anti-PD-L1 tem sido produzidos, com consideráveis variações no epítipo alvo, isotipo e fonte (recombinante versus policlonal). Os resultados dos diferentes *trials* clínicos investigando a terapia anti-PD-L1 são dados de acordo com os clones de anticorpos específicos para as plataformas “*companion diagnostic*” e é impossível deduzir se estes diferentes anticorpos podem ser usados na mesma avaliação <sup>77</sup>. Alguns anticorpos aparecem prover um nível mais sensível de detecção que outros. Cerca de 25% dos tumores são positivos para um clone de PD-L1 e podem ser negativos para um segundo anticorpo <sup>103</sup>. Certos anticorpos anti-PD-L1 são direcionados contra epítipos intracelulares enquanto outros reconhecem essencialmente epítipos extracelulares <sup>103</sup>.

De fato, o PD-L1 tem somente poucos sítios de ligação para anticorpos de IHQ porque ele contém apenas duas pequenas regiões hidrofílicas. Portanto, os sítios de ligação para anticorpos destinados para IHQ podem ser diferentes dos anticorpos anti-PD-1 utilizados para terapia <sup>67</sup>. Uma gama de plataformas de IHQ com seus respectivos anticorpos estão aprovados pelo FDA e estão comercialmente disponíveis para uso em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina como “*companion diagnostics*” para identificar pacientes mais prováveis de se beneficiar com os inibidores de PD-1/PD-L1. A plataforma SP263, que foi utilizada no nosso estudo, usa um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 (clone SP263) e é aprovado como um teste diagnóstico para o tratamento pretendido no CNPC com

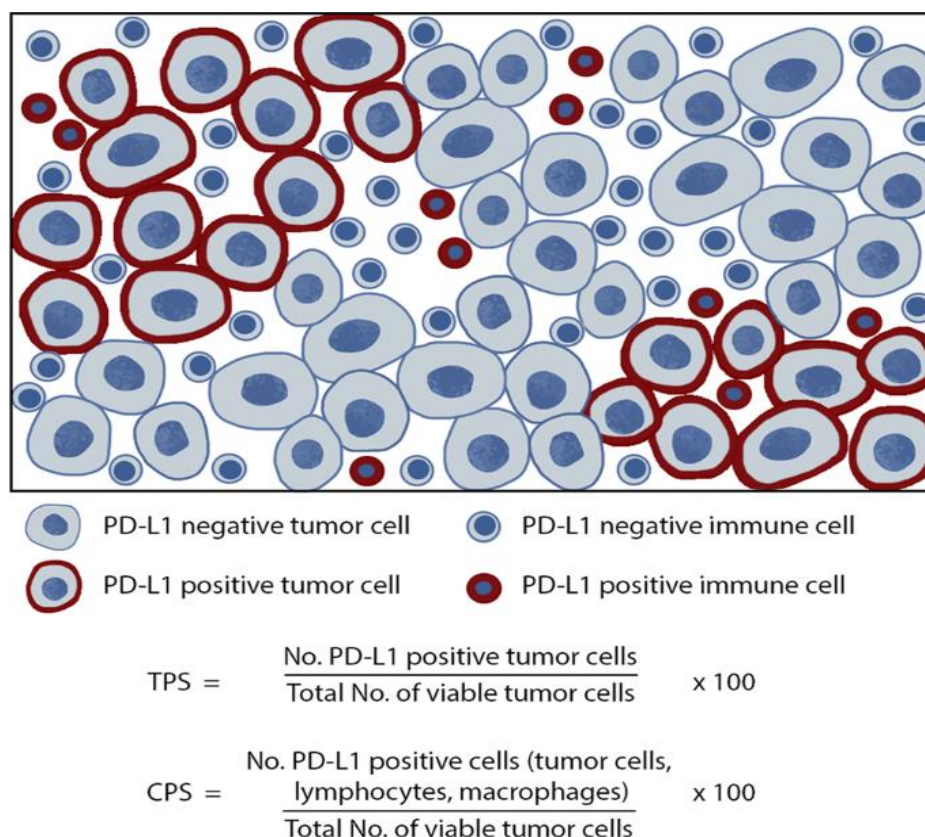
pembrolizumab, durvalumab e nivolumab, assim como para o tratamento do carcinoma urotelial com durvalumab. Ele é recomendado para ser utilizado pela plataforma Ventana BenchMark Ultra, Roche <sup>14</sup>.

## 2.14 Interpretação do PD-L1 na imuno-histoquímica

Os vários *trials* clínicos tem utilizado diferentes algoritmos e métodos de escore para interpretação de cada plataforma de IHQ em diferentes tipos de tumores <sup>14</sup>. Todavia, a maioria dos estudos recomendam que avaliação da expressão do PD-L1 deve ser realizada em áreas dos tumores invasivos e células normais e componentes “in situ” não devem ser incluídos na avaliação. É importante mencionar que pelo menos 100 células tumorais devem estar presentes para a avaliação ser considerada confiável <sup>14</sup>. Na avaliação das células tumorais a marcação de membrana de qualquer intensidade deve ser considerada positiva quando for dado um escore. A marcação citoplasmática e nuclear das células tumorais não deve ser considerada positiva e deve ser descartada <sup>14</sup>. Já na avaliação das células inflamatórias, apenas células imunes que infiltram o tumor invasivo e o seu estroma intra ou peritumoral devem ser contabilizadas. As células imunes (usualmente macrófagos e linfócitos) são consideradas positivas com qualquer marcação de PD-L1, independentemente do tipo de célula imune ou localização da marcação <sup>14</sup>.

Uma variedade de métodos de escore tem sido proposto para quantificar a expressão de PD-L1 em diferentes malignidades, avaliando a expressão nas células tumorais ou nas células inflamatórias, ou em ambas. Todas as avaliações devem ser conduzidas em amostras de tecido com o maior número de células tumorais viáveis. As áreas de necrose, hemorragia e diatermia devem ser evitadas <sup>14</sup>. Os métodos mais comuns são o *Tumor Proportion Score* (TPS) e o *Combined Proportion Score* (CPS). O TPS é um percentual de células tumorais viáveis mostrando marcação de membrana parcial ou completa de qualquer intensidade relativo ao número total de células tumorais viáveis presente na amostra <sup>104</sup>. As células não malignas e células imunes como linfócitos infiltrantes ou macrófagos que expressarem PD-L1 não devem ser incluídos na contagem. Essa avaliação é aplicada para a plataforma 22C3 pharmDX para o pembrolizumab no CNPC <sup>105</sup>. Já o CPS é calculado adicionando o número de células tumorais PD-L1 positivas ao número de células imunes positivas (linfócitos e

macrófagos) e dividindo pelo número de células tumorais viáveis, com um escore máximo definido de 100<sup>104</sup>. Este método é proposto para IHQ com a plataforma 22C3 pharmDX para o pembrolizumab no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP), carcinoma urotelial e carcinoma de estômago<sup>106</sup>. A figura 6 ilustra de forma esquemática o cálculo do TPS e CPS.



**Figura 6.** Cálculo do TPS e CPS. A imagem esquemática mostra o espécime tumoral corado pelo PD-L1. O TPS é definido pelo número de células tumorais positivas divididas pelo número total de células tumorais viáveis e multiplicados por 100%; o CPS é definido como o número de células positivas (células tumorais, linfócitos e macrófagos) dividido pelo número total de células tumorais viáveis e multiplicados por 100. Referência (Ruiter et al.<sup>107</sup>).

## 2.15 Estudos internacionais envolvendo o PD-L1 no CPT

Existem alguns estudos no mundo avaliando a prevalência e associação com fatores clínico-patológicos e de prognóstico. Todavia, os resultados mostraram grande variabilidade devido à múltiplos fatores incluindo (1) metodologia: diferentes plataformas de IHQ, (2)

anticorpos primários monoclonais, (3) sistemas de escore e interpretação incluindo sítio de expressão de PD-L1 (membrana versus citoplasma), (4) tipos de células (células tumorais com ou sem linfócitos) e (5) cut-offs que definem o resultado positivo. Estes estudos serão descritos a seguir.

Em um estudo no Canadá, Chowdhury et al.<sup>4</sup> analisaram a expressão e localização do PD-L1 através de IHQ no CPT com suas variantes e seu potencial como marcador prognóstico através da sobrevida livre de doença (SLD). A amostra foi composta por 251 casos, sendo 185 de casos de CPT. O clone do PD-L1 foi o E1L3N (*Cell Signaling Technology*). O escore imuno-histoquímico utilizado se baseou no percentual de positividade das células e intensidade da reação que variou em uma pontuação de 0-7. Os autores identificaram uma prevalência de PD-L1 citoplasmático em 66,5% (123/185) e de PD-L1 na membrana plasmática de 40% (74/185). Já nas variantes agressivas do PTC, 95,9% (71/74) casos mostraram expressão de PD-L1 no citoplasma e 71,6% (53/74) casos mostraram expressão de PD-L1 na membrana. Não foi observado associação entre PD-L1 e multifocalidade, extensão extratireoidiana (ETE), microcarcinoma e invasão perineural. Porém, observaram aumento da expressão de PD-L1 na tireoidite linfocítica benigna e tireoidite de Hashimoto (TH). Devido ao baixo número de casos, não constava o valor do *p*. Notaram ainda associação de PD-L1 com diminuição da sobrevida livre de doença (SLD) em todos os estágios combinados de PTC e tanto com positividade citoplasmática, plasmática e/ou ambas. Os resultados do estudo mostraram uma correlação da expressão de PD-L1 com formas agressivas de PTC e a SLD. Todavia, como ponto duvidoso do estudo foi a inclusão de 18 casos de CAT na casuística do CPT, o que pode ter ajudado a “inflar” alguns resultados.

Em um estudo chinês envolvendo o período de 2003 a 2012, Shi et al.<sup>108</sup> avaliaram a significância da expressão de PD-L1 e a associação com fatores clínico-patológicos e de desfecho no CPT. A amostra foi composta de 260 casos de CPT onde foram utilizados dois anticorpos anti-PD-L1: o ab174838 (1:50, Abcam, Cambridge, MA) e o MABC290 (1:200, Millipore, Darmstadt -Germany) em “*tissue microarray*” (TMA). O escore de imunorreatividade do estudo baseou-se em intensidade da reação e percentual de positividade das células e tiveram como resultados <4 (negativo), 4 (fraco), 6 (médio) e >8 (forte). A prevalência do PD-L1 encontrada no estudo foi de 52.3% (136/260). Houve associação positiva do PD-L1 com multifocalidade ( $p=0.001$ ) e EET ( $p=0.001$ ); porém não houve associação com sexo, idade, tamanho tumoral, tireoidite de Hashimoto (TH), metástase linfonodal central e lateral. Notou-se ainda associação PD-L1 com recidiva quando avaliado

em um modelo binomial ( $p=0,002$ ) e como preditor independente de recidiva ( $p=0.005$ ). Observou-se ainda que nos pacientes com PD-L1 a sobrevida livre de recorrência (SLR) foi significativamente menor nos seguintes subgrupos: sexo masculino, maior idade, maior tamanho tumoral ( $>4$  cm), multifocalidade, EET e metástase linfonodal.

Um dos primeiros estudos a relacionar a mutação do gene BRAFV600E com PD-L1 e estados imunossupressivos no PTC foi o de Angell et al. <sup>16</sup>. Neste estudo americano, foi avaliada a associação entre a mutação do gene BRAF V600E com ligantes imunossupressivos expressos pelo tumor como o PD-L1, HLA-G, IDO juntamente com a avaliação das populações de células imunes infiltrantes tumorais (efetoras e supressoras), assim como a correlação com os achados clínicos-patológicos. A amostra foi composta por 33 casos de CPT e foi utilizado o anticorpo anti-PD-L1 4059 (ProSci, Inc., Poway, CA). A prevalência da mutação do BRAF foi de 51,5% (17/33) dos casos. Já a prevalência de PD-L1 foi de 30,3% (10/33%), onde foi encontrado uma alta expressão de PD-L1 nos pacientes com a mutação do BRAF (9/17) contra uma expressão de apenas 6,25% (1/16) nos pacientes sem a mutação. Os dados apresentados no estudo mostraram uma associação significativamente positiva entre o BRAFV600E e o PD-L1 assim como com outras moléculas imunossupressivas, demonstrando um forte perfil imunossupressivo dentro do microambiente tumoral do PTC BRAFV600E+.

Em um estudo retrospectivo no período de 1994 a 2004 na Coreia do Sul, Ahn et al. <sup>17</sup> analisaram a frequência de PD-L1 em vários tipos de câncer de tireoide e associação com fatores clínico-patológicos incluindo a mutação do TERT (*human telomerase reverse transcriptase*), o status do BRAF e a progressão de doença. A amostra foi composta de 407 casos de carcinoma primário da tireoide com 326 (80,1%) casos de CPT e com um “*follow-up*” médio de 13,7 anos. A pesquisa do PD-L1 foi realizada em TMA e utilizou o anticorpo primário SP142 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) na plataforma Benchmark (Ventana, Tucson, AZ, USA). Eles avaliaram a expressão de PD-L1 tanto nas células tumorais como linfócitos infiltrantes tumorais (LITs). O teste foi positivo nas células tumorais quando havia expressão circunferencial linear completa e/ou parcial na membrana plasmática de qualquer intensidade. A positividade do PD-L1 foi determinada baseada em “*cut-offs*” de 1% e 5%. Nos LITs, a reação foi considerada positiva tanto na marcação de membrana ou citoplasma de qualquer intensidade. A prevalência de PD-L1 global foi de 6,6% (27/407) dos casos com expressão em 6,1% (20/326) dos casos de CPT, 7,6% (5/66) dos casos de CFT e 22,2% (2/9) dos casos de CAT. A maioria dos casos de CPT PD-L1+ teve intensidade fraca (1+) e em menos de 5% de células positivas. Um dado interessante observado foi que quando

aumentou o “*cut-off*” para 5% a positividade do PD-L1 no CPT diminuiu para 0,9% (3/326). Além disso, foi observado que todos os casos de CFT e CAT que foram positivos para PD-L1, tiveram intensidade forte (2+ e 3+). Não foi observado associação do PD-L1 com idade, sexo, tamanho tumoral, estágio, metástase inicial, recidiva e mutação do BRAF e TERT. A baixa prevalência de PD-L1 no CPT que foi reportada pode ser justificada pela reação ter sido feita em TMA, uma vez que devido à heterogeneidade intratumoral do PD-L1 alguns casos positivos podem ter sido perdidos.

Em um estudo retrospectivo na Austrália, Aghajani et al.<sup>22</sup> investigou a expressão do PD-L1 e a densidade dos LITs nos espécimes de CPT e a associação com características clínico-patológicas e a SLD. A amostra foi composta de 75 espécimes de CPT, sendo 48 (64%) a forma clássica e 27 (36%) a variante folicular. O estudo usou na IHQ o clone 22C3 do PD-L1 (1:100, DAKO) na plataforma Leica Bond III *Immuno-Autostainer*. O escore de avaliação do PD-L1 foi estimado em um percentual quantitativo com expressão parcial ou completa dentro do citoplasma e/ou membrana variando entre: 1 (<1% das células); 2 (1%-10% das células); 3 (11%-33% das células); 4 (34%-66% das células) e 5 (67%-100%). Do ponto de vista qualitativo, quantificaram a intensidade em: 0 (nenhuma), 1+ (leve), 2+ (moderada) e 3+ (intensa). Finalmente, *Allred score* (variando de 1 a 8) foi calculado pela soma do percentual e intensidade. O estudo revelou uma prevalência de PD-L1 60% (45/75) dos casos, com expressão difusa em 20% (15/75) dos casos e com intensidade moderada em 46,7% (35/75) dos casos. Segundo o estudo, houve associação do PD-L1 com EET (p=0.026), invasão angiolinfática (IAL) (p=0.038), tireoidite linfocítica crônica (TLC) (p=0.003), alto número de linfócitos CD4+ (p=0.001) e CD20+ (p< 0.001). Observaram também um aumento significativo na incidência de metástase linfonodal (p=0.031) no grupo PD-L1+/CD8+ baixo. Além disso, não foi encontrada associação entre expressão elevada de PD-L1 e uma menor SLD (p=0.266).

An et al.<sup>109</sup> analisaram a expressão de PD-L1 e PD-1 no CPT e sua correlação com metástase linfonodal em Jinju (Coréia do Sul) no ano de 2009. A amostra foi composta de 116 casos de pacientes com CPT na forma clássica, excluindo, portanto, outras variantes. Foram utilizados como anticorpo para o PD-L1 o clone E1L3N (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) e como anticorpo para o PD-1 o clone ab52587 (Abcam, Cambridge, UK) em amostras de TMA. A reação foi considerada positiva quando tinha expressão distinta em membrana e citoplasma, excluindo-se a reação inespecífica estromal. O número de células positivas para as duas reações foi analisado em duas categorias: células tumorais e células

inflamatórias. Para as células tumorais, a reação foi quantificada quando à expressão em: negativo, grau 1 (1%-50% das células positivas) e grau 2 (51%-100%). Já para as células imunes foi: negativo, grau 1 (1%-10%) e grau 2 (11%-20%). A avaliação qualitativa da expressão da proteína foi apenas negativa ou positiva. A prevalência de PD-L1 nas células tumorais foi de 33,6% (39/116) dos casos e nas células imunes foi de 6% (6/116) dos casos. O estudo mostrou correlação significativa entre a positividade para PD-L1 nas células tumorais e PD-1 nas células tumorais ( $p=0.001$ ) e PD-1 nas células inflamatórias ( $p<0.001$ ). Não houve associação entre PD-L1 e PD-1 no PTC com idade, sexo, estágio T e N. Porém, o estudo reportou associação de PD-L1 no PTC com metástase linfonodal ( $p=0.036$ ).

Na cidade de Aurora, no Colorado (Estados Unidos), Bastman et al.<sup>110</sup> investigaram o papel das células T “exaustas” no CDT usando *real time* PCR (qRT-PCR) e a modulação imune nos cânceres de tireoide agressivos através de IHQ. A amostra que foi submetida ao qRT-PCR foi composta de 92 casos e a que foi submetida à IHQ foi composta de 22 casos de peças cirúrgicas de tireoide de tumores pT4 (incluindo 12 casos de CDT, 8 casos de CAT e 2 casos de CPDT) e 6 de metástases não-linfonodais. O anticorpo para PD-1 foi o clone ab52587 (Abcam) e para o PD-L1 foi o SP142 (Spring Bioscience). A reação de IHQ foi quantificada em uma escala de 1+ a 3+ e o percentual das células positivas foi estimado em: (1= $<1\%$ , 2= $1\%-10\%$ , 3= $11\%-33\%$ , 4= $34\%-66\%$ , 5= $67\%-100\%$ .), gerando um *Allred score* para avaliação das amostras. Foi observado uma prevalência de PD-L1 de 59,09% (13/22) em uma intensidade (1-2+), sendo focal nos casos de CDT e mais difuso nos seis casos de CAT. O PD-L1 também foi expresso em linfócitos intratumorais e peritumorais, estando presente em 10/13 casos PD-L1+. Um dado interessante é que as 06 metástases não linfonodais foram totalmente negativas para o PD-L1. Em 3 casos houve comparação com o tumor primário e todos eles foram negativos para a expressão do PD-L1. Além disso, a mutação do BRAFV600E não teve associação com PD-L1, linfócitos CD-8, linfócitos FoxP3+ e PD-1.

Em um outro estudo interessante baseado na Austrália, Fadia et al.<sup>23</sup> compararam a expressão de PD-L1 por IHQ em pacientes com o diagnóstico de CPT com e sem tireoidite linfocítica (TL) associada. A amostra foi composta de 81 espécimes de tireoidectomia com diagnóstico de PTC entre 2005 e 2012. Utilizaram como anticorpo anti-PD-L1 o clone SP263 (Ventana, USA) na plataforma automatizada Benchmark Ultra Autostainer (Ventana). A reação foi considerada positiva apenas nas células tumorais com marcação de membrana. A expressão do PD-L1 foi avaliada utilizando a intensidade de expressão e o TPS. A intensidade da reação foi quantificada em: 0 (negativa), 1+ (fraca), 2+ (moderado) e 3+ (forte). O TPS foi

graduado em negativo (TPS <1%), expressão fraca (TPS 1-49%) e expressão forte (TPS ≥50%). O tumor foi considerado positivo quando o PD-L1 tinha pelo menos uma intensidade fraca (1+) e TPS baixo (1-49%). O estudo evidenciou expressão de PD-L1 em 16,4% (13/81) dos casos, com 53,8% (7/13) destes apresentando intensidade de 2+ a 3+. Um resultado interessante foi que a expressão de PD-L1 foi significativamente associada com a presença de TL, estando presente em 39,1% (9/23) dos casos com TL contra apenas 6,9% (4/58) nos casos sem TL. Não houve associação do PD-L1 com tamanho (p=0.20), metástase linfonodal (p=0.36), multifocalidade (p=0.21), EET (p=0.72) e ILV (p=0,61). A hipótese dos autores é que a expressão do PD-L1 no CPT pode ser um epifenômeno da doença autoimune da tireoide e que, portanto, a utilidade do PD-L1 como marcador prognóstico deve ser interpretada com cautela.

Em um outro estudo retrospectivo em Beijing (China) , Bai et al. <sup>18</sup> analisaram a expressão de PD-L1, PD-1 e BRAFV600E por IHQ e o significado clínico da expressão dessas proteínas. A amostra foi composta por 110 casos de CPT maiores que 1,0 cm e foram excluídos casos de TL ou TH. Foi utilizado como anticorpo anti-PD-L1 o clone SP142 (Zhongshan Golden Bridge Biotechnology, Beijin, China) na plataforma automatizada BOND-III (Leica Biosystems Ltd., Newcastle, UK). Considerou-se como positivo a marcação em 5% ou mais das células tumorais. A prevalência de PD-L1 foi de 46% (51/110) e com expressão focal em 6/18 casos da variante folicular. Os autores observaram associação com ausência de corpos psamomatosos (p= 0.007); porém, sem associação com os demais parâmetros clínico-patológicos. Além disso, a expressão de BRAFV600E foi correlacionada com o PD-L1 (p=0.004) e a expressão de PD-L1 foi correlacionada com a de PD-1 (p=0.005). Os autores ainda correlacionaram o microambiente tumoral de acordo com a expressão de PD-L1/PD-1 em: (PD-L1+/PD-1+); (PD-L1-/PD-1-) ;(PD-L1+/PD-1-) e (PD-L1-/PD-1+). Foi identificado que pacientes do primeiro grupo tiveram prevalência de 41%, uma positividade para BRAFV600E de 89% e estes poderiam se beneficiar do bloqueio com droga única anti-PD-L1/PD-1, já que são iodo-refratários.

Em um outro estudo americano, Lubin et al. <sup>111</sup> analisaram a influência da tireoidite linfocítica crônica (TLC) e TH na expressão de PD-L1 no epitélio folicular benigno e no CPT, além de avaliar se a expressão de PD-L1 persistia na metástase linfonodal. A amostra foi composta de 5 casos de tireoide sem alteração, 5 casos de TLC, 5 casos de TH, 10 casos de CPT em tireoide normal, 10 casos de CPT em tireoide com TLC e 10 casos de CPT em tireoide com TH. Foi utilizado como anticorpo anti-PD-L1 o clone E1J2J em espécimes cirúrgicos do



arquivo previamente fixados em formalina e embebidos em parafina. A reação foi positiva quando ocorreu qualquer marcação de membrana nas células epiteliais foliculares, sendo parcial ou completa. O estudo apontou alguns resultados interessantes. Não houve positividade para o PD-L1 nos casos de tireoide sem tireoidite associada. Por outro lado, os cinco casos de TH mostraram expressão significativa de PD-L1, variando entre 10-90% de expressão ( $p < 0.01$ ). Já os casos de CPT em contexto de TH demonstraram uma expressão significativa de PD-L1 que persistia no linfonodo metastático. Além disso, os autores observaram uma expressão de PD-L1 no epitélio folicular não neoplásico nos casos de TH. Os pontos negativos do estudo foram a falta de correlação com fatores clínico-patológicos e o pequeno tamanho amostral. Uma hipótese interessante no estudo é que a expressão forte de PD-L1 na TH poderia representar uma resposta adaptativa pela qual células epiteliais foliculares com ausência de expressão de PD-L1 são eliminadas pelo infiltrado autoimune, restando uma maioria de células epiteliais com expressão de PD-L1. Portanto, os autores especulam que o CPT surgindo em fundo de TH pode ser biologicamente diferente do CPT surgindo em tireoide sem inflamação ou TLC, podendo ter impacto no comportamento biológico e uma possível resposta à terapia no CPT.

## **2.16 Estudo brasileiro de PD-L1 no CPT em 2013**

No Brasil, há apenas um estudo avaliando a expressão do PD-L1 no CPT. Cunha et al.<sup>20</sup> investigaram o papel do PD-L1 na evolução dos pacientes com CDT e na correlação desta proteína com outras células imunes infiltrantes tumorais. Os pesquisadores analisaram 407 amostras de tecido de tireoide, incluindo 254 casos de CPT (destes 153 eram da forma clássica, 80 da variante folicular e 20 da variante de células altas), 56 casos de adenomas foliculares (AF) e 40 casos de CFT. Realizaram ainda o pareamento de 18 casos de CPT com os respectivos linfonodos metastáticos excisados durante a cirurgia inicial. A avaliação da proteína PD-L1 se deu tanto por IHQ como pela *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) em amostras de TMA. O anticorpo anti-PD-L1 utilizado foi o ab82059 (pré-diluído, Abcam, Cambridge, UK). O teste foi considerado positivo quando ocorria marcação amarronzada no citoplasma. O percentual de células positivas foi graduado em: 0 (nenhuma célula positiva); 1 (até 10% de células positivas); 2 (10-30% de células positivas); 3 (> 30% de células positivas). Os casos com escore 0 foram considerados negativos e os com escore 1-

3 foram agrupados como positivos. A prevalência encontrada do PD-L1 no CPT foi de 82,5% (209/254) dos casos. No presente estudo, chama atenção o número expressivo de casos positivos para o PD-L1 em condições como bócio com 78,4% (45/58) dos casos, adenoma folicular com 84,3% (47/56) dos casos e carcinoma folicular da tireoide com 87,5% (35/40) dos casos. Além disso, não se identificou associação com sexo ( $p=0.4635$ ), idade no diagnóstico ( $p=0.7911$ ), multifocalidade ( $p=0.4014$ ), invasão capsular ( $p=0.2571$ ), extensão extratireoidiana ( $p=1.000$ ), TL concomitante ( $p=0.1336$ ), metástase no diagnóstico ( $p=0.5090$ ), tamanho tumoral ( $p=0.6274$ ) e estágio ( $p=0.2945$ ).

Com estes resultados encontrados, os autores sugeriram que a análise visual da proteína não foi clinicamente útil em termos de predição de prognóstico. Observaram ainda a diminuição da expressão de PD-L1 em linfonodos metastáticos ( $p=0.0158$ ). Houve ainda associação do PD-L1 com linfócitos CD4+ ( $p=0.04942$ ), linfócitos CD8+ ( $p=0.0003$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0.01283$ ) e linfócitos FOXP3+ ( $p=0.00626$ ). Como achado interessante, observam que tumores com TLC associada apresentaram maiores níveis de PD-L1 ( $61.0188 \pm 11.3663$ ) que tumores sem TLC ( $43.7773 \pm 7.86066$ ;  $P= 0.00647$ ). A análise multivariada confirmou a associação independente entre PD-L1 e TL concorrente ( $p=0.018$ ), sugerindo que o processo inflamatório crônico pode contribuir para a superexpressão de PD-L1 nas células tumorais. A tabela 1 mostra uma visão geral dos principais estudos envolvendo o PD-L1 no carcinoma papilífero de tireoide.

**Tabela 2.** Visão geral dos estudos analisando o “status” da expressão de PD-L1 e associação com fatores clínico-patológicos nos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide.

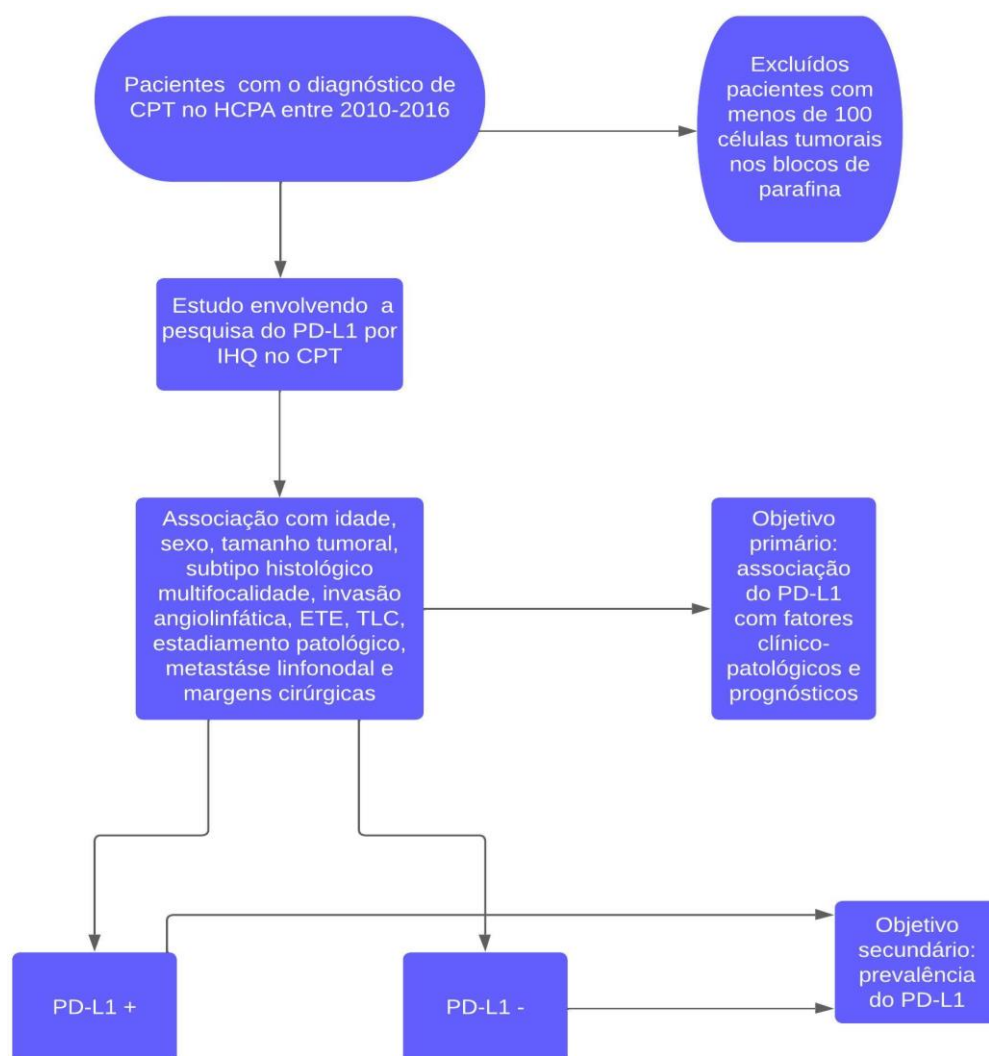
Referência	Amostra	Anticorpo (clone)	Definição de positividade	Interpretação	Prevalência	Associações	Outros achados
Chowdhury et al. <sup>4</sup>	251 casos e 185 de CPT/WTS	E1L3N	NM	Positividade na membrana e/ou citoplasma	66.5% positividade no citoplasma e 40% de positividade na membrana	Estágio, variantes agressivas e SLD	Maior expressão de PD-L1 na TLC e TH
Angell et al. <sup>16</sup>	33 casos/WTS	4059	NM	NM	30.3%	Não avaliado	Associação do PD-L1 com a mutação do BRAF
Shi et al. <sup>108</sup>	260 casos/TMA	Ab174838 MABC290	EI > 6	NM	52.3%	Multifocalidade, EET e SLD	TH diminuiu o impacto negativo do PD-L1.
Ahn et al. <sup>17</sup>	407 casos e 326 de CPT/TMA	SP-142	Cut-offs de 1% e 5%	Membrana parcial ou completa	CPT: 6,1% CFT: 7.6% CAT: 22.2%	Ausente	A intensidade do PD-L1 < no CPT do que no CFT e CAT.
Cunha et al. <sup>20</sup>	407 casos e 253 CPT/TMA	Ab82059	Escore 1 a 3	Citoplasma	82.5% no CPT	TLC e idade avançada	Maiores expressões de PD-L1 nos tumores malignos. Metástase LN com diminuição da expressão de PD-L1.
Bai et al. <sup>18</sup>	110 casos/WTS	SP142	5%	NM	46%	Ausência de CP	Associação com BRAFV600E.
An et al. <sup>109</sup>	116 casos/TMA	E1L3N	Grau 1 e 2	Membrana ou citoplasma	33.6%	Metástase LN	Associação com PD-1 nas CT e CI.
Fadia et al. <sup>23</sup>	81 casos/WTS	SP263	Intensidade fraca e TPS (1-49%)	Membrana	16.4%	TL	-
Aghajani et al. <sup>112</sup>	75 casos/WTS	22C3	Allred ≥ 2	Citoplasma e/ou membrana	66.7%	EET, ILV e TL	Associação com linfócitos CD4+ e CD20+.
Bastman et al. <sup>110</sup>	92 casos de CPT e 22 casos de CDT e CAT	SP142	Allred	NM	59.1% dos CDT/CAT	NM	A expressão do PD-L1 foi focal no CDT e mais difuso no CAT. PD-L1 não foi encontrado na metástase.

Abreviações: WTS: *whole-tissue section*; NM: não mencionado; SLD: sobrevida livre de doença; TLC: tireoidite linfocítica crônica; TH: tireoidite de Hashimoto; TMA: *tissue microarray*; EI: escore de imunorreatividade;

EET: extensão extratireoidiana; CPT: carcinoma papilífero da tireoide; CFT: carcinoma folicular de tireoide; CAT: carcinoma anaplásico de tireoide; LN: linfonodo; CP: corpos psamomatosos; CT: células tumorais; CI: células imunes; TPS: *tumor proportion score* , TL: tireoidite linfocítica; ILV: invasão linfovascular.

### 3. MARCO CONCEITUAL

O CPT possui bom prognóstico, todavia 20-30% dos pacientes desenvolvem recorrência da doença, usualmente em linfonodos locorregionais, e 5-10% metástase à distância. O PD-L1 emerge como um potencial biomarcador de prognóstico apesar dos resultados conflitantes no CPT. O nosso estudo envolveu uma amostra de CPT dos anos de 2010-2016 no HCPA. Realizou-se a pesquisa da expressão da proteína PD-L1 por IHQ. A associação com fatores clínico-patológicos e prognósticos do CPT foi considerado o objetivo primário. Já os dados de expressão do PD-L1 e prevalência configuraram o objetivo secundário.



**Figura 7** – Marco conceitual da avaliação do PD-L1 no carcinoma papilífero da tireoide. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

#### 4. JUSTIFICATIVA

O câncer de tireoide é o tumor endócrino maligno mais comum, com sua incidência aumentando nas últimas décadas em todo o mundo. O CPT é o subtipo mais comum e responsável por aproximadamente 90% dos cânceres de tireoide. Apesar do bom prognóstico desta neoplasia, cerca de 10% dos pacientes com CDT desenvolvem doença primária progressiva invasiva, 5% desenvolvem metástase à distância e 20-30% apresentam recorrência da doença. O PD-L1 que é expresso em uma ampla variedade de tumores é relacionado com as características clínico-patológicas e com o prognóstico do paciente, auxiliando na terapêutica dos pacientes com expressão do eixo PD-1/PD-L1.

Os poucos estudos realizados até agora avaliando a expressão e associação do PD-L1 com variáveis clínico-patológicas e de prognóstico no CPT mostraram resultados divergentes. As explicações para esta variabilidade podem ser devido à múltiplos fatores: (1) metodologia: diferentes plataformas de IHQ, (2) anticorpos primários monoclonais, (3) sistemas de escore e interpretação, (4) tipos de células (células tumorais com ou sem linfócitos) e (5) *cut-offs*. No Brasil até então, existe apenas um estudo avaliando a expressão de PD-L1 por IHC em casos de carcinoma papilífero de tireoide (Cunha et al. <sup>20</sup>, 2013).

O Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) tem um volume estimado de cerca de 50 peças de tireoidectomia ao ano com um número de 30-35 casos diagnosticados como CPT, sendo este um dado relevante pois viabiliza estudos de prevalência e avaliação dos fatores clínico-prognósticos.

Nosso objetivo será o de relatar os níveis de expressão de PD-L1 e sua associação com fatores clínicos e de prognóstico no CPT. Este será o primeiro estudo no país a usar um método de escore padronizado (TPS) em uma amostra de um centro terciário. Não existem outros estudos na América latina avaliando a expressão de PD-L1 no CPT, sendo os poucos estudos relatados derivados dos outros continentes.

Consideramos que o presente estudo, poderá apresentar dados mais completos acerca da prevalência do PD-L1, bem como correlação com os fatores clínico-patológicos do CPT e o conhecimento dos fatores que influenciam a expressão de PD-L1 no microambiente tumoral, o que pode configurar o PD-L1 como biomarcador útil no CPT.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo primário**

Analisar por estudo IHQ a associação do PD-L1 com as seguintes variáveis clínico-patológicas e de prognóstico do CPT (idade, sexo, tamanho tumoral máximo, subtipo histológico, invasão angiolinfática, multifocalidade tumoral, extensão extratireoidiana, tireoidite linfocítica crônica, estadiamento patológico - AJCC, 8ª edição, metástase linfonodal e margens cirúrgicas).

### **5.2 Objetivos Secundário:**

- Verificar os níveis de expressão e prevalência do PD-L1 nos casos de CPT do HCPA.
- Estimar o potencial uso do PD-L1 como biomarcador no CPT.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahn, D. *et al.* Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Acta Oncol.* 50, 1228–1234 (2011).
2. Pacini, F. *et al.* European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur. J. Endocrinol.* (2006).
3. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Thyroid Cancer. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>. Acesso em 23/10/2022.
4. Chowdhury, S. *et al.* Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. *Oncotarget* 7, 32318–32328 (2016).
5. Durante, C. *et al.* Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2892–2899 (2006).
6. Viola, D. *et al.* Treatment of advanced thyroid cancer with targeted therapies: ten years of experience. *Endocr. Relat. Cancer* 23, R185–R205 (2016).
7. Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V. & Elkord, E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp. Mol. Med.* 50, (2018).
8. Larkin, J. *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 23–34 (2015).
9. Wan, B. *et al.* Association between programmed cell death ligand 1 expression and thyroid cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 100, (2021).
10. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 236, 219–242 (2010).
11. Immunology, M., Saale, H. & Seliger, B. Basis of PD1 / PD-L1 Therapies. 1–14 (2019).
12. Blank, C. & Mackensen, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: An update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 739–745 (2007).
13. Jiang, X. *et al.* Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol. Cancer* 2019 181 18, 1–17 (2019).
14. Paver, E. C. *et al.* Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology* 53, 141–156 (2021).
15. Mehnert, J. M. *et al.* Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody



- pembrolizumab in patients with advanced, PD-L1-positive papillary or follicular thyroid cancer. *BMC Cancer* 19, 196 (2019).
16. Angell, T. E. *et al.* BRAFV600E in papillary thyroid carcinoma is associated with increased programmed death ligand 1 expression and suppressive immune cell infiltration. *Thyroid* 24, 1385–1393 (2014).
  17. Ahn, S. *et al.* Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 24, 97–106 (2017).
  18. Bai, Y. *et al.* In papillary thyroid carcinoma, expression by immunohistochemistry of BRAF V600E, PD-L1, and PD-1 is closely related. *Virchows Arch.* 472, 779–787 (2018).
  19. Zhu, X. *et al.* Specific immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 100, 236–241 (2016).
  20. Cunha, L. L. *et al.* Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocr. Relat. Cancer* 20, 103–110 (2013).
  21. Shi, R.-L. *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Expression in Papillary Thyroid Cancer and Its Correlation with Clinicopathologic Factors and Recurrence. *Thyroid* 27, 537–545 (2017).
  22. Aghajani, M. J. *et al.* Predictive relevance of programmed cell death protein 1 and tumor-infiltrating lymphocyte expression in papillary thyroid cancer. *Surgery* 163, 130–136 (2018).
  23. Fadia, M. *et al.* PD-L1 expression in papillary thyroid cancer with and without lymphocytic thyroiditis: a cross sectional study. *Pathology* 52, 318–322 (2020).
  24. Zhang, G. Q. *et al.* Programmed cell death-ligand 1 overexpression in thyroid cancer. *Endocr. Pract.* 25, 279–296 (2019).
  25. Hayat, M. J., Howlader, N., Reichman, M. E. & Edwards, B. K. Cancer Statistics, Trends, and Multiple Primary Cancer Analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* (2007).
  26. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424 (2018).
  27. Aschebrook-Kilfoy, B., Ward, M. H., Sabra, M. M. & Devesa, S. S. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid* 21, 125–134 (2011).
  28. Hundahl, S. A., Fleming, I. D., Fremgen, A. M. & Menck, H. R. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* (1998).

29. Institute, N. C. SEER Cancer Statistics Review 1975-2008 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2008 National Cancer Institute. *Cancer* (2011).
30. Chen, A. Y., Jemal, A. & Ward, E. M. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. *Cancer* 115, 3801–3807 (2009).
31. Kondo, T., Ezzat, S. & Asa, S. L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 6, 292–306 (2006).
32. Antonelli, A. *et al.* Emerging Therapeutic Approaches for the Most Aggressive Epithelial Thyroid Cancers. *Thyroid Cancer - Adv. Diagnosis Ther.* (2016).
33. Araque, K. A., Gubbi, S. & Klubo-Gwiedzinska, J. Updates on the Management of Thyroid Cancer. *Horm. Metab. Res.* 52, 562–577 (2020).
34. Dean, D. S. & Gharib, H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (2008).
35. Haugen, B. R. *et al.* 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 26, 1–133 (2016).
36. Pacini, F., Castagna, M. G., Brilli, L. & Pentheroudakis, G. Thyroid cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 23, (2012).
37. Cooper, D. S. *et al.* Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* (2009).
38. Ulisse, S. *et al.* Papillary Thyroid Cancer Prognosis: An Evolving Field. *Cancers (Basel)*. 13, (2021).
39. Sisdelli, L. *et al.* A Multifocal Pediatric Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) Harboring the AGK-BRAF and RET/PTC3 Fusion in a Mutually Exclusive Pattern Reveals Distinct Levels of Genomic Instability and Nuclear Organization. *Biology (Basel)*. 10, 1–9 (2021).
40. Ulisse, S. *et al.* Thyroid Imaging Reporting and Data System Score Combined with the New Italian Classification for Thyroid Cytology Improves the Clinical Management of Indeterminate Nodules. *Int. J. Endocrinol.* 2017, (2017).
41. GHARIB, H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and effect. *Mayo Clin. Proc.* 69, 44–49 (1994).
42. Cibas, E. S. & Ali, S. Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Switzerland: Springer, 2018.
43. Melillo, R. M. & Santoro, M. Molecular Biomarkers in Thyroid FNA Samples. *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab.* 97, 4370–4373 (2012).
44. Nikiforov, Y. E. *et al.* Molecular Testing for Mutations in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. (2009).
  45. Alexander, E. K. *et al.* Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *N. Engl. J. Med.* 367, 705–715 (2012).
  46. Haroon Al Rasheed, M. R. & Xu, B. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. *Surg. Pathol. Clin.* 12, 921 (2019).
  47. Agrawal, N. *et al.* Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 159, 676–690 (2014).
  48. Haddad, R. I. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Thyroid Carcinoma, Version 2.2018. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 16, 1429–1440 (2018).
  49. Gharib, H. *et al.* American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and associazione medici endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules -2016 update. *Endocr. Pract.* 22, (2016).
  50. Tuttle, R. M., Haugen, B. & Perrier, N. D. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 27, 751–756 (2017).
  51. Tuttle, R. M. & Alzahrani, A. S. Risk Stratification in Differentiated Thyroid Cancer: From Detection to Final Follow-up. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 4087–4100 (2019).
  52. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 93–99 (2017).
  53. Tuttle, R. M., Haugen, B. & Perrier, N. D. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 27, 751–756 (2017).
  54. Hulse, K., Williamson, A., Gibb, F. W., Conn, B. & Nixon, I. J. Evaluating the predicted impact of changes to the AJCC/TMN staging system for differentiated thyroid cancer (DTC): A prospective observational study of patients in South East Scotland. *Clin. Otolaryngol.* 44, 330–335 (2019).
  55. Kim, M. *et al.* Comparison of the Seventh and Eighth Editions of the American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 27, 1149–1155 (2017).
  56. Kim, M. *et al.* Eighth edition of tumor-node-metastasis staging system improve

survival predictability for papillary, but not follicular thyroid carcinoma: A multicenter cohort study. *Oral Oncol.* 87, 97–103 (2018).

57. Durante, C. *et al.* Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2892–2899 (2006).
58. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264 (2012).
59. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nat.* 2017 5417637 541, 321–330 (2017).
60. Madore, J. *et al.* PD-L1 Negative Status is Associated with Lower Mutation Burden, Differential Expression of Immune-Related Genes, and Worse Survival in Stage III Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 22, 3915–3923 (2016).
61. Hellmann, M. D. *et al.* Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 33, 853–861.e4 (2018).
62. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887 (1992).
63. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704 (2008).
64. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895 (1992).
65. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544 (2009).
66. Staron, M. M. *et al.* The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. *Immunity* 41, 802–814 (2014).
67. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5, 1365–1369 (1999).
68. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* (2000).
69. Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* 8,

- 239–245 (2007).
70. Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L. & Zhang, X. D. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 409–416 (2016).
  71. Akinleye, A. & Rasool, Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J. Hematol. Oncol.* 12, 1–13 (2019).
  72. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 8, 1069–1086 (2018).
  73. Han, Y., Liu, D. & Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 10, 727 (2020).
  74. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *CANCER Discov.* 1069 (2018).
  75. Nurieva, R. *et al.* T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J.* 25, 2623–2633 (2006).
  76. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3015–3029 (2009).
  77. Ilie, M., Hofman, V., Dietel, M., Soria, J. C. & Hofman, P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Archiv* (2016).
  78. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800 (2002).
  79. Taube, J. M. *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* (2012).
  80. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* (2014).
  81. Parsa, A. T. *et al.* Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.* 13, 84–88 (2007).
  82. Marzec, M. *et al.* Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20852–20857 (2008).
  83. Han, Y., Liu, D. & Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 10, 727–742 (2020).
  84. Akbay, E. A. *et al.* Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov.* 3, 1355–1363 (2013).

85. Patel, S. P. & Kurzrock, R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 14, 847–856 (2015).
86. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nat.* 2014 5157528 515, 568–571 (2014).
87. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27, 450–461 (2015).
88. Spranger, S. *et al.* Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 200ra116 (2013).
89. Xia, A., Zhang, Y., Xu, J., Yin, T. & Lu, X. J. T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front. Immunol.* 10, 1719 (2019).
90. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111–122 (2007).
91. Diggs, L. P. & Hsueh, E. C. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomark. Res.* 5, (2017).
92. Garon, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* (2015).
93. Kazandjian, D. *et al.* Benefit-Risk Summary of Nivolumab for Patients With Metastatic Squamous Cell Lung Cancer After Platinum-Based Chemotherapy: A Report From the US Food and Drug Administration. *JAMA Oncol.* 2, 118–122 (2016).
94. Postow, M. A. *et al.* Peripheral and tumor immune correlates in patients with advanced melanoma treated with nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) monotherapy or in combination with ipilimumab. *J. Transl. Med.* 12, O8 (2014).
95. Kefford, R. *et al.* Clinical efficacy and correlation with tumor PD-L1 expression in patients (pts) with melanoma (MEL) treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475. *J. Clin. Oncol.* 32, 3005 (2014).
96. Schmid, P. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 379, 2108–2121 (2018).
97. Burtneß, B. *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)* 394, 1915–1928 (2019).
98. Chen, L. & Han, X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J. Clin. Invest.* 125, 3384–3391 (2015).
99. Cabanillas, M. E., Zafereo, M., Gunn, G. B. & Ferrarotto, R. Anaplastic Thyroid

- Carcinoma: Treatment in the Age of Molecular Targeted Therapy. *J. Oncol. Pract.* 12, 511–518 (2016).
100. Chintakuntlawar, A. V. *et al.* Expression of PD-1 and PD-L1 in Anaplastic Thyroid Cancer Patients Treated With Multimodal Therapy: Results From a Retrospective Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 1943–1950 (2017).
  101. Iyer, P. C. *et al.* Salvage pembrolizumab added to kinase inhibitor therapy for the treatment of anaplastic thyroid carcinoma. *J Immunother Cancer* (2018).
  102. Kollipara, R., Schneider, B., Radovich, M., Babu, S. & Kiel, P. J. Exceptional Response with Immunotherapy in a Patient with Anaplastic Thyroid Cancer. *Oncologist* 22, 1149–1151 (2017).
  103. McLaughlin, J. *et al.* Quantitative assessment of the heterogeneity of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncol.* (2016).
  104. Kulangara, K. *et al.* Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 143, 330–337 (2019).
  105. Schildhaus, H. U. Predictive value of PD-L1 diagnostics. *Pathologe* 39, 498–519 (2018).
  106. Twomey, J. D. & Zhang, B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS J.* 23, (2021).
  107. de Ruiter, E. J. *et al.* Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mod. Pathol.* 34, 1125–1132 (2021).
  108. Shi, R. L. *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Expression in Papillary Thyroid Cancer and Its Correlation with Clinicopathologic Factors and Recurrence. *Thyroid* 27, 537–545 (2017).
  109. An, H. J. *et al.* Programmed death-ligand 1 expression and its correlation with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *J. Pathol. Transl. Med.* 52, 9–13 (2018).
  110. Bastman, J. J. *et al.* Tumor-Infiltrating T Cells and the PD-1 Checkpoint Pathway in Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 2863–2873 (2016).
  111. Lubin, D. *et al.* Papillary Thyroid Carcinoma Emerging from Hashimoto Thyroiditis Demonstrates Increased PD-L1 Expression, Which Persists with Metastasis. *Endocr. Pathol.* 29, 317–323 (2018).
  112. Aghajani, M. J. *et al.* Predictive relevance of programmed cell death protein 1 and tumor-infiltrating lymphocyte expression in papillary thyroid cancer. *Surg. (United States)* 163, 130–136 (2018).

## **7. ARTIGO**



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi o primeiro no Rio Grande do Sul a avaliar os níveis de expressão e prevalência do PD-L1 no CPT e a associação com fatores clínico-patológicos. Nós buscamos avaliar o papel do PD-L1 como biomarcador no CPT, sendo que este estudo foi o primeiro no Brasil a padronizar o método de escore do PD-L1 pelo TPS em uma plataforma “*companion diagnostic*”. Consideramos que os nossos objetivos tenham sido contemplados pelos resultados encontrados em uma amostra de 121 casos. Pode-se concluir que pacientes com TLC têm maior chance de expressar PD-L1 e a EET tem uma tendência a influenciar na expressão desta proteína. Estes dados corroboram estudos mais recentes que identificaram o papel da TLC na expressão do PD-L1, demonstrando, portanto, o papel do sistema imune no desenvolvimento e progressão dos tumores.

Como objetivos secundários identificamos uma expressão do PD-L1 de 33,1% dos casos de CPT o que vai em consonância com estudos com um tamanho amostral próximo do nosso. Não foi observado diferença entre a expressão de PD-L1 nos diferentes subtipos histológicos; todavia, só tivemos na amostra 3 casos de variantes classicamente agressivas e em uma delas (variante de células altas) tivemos expressão moderada do PD-L1. Por fim, pacientes com CPT associados com TLC e que apresentam expressão de PD-L1 (resistência imune adaptativa) poderiam apresentar potencial benefício clínico com imunoterapia.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, queremos ampliar o nosso tamanho amostral, incluindo um outro centro terciário para maiores inferências acerca da associação do PD-L1 com fatores clínico-patológicos. Além disso, planejamos obter dados mais fidedignos acerca do “*follow-up*” destes pacientes como: recidiva, SLD e SG. Neste estudo, estes dados não foram contemplados devido à perda de seguimento de vários pacientes e uma grande parcela dos pacientes derivou dos convênios privados e que não mantinham o “*follow-up*” nesta instituição.

Acreditamos que os dados encontrados no nosso estudo possam ser utilizados em outros estudos para fazer outras análises que não tenham sido contempladas neste estudo. De forma pioneira, listamos um banco de dados dos casos de CPT derivado dos anos de 2010-2016 com inúmeras informações pertinentes.

Projetamos avaliar em um estudo futuro a relação do PD-L1 com o BRAFV600E no CPT em amostras de “*cell-block*” decorrentes das PAAF's de tireoide realizadas no ambulatório CPDA do HCPA. Entendemos que a informação prévia da expressão do PD-L1 em amostras de “*cell-block*” poderia auxiliar as equipes clínicas em uma melhor estratificação de risco e guiar o manejo terapêutico destes pacientes.

## 10. ANEXO E/OU APÊNDICES

### Anatomical Quality Assurance (AQUA) Checklist



### Anatomical Quality Assurance (AQUA) Checklist

*"For improving the quality and reporting of anatomical studies."*

Checklist Component	#	Description and Recommendation:	Page Number*
<b>Title</b>			
Title	1	Identify the main objective or key characteristic of the study in the title.	p. 56
<b>Abstract</b>			
Structured Summary	2	Provide a clear and structured summary of the study with emphasis on the aims, methodology, key findings, and conclusions directly supported by study findings.	p. 56
<b>Introduction</b>			
Background / Rationale	3	Provide a rationale for the study including a concise, updated scientific background, appropriately referenced. Identify any relevant knowledge gaps to support the study rationale.	p.57-58
Objective	4	Indicate clearly the main objective(s) of the study, and state any hypotheses to be tested.	p.58
<b>Methodology</b>			
Study Design and Fundamentals	5	Provide precise details with respect to the design and fundamentals of the study, including but not limited to the following: 1. Study design: prospective, retrospective, cross-sectional, etc. 2. Study type: cadaveric (e.g. formalin fixed or fresh frozen), imaging, intraoperative, etc.	p.58
Setting	6	Describe clearly the location where the study was conducted and dates (month/year) between which the data were collected.	p.58
Sample Size	7	When appropriate, statistical power analysis should be used to calculate sample size or effect size. If relevant, justification for the study sample size should be briefly stated.	p.59
Subjects	8	Define clearly the eligibility criteria and methods of subject selection and inclusion, with details of the baseline and demographic selection criteria of the subjects (age, sex, healthy or diseased etc.) included in the study.	p.58
Reference Standard	9	Define clearly and accurately all anatomical definitions (normal anatomy, variations, classifications, etc.) by which data will be collected, analyzed, and compared. Citations should be included when appropriate.	p.58
Outcomes and/or Parameters	10	Define clearly the outcomes and parameters (e.g. prevalence of a variation, mean length and diameter of a structure, etc.) assessed in the study. When present, confounders should be clearly stated.	p.58-59
Measurement and Assessment	11	Indicate clearly the group of subjects included in each measurement/assessment (source of data). Provide clear details about the methods of measurement/assessment of each outcome and/or parameter (e.g. reference points for length measurements, internal or external diameter, etc.).	p.58-59
Modality	12	Describe clearly the materials, equipment, and instruments used (with manufacturer/supplier details) to conduct the specific study design.	p.58
Technique	13	Describe precisely the methods (e.g. dissection technique, image reconstruction, etc.) applied in the study to allow for reproducibility. Relevant details (profession, years of experience) regarding the individual(s) performing the technical aspect of the study are recommended.	p.58-59

Bias	14	Identify any potential source of bias and, when present, describe measures implemented to assess the risk of bias.	p.58
Statistical Approach	15	Describe all statistical methods for analyzing the data, including those of confounders. Statistical methods for additional analyses (e.g. subgroup/sensitivity analyses), when performed, should be described.	p.59-60
Ethics	16	Provide the details of compliance with ethical guidelines, including the name of the review board or agency, approval number, and date. AQUA endorses the Helsinki Declaration and its later amendments. When appropriate, details of written, informed consent should be clearly stated.	p.58
<b>Results</b>			
Subjects	17	Report the numbers of subjects included in the study, including data on their baseline and demographic characteristics. When needed, provide reason(s) and data on characteristics of the subjects excluded from the study at any stage.	p.58
Main Results	18	Provide unaltered/non-manipulated summary data (number [percentage]) or estimates (with confidence intervals and values of consistency when applicable) from the analyses performed. Tabular presentation of the results is highly recommended.	p.59-60
Descriptive Anatomy	19	Present clear and comprehensible figures (i.e. images, illustrations, diagrams, etc.), labeled as appropriate, to explain the results where needed AND describe clearly any anatomical findings that could be ambiguous, questionable, or atypical. New classifications of anatomical variations should be complemented by representative figures and corresponding dissection/imaging photographs.	p.65-69
Confounders	20	Present precise data from assessment/measurement of confounders, if any.	p.60
Additional analyses	21	Provide clear results of additional analyses (e.g. subgroup/sensitivity analyses), if performed. Tabular presentation of the results is highly recommended.	p.60
<b>Discussion</b>			
Key Findings	22	Include summary of key evidence/findings from the study pertaining to the rationale/objectives of the study. No new study results should be presented in the discussion.	p.60-62
Interpretation and Comparison(s)	23	Provide comprehensive (but judicious) interpretation of the results from the study, and comparison and/or reference to the results from other studies on the topic, appropriately cited. Meaningful clinical impact/significance of the findings from the study should be discussed where relevant.	p.60-62
Implication(s)	24	State briefly the implications of the findings or potential areas of the study that require further research.	p.60-62
Limitation(s)	25	Discuss briefly limitations of the study at any stage, including risk of bias, potential confounders, or intraobserver and/or interobserver variability.	p.62
<b>Conclusions</b>			
Summary	26	Summarize the key information (i.e. "take-home message") directly supported by the findings/evidence from the study.	p.62
<b>Other Information</b>			
Acknowledgement	27	Acknowledge individual(s), institution(s), or third parties who significantly contributed to the study.	-
Conflict of interest	28	Disclose any conflicts of interests related to the study for all contributing authors.	-
Funding	29	Describe sources of funding for the study and any other support.	-

\* If an item is not applicable to the study, mark N/A in the page number box.

Tomaszewski KA, Henry BM, Ramakrishnan PK, et al. Development of the Anatomical Quality Assurance (AQUA) Checklist. *Journal of the American College of Surgeons*. 2018;126(4):e1-e11. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2018.02.001

Page 2 of 2

