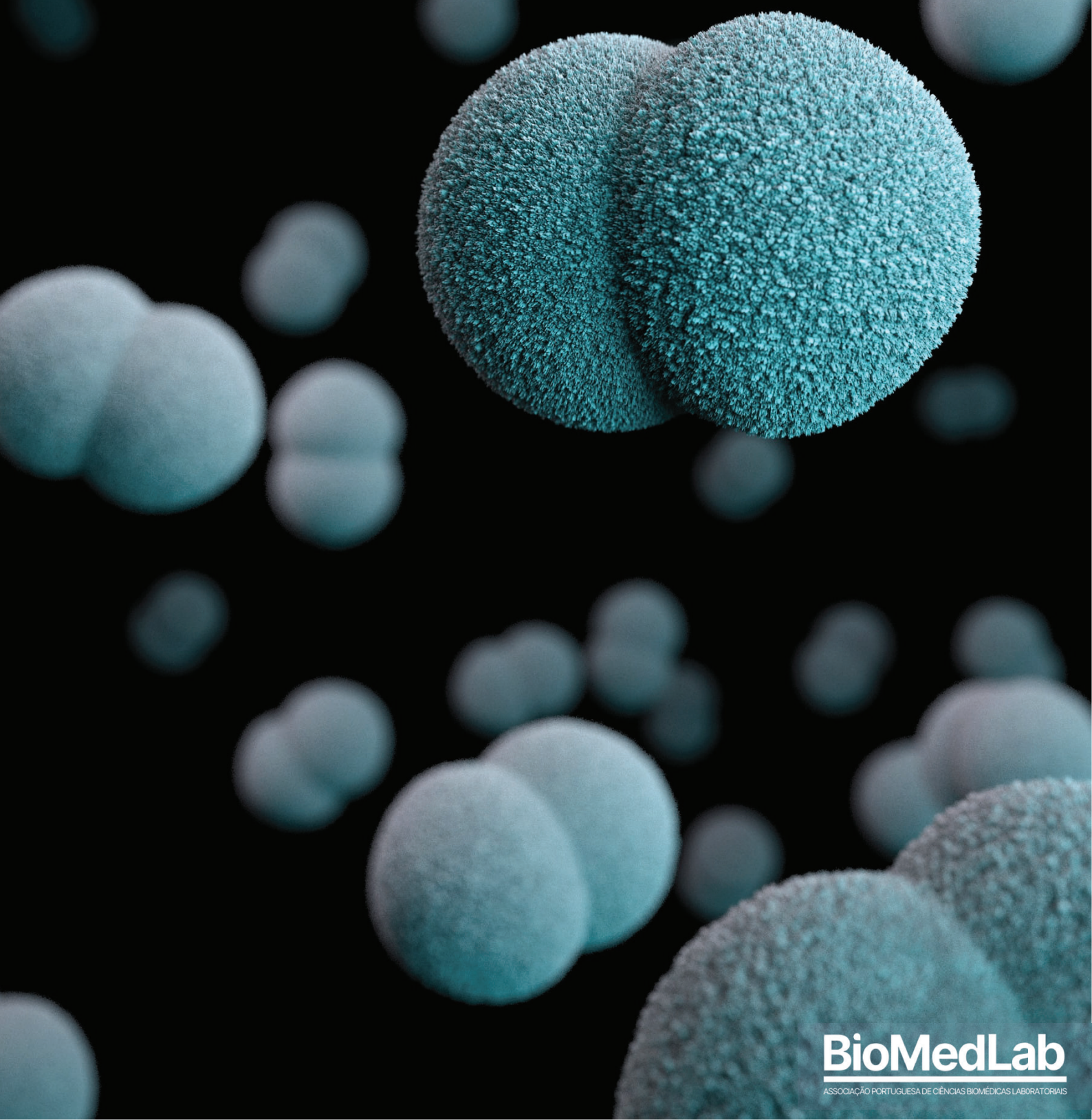


TRENDS IN

Biomedical Laboratory Sciences



BioMedLab

ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS LABORATORIAIS

TRENDS IN Biomedical Laboratory Sciences

Ficha Técnica

Trends in Biomedical laboratory
Sciences
Volume 2, N.º1, 2024

Periodicidade

Anual

Direcção/Edição

Diana Martins

Conselho Editorial

Fernando Mendes
Josiana Vaz
Rúben Roque
Sílvia Fernandes
Vera Calhau

Propriedade

BioMedLab- Associação Portuguesa de
Ciências Biomédicas Laboratoriais

Imagem e Comunicação

Carolina Melo
Raquel Lopes

Contato

revista@abiomedlab.org

Editorial	1
-----------	---

Destaque:

BRCA1/2: a new approach to therapy	3
------------------------------------	---

Uso racional dos testes de diagnóstico <i>in vitro</i>	12
--	----

Perspectives on the future of potential biomarkers alongside PD-L1 in NSCLC- A systematic review	27
--	----

Influência da expressão do recetor de androgénio, p53, BCL2 e Ciclina D1 no prognóstico do cancro de mama nos homens.	49
---	----

Suicídio em Portugal entre os anos de 2017 e 2021	56
---	----

Óleos Naturais como substitutos do uso de Xileno na etapa de Diafanização do Processamento Histológico- Revisão Sistemática da Literatura	69
---	----

Técnica de disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de cancro colorretal: revisão da literatura	80
---	----

Editorial

Juntos construímos conhecimento

É com enorme satisfação que apresentamos o segundo número da Trends in Biomedical Laboratory Sciences, a Revista Científica da Associação Portuguesa de Ciências Biomédicas Laboratoriais, dirigida a todos os profissionais de saúde que atuam na área da Biomedicina Laboratorial, estudantes e investigadores. Pretende-se que seja um meio de divulgação de excelência para a partilha de conhecimento, assim como de boas práticas laboratoriais, sendo um instrumento promotor de inovação e qualidade nas Ciências Biomédicas Laboratoriais.

A realização de investigação científica é uma atividade fundamental para a valorização da saúde. As decisões em saúde, muitas vezes encontram-se associadas à incerteza e risco, necessitando obrigatoriamente de uma abordagem científica, bem como de boa qualidade e rigor para credibilizar as boas práticas clínico-laboratoriais. Acresce o avanço cognitivo constante do diagnóstico, da terapêutica e da monitorização, originando por vezes dificuldades de atualização a quem tem a responsabilidade de proporcionar melhores cuidados de saúde.

Neste sentido, a investigação é um alicerce indispensável para uma boa prática clínico-laboratorial, assumindo a Trends in Biomedical Laboratory Sciences, um papel fundamental para potenciar a investigação e partilha do conhecimento em Ciências Biomédicas Laboratoriais em Portugal.

O segundo número da Trends in Biomedical Laboratory Sciences apresenta ainda uma novidade. Os artigos e os resumos publicados nos suplementos desta revista, têm International Standard Serial Number (ISSN), que é um código numérico que constitui um identificador internacional unívoco para cada título de publicação em série. O sistema ISSN é definido pela norma ISO 3297: 2017 - Information and Documentation. International Standard Serial Number ISSN, gerida pelo ISSN International Centre.

Merece ainda destaque o II Congresso da BioMedLab, em Coimbra. Com o intuito de divulgação e partilha de conhecimento, a Trends in Biomedical Laboratory Sciences desenhou um Suplemento no qual constam as comunicações orais e posters apresentados no Congresso.

Parabéns a todos os que contribuem para a afirmação das Ciências Biomédicas Laboratoriais, não podendo deixar de dar uma palavra muito especial à equipa editorial e todos aqueles que contribuíram para a publicação do segundo número da Trends in Biomedical Laboratory Sciences.

Quanto aos autores, desafio-os a fazerem da Trends in Biomedical Laboratory Sciences, a vossa revista de preferência, mantendo viva a chama da ciência e do conhecimento nas Ciências Biomédicas Laboratoriais!

Editora
Diana Martins



Editorial

Aos Bravos que Ousaram Ousar!

As Ciências Biomédicas Laboratoriais em Portugal tem tido um percurso vertiginoso, desde a sua constituição enquanto formação académica no ano de 2014. Importa referir que em Portugal, esta formação até 2014 era representada por duas formações académicas distintas: as Análises Clínicas e Saúde Pública e Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica.

Aos pioneiros que lideraram estas profissões no meio académico (professores e alunos), nos seus locais de trabalho e nas associações profissionais existentes à data, importa hoje reconhecer e partilhar uma palavra de apreço pelos feitos conseguidos para as Ciências Biomédicas Laboratoriais, honrando desta forma o percurso realizado.

Contundo as Ciências Biomédicas Laboratoriais pressionadas pela rápida transformação da Biomedicina Laboratorial (associada à evolução científica e tecnológica), às necessidades do Serviço Nacional de Saúde na prestação de cuidados de saúde, bem como a um mercado de trabalho europeu regulado, fluído e com comparabilidade profissional, contribuíram para o surgimento em Portugal da Associação Portuguesa de Ciências Biomédicas Laboratoriais (BioMedLab).

A BioMedLab emerge de um grupo de bravos, permitam-me a ousadia de lhes chamar bravos, que ousaram fazer o que nunca tinha feito e que se apercebendo da rápida evolução e transformação destas ciências da saúde, associado a uma necessidade efetiva de comparabilidade Europeia e Internacional, criaram a BioMedLab.

Constituindo-se numa comissão instaladora, um grupo de colegas trabalhando semanalmente do zero criaram estatutos, identidade visual, website, uma revista Científica a Trends in Biomedical Laboratory Sciences, e programaram formação continua profissional através de webminares e o Congresso BioMedLab para os colegas. Esta é a parte visível de muitas reuniões e de trabalho realizado silenciosamente. Este é o momento de lhes agradecer publicamente o trabalho realizado. Muito obrigado!

Mas a necessidade imperiosa de ter uma direção e liderança, proporcionou a realização de eleições. Estas decorreram durante o mês de fevereiro, tendo sido eleita a lista P. A mim coube-me a tarefa de liderar a primeira lista e ser Presidente da direção da BioMedLab.

Tenho a plena consciência de que os desafios serão mais que muitos, contudo conto com uma equipa de colegas, que trabalhando colaborativamente e com uma vontade inigualável de fazer diferente. Juntos tudo faremos pela afirmação da Ciências Biomédicas Laboratoriais em Portugal.

Desta forma a BioMedLab tenciona dialogar com todos os atores na área da Biomedicina Laboratorial, outras Associações Profissionais, Fórum das Tecnologias da Saúde, Ordens Profissionais e diferentes Organismos do Estado Português para elevar e defender as Ciências Biomédicas Laboratoriais em Portugal e a criação de uma profissão única. Mas Portugal encontra-se na Europa e integra a União Europeia; a globalização transformou o Mundo, tornando-o numa aldeia, e como tal a BioMedLab, tenciona não se confinar a Portugal, colaborando e reconhecendo a importância de integrar redes internacionais participando ativamente nestas.

Todos os profissionais das Ciências Biomédicas Laboratoriais e associados da BioMedLab têm a plena consciência que a atividade clínico-laboratorial está em constante evolução devido ao progresso científico e à exigência das boas práticas clínico-laboratoriais. A BioMedLab não fica indiferente a esta realidade, tenciona ser um fator aglutinador na na formação profissional contínua, contribuindo ainda para a integração da investigação nos cuidados de saúde e os seus resultados serem efetivamente disseminados através da Trends in Biomedical Laboratory Sciences.

Longa vida à BioMedLab. Que esta seja a Associação Profissional de todos, que as diferenças existentes sejam esbatidas, que surja o diálogo efetivo e uma profissão única em Portugal, pois as Ciências Biomédicas Laboratoriais são muito mais que a soma das partes.

Presidente BioMedLab
Fernando Mendes



Review

BRCA1/2: a new approach to therapy

Filipa Joia ^{1,*} and Joana Tente ¹¹ Centro Hospitalar Barreiro Montijo, EPE

* Correspondence: filipaajoia@gmail.com;

Abstract: Breast Cancer Genes 1 and 2 (BRCA1 and 2) are involved in the repair of deoxyribonucleic acid (DNA) double-strand breaks (DSB) and are associated with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC). There are common mutations in these genes associated with a founder effect, like the Alu insertion which has Portuguese origin and it's the most prevalent in this country. Individuals with BRCA pathogenic variants are at a greater risk of developing several types of cancer. Genetic counselling is essential in this clinical context, as these patients can undergo risk-reducing surgeries or even neoadjuvant chemotherapies to prevent cancer development. Nevertheless, the development of other solutions on a molecular level can also be extremely helpful. As we know, the lack of DNA damage repair genes, such as BRCA1/2, leads to accumulation of DNA errors. Usually, the tumour cell can find a way around this, using other proteins to correct DNA strand breaks, such as Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) and keep proliferating. Knowing this, researchers try to inhibit this pathway and consequently promote cell death. However, these mechanisms create resistance over time, as the cell tries to compensate this inhibition using other mechanisms, and new therapies or combinations are needed to prolong the action and guarantee the highest possible disease-free survival for the patient. As a result, the same drugs used to treat BRCA mutations are now being used to manage non-BRCA mutation associated cancers, as studies have shown efficiency even in nonmutation carriers groups. This review will discuss the current therapeutic strategies and how new approaches are changing the outcome for patients.

Keywords: BRCA; Cancer; Hereditary Syndrome; PARP inhibitors; Therapeutics.

Citation: Joia, F.; Tente, J. BRCA1/2: a new approach to therapy. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2024 Mar 2; 2(1): 3-11

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: September 2023

Accepted: October 2023

Published: march 2024

1. Introduction

Cancer is the second most common cause of death in Portugal, according to the latest report from The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). In this report, despite having an estimated incidence of cancer per 100,000 inhabitants below the European Union (EU) average and a higher survival rate for the most common cancers than most of the other European countries, Portugal still has a long way to go in terms of prevention, reduction of risk factors, early detection, and specific healthcare (1).

Although 90% of cancers are sporadic (dependent of environmental and lifestyle factors such as workplace, diet, etc.), 10% are associated with hereditary syndromes. In these cases, germline pathogenic variants are transmitted from parents to children and lead to a predisposition for certain types of tumours (2-4).

This review will focus on germline mutations of Breast Cancer Genes 1 and 2 (BRCA1 and 2) and the Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC). It will discuss the current therapeutic strategies and how new genetic approaches are changing the outcome for patients worldwide.

1.1 Hereditary cancer associated with BRCA mutations

There are family syndromes that increase the risk of developing cancer and are the result of germline mutations in important genes for tumour progression. HBOC is responsible for approximately 5% to 10% of diagnosed cases of breast cancer (BC) and 15% of ovarian cancer (OC) cases (2). This syndrome is characterized by variants in the BRCA genes, with relatively common mutations, with a ratio of 1:1000 in BRCA1 and 1:500 in BRCA2; They are more frequent in certain population clusters (e.g., individuals with Ashkenazi Jewish ancestors [variant in BRCA1: 285delAG and BRCA2: 6174delT]) (3, 5).

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Science

This syndrome has autosomal dominant inheritance, which means that any carrier of the BRCA1 and/or BRCA2 mutation, male or female, has a 50% chance of transmitting the mutation to their descendants (2).

Individuals with pathogenic variants in these two genes have a higher risk of developing cancer throughout their lives, namely 50% to 85% more risk of developing BC than the normal population (around 11%), for women, while men have a lower probability (<1% for BRCA1 mutations, and 6% for BRCA2 mutation). Women with no mutation have between 1% and 2% risk of developing OC, while the risk for women carrying mutations in BRCA1 and 2, is respectively, 40% and 20%. On the other hand, for prostate cancer, between 24% and 36% of men with mutations in these genes have high risk, while in the population without the mutation the risk is 12% (3, 5, 6).

Not everyone with BRCA1 or BRCA2 germline pathogenic variants will develop cancer, despite the increased risk. However, research suggests that BRCA mutations are associated with tumour aggressiveness and poor prognosis (7).

1.2 Breast cancer genes 1 and 2

The BRCA genes were first described in the early 1990s and it was quickly realized that despite being present in all individuals, some people had mutations that increased the risk of developing breast and ovarian cancer (8).

BRCA1 is present not only in endocrine tissues but also in neuroepithelial cells. BRCA2 is expressed in a wide variety of tissues, mostly in the breast and thymus. More than 2000 variants of these genes have already been described, often associated with family, ethnic and/or geographic location clusters (6). 80% of these variants are point mutations or deletions/insertions (9), which result in changes in the reading frame, truncated proteins, and variations in the splicing site (6).

These genes are highly involved in the repair of DNA double-strand breaks (DSB), by recognizing the break sites and allowing repair by homologous recombination (HR). When there's a deficiency in these proteins, these DSB are not repaired, and this can result in abnormal cells. Therefore, the BRCA genes act as tumour suppressor genes, regulate DNA synthesis, and play an important role in DNA repair, transcriptional regulation, cell growth and maintaining of genomic integrity (8, 9).

Around 70% to 80% of pathogenic variants of these genes result in non-functional proteins or their absence (8).

BRCA1 is located near the centromere on chromosome 17q21. It has 23 exons (NM_007294.4) and encodes a protein with 1863 amino acids. It is in S phase that the greatest amount of BRCA1 protein is observed, remaining during G2/M phase and decreasing in G1. This gene encodes domains with different functions: in the N-terminal region it contains a Really Interesting New Gene (RING) domain whose purpose is to interact with the BRCA1 Associated RING Domain 1 (BARD1) and form the E3 ubiquitin ligase complex; in the C-terminal region there are two binding peptides that maintain the interaction of BRCA1 with key proteins in DNA repair such as the CtIP binding protein (C-terminal Interacting Protein). In the middle of the BRCA1 gene we can find two nuclear localization signals (NLS) and one coiled coil domain, which allow the BRCA1 to locate and interact with the BRCA2 protein (8, 9, 10).

The BRCA2 gene (NM_000059.4) is located on chromosome 13q12.3. It has 27 exons (26 coding exons), giving origin to a protein with 3418 amino acids. This gene contains, in the centre, a BRC (multiple repeats) domain, which is involved in the binding to the RAD51 recombinase during DNA repair; in the N-terminal region, it has a transcriptional activation domain (TAD); in the opposite region is the DNA-binding domain, which allows binding to double- and single-stranded DNA. In the C-terminal, it contains two NLS domains and one TR2. Tumours with BRCA2 mutations generally exhibit loss of heterozygosity (LOH) of the normal allele (8, 9, 11).

The most frequent germline variant is a 6174delT frameshift mutation, which was found in exon 11 of the BRCA2 gene in Ashkenazi Jews (8). Mutations in BRCA2 increase the risk not only for breast, ovarian and prostate cancer, but also melanoma, pancreatic, bile duct and gastric cancer (8).

1.3 Portuguese founder mutation of BRCA2

Mutations in the BRCA genes are dominant, so transmission to offspring is very common, classifying certain families as high-risk. For geographical and cultural reasons, a phenomenon called "founder effect" occurs. In a community, a certain pathogenic variant is passed from generation to generation, in a population with a common ancestor. This variant will then be found more frequently in that same community. With the flow of people over the centuries, it is often

possible to identify an individual's ancestry by its variant regardless of the location in which the analysis is being carried out.

This was what happened in 2005 in Belgium. A group of researchers was studying a 46-year-old woman of Portuguese ascendance with BC who had in her family at least 6 other cases of the same cancer, 1 OC case, and a variety of other tumours, both in women and men of the family. Under strong suspicion that they were facing a hereditary syndrome, the researchers studied the BRCA genes. To do so, they used the Institution's standard screening protocol (Protein Truncation Test [PTT] on exon 11 of BRCA1 and exons 10 and 11 of BRCA2) and didn't find any sequence abnormalities. However, after doing a Southern blot analysis, Teugels *et al.* found an insertion in exon 3 region of BRCA2 and identified it, with Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequence analysis, as an Alu insertion (c.156_157insAlu). This insertion leads to differences in the splicing region removing all exon 3 of the spliced transcript (6, 12).

After this, many studies emerged to characterize this Portuguese founder mutation (13 – 18). The age of this mutation was placed somewhere around 558 years ago (+/- 215 years), and it's the most common mutation of BRCA2 in Portuguese HBOC families. The most frequent subtype of BC with this mutation is luminal B-like (55,2%) and although none of the patients was a stage IV at diagnosis, 30% developed metastatic progression later (6).

Other variants with possible founder effect were found in Portugal, but more studies will be needed in the future (16).

1.4 Genetic Testing and Counselling

Specific subgroups of the population have been identified as having a higher proportion of individuals who are carriers of BRCA pathogenic variants, including, among others, those who have been diagnosed with triple-negative breast cancer (TNBC) and those who belong to ethnic groups with Ashkenazi Jewish ancestry (2, 19). The identification of BRCA mutations through genetic screening offers the opportunity to improve the monitoring and surveillance of patients with BC and other tumours, while also enabling prophylactic and risk-reducing interventions.

Fifteen relevant international guidelines (8 European, 6 North American and 1 Australian) agree and insist on the importance of genetic counselling before and after testing for BRCA mutations. These recommendations suggest that genetic counselling should be carried out in individuals with a family history of BC, carriers of BRCA mutations and/or in patients with a personal history of BC. It should be noted that these same guidelines agree that no predictive test for genetic mutations should be carried out without the patient being properly informed in a genetic counselling consultation (19). Genetic counselling includes risk assessment by reviewing family and personal medical records, clearly explaining the difference between hereditary and sporadic cancers, and selecting the best index case in the family to study, if there is a disease with a genetic base. An important aspect of these consultations is also the support for affected family members, screenings promotion and improvement of oncological literacy (2, 5, 19). In these consultations, patients with a pathogenic mutation also learn about the prophylactic solutions available to them, as well as the type of oncological surveillance they should undergo. This way, the patient can make conscious and fully informed decisions.

In Portugal, most of hereditary cancer syndromes are followed by the Portuguese Institute of Oncology. This Institute is a highly differentiated organisation belonging to the National Health System and providing specialised care; however, a lot of certified laboratories can also perform these genetic analyses. Usually, blood samples are used to find germline mutations, but formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tumour samples can also be used. The geneticist or the attending physician can request a New Generation Sequence (NGS) analysis and can choose what type of gene panel they want. This panel can be less specific, and just search for BRCA1/2 mutations - evidently, in Portugal it must include the Alu insertion - or it can be more comprehensive, with more signalling pathways represented (20).

It is important to consider that the more germline pathogenic variants found, the greater the impact on the patient's family life. These exams must be considered, understood, and consented to by the patient.

1.5 Prophylactic and risk-reducing surgery

For women who carry BRCA mutations risk-reducing surgery (RRS), which consist of prophylactic bilateral mastectomy, and chemoprevention are often suggested as primary prevention, as well as the use of Magnetic Resonance Imaging (MRI), mammography, and breast ultrasound studies as secondary prevention (6, 21). The American College of Obstetricians and Gynaecologists (ACOG) recommends annual mammography starting at the age of 40 for all women; and annual mammography and MRI starting at the age of 30 for those who have a 20%

or higher risk of developing BC, based on family history, existence of pathogenic variants, among other factors, such as personal history of tumours treated with radiation to the chest. The National Cancer Comprehensive Network (NCCN) recommends almost the same actions as the ACOG but starting at the age of 25 for women with BRCA mutations. The European Society for Medical Oncology (ESMO), in its latest practice guidelines, published in 2022, recommends annual screening, except for BRCA1 mutation, where 6-monthly screening should be considered (2, 19, 22).

Several studies (23 – 26) have suggested that MRI has a more important role in screening these patients, since at young ages it is often difficult to acquire mammograms due to low breast density or the benign appearance of many lesions associated with BRCA; as these tumours are often fast growing, the use of MRI seems to have better results in early diagnosis and survival, as well as cost/benefit for the healthcare service/patient (21).

It has been shown that prophylactic mastectomy leads to a 90% reduction of the risk of BC in women with BRCA1/2 mutations, and that it should only be done after the age of 25, as there are no significant differences in doing it before that age. Even after RRS, the patient should maintain some imaging surveillance, on a case-by-case basis (6, 7, 21).

To reduce the personal and psychological impact on patients, the possibility of allowing nipple sparing mastectomy (NSM) was studied, and two recent studies demonstrated that this does not affect the effectiveness rate of breast reduction, guaranteeing the same decrease in BC risk (27, 28). The reconstructive surgery is highly suggested and should be done at the same time of the RRS (21).

OC is a silent and often aggressive tumour, and, unlike BC, it isn't easily identified on ultrasounds, and screening methods are not usually effective. The risk-reducing role of bilateral salpingo-oophorectomy (BSP) has become important, decreasing not only the risk of OC by 95%, but also the risk of BC by 50%, by inducing early menopause (6, 21). If the patient doesn't want to do the RRS, in this case BSP, transvaginal ultrasound every 6 months and serum CA125 quantification can be considered, although the benefits of this approach are not yet confirmed (2).

There's currently no conclusive evidence of higher survival rates when the uterus is removed at the same time as the ovaries and fallopian tubes. However, it may facilitate the future use of hormonal therapy, if needed, since there is an association between the continued use of tamoxifen and the development of endometrial carcinoma (2, 21).

2. New approach to therapy

The guidelines recommend testing only in individuals with a strong suspicion of a hereditary syndrome, and for specific variants, hence the importance of knowing the founder effect variants in each community. Nevertheless, it's being observed that many patients who do not meet the requirements to be tested present pathogenic variants in BRCA genes (19).

With the emergence of therapies targeting BRCA mutations, such as Poly(ADP-ribose) polymerases (PARP) inhibitors (PARPi), it becomes essential to know which patients can benefit from these drugs. Thus, there is also the need to use more comprehensive panels, with several genes analysed by NGS that allow not only to characterize the BRCA variants - the most common ones, with founder effect, and others, in a single run - but also to create a mutational landscape that can be used to evaluate new therapeutic targets. However, this exhaustive genetic characterization has a social impact on the patient and should always be supported by genetic counselling consultations.

Some genetic risk assessment models, like BRCA-Pro, CanRisk, and others, are already in use for individuals who do not meet the criteria for BRCA testing. These models have been used to predict the probability of having a BRCA gene mutation, and they use family history, personal lifestyle, hormonal status, and mammographic density to calculate the risk for patients and families (6).

Knowingly that BRCA somatic mutation is also a reality for most cancers, the same therapies used in case of germline mutation are now being used in these cases.

2.1 PARP inhibitors

As previously discussed, deficiency in BRCA genes leads to DNA DSB not being repaired, resulting in genomic instability. PARP1 and PARP2 are enzymes with an important role in the response to DNA damage (29).

The first hallmarks of cancer (sustain proliferative signalling, evading growth suppressors, activating invasion and metastasis, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and resisting cell death) now include non-mutational epigenic reprogramming, avoiding immune

destruction, polymorphic microbiomes, unlocking phenotypic plasticity, genomic instability, and inflammation (30). PARP enzymes are activated when cell suffers oxidative stress that leads to DNA damage. In normal cells, PARP1, for example, is responsible for correcting DNA single-strand breaks (SSB) through base excision repair (BER). PARP1 can also promote inflammation by regulating transcriptional factors, cytokines, and inflammatory mediators (31, 32).

When the cell has a mutation in the BRCA genes and consequently deficiency or depletion of BRCA 1 or 2 proteins, and cannot correct double-strand errors, it uses PARP1 to guarantee its survival (figure 1). This compensation mechanism makes PARP an excellent target for targeted therapies (32). PARP1 is also capable of enabling alternative repair mechanisms like nucleotide excision repair (NER) (29).

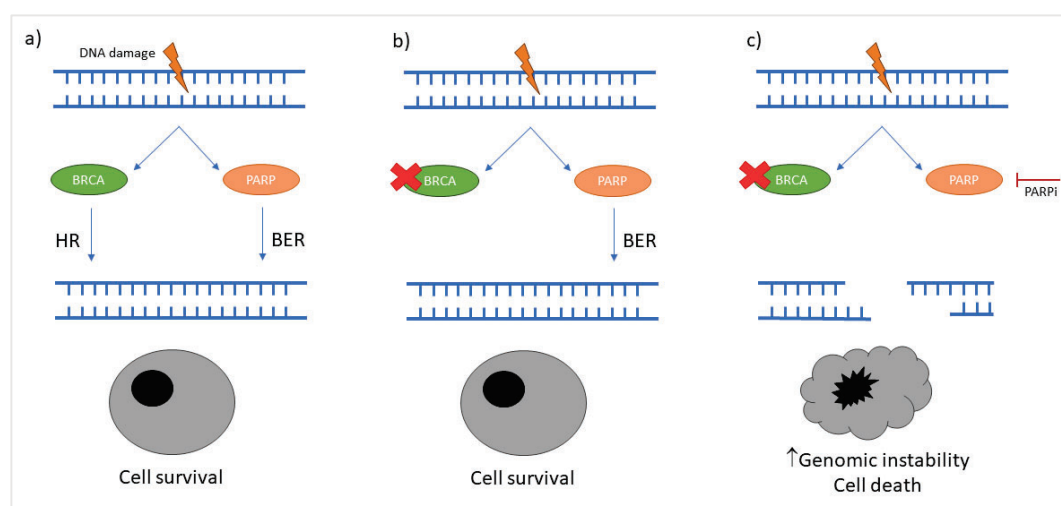


Figure 1. Response to DNA damage: synthetic lethality. (a) In a normal cell, both pathways are active, so if the DNA damage promotes DSB, the BRCA mediated pathway will correct it with HR. In case of SSB, the PARP mediated pathway will use BER to promote cell survival; (b) in a BRCA-mutated cell, the HR pathway will not be functional, so the cell will use the BER pathway; (c) in a BRCA-mutated cell, if the PARP pathway is inhibited, the cell is not capable of correcting the DNA DSB and will accumulate errors that will eventually lead to cell death. DNA Deoxyribonucleic Acid; DSB Double-Strand Break; BRCA Breast Cancer genes; HR Homologous Recombination; SSB Single-Strand Break; PARP Poly(ADP-ribose) Polymerases; BER Base Excision Repair; PARPi PARP inhibitor.

Some PARPis are already approved by both the United States Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) for use primarily in patients with germline mutations in DNA repair genes such as BRCA. Olaparib, rucaparib, niraparib and talazoparib vary slightly in the context in which they are used, but essentially, they are administered in advanced or relapsed ovarian cancers, human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2)-negative breast tumours or TNBC. The efficacy of these inhibitors in pancreatic and small cell lung tumours was also demonstrated, regardless of BRCA status (32, 33). Another promising use is in prostate cancer, where studies have already demonstrated proven efficacy in patients with BRCA mutations (29).

2.1.1 PARPis mode of action

There are 18 PARP enzymes (PARP1 and PARP2 being the most studied) with slightly different functions. Knowing what PARP does, helps us to understand how PARPis works. In non-pathological situation, PARP has several functions, such as DNA repair by binding to the SSB site and recruiting DNA repair effectors, protection of the replication fork from replication stress, and transcription regulation of HR genes via the E2F1 transcription factor. Moreover, PARP1 contributes to the HR pathway of DSB by recruiting of molecules like BRCA1 and 2 to DNA damage sites (32).

The first and most direct mode of action of PARPis is based on the synthetic lethality. This means that a single genetic event is not enough to cause cell death, but when multiple genetic events happen simultaneously, the cell cannot survive. When there is a BRCA mutation and the HR damage repair fails, PARPis will inhibit BER in case of DNA SSB. This way of forcing the accumulation of errors leads to cell death. Synthetic lethality between PARP inhibition and HR deficient-cells was confirmed by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) screens in 2018 and has revolutionized BRCA-mutated cancer treatment (32,34).

The lack of recruitment of HR machinery like BRCA1 by PARP leads to more stress inside the cell. With the inhibition of DNA damage repair by the HR pathway, the cell tries to use the non-homologous end joint (NHEJ) repair pathway, which is an error-prone pathway, often causing deletions and more errors (32, 35).

PARP inhibitors bind to PARP, trapping the protein at replication fork sites, creating a blockage and causing the collapse of the replication fork and forcing DSB that are not going to be repaired, which, therefore, leads to genomic instability (31, 32).

The use of PARPis will create an overload of errors, mitotic catastrophe, and cell death.

2.1.2 Mechanisms of PARPis resistance

More than 40% of patients with BRCA mutation and OC show resistance to PARPis (33), and with time an increasing number of patients with different types of tumours being treated with monotherapy with these inhibitors show signs of less response or decrease of overall survival.

The first mechanism responsible for resistance to these drugs is the cell capacity to restore the HR pathway, usually due to secondary mutations that revert the first one and restore some protein function. Many authors described reversion mutations in both BRCA1 and 2, often correcting the reading frame of gene transcription (33, 35). When the HR pathway is restored, PARPis are no longer useful because the DSB are being corrected anyway.

Epigenetic changes may also be behind resistance to PARPis since methylation of the BRCA1 promoter has already been described as a cause of protein failure, so demethylation of this by mRNA re-expression may promote the transcription of a normal BRCA1 (33).

Other proteins can be involved in PARPis resistance, such as the increased levels of RAD51, very common in TNBC, or the downregulation of the early mitotic inhibitor 1 (EMI1) (32, 33).

The cell can also restore the HR pathway in BRCA1 mutation patients by inactivating of NHEJ-promoting factors, like the TP53 binding protein1 (53BP1), which is regulated by BRCA1, although the success of this restauration depends on the existence of a functional BRCA2 (32, 35).

During replication, PARP1, BRCA1 and BRCA2 have an important role protecting the replication forks from degradation. PARPis mediated cytotoxicity depends on dysregulation of this fork's reversal. This function can be assured by other proteins, like Ataxia Telangiectasia and Rad3-related (ATR) kinase, that inhibit the recruitment of nucleases like MRE11 or MUS81 and stop cell cycle progression and promote stalled forks restauration, ultimately leading to PARPis resistance (32, 35, 36).

Furthermore, some PARP1 mutations already described confer resistance to the inhibitors by disturbing PARP trapping. These mutations only have impact in cells with BRCA-deficiency, because PARP1 and BRCA1 mutations are synthetic lethal (32, 35, 36).

It was showed that some variants in PAR glycohydrolase (PARG) enzyme, which is an important element of PARP1 trapping, can lead to PARPis resistance (32).

One common problem involving drug administration is drug metabolism and drug cellular efflux. PARPis are not immune to these variations. Mutations that result in an overexpression of drugs efflux pumps molecules like the ABCB1 gene, that encodes for the p-glycoprotein (MDR1), a well-known multi-drug efflux pump, increase the exit of the inhibitors, decreasing their action (35).

To overcome innate and acquired PARPis resistance, combined therapy strategies are beginning to be used. Whether target molecules in the tumour microenvironment, modulation of the immune response or even chemotherapy, many possibilities have already been studied and are in the process of being approved (31, 33, 35 - 38).

2.2. Combined therapies

The combination of different types of therapies has the potential to increase success and overcome resistance mechanisms. PARPis combinations are highly under investigation, on several ongoing phase II and III trials (35-40).

PARPis activate the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) pathway. This pathway is responsible for the identification of external cytosolic DNA, usually in cases of infection, and it activates the innate immune system by upregulation of interferons (39). The continuous breakage of DNA chains leads to the activation of the STING pathway, therefore recruiting immune cells to the tumour, increasing the expression of PD-L1 and creating an anti-tumoral environment. The use of immune checkpoint blockade in combination with PARPis is of interest due to the synergistic effects. Some undergoing studies show that this combination works regardless BRCA1/2 mutation (MEDIOLA, TOPACIO, and more). The MEDIOLA trial (phase II), for example, has assessed the safety of using a combination of the PD-L1 antibody durvalumab with

the PARP inhibitor olaparib in patients with or without BRCA mutations. This study also studies different types of cancers, having 4 main cohorts: BRCA-associated BC, BRCA-associated OC, metastatic gastric cancer, and relapse small cell lung cancer; and has shown an increase of disease control rate and duration of response (35 - 40).

The PI3K/AKT/mTOR (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase / Akt/mammalian [or mechanistic] target of rapamycin) pathway is usually dysregulated in many cancers. The idea of using PI3K inhibitors is based on the regulatory action that this pathway has on BRCA proteins. The inhibition of this pathway leads to HR deficiency, increasing the action potential of PARPis (35, 36).

Angiogenesis is one of the hallmarks of cancer and it's very important in OC. As such, the combination of PARPis and anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapies is being studied. Some phase III trials are already showing good results, with a small increase of progression-free survival (PFS) in advanced OC and recurrent OC (35).

More studies assessing other pathways and tumour microenvironment are ongoing. Multiple combinations with chemotherapy, in both HBOC patients and other solid tumours, are being published, although these therapies are usually less tolerated by the patients (36).

3. Conclusions

BRCA1/2 germline mutations carriers have a higher risk of developing cancer. There are several ways to carry out screenings aiming for an earlier diagnosis and a decrease of the risk for these patients, thus improving quality of life. Knowing that you carry a mutation that has a very high probability of causing cancer can be challenging and psychologically difficult. These patients have often seen their immediate family suffer from malignancies, some of whom have died. Fear of the disease can be unpredictable and lead patients to anxiety and exhaustion. It is very important to monitor these patients and ensure that they have all the necessary tools (like RRS) at their disposal to try to prevent cancer or, if it does happen, its early diagnosis and more appropriate treatment.

Genetic tests for hereditary cancer predisposition represent a huge advance in Oncology, but we need to choose wisely how to use the available technology. To do that, more specific guidelines are needed.

The future is personalized medicine, in which each patient receives treatment tailored for their specific tumour. Many advances are being made in immunotherapy techniques, with gene editing with CRISPR technology being in the middle of everything.

Therefore, a joint use of clinical criteria, risk model tools and genomic information can provide the best solutions for cancer.

Understanding the mechanism of synthetic lethality has revolutionized the treatment of cancers with deficient DNA repair genes, such as breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancer. In BC, studies point to an increased PFS in patients treated with olaparib compared to chemotherapy alone. It is worth noting that olaparib was also shown to be better tolerated by patients. In OC, phase III trials are showing that the use of PARPis as maintenance therapy in newly diagnosed advanced cancer represent a significantly increase on PFS.

Genetic screening of BRCA mutation, even in individuals who do not meet the criteria to HBOC, allows monitoring and surveillance for various types of cancer. Searching for BRCA status in tumour samples also gives light to what type of treatment will have the best results.

Author Contributions: All authors contributed to the conception, design and drafting of the manuscript; all authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors are thankful to Dr. Mariana Teixeira, MA, for the linguistic revision of this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

- (1) The Organization for Economic Co-operation and Development. European Cancer Inequalities Registry: Portugal: perfil sobre cancro por país. 2023.
- (2) Sessa, C.; Balmaña, J.; Bober, S.L.; Cardoso, M.J.; Colombo, N.; Curigliano, G.; et al. Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline. *Ann Oncol.* 2023; 34(1):33-47. doi: 10.1016/j.annonc.2022.10.004.
- (3) Casaubon, J.T.; Kashyap, S.; Regan, J.P.; BRCA1 and BRCA2 Mutations. [Updated 2023 Jul 23]. StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>, accessed 08 August 2023.
- (4) Semmler, L.; Reiter-Brennan, C.; Klein A. BRCA1 and Breast Cancer: a Review of the Underlying Mechanisms Resulting in the Tissue-Specific Tumorigenesis in Mutation Carriers. *J Breast Cancer.* 2019; 22(1):1-14. doi: 10.4048/jbc.2019.22.e6.
- (5) Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE. Guia de Orientação Terapêutica Cancro hereditário. 2018; Mediana - Global Communication
- (6) Vicente, R.; Costa, D.A.; Vitorino, M.; Mendes, A.D.; Santos, C.; Fontes-Sousa, M.; Mutation Patterns in Portuguese Families with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Cancers,* 2022; 14, 4717. <https://doi.org/10.3390/cancers14194717>.
- (7) Wang, C.; Lin, Y.; Zhu, H.; Zhou, Y.; Mao, F.; Huang, X.; et al. Breast-conserving therapy for breast cancer with BRCA mutations: a meta-analysis. *Breast Cancer.* 2022; 29(2):314-323. doi: 10.1007/s12282-021-01312-2.
- (8) Gorodetska, I.; Kozeretska, I.; Dubrovskaya, A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer.* 2019; 10(9):2109-2127. doi: 10.7150/jca.30410.
- (9) Varol, U.; Kucukzeybek, Y.; Alacacioglu, A.; Somali, I.; Altun, Z.; Aktas, S.; Tarhan, M.O.; BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON.* 2018; 23(4):862-866.
- (10) Transcript: ENST00000357654.9 BRCA1-203 [Internet]. Place of publication: Ensembl; July 2023. Available from: http://Jul2023.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG0000012048;r=17:43044295-43170245;t=ENST00000357654
- (11) Transcript: ENST00000380152.8 BRCA2-201 [Internet]. Place of publication: Ensembl; July 2023. Available from: http://Jul2023.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32315086-32400268;t=ENST00000380152
- (12) Teugels, E.; Brakeleer, S.; Goelen, G.; Lissens, W.; Sermijn, E.; De Grève, J. De novo Alu element insertions targeted to a sequence common to the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat.* 2005; 26(3):284. doi: 10.1002/humu.9366.
- (13) Machado, P.M.; Brandão, R.D.; Cavaco, B.M.; Eugénio, J.; Bento, S.; Nave, M.; et al. Screening for a BRCA2 Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25, 2027–2034.
- (14) Peixoto, A.; Santos, C.; Rocha, P.; Pinheiro, M.; Príncipe, S.; Pereira, D.; et al. The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009; 114, 31–38.
- (15) Peixoto, A.; Santos, C.; Pinheiro, M.; Pinto, P.; Soares, M.J.; Rocha, P.; et al. International distribution and age estimation of the portuguese BRCA2 c.156_157insAlu founder mutation. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011, 127, 671–679.
- (16) Peixoto, A.; Santos, C.; Pinto, P.; Pinheiro, M.; Rocha, P.; Pinto, C.; et al. The role of targeted BRCA1/BRCA2 mutation analysis in hereditary breast/ovarian cancer families of Portuguese ancestry. *Clin. Genet.* 2015; 88, 41–48.
- (17) Miguel, I.; Rodrigues, F.; Fragoso, S.; Freixo, J.; Clara, A.; Luis, A.; et al. Hereditary breast cancer and ancestry in the Madeira archipelago: An exploratory study. *Ecanermedicalscience* 2021; 15, 1261.
- (18) Macedo, F.; Soares, R.F.; Pereira, T.C.; Monteiro, A.; Bonito, N.; Broco, S.; et al. Founder mutations BRCA2 c.156_157insAlu in Portuguese population. *Ann. Oncol.* 2019; 30, iii20.
- (19) Forbes, C.; Fayter, D.; de Kock, S.; Quek, R.G. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2019; 22;11:2321-2337. doi: 10.2147/CMAR.S189627.
- (20) Peixoto, A.; Pinto, P.; Guerra, J.; Pinheiro, M.; Santos, C.; Pinto, C.; et al. Tumor Testing for Somatic and Germline BRCA1/BRCA2 Variants in Ovarian Cancer Patients in the Context of Strong Founder Effects. *Frontiers in Oncology.* 2020; 10:1318. doi: 10.3389/fonc.2020.01318.
- (21) Berger ER, Golshan M. Surgical Management of Hereditary Breast Cancer. *Genes (Basel).* 202; 12(9):1371. doi: 10.3390/genes12091371.
- (22) National Comprehensive Cancer Network. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. Version 4.2023 — March 23, 2023. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) 2023. Available from: <https://www.nccn.org/>. Accessed 18 August 2023.
- (23) Warner, E.; Plewes, D.B.; Shumak, R.S.; Catzavelos, G.C.; Di Prospero, L.S.; Yaffe, M.J.; et al. Comparison of breast magnetic resonance imaging, mammography, and ultrasound for surveillance of women at high risk for hereditary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2001, 19, 3524–3531.
- (24) Kriege, M.; Brekelmans, C.T.; Boetes, C.; Besnard, P.E.; Zonderland, H.M.; Obdeijn, I.M.; et al. Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N. Engl. J. Med.* 2004, 351, 427–437.
- (25) Taneja, C.; Edelsberg, J.; Weycker, D.; Guo, A.; Oster, G.; Weinreb, J. Cost effectiveness of breast cancer screening with contrast-enhanced MRI in high-risk women. *J. Am. Coll. Radiol.* 2009, 6, 171–179.
- (26) Plevritis, S.K.; Kurian, A.W.; Sigal, B.M.; Daniel, B.L.; Ikeda, D.M.; Stockdale, F.E.; et al. Cost-effectiveness of screening BRCA1/2 mutation carriers with breast magnetic resonance imaging. *JAMA* 2006, 295, 2374–2384.
- (27) Lewis, R.S.; George, A.; Rusby, J.E. Nipple-sparing mastectomy in women at high risk of developing breast cancer. *Gland Surg.* 2018, 7, 325–336.
- (28) Rocco, N.; Montagna, G.; Criscitello, C.; Nava, M.; Privitera, F.; Taher, W.; et al. Nipple Sparing Mastectomy as a Risk-Reducing Procedure for BRCA-Mutated Patients. *Genes* 2021; 12, 253.
- (29) Wang, S. Y.; Jie, Y.E.; Cheng, S.W.; Ling, G.L.; Ming, H.V. PARP Inhibitors in Breast and Ovarian Cancer. *Ancers.* 2023; 15, 2357. Doi: 10.3390/cancers15082357
- (30) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011; *Cell*, 144(5), 646–674. Doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

- (31) Klotz, D.M.; Wimberger, P. Overcoming PARP inhibitor resistance in ovarian cancer: what are the most promising strategies? *Arch Gynecol Obstet.* 2020; 302(5):1087-1102. doi: 10.1007/s00404-020-05677-1.
- (32) Slade, D. PARP and PARP inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev.* 2020 Mar; 34(5-6):360-394. doi: 10.1101/gad.334516.119.
- (33) Li, H.; Liu, Z.Y.; Wu, N.; Chen, Y.C.; Cheng, Q.; Wang, J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer.* 2020; 19(1):107. doi: 10.1186/s12943-020-01227-0.
- (34) Zimmermann, M.; Murina, O.; Reijns, M.A.M. et al. CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions. 2018; *Nature* 559, 285–289. doi: 10.1038/s41586-018-0291-z
- (35) Miller, R. E.; El-Shakankery, K. E.; Lee, J. PARP inhibitors in ovarian cancer: overcoming resistance with combination strategies. *J Gynecol Oncol.* 2022; 33(3):e44
- (36) Bhamidipati, D.; Haro-Silerio, J.I.; Yap, T.A.; Ngoi, N. PARP inhibitors: enhancing efficacy through rational combinations. *Br J Cancer* 129, 904–916 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02326-7>
- (37) Mehta, A.K.; Cheney, E.M.; Hartl, C.A.; Pantelidou, O.M.; Castrillon, J.A.; Lin, J.R.; et al. Targeting immunosuppressive macrophages overcomes PARP inhibitor resistance in BRCA1-associated triple-negative breast cancer. *Nat Cancer.* 2021; 2(1):66-82. doi: 10.1038/s43018-020-00148-7.
- (38) Gupta, T.; Vinayak, S.; Telli, M. Emerging strategies: PARP inhibitors in combination with immune checkpoint blockade in BRCA1 and BRCA2 mutation-associated and triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2023; 197(1):51-56. doi: 10.1007/s10549-022-06780-4.
- (39) Samson, N.; Ablasser, A. The cGAS–STING pathway and cancer. 2022; *Nat Cancer* 3, 1452–1463. doi: 10.1038/s43018-022-00468-w
- (40) Cortesi, L.; Rugo, H.S.; Jackisch, C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Target Oncol.* 2021; 16(3):255-282. doi: 10.1007/s11523-021-00796-4.

Uso racional dos testes de diagnóstico *in vitro*

Francisco Freitas ^{1*}

¹ Laboratório de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, Hospital São Teotónio, Unidade Local de Saúde Viseu Dão-Lafões

* Correspondence: francyske@gmail.com;

Abstract: A importância central dos testes de diagnóstico *in vitro* (DIV) e da informação por eles proporcionada é hoje inquestionável, constituindo-se numa ferramenta essencial na prática clínica, influenciando entre 60-70% das decisões clínicas. São ainda requeridos por cerca de 80% das *guidelines* clínicas para estabelecer um diagnóstico ou gerir o processo de doença ou via terapêutica (*Clinical Pathway*). Por outro lado, a evidência recente sugere que aproximadamente 25-40% dos testes solicitados são de alguma forma questionáveis num determinado contexto clínico, e que até 30% podem ser considerados inapropriados. Num contexto de recursos financeiros limitados, torna-se por isso uma prioridade do laboratório clínico a implementação de estratégias de uso racional de uma forma holística e que inclua as partes interessadas relevantes. Apresenta-se como modelo a *guideline* CLSI-49 e incluem-se propostas de melhoria que qualquer laboratório clínico pode perseguir.

Keywords: Medicina laboratorial; Utilização inapropriada de testes de diagnóstico *in vitro*; Qualidade e segurança; CLSI-GP49 *guideline*; Estratégias de intervenção; Cuidados de saúde baseados nos resultados.

1. Introdução

O laboratório clínico tem nos nossos dias um papel essencial na qualidade e segurança com que são prestados os cuidados de saúde. Para garantir essa qualidade os testes laboratoriais (ou de diagnóstico *in vitro* – DIV) solicitados devem estar suportados numa lógica de valor na via terapêutica, serem executados no momento adequado e na amostra apropriada. Dada a constante evolução científica e a descoberta de novos biomarcadores, o menu de testes disponíveis é atualmente cerca de 3500 (1), o que significa que uma porção significativa se tem tornado irrelevante em determinados contextos clínicos. A continuada utilização de testes de baixo valor clínico ou desnecessários, acompanhada da elevada frequência com que são solicitados é um desperdício de recursos para a sociedade que poderiam ser alocados noutras intervenções. O uso inapropriado dos Testes de DIV é hoje tema de investigação e uma preocupação dos profissionais de laboratório, verificando-se variações significativas entre clínicos, instituições, regiões e países (2,3), demonstrando a importância do seu uso racional na devolução de cuidados de saúde custo-efetivos. Procuramos nesta revisão elencar o valor e benefícios dos Testes de DIV, os custos incorridos para o sistema de saúde, as causas de uso inapropriado, iniciativas para a gestão e implementação de uso apropriado e propostas para a melhoria da sua utilização nas instituições de saúde.

2. Propósito e Valor dos Testes de Diagnóstico *in vitro*

Os Testes de DIV, muitos dos quais se traduzem na medição de biomarcadores, são exames realizados em ambiente laboratorial para atingir um benefício clínico ou impacto positivo para o paciente, que resulta das suas características de desempenho analítico e clínico suportados pela evidência clínica (4). Assim, os Testes de DIV são solicitados pelos clínicos num determinado contexto, tendo por isso em vista diferentes propósitos ou objetivos de saúde (5-7), nomeadamente:

- a) A deteção ou a exclusão de determinadas patologias, permitindo a identificação e confirmação de um diagnóstico mais preciso no âmbito da doença aguda;
- b) O diagnóstico precoce de uma ampla variedade de condições médicas, potenciando iniciar uma intervenção de maior eficácia;

Citation: Freitas, Francisco. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2024 Mar 2; 2(1): 12-26

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: 19 December 2023

Accepted: 2 February 2024

Published: 2 March 2024

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Science

- c) Como guia para a admissão e alta hospitalar;
- d) A avaliação da gravidade da doença (estratificação de risco), de forma a prever a sua evolução (prognóstico) e acompanhar a respetiva progressão, fornecendo informação crucial, nomeadamente na avaliação da eficácia da resposta ao tratamento;
- e) A seleção do tratamento mais adequado com base nas características individuais dos doentes, contribuindo para resultados mais eficazes e maiores ganhos em saúde, evitando reações adversas;
- f) A gestão da doença crónica, permitindo a monitorização ou vigilância da sua progressão, o ajuste ou a paragem do tratamento em conformidade com a informação disponibilizada;
- g) A avaliação do cumprimento de um tratamento ou intervenção;
- h) A deteção e prevenção de erros de medicação;
- i) Determinar a segurança e compatibilidade com potenciais recetores;
- j) A prevenção da propagação de doenças infecciosas, ao possibilitar informação para a interrupção das cadeias de transmissão;
- k) A determinação de fatores de risco associados a patologias específicas;
- l) A análise da predisposição genética para determinadas doenças, o que permite aos utentes conhecer o risco de desenvolvimento de doenças hereditárias e tomar decisões mais informadas acerca da sua saúde;
- m) Avaliações para efeitos médico-legais.

A importância central dos Testes de DIV e da informação por eles proporcionada é inquestionável, constituindo-se numa ferramenta essencial na prática clínica, influenciando entre 60-70% das decisões clínicas (8). São ainda requeridos por cerca de 80% das *guidelines* clínicas para estabelecer um diagnóstico ou gerir o processo de doença ou via terapêutica (*Clinical Pathway*) (5).

3. Custos, Benefícios e Uso Inapropriado dos Testes de Diagnóstico *in vitro*

Esta centralidade dos Testes de DIV traz custos acrescidos para os sistemas de saúde devido ao aumento da demanda laboratorial, pela inovação e complexidade crescentes, pelo aumento da população com doenças crónicas e da esperança de vida, mas também pela forma como são utilizados pelos clínicos.

Segundo dados do Conselho de Finanças Públicas (9) em 2021 a despesa em cuidados de saúde ascendeu a 23,9 MM Euros, cabendo ao Serviço Nacional de Saúde (SNS) 12,4 MM Euros. Nesse mesmo ano foram realizados 191,7 milhões de atos complementares de diagnóstico e/ou terapêutica nos hospitais portugueses, sendo que as análises clínicas com 129,3 milhões foram destacadamente o principal ato complementar, sendo 88% efetuadas em hospitais públicos (10). Segundo as estimativas de 2017 do INE-PORDATA (11) as análises clínicas representaram 2,3% da despesa do SNS, valor que compara com dados internacionais (12). Contudo, e segundo a APIFARMA (7) os custos totais imputados ao processo incluindo despesas com pessoal e manutenção das instalações podem aproximar-se de 5% das despesas em saúde, o equivalente a 1,2 MM Euros.

Perante um ambiente adverso de crescimento da despesa com cuidados de saúde combinado com a finitude de recursos e subfinanciamento crónico do SNS, torna-se crucial a adoção de estratégias de uso racional e apropriado dos Testes de DIV baseadas nas necessidades clínicas e que se traduzam em valor para o doente e para a sociedade em geral. Isto implica garantir que:

- a) O teste correto é requisitado para uma condição clínica apropriada;
- b) A amostra é colhida de forma correta e no momento adequado;
- c) O laboratório executa os testes requeridos de forma precisa, exata e em tempo útil;
- d) O teste providencia informação clínica útil que é interpretada corretamente e que se traduz numa ação apropriada (13);
- e) São obtidos benefícios clínicos e económicos.

Importa por isso assegurar a atualização contínua da relevância clínica de determinadas investigações laboratoriais mais antigas e de menor valor, assim como guiar novas implementações de Testes de DIV suportadas numa lógica de valor permitindo aos clínicos e partes interessadas tomar melhores decisões sobre os cuidados a prestar, através de análises de custo-benefício e/ou ganhos associados à qualidade de vida ajustados à idade (QALY's) (14,15). Nesse sentido três questões devem ser colocadas (16):

- a) Um teste de DIV muda a maneira como um médico pensa sobre um paciente?
- b) Essa mudança de pensamento altera a forma como o médico trata o paciente?
- c) Essa mudança no tratamento do paciente afeta o resultado clínico (i.e., mortalidade / morbilidade / redução de estadia / redução de antibióticos / custos de tratamento)?

A resposta a estas três questões teria preferencialmente como resultado final o uso racional e apropriado dos Testes de DIV no momento adequado e em intervalos recomendados, assegurando que testes não beneficiários não são requisitados (17). Contudo, tanto a experiência laboratorial como a evidência científica crescente sugerem que uma porção significativa são redundantes ou duplicativos, fazendo com que um Teste de DIV seja repetido demasiado cedo para providenciar informação útil (18-20). Numa meta-análise abrangendo 15 anos (1997-2012) Zhi et al. (21), estimaram a taxa de sobre utilização de Testes de DIV em 20.6% e por outro lado a taxa de subutilização em 44,8%. Em 2017 Sarkar et al. (22), reportaram uma taxa de uso inapropriado de 78% em doentes com problemas da hemostase, 34% e 61% dos quais devido a sobre e subutilização respetivamente. Driskell et al. (23), estimaram o uso inapropriado da HbA1c em 21%.

O uso inapropriado tem também sido relacionado com o facto de muitos pedidos de Testes de DIV não serem suportados por protocolos adequados e acordados (*guidelines* ou consensos internacionais / locais / organizacionais, algoritmos, ou diretivas administrativas), e ainda por ocorrerem variações nos padrões de requisição dos clínicos influenciados por múltiplos fatores, incluindo falta de experiência e incerteza (24,25). Frequentemente os clínicos solicitam Testes de DIV numa estratégia “defensiva” de modo a obviar a eventual responsabilidade por negligência médica, sobretudo em ambiente de urgência, mesmo que na verdade não melhore a qualidade geral do atendimento ao paciente (26). Por vezes são induzidos pelos próprios pacientes a solicitar

um teste, mesmo quando não acreditam que seja clinicamente adequado, devido ao seu conhecimento e expectativas (27,28). Grandes instituições de saúde com muitos profissionais enfrentam o desafio adicional de que um clínico pode não estar ciente de que um teste já foi solicitado por outro colega, contribuindo para a duplicação de testes (29), a qual é detetada no laboratório apenas quando o resultado já foi obtido. A esta situação está implicitamente ligada a sensação de que a execução dos Testes de DIV é fácil, rápida e barata, não havendo por parte dos clínicos a noção real do custo e por vezes do conceito ou das características técnicas dos testes (sensibilidade e especificidade; valor preditivo; variação biológica; intervalos mínimos de testagem; diferença crítica entre medições consecutivas) (30), sobretudo dos mais inovadores e complexos (31). Todas estas questões contribuem para a entrega de menor valor em saúde.

Segundo a Norma CLSI GP49-ED1 (13) existem cinco causas principais que levam ao uso inapropriado dos Testes de DIV, nomeadamente:

- a) Seleção inapropriada do teste, incluindo sobre utilização (definida como a realização de um teste cujo resultado tem pouco ou nenhum efeito no cuidado do paciente);
- b) Seleção incorreta do procedimento (metodologia / tempo de resposta);
- c) Subutilização ou omissão de um teste (quando um clínico não solicita um teste que possa afetar positivamente os resultados do paciente);
- d) Interpretação incorreta dos resultados;
- e) Falha no seguimento clínico dos resultados do teste.

Qualquer uma das causas reduz o valor de testar, podendo resultar em erros diagnósticos e eventos adversos. Compreender as razões de uso inapropriado dos Testes de DIV contribuirá para o desenvolvimento de soluções para melhorar a sua utilização e mitigar os efeitos indesejáveis (13).

4. Iniciativas para a Gestão e Uso Apropriado dos Testes de Diagnóstico *in vitro*

É neste ambiente que têm surgido várias iniciativas internacionais no âmbito do uso racional e apropriado dos Testes de DIV, a mais notável das quais a *Choosing Wisely* da American Board of Internal Medicine Foundation (2012) em parceria com mais de 80 Sociedades Médicas de múltiplos países (32). Esta campanha resultou em mais de 700 recomendações (ABIM Foundation, 2023) relativas ao uso de Testes de DIV ou práticas médicas, tendo como alvo na maioria dos casos a sua não realização quando carecem de evidência científica, podem ser duplicativos, prejudiciais ou simplesmente desnecessários. (33). Na Tabela 1 destacam-se algumas das recomendações.

Tabela 1. Exemplos de recomendações *Choosing Wisely* (Adaptado de Baird, 2019).

Não repetir eletroforese de hemoglobina em pacientes com resultado prévio e que não requeiram intervenção terapêutica ou monitorização dos níveis das variantes;
Não testar os níveis de proteína C e S ou antitrombina durante um evento de coagulação ativo;
Não solicitar serologia de <i>Helicobacter pylori</i> . Usar o antigénio fecal ou teste respiratório;
Não solicitar amilase na pancreatite aguda. Testar lipase;
Não solicitar mioglobina e Creatina quinase-MB no enfarte agudo do miocárdio. Testar troponina I ou T;

Não solicitar velocidade de sedimentação para investigar inflamação em pacientes não diagnosticados.
 Testar proteína C reativa;
 Não executar *screening* populacional de deficiência de vitamina D;
 Não pesquisar toxina de *Clostridium difficile* para confirmar a cura se os sintomas resolveram;
 Não solicitar um teste genético duplicado para uma condição adquirida, a não ser que exista incerteza sobre a validade do resultado obtido;
 Não executar hemograma e testes de química clínica de forma repetitiva em doentes estáveis clínica e laboratorialmente.

No Canadá, a iniciativa *Choosing Wisely* (CWC) estendeu-se de forma interessante à elaboração de recomendações direcionadas a várias práticas laboratoriais que os profissionais devem questionar (Tabela 2), devido ao seu potencial de causar dano ao paciente ou gerar desperdício (34).

Tabela 2. Exemplos de recomendações CWC para Profissionais de Laboratório Clínico (Adaptado de VanSpronsen, 2022).

Objetivo	Recomendação
Limitar a sobre utilização de Testes de DIV	Não apoiar a testagem repetitiva a uma frequência que não seja suportada por evidência clínica Encorajar o desenvolvimento de testes reflexo, algoritmos e sistemas de suporte à decisão Não permitir a entrada de solicitações permanentes sem uma data de revisão
Limitar a quantidade de sangue colhido	Não colher mais sangue do que o necessário Usar tubos mais pequenos Considerar a adição de testes <i>à posteriori</i> Reduzir ou combinar solicitações duplas Não colher tubos extra em antecipação
Melhoria do julgamento profissional	Não repetir por rotina resultados críticos dos analitos mais comuns antes de reporte, particularmente se o doente tem histórico de resultados similares Não proceder com o teste ou reporte quando a qualidade da amostra ou a informação do paciente é suspeita

Outra importante iniciativa partiu da Associação de Bioquímica Clínica e Medicina de Laboratório (ACBLM) do Reino Unido com o apoio do Colégio de Patologistas (RCP) e Instituto de Ciência Biomédica (IBMS) (2013), instituindo intervalos mínimos de re-testagem – IMR's (i.e.; tempo mínimo antes que um teste seja repetido, com base nas características do teste e na situação clínica específica em que é utilizado) em Testes de DIV de diversas valências laboratoriais (35). Esta *guideline* atualizada em 2021 (36) procura harmonizar o processo de solicitação de Testes de DIV evitando desperdícios em testes desnecessários, economizando dinheiro e

otimizando o cuidado dos pacientes (Tabela 3). A frequência com que um Teste de DIV deve ser repetido, se for o caso, deve basear-se em vários critérios, nomeadamente:

- a) As propriedades fisiológicas;
- b) A semi-vida e variação biológica expectável (diária, circadiana, sazonal);
- c) Aspetos analíticos incluindo valor crítico de mudança (delta) ou taxa de variação;
- d) Requisitos de tratamento e monitorização, incluindo a probabilidade dum resultado alterar a tomada de decisão;
- e) A *Guideline* estabelecida.

Tabela 3. Exemplos de IMR's ACBLM/RCP/IBMS (2021).

Situação Clínica	Recomendação
Monitorização dos níveis de potássio (K ⁺) na terapia com digoxina	8 dias após início ou alteração dose terapêutica; anualmente se não houver alteração
Carbamazepina	Seis meses
Fosfatase alcalina (ALP) e proteínas totais em cuidados agudos	Testar em intervalos semanais; ALP com maior frequência no contexto de alterações colestáticas agudas
γ-glutamyl transferase (GGT) e bilirrubina conjugada em cuidados agudos	Testar em intervalos semanais
Investigação do Síndrome Anti-fosfolipídico após completar a anticoagulação	Pelo menos 7 dias após a paragem da anticoagulação
Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina-Resistente (MRSA)	Sete dias
Eletroforese de proteínas (soro)	Três meses

Por outro lado, em 2017 o *Clinical Laboratory Standards Institute* publicou a Norma GP49-ED1 que serve de orientação para o estabelecimento e manutenção de um programa eficaz de utilização de pedidos laboratoriais. Esta norma destaca que estes programas devem preferencialmente ser geridos por equipas multidisciplinares (Comissões), abrangendo pessoas interessadas na temática, empenhadas e comprometidas, tanto do laboratório como de especialidades médicas e até da administração hospitalar, e que aportem conhecimento diversificado (37). Estas equipas devem:

- a) Estabelecer o âmbito e objetivos da comissão;
- b) Estabelecer a agenda de reuniões;
- c) Estabelecer as iniciativas a priorizar;
- d) Gerir o progresso das iniciativas;
- e) Efetuar a colheita e análise de dados;
- f) Implementar as melhorias propostas e monitorizar mudanças
- g) Rastrear e reportar sucesso.

Apesar do foco destas e outras iniciativas estar habitualmente direcionado para a sobre utilização de Testes de DIV, as organizações não devem descuidar as causas de subutilização, as quais embora menos estudadas podem trazer consequências clínicas desfavoráveis (13), incluindo:

- a) Diagnóstico incorreto ou tardio;
- b) Hospitalização desnecessária ou aumento do tempo de internamento;
- c) Aumento dos custos para o paciente e/ou para a unidade de saúde;
- d) Exposição a responsabilidade por negligência;
- e) Insatisfação dos pacientes.

5. Implementação de Estratégias de Uso Apropriado de Testes de DIV segundo a Norma CLSI GP49

5.1 Intervenções Educacionais e Feedback

Feedback prospetivo – Implementação de medidas educacionais anteriores à prescrição, nomeadamente reuniões com vários serviços de modo a perceber as necessidades e oportunidades de melhoria (38); disseminação de *guidelines*, recomendações e algoritmos baseados na evidência; educação dos pacientes sobre o porquê da realização dos testes de modo a evitar falhas no controlo terapêutico; consultoria direta pelo patologista clínico no âmbito de um plano diagnóstico; suporte informatizado à decisão, incluindo custo do teste, tempo de resposta, comentários ou alertas de redundância (30,38).

Feedback Retrospetivo – *Benchmarking* por volume ou padrões de requisição consoante o perfil clínico (Urgência, Especialidades Médicas); auditorias focadas na avaliação das práticas de requisição em comparação com as recomendações estabelecidas (2); *benchmarking* interinstitucional de modo a identificar situações inesperadas de uso inapropriado.

5.2 Controlo dos Pedidos Laboratoriais

Uso de Painéis ou Menus de Testes – A configuração de painéis (revistos anualmente com os utilizadores) (2), por locais específicos (internamento ou consulta), por especialidades médicas, por perfis diagnósticos (maior número de testes e por isso mais sensível) ou por doença-específica e de monitorização (menor número de testes e por isso mais específico) é um modo de otimizar a eficiência dos pedidos, facilitar escolhas corretas e eliminar práticas inapropriadas, devendo incluir menus menos acessíveis a testes de segunda linha; testes de baixo valor clínico ou obsoletos devem ser removidos dos painéis (2, 39).

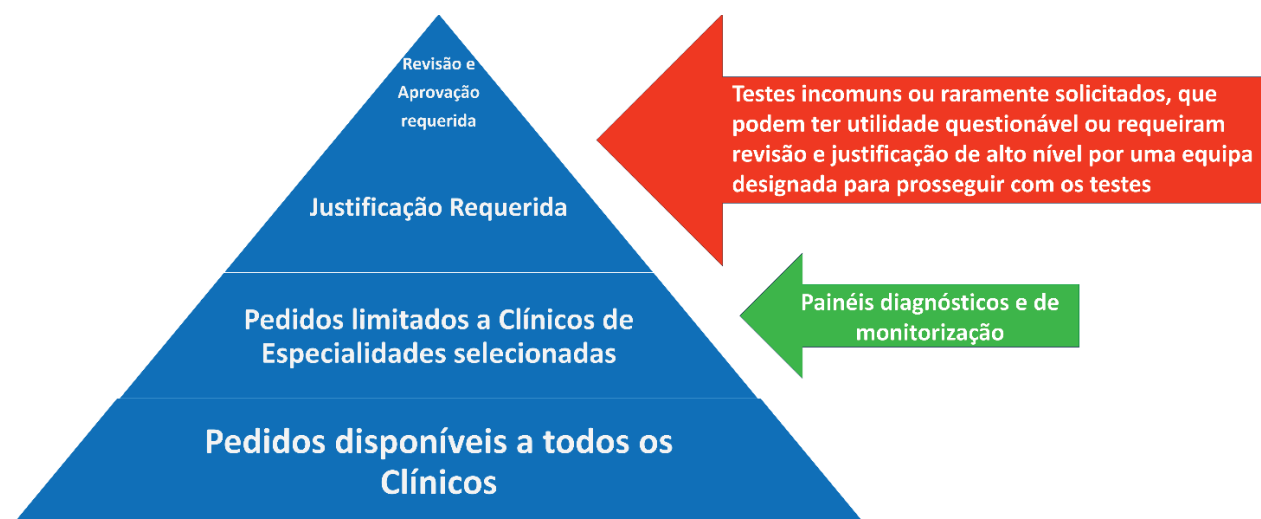
Testes Reflexo e Algoritmos – Protocolos reflexo reduzem a utilização desnecessária e asseguram o *follow-up* adequado, através de testes de *screening* para determinar se são necessários testes adicionais (i.e. – Ac. Totais Sífilis → Rapid Plasma Reagin (RPR) + IgM; Anticorpos Anti-Nucleares (ANA) → anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB; Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilo (ANCA) → anti-proteinase-3 e mieloperoxidase (40); Antígeno Específico da Próstata (PSA) → PSA Livre; Hormona Estimulante da Tiróide (TSH) → Tiroxina Livre (FT4); Hipocalcemia → 25-Dihidroxitamina D) (30), ou para garantir que testes não solicitados são realizados (i.e. – Anticorpos anti-Vírus da Hepatite C (Anti-HCV) + → Ácido Ribonucleico de HCV) (13); a incorporação de algoritmos nos painéis (usualmente incluídos em recomendações de boas práticas) ajudam a garantir que os clínicos solicitam os testes mais apropriados em cada cenário e momento específico (i.e. – Serologia de Hepatites em diálise) (41).

Limitar a Disponibilidade – As estratégias para limitar a disponibilidade interrompem deliberadamente a realização de um teste no momento em que o pedido é feito ou após a colheita

da amostra, mas antes do início do teste. Estes tipos de intervenções devem ser baseados em políticas e protocolos aprovados em colaboração com as especialidades médicas. Quatro estratégias poderão ser implementadas:

1. Cancelamento automático de pedidos baseado em regras, nomeadamente frequência de testagem (período de tempo – IMR's) (38,39), resultados prévios (i.e. – Factor V Leiden; *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de *Mycobacterium Tuberculosis*; etc.), sem resultados concordantes (i.e. – Antígeno e da Hepatite B (HBeAg), Anticorpo e da Hepatite B (HBeAc)) e experiência e competência clínica no uso e interpretação do teste (i.e. – testes genéticos moleculares);
2. Configuração de painéis ou menus de testes;
3. Desabilitar a colocação de pedidos diários para alguns ou todos os testes, segundo protocolo, ou estabelecer limites de tempo para agendar pedidos futuros dado o pouco valor clínico acrescentado, e potencial dano para o paciente (i.e. – agravamento de anemia em internamento prolongado) (42);
4. Rever e reter pedidos antes de realizar os testes – Testes de elevado custo ou efetuados em laboratórios referenciados devem ser avaliados por patologista ou especialista clínico quanto à adequação técnica, tendo em conta sobretudo a disponibilidade da informação clínica e de resultados associados (i.e. – PCR para micobactérias, fungos e vírus no Líquido Cefalo-raquídeo vs contagem celular e medição de proteínas); obrigatoriedade de formulário escrito para testes de segunda ou terceira linha que requeiram a aprovação de subespecialistas (i.e. – testes genéticos moleculares) (Figura 1); anulação pela característica da amostra (i.e. – pesquisa de Toxina de *C. difficile* em amostras não diarreicas); anulação de pedidos inválidos (i.e. – PSA livre com PSA total <4 ou >10 ng/mL), ou redundantes (i.e. – Velocidade de Sedimentação e proteína C reativa; ureia na função renal; amilase na pancreatite aguda (43) e Creatina Fosfoquinase (CPK) e Creatina quinase-MB (CK-MB) no Síndrome Coronário Agudo (3)).

Figura 1. Exemplo da Estrutura de um Formulário Laboratorial (Adaptado de CLSI GP49, 2017).



5.3 Seleção Adequada e Aplicação dos Procedimentos Laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais e os manuais institucionais devem detalhar claramente os requisitos de colheita (incluindo necessidade de jejum, dieta específica ou medicação), transporte, processamento e manutenção da integridade das amostras, de modo que estas sejam de boa qualidade. A obtenção de amostras inadequadas (i.e. – hemolisadas, coaguladas, mal identificadas ou contaminadas) pode ser detetada por *delta-checking*, e ainda assim originar resultados e interpretações clínicas erróneas se não ocorrer essa avaliação prévia. O momento da colheita é especialmente importante na gestão da medicação para evitar falsa toxicidade ou resultados sub-terapêuticos. Os métodos escolhidos para a realização dos testes devem deter sensibilidade aceitável para proporcionar a melhor informação diagnóstica, e se possível contribuir para a redução da pegada ecológica. Os clínicos devem estar informados sobre o tempo de resposta habitual (incluindo em situações especiais como fim-de-semana, noites e férias) para o processamento e reporte dos resultados, uma vez que estes perdem valor quando ocorrem atrasos não exatáveis (13).

5.4 Utilização dos Resultados Laboratoriais

De modo a melhorar a sua utilização, os profissionais de laboratório devem assegurar, onde adequado, a interpretação dos resultados (auxílio na compreensão do significado), recomendar testes subsequentes (se aplicável), e promover a disponibilização em tempo útil para o clínico, incluindo a notificação de valores críticos que necessitam de tomada de decisão imediata (13,44).

5.5 Métricas de Desempenho e Identificação de Oportunidades

Idealmente, o desenvolvimento de métricas é estabelecido antes do início da intervenção, o que assegura a avaliação e análise de dados apropriada, a determinação do âmbito do projeto e dos objetivos ou critérios de sucesso, o seguimento de tendências e reduz o risco inadvertido de múltiplas hipóteses. Estas devem permitir: capturar todos os efeitos clínicos e operacionais da iniciativa de utilização em avaliação; excluir de forma exata alterações nos resultados clínicos e operacionais não relacionados com a iniciativa; atingir poder estatístico suficiente; ser concisas e facilmente interpretáveis. Um dos maiores desafios ao desenvolvimento de métricas é o acesso a dados de forma fácil e precisa de modo a desenvolver análises pré e pós intervenção (13).

A identificação de oportunidades de melhoria deriva frequentemente de observações pessoais de más práticas de utilização, discussão com colegas ou através de revisão da literatura científica. Contudo abordagens analíticas permitem detetar padrões e tendências populacionais mais subtis de uso inadequado, selecionar estratégias viáveis e priorizar iniciativas, uma vez que as equipas envolvidas apenas terão tempo e recursos para perseguir um subconjunto potencialmente útil das mesmas num determinado período de tempo (13, 38). Nesse sentido é boa prática o uso do princípio de Pareto, através do qual 80% dos objetivos são atingidos com 20% do empenho (30). Identificar o valor e o propósito de uma iniciativa tanto ao nível organizacional como laboratorial quando o foco são as boas práticas (fazer o correto de acordo com a evidência), contribui para maior envolvimento dos clínicos, permitindo uma boa análise pós-intervenção nomeadamente quanto à melhoria cuidados de saúde e redução de custos (13, 38, 43).

Frequentemente os laboratórios começam com projetos que envolvem testes referenciados e de alto custo, uma vez que o efeito financeiro da utilização apropriada é facilmente rastreável porque os custos são capturados separadamente (i.e. – custo do teste x testes desnecessários não referenciados). A redução de custos constitui uma importante medida de sucesso dum projeto e deve ser calculada de forma precisa para justificar os recursos alocados à iniciativa.

Em ambiente de internamento os Testes de DIV são habitualmente custeados como parte global do Grupo de Diagnóstico Homogéneo (GDH – grupos clinicamente coerentes e similares do ponto de vista do consumo de recursos) (45), pelo que a redução do volume ou número de testes realizados não afeta as receitas da instituição, e é por isso um forte incentivo para que se desenvolvam estratégias de uso apropriado (13). Na Tabela 4 explicitam-se questões-chave que ajudam a identificar oportunidades de melhoria e a selecionar a estratégia de gestão de utilização mais adequada.

Tabela 4. Questões Chave na Gestão da Utilização de Testes de DIV (Adaptado de CLSI GP49-ED1).

Aplicação	Questão
Identificação de potenciais oportunidades de melhoria	A requisição do teste reflete as <i>guidelines</i> estabelecidas localmente?
	Os testes são solicitados no ambiente expectável (i.e. – internamento vs consulta externa, doenças infecciosas vs cirurgia ortopédica)?
	Testes de uso único (i.e. – testes genéticos) são repetidos no mesmo paciente?
	Os testes são solicitados nos intervalos expectáveis?
	Existe variação nas taxas de utilização entre médicos que observam pacientes similares, e que não é explicada por fatores clínicos?
	São solicitados testes de segunda-linha antes de obter os de primeira-linha?
	O “rendimento” do teste (i.e. – taxa de resultados anormais ou distribuição de resultados numéricos), está conforme o esperado?
	Existe variação inexplicável de rendimento do teste entre médicos requisitantes?
	Existem mudanças inesperadas nas taxas/padrões de utilização? Se sim, podem ser identificadas (i.e. – determinado clínico, painel, etc.)?
	Qual é a origem e o formato dos pedidos (i.e. – modelos, painéis, pedidos únicos, pedidos escritos em papel, pedidos diários recorrentes)?
	Como é que os padrões de utilização se comparam com os de instituições pares?
	São solicitados vários testes para o mesmo paciente e finalidade semelhante sem justificação clínica (i.e. - serologia e PCR para o mesmo agente infeccioso)?
	“Qual é o custo do teste?” e/ou “O reembolso/seguro cobrirá o custo do teste?”
Seleção da estratégia de gestão adequada	O teste é solicitado por quantos médicos, especialidades ou tipos de práticas?
	Qual o volume geral do teste? Qual o volume de testes em diferentes períodos do dia e da semana)?
	Quem está a solicitar o teste?
	Como é que o teste é solicitado?
	Os médicos consultam (manual de colheitas / telefonema) o laboratório antes da requisição do teste?

São identificados critérios clínicos que ajudam a prever resultados anormais?
Qual a economia de custos estimada se for adotada uma estratégia de gestão?

6. Propostas para a Melhoria da Utilização de Testes de DIV nas Instituições de Saúde

Tendo em conta a revisão da literatura efetuada, suportada pelas iniciativas de gestão e uso apropriado de Testes de DIV descritas, assim como pelas boas práticas de gestão laboratorial, enunciam-se as seguintes propostas de melhoria que qualquer laboratório clínico pode perseguir, nomeadamente:

- a) Criação de comissões de utilização de Testes de DIV;
- b) Realização de sessões formativas direcionadas aos clínicos na ótica da prescrição;
- c) Realização de sessões formativas direcionadas ao pessoal que efetua colheita de produtos biológicos;
- d) Divulgação das principais causas de não conformidade e respetiva estatística junto dos profissionais de saúde que são parte interessada;
- e) Disponibilização do tempo de resposta dos Testes de DIV nos manuais de colheitas;
- f) Eliminação de eventuais testes obsoletos dos programas informáticos;
- g) Restringir a colocação de pedidos diários (ou com poucas horas de diferença) que não acrescentam valor clínico em doentes bem controlados, tanto do serviço de urgência como do internamento;
- h) Desenho de painéis ou menus de testes adaptados a cada realidade clínica tendo por base a melhor evidência (*guidelines*);
- i) Auditoria da efetividade dos painéis de testes nas condições determinadas;
- j) Restringir a solicitação de testes específicos a vias terapêuticas designadas ou especialidade médica (i.e. – Troponina I; Procalcitonina; Vitamina D, etc.);
- k) Revisão por pares ou Subespecialistas de testes de elevado custo;
- l) Integração de algoritmos de cancelamento e de adição automática de testes de segunda linha;
- m) Criação, divulgação e integração de intervalos mínimos de testagem nos sistemas informáticos;
- n) Disseminação de informação sobre práticas clínicas e laboratoriais que carecem de evidência científica ou utilidade clínica, e que devem ser desencorajadas ou eliminadas;
- o) Criação e divulgação duma lista de valores críticos;
- p) Onde possível, incluir no relatório o valor crítico de mudança (Reference Change Value – RCV);
- q) Incluir nos relatórios a metodologia de teste;
- r) Implementação de metodologias de teste com o mais elevado padrão de qualidade atingido;
- s) Entrega de amostras e marcação de análises provenientes da consulta externa tendo em conta o momento da utilidade clínica;
- t) Ajuste do horário de colheita para solicitações que não justificam jejum prolongado;
- u) Identificar oportunidades de melhoria na utilização de Testes de DIV;
- v) Divulgação dos resultados das iniciativas empreendidas.

7. Conclusão

O valor e importância dos Testes de DIV na saúde e na economia está bem estabelecido, contudo a evidência recente sugere que aproximadamente 25-40% dos testes solicitados são de alguma forma questionáveis num determinado contexto clínico, e que até 30% podem ser considerados inapropriados (30). É por isso evidente que uma grande porção dos Testes de DIV não contribui para uma efetiva tomada de decisão, não proporcionando valor no contexto dos cuidados de saúde.

Num ambiente de recursos limitados e de otimização dos cuidados, torna-se por isso fundamental a implementação holística de estratégias de gestão de Uso Racional / Apropriado dos Testes de DIV, cujas iniciativas devem partir de dentro do laboratório (responsável pela implementação dos testes) e incluir outras partes interessadas de modo a garantir o envolvimento e melhor aceitação. Sendo uma tarefa multidisciplinar, trata-se, portanto, também de uma oportunidade para conhecer e colaborar de forma aberta com profissionais com perspectivas diferenciadas, o que contribuirá para decisões mais informadas e para o sucesso e sustentabilidade das iniciativas.

As propostas enunciadas pretendem ser um contributo para uma medicina laboratorial mais proativa, mais visível, mais sustentável e mais focada no nível de valor entregue, de preferência no contexto da integração em vias terapêuticas nas quais os testes são usados (14), não descurando a qualidade da performance analítica e custo de entrega. São expectáveis benefícios em testes de trabalho intensivo, e por outro lado, a realização de menor número de testes de baixa utilidade ou redundantes, ajudando a melhorar o tempo de resposta do laboratório em favor de testes de maior complexidade e utilidade clínica. Eventuais melhorias de eficiência podem traduzir-se em diagnósticos mais atempados, monitorizações e tratamentos mais efetivos, estadias menos prolongadas tanto no internamento como na urgência e maior satisfação dos pacientes.

O nível atual de informatização da solicitação de Testes de DIV e a criação de Unidades Locais de Saúde, tem o potencial de ampliar os benefícios do conceito de uso racional, uma vez que médicos em diferentes ambientes de prestação terão acesso a resultados prévios ou pendentes de um determinado paciente, permitindo selecionar apenas os testes necessários evitando desperdícios. A educação dos clínicos e dos pacientes é aqui um ponto de extrema relevância.

Concluindo, a implementação de melhores práticas de uso racional e apropriado dos Testes de DIV visam melhorar a qualidade e segurança das decisões tomadas sobre os cuidados de saúde, de forma custo-efetiva e centrada nos resultados do paciente.

Author Contributions: Não aplicável.

Funding: Sem qualquer financiamento a declarar.

Conflicts of Interest: O autor declara não existirem conflitos de interesse.

8. Referências

1. Olver P, Bohn MK, Adeli K. Central role of laboratory medicine in public health and patient care. Clin Chem Lab Med. 2023;61(4): 666–73.

2. Freedman D. Towards better test utilization – strategies to improve physician ordering and their impact on patient outcomes. *eJIFCC*. 2015;26(1):015-030.
3. Plebani M, Zaninotto M, Faggian D. Utilization management: a European perspective. *Clin Chim Acta*. 2014;427:137-41.
4. Regulamento (ue) 2017/746 do parlamento europeu e do conselho de 5 de abril de 2017 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* e que revoga a Diretiva 98/79/CE e a Decisão 2010/227/UE da Comissão. JOUE L 117, 5.5.2017:176–332 pp. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj>.
5. The Lewin Group Inc. The Value of Diagnostics Innovation, Adoption and Diffusion into Health Care. 2005.
6. The Lewin Group Inc. The Value of Laboratory Screening and Diagnostic Tests for Prevention and Health Care Improvement. 2009.
7. Apifarma. Valor dos Testes Diagnóstico In Vitro na Saúde, Sociedade e Economia. 2023.
8. Rohr UP, Binder C, Dieterle T, Giusti F, Messina C, Toerien E, et al. The Value of In Vitro Diagnostic Testing in Medical Practice: A Status Report. *PLoS One*. 2016;11(3):e0149856.
9. Conselho de Finanças Públicas (CFP). Evolução do desempenho do serviço nacional de saúde em 2021. CFP; Junho 2022.
10. Instituto Nacional de Estatística (INE). Estatísticas de saúde 2021. Edição 2023. Lisboa: INE; 2023.
11. INE, PORDATA. European IVD Market Statistics Report, MedTech Europe. 2017.
12. Lippi G, Plebani M. The add value of laboratory diagnostics: the many reasons why decision-makers should actually care. *J Lab Precis Med*. 2017; 2(12):100.
13. CLSI. Developing and Managing a Medical Laboratory (Test) Utilization Management Program. 1st ed. CLSI report GP49. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
14. Price C, St John A, Christenson R, Scharnhorst V, Oellerich M, Jones P, et al. Leveraging the real value of laboratory medicine with the value proposition. *Clin Chim Acta*. 2016;462:183-6.
15. Kouri T, Hofmann W, Falbo F, Oyaert M, Schubert S, Gertsen JB, Merens A, Pestel-Caron M, on behalf of the EFLM European Urinalysis Group. The EFLM European Urinalysis Guideline Update 2023. Available from: https://www.hdmblm.hr/images/vijesti/-2023/31-01/EFLM_European_Urinalysis_Guidelines_Draft.pdf
16. Berte LM, Nevalainen DE. The laboratory's role in assessing patient outcomes. *Lab Med*. 1998;29:114-9.
17. Kroner G, Richman S, Fletcher A. Current state of laboratory test utilization practices in the clinical laboratory. *Acad Pathol*. 2022;9;9(1):100039.
18. Bates DW, Boyle DL, Rittenberg E, Kuperman GJ, Ma'Luf N, Menkin V, et al. What proportion of common diagnostic tests appear redundant? *Am J Med*. 1998;104(4):361-8.
19. Procop GW, Keating C, Stagno P, Kottke- Marchand K, Partin M, Tuttle R, et al. Reducing duplicate testing: a comparison of two clinical decision support tools. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(5):623-6.
20. Eaton KP, Levy K, Soong C, Pahwa AK, Petrilli C, Ziemba JB, Cho HJ, et al. Evidence-Based Guidelines to Eliminate Repetitive Laboratory Testing. *JAMA Intern Med*. 2017;177(12):1833-9.

21. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, Whelan J, Arnaout R. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(11):e78962.
22. Sarkar MK, Botz CM, Laposata M. An assessment of overutilization and underutilization of laboratory tests by expert physicians in the evaluation of patients for bleeding and thrombotic disorders in clinical context and in real time. *Diagnosis (Berl)*. 2017;4(1):21-6.
23. Driskell OJ, Holland D, Hanna FW, Jones P, Pemberton RJ, Tran M, et al. Inappropriate requesting of HbA1c is widespread: assessment of prevalence, impact of national guidance and practice-to-practice variability. *Clin Chem*. 2012;58:906–15.
24. Rubinstein M, Hirsch R, Bandyopadhyay K, Madison B, Taylor T, Ranne A, et al. Effectiveness of Practices to Support Appropriate Laboratory Test Utilization: A Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Pathol*. 2018;149(3):197-221.
25. Fryer AA, Smellie WS. Managing demand for laboratory tests: a laboratory toolkit. *J Clin Pathol*. 2013;66(1):62-72.
26. DeKay ML, Asch DA. Is the defensive use of diagnostic tests good for patients, or bad? *Med Decis Making*. 1998;18(1):19-28.
27. Herndon MB, Schwartz LM, Woloshin S, Anthony D, Gallagher P, Fowler F, et al. Older patients perceptions of “unnecessary” tests and referrals: a national survey of Medicare beneficiaries. *J Gen Intern Med*. 2008;23(10):1547-54.
28. Fryer AA, Hanna FW. Managing demand for pathology tests: financial imperative or duty of care? *Ann Clin Biochem*. 2009 46(Pt 6):435-7.
29. Valenstein P, Leiken A, Lehmann C. Test-ordering by multiple physicians increases unnecessary laboratory examinations. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(3):238-41.
30. Salinas M, Lopez-Garrigos M, Rodriguez-Borja E, et al. Laboratory Test Requesting Appropriateness and Patient Safety. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH; 2017.
31. Smellie WS. Demand management and test request rationalization. *Ann Clin Biochem*. 2012;49(Pt 4):323-36.
32. American Board of Internal Medicine Foundation. Choosing Wisely; 2023. Available from: <http://www.choosingwisely.org/>.
33. Baird GS. The Choosing Wisely initiative and laboratory test stewardship. *Diagnosis (Berl)*. 2019;6(1):15-23.
34. VanSpronsen AD, Villatoro V, Zychla L, Wang Y, Turley E, Ohinmaa A, et al. A New List for Choosing Wisely Canada From the "Hidden Profession" of Medical Laboratory Science. *Am J Clin Pathol*. 2022;157(1):40-6.
35. Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine. National Minimum Re-testing Interval Project: A final report detailing consensus recommendations for minimum re-testing intervals for use in Clinical Biochemistry. 2013. Available from: <https://www.rcpath.org/static/bbcd0eb4-e250-4a09-80ec5e7139ab4fb8/ACB-Minimum-Retesting-Intervals-for-Clinical-Biochemistry-recommendations.pdf>.
36. Royal College of Pathologists. National minimum retesting intervals in pathology. 2021. Available from: https://www.rcpath.org/static/253e8950-3721-4aa2-8ddd4bd94f73040e/g147_national-minimum_retesting_intervals_in_pathology.pdf.

37. Jackson BR, Krasowski MD, Sims PJ. Laboratory diagnostic oversight committees and the profession of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(3):273-4.
38. Cadamuro J, Ibarz M, Cornes M, Nybo M, Haschke-Becher E, von Meyer A, et al. Managing inappropriate utilization of laboratory resources. *Diagnosis (Berl)*. 2019;6(1):5–13.
39. Mrazek C, Haschke-Becher E, Felder T, Keppel M, Oberkofler H, Cadamuro J. Laboratory Demand Management Strategies—An Overview. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(7):1141.
40. Srivastava R, Bartlett WA, Kennedy IM, Hiney A, Fletcher C, Murphy M. Reflex and reflective testing: efficiency and effectiveness of adding on laboratory tests. *Ann Clin Biochem*. 2010;47(Pt 3):223-7.
41. Constancio N, Ferraz M, Martins C, Kraychete A, Bitencourt P, Nascimento M. Hepatitis C in Hemodialysis Units: diagnosis and therapeutic approach. *J Bras Nefrol*. 2019;41(4):539-49.
42. Higgins C. Iatrogenic anemia – a downside of blood testing. 2008. Available from: <https://acutearetesting.org/en/articles/iatrogenic-anemia--a-downside-of-blood-testing>.
43. Tomaiuolo R, Banfi G. From volume to value: a watershed moment for the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2023; doi: 10.1515/cclm-2023-0870.
44. CLSI. Management of Critical- and Significant-Risk Results. 1st ed. CLSI guideline GP47. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
45. Beaty L. Understanding diagnostic related groups (DRGs) and inpatient hospital reimbursement. *Gastroenterol Nurs*. 2005;28(5):363-8.

Systematic Review

Perspectives on the future of potential biomarkers alongside PD-L1 in NSCLC- A systematic review

Mariana Freire ¹, Diana Martins ^{1,2,3,4,5}, Maria Filomena Botelho ^{3,4,5}, Fernando Mendes ^{1,2,3,4,5,6,*}¹ Politécnico de Coimbra, ESTeSC, UCPCBL, Rua 5 de Outubro- SM Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal; marianafreire@estescoimbra.pt (M.F.); dianamartins@estesc.ipc.pt (D.M.)² Laboratório de Investigação em Ciências Aplicadas à Saúde (LabinSaúde), Politécnico de Coimbra, ESTeSC, Rua 5 de Outubro- SM Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal³ Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) Area of Environment Genetics and Oncobiology (CI-MAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; mfbotelho@fmed.uc.pt (M.F.B.)⁴ Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal⁵ Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), 3004-561 Coimbra, Portugal⁶ European Association for Professions in Biomedical Sciences, B-1000 Brussels, Belgium

* Correspondence: fjmendes@estesc.ipc.pt (F.M.)

Abstract: Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) are a remarkable approach to Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) treatment. However, most patients may develop primary or acquired resistance. The expression of programmed cell death protein ligand 1 (PD-L1) is the only current companion diagnostic, but limitations in this marker are described. We aim to highlight the current knowledge of immunotherapy resistance mechanisms and identify possible supporting biomarkers in NSCLC patients. For this systematic review, we conducted a search on the PubMed database. English language, Free-full text articles were initially imposed and all manuscripts out of the main context were excluded. The quality of the evidence was assessed with the ROBVIS risk of bias tool. This systematic review is registered at the International Platform of Registered Systematic Review and Meta-analysis Protocols. Of the 590 records, data for qualitative synthesis were available for 27 studies. Patients with high tumor mutational burden showed longer median overall survival and progression-free survival. Harboring certain types of mutations displayed worse ICI outcomes. Assessment of CTC and ctDNA has shown a crucial impact on the stratification patients for immunotherapy. Limitations in the PD-L1 test may result in ambiguous and inconsistent conclusions. Tumor mutational burden, mutation profile and liquid biopsies are promising complementary biomarkers.

Keywords: NSCLC; Immunotherapy; Resistance; Therapeutics; Biomarkers; Genetic; Liquid Biopsy.

Citation: Freire, Mariana; Martins, Diana; Botelho, Maria Filomena; Mendes, Fernando. Perspectives on the future of potential biomarkers alongside PD-L1 in NSCLC- A systematic review. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2024 Mar 11;1(1): 27-48

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: 20 December 2023

Accepted: 19 January 2024

Published: 2 March 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Despite the advances in cancer research, lung cancer (LC) remains one of the leading cancers worldwide. In 2020, 2 06 771 new cases were globally estimated and 1 796 144 deaths, representing the uttermost frequent cause of death by cancer (1).

Immunotherapy, mainly PD-1/PD-L1 blockade, has revolutionized the treatment landscape of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), as first-line and second-line therapy, used as monotherapy or in combination with chemotherapy/chemoradiotherapy, by removing the blockade of T cell activation triggered by cancer cells, thus, promoting the sustaining and increasing of antitumor immunity (2–4).

ICI, which limits programmed cell death protein 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), such as anti-PD-1/PD-L1 and anti-CTLA-4, has improved exponentially the treatment outcome (2). The immune checkpoint CTLA-4 is found on activated T cells and regulatory T cells (Treg) and its main role is preventing T cell activation by binding to B7, present on the dendritic cells (DC) surface, to hinder its interaction with CD28 (5–7).

PD-1, expressed on diverse cell surfaces such as T cells, Natural Killer cells, B cells, dendritic cells, monocytes and macrophages, and PD-L1, expressed by activated T cells, B cells, DCs and

macrophages, are regulated by diverse factors such as transcription factors (e.g. interferon, nuclear factor of activated T cells, NOTCH, MYC, STAT family, cyclin-dependent kinase 5), oncogenes, microRNAs and tumor suppressor genes, which during the immune response, leads to the interaction between these proteins allowing the tumor to escape (5,7–11).

Presently, there are three anti-PD-1 antibodies - pembrolizumab, nivolumab and cemiplimab – and three anti-PD-L1 antibodies - atezolizumab, durvalumab and avelumab – for the treatment of several types of cancer (12).

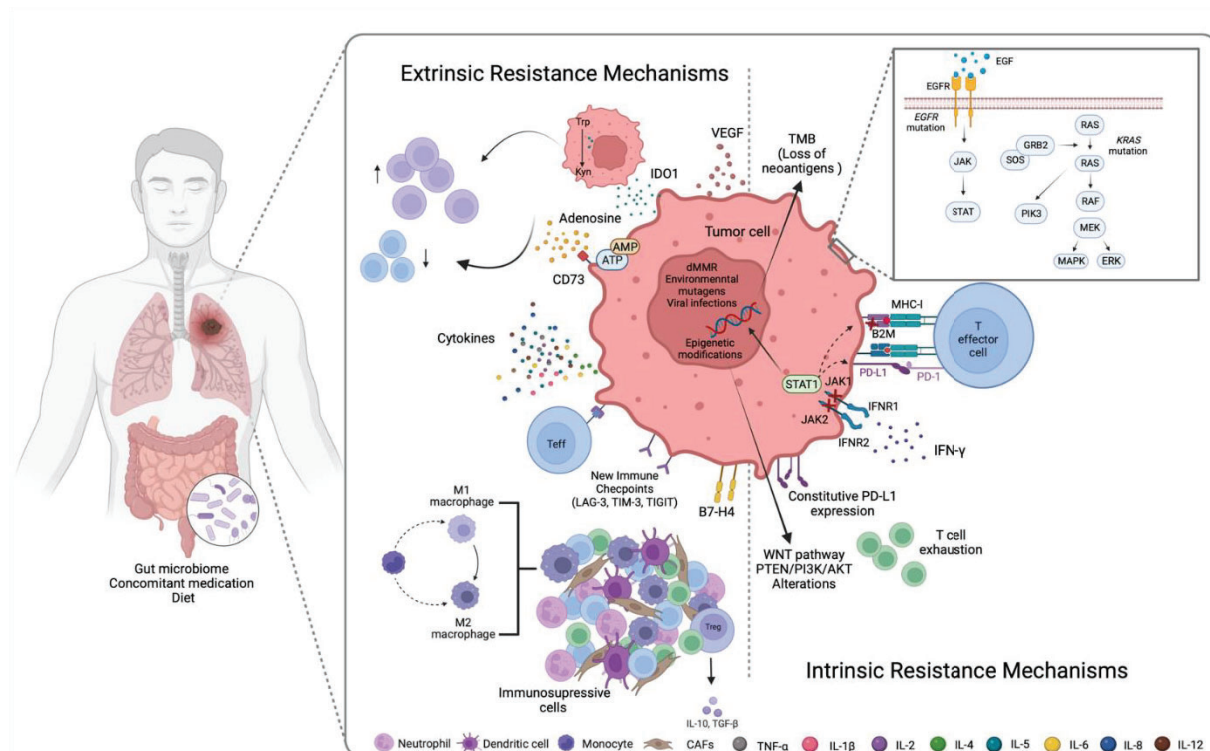
1.1 Primary and acquired resistance to immunotherapy in lung cancer

Even though ICI has demonstrated long-term improvements in patient outcomes, developing data also revealed that only 15-20% achieved an objective response (13). Most patients develop either primary resistance, representing a problem with a frequency of 8-21%, or secondary resistance or also designed as acquired resistance (AR) (13–16).

Given these observations, it is crucial to understand the mechanisms of resistance so that new approaches can be used to improve clinical options and achieve durable outcome benefits in NSCLC patients.

1.2 The mechanisms of immunotherapy resistance in lung cancer

From a spatial perspective, principal mechanisms of resistance involving tumor cell-intrinsic features include changes in immune recognition, cell signaling pathways, gene expression and antigen presentation, leading to an inhibitory immunosuppressive microenvironment; tumor extrinsic mechanisms occurring in the microenvironment and tumor-immunity cycle involve the trigger of immunosuppressive cells, cytokines, metabolites, and new alternatives ICI (Figure 1) (18,26,27). Furthermore, host-related characteristics such as the gut microbiome, diet and asso-



ciated medications play a critical role in immune functions and ICI response (Figure 1) (26).

Figure 1. Immunotherapy resistance mechanisms in lung cancer. Tumor intrinsic mechanisms involve alterations in immune recognition (PD-L1 expression), changes in immunogenicity (TMB) and antigen presentation (mutation of B2M), abnormal cell signaling pathways (e.g., IFN, MAPK, PI3K, JAK/STAT) and the presence of driver mutations (e.g., KRAS, EGFR, ALK, KEAP1, STK11 mutations) causing a tumor immunosuppressive environment. Tumor extrinsic mechanisms include expression of immunosuppressive cells (TAM, M2 macrophages, MDSCs, regulatory T cells), T cell exhaustion phenotype, cytokines (e.g., IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , VEGF) and metabolites (adenosine, IDO1), as well as co-expression of immune checkpoint inhibitors

(TIM, LAG-3, TIGIT). Host-related factors comprise diet, concomitant medication and microbiome affecting immunotherapy response.

Programmed cell death protein ligand 1 expression

The PD-1/PD-L1 axis represents the principle of immunotherapy in NSCLC. Different strategies have been described that allow tumor cells to avoid immune surveillance such as an activated IFN- γ cascade by T-cells resulting in high PD-L1 and various pathways, namely, PI3K/AKT pathway, MAPK pathway, WNT pathway, JAK/STAT pathway (13,17,18).

Two different resistance mechanisms can be identified related to PD-L1 expression: the lack of tumor PD-L1 has been associated with poor responses to PD-1/PD-L1 therapy and the presence of exhausted CD8⁺ T cells due to chronic exposure to high PD-L1 phenotype, causing default cytotoxicity and proliferation (Figure 1) (13,17,18).

Immunoediting is a process of down-regulation of neoantigens and abnormal antigen-presenting genes by cancer cells contributing to primary and acquired resistance (19–22).

Tumor Mutational Burden and changes in immunogenicity

Tumor cells harboring somatic mutations are genetically unsteady and consequently express neoantigens, enabling dendritic cells (DC) to stimulate T-cells maturation and proliferation in TME, which triggers an adaptative immune response against tumor cells (13,18,23). The presence of continuous mutations is due to DNA damage as a consequence of mismatch repair deficiency (dMMR), environment mutagens and viral infections (23) (Figure 1). Especially in LC patients, tobacco contains several carcinogenic compounds that are responsible for the increase of tumor mutational burden (TMB) (23).

TMB is defined as the total number of nonsynonymous mutations per coding area of a tumor genome (Mut/Mb) and tumors expressing high mutation loads have been correlated with PD-1/PD-L1 blockade efficacy (23,24)

Mutations in Oncogenes and Suppressor tumor genes and abnormal signal pathways

Alterations in oncogenes and suppressor tumor genes are the starting point for tumor growth and these mutations have significant repercussions on ICI activity (13). In NSCLC patients, one of the most frequent mutations is found in *EGFR* and despite the fact that these tumors tend to express high levels of PD-L1, the TMB is low as a result of its elevated association with non-smoking habits and capacity of up-regulating immunosuppressive cells, inhibitory immune checkpoints and cytokines (13,25,26).

Moreover, *Kristen Rat Sarcoma* (*KRAS*) mutations represent a significant percentage of NSCLC patients (27,28). *KRAS*-mutant NSCLC reveals high PD-L1 expression as well as TMB and T cell infiltration due to its prevalence in smokers, consequently conferring ICI sensitivity (Figure 1) (25,27). Certain co-mutations show an influence on clinical responses using immunotherapy, namely co-occurring *Tumor Protein P53* (*TP53*) mutations, *KRAS/STK11* mutations and *KEAP1* mutations (25,29).

Despite remarkable developments, many patients fail to respond to immunotherapy and PD-L1 expression by immunohistochemistry (IHC) is the only current standard test to predict the immunotherapy response (15,30–32). Therefore, it is important to characterize the resistance mechanisms and identify the biomarkers associated with that and so overcome immunotherapy resistance.

This systematic review aims to provide an overview of the immunotherapy resistance mechanisms and identify possible biomarkers associated with immunotherapy response in NSCLC, as well as examine new treatment options to overcome this obstacle.

2. Materials and Methods

This systematic review was performed according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (33). We conducted an extensive search on the PubMed database undertaking literature from randomized clinical trials (RCT), review articles (RA), clinical trials (CT), meta-analysis and systematic reviews, using the following MeSH

Terms “NSCLC”, “Immunotherapy”, “Resistance”, “Biomarkers”, “Liquid Biopsy”, “Genetic” and “Targeted Therapy” (Table 1). All the selected articles were initially undergoing inclusive and exclusion criteria and sorted afterward by title and abstract resulting in a total of 291 manuscripts in which 27 studies were available for qualitative synthesis after articles exclusion. A robust analysis was executed thereupon to determine the relevance and quality of the selected articles underlying those with immunotherapy resistance mechanisms, biomarkers and novel therapy approaches findings. English language, Free-full text articles and clinical trials in humans were initially imposed and all manuscripts out of the main context were excluded. Additionally, it was only taken into consideration papers between 2017 and 2022. The detailed search strategy is displayed in Figure 2 and all information is properly referenced. The quality of the evidence was assessed with the ROBVIS risk of bias tool evidencing a low to moderate risk of bias with special attention due to the randomization process (supplementary material). For a better comprehension of the selected articles, median overall survival (OS) was compared between groups undergoing PD-1/PD-L1 blockade and identified in the table and progression-free survival (PFS) was described in the results. Even not presented, other statistics parameters were analyzed, such as ORR and DCB. All the results presented were statistically significant ($p\text{-value} \leq 0.05$). This systematic review is registered at the International Platform of Registered Systematic Review and Meta-analysis Protocols (INPLASY) with the digital object identifier 10.37766/inplasy2022.9.001.

As guidance for the search strategy, the following PICO criteria were addressed: **Population:** Patients undergoing PD-1/PD-L1 blockade for histologically confirmed NSCLC represented our target population. Furthermore, patients with prior cycles of chemotherapy or radiotherapy, as first-line treatment, were allowed and patients with metastatic sites were also legible to evaluate PD-L1 expression. **Intervention:** Accurate information about PD-L1 IHC, TMB assessment, Mutation profile, ctDNA and CTC methodologies were taken into consideration and identified to interpret results. Patients undergoing ICI were submitted to PD-L1 expression, TMB, mutation profile, ctDNA and CTC assessment and sorted into different groups determined by the expression of these biomarkers. **Comparators:** Considering the potential impact of these biomarkers on ICI response, patient groups were compared between high/low expression or presence/absence. **Outcomes:** In all cases, median overall survival and progression-free survival, whenever available, were retrieved. The outcomes were extrapolated to understand how new potential complementary biomarkers alongside PD-L1 expression may benefit clinical decisions for ICI.

Table 1. The strategy used for advanced search using Medical Subject Headings terms and boolean operators to acquire proper articles for this review

Medical Subject Headings terms	And	Not
NSCLC	Immunotherapy, Resistance	
NSCLC	Immunotherapy, Resistance, Biomarkers	
NSCLC	Immunotherapy, Resistance, Genetic	
NSCLC	Immunotherapy, Biomarkers, Therapeutics	Target therapy
NSCLC	Liquid Biopsy	
NSCLC	PD-L1, Circulating tumor DNA	
NSCLC	Circulating tumor DNA	EGFR, ALK

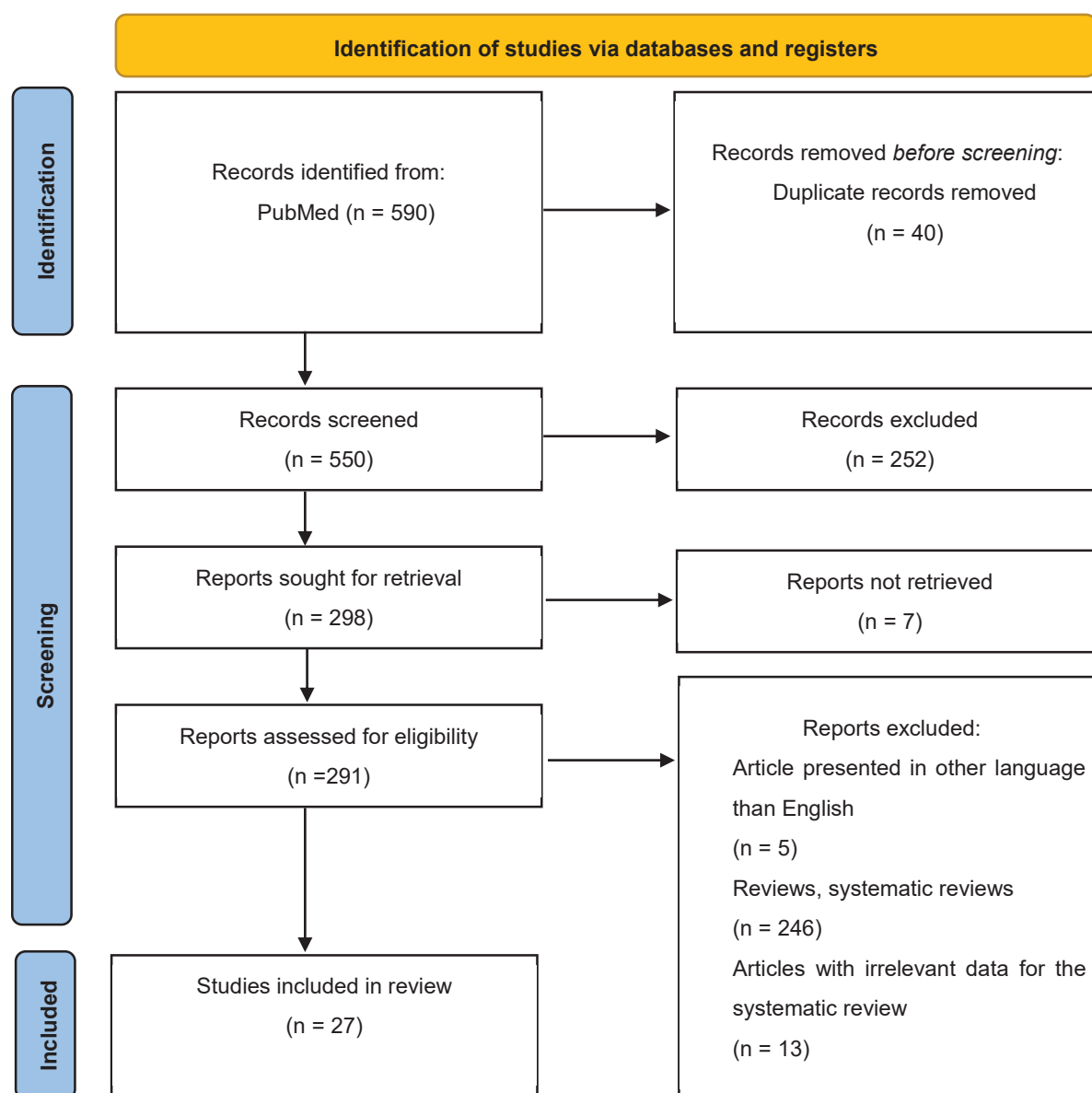


Figure 2. Flow chart. Prism of the systematic review, detailing the searches on the database, the number of abstracts selected, full-text articles assessed for eligibility, and the total number of studies included for qualitative synthesis.

3. Results

This systematic review included 27 studies, mentioned in Table 2, that were evaluated providing an overview of the results, suggesting strong associations among diverse biomarkers, supporting PD-L1 expression on patient selection for PD-1/PD-L1 blockade therapy.

Table 2. Studies included in this systematic review exhibiting the capability of different biomarkers to have a supporting role alongside PD-L1 that may improve clinical decisions and patient outcomes

Ref	Author	Year	Study	Biomarker	Method	Therapy	Result
(34)	Mok <i>et al.</i>	2019	Clinical Trial (KEYNOTE-042)	PD-L1 expression	Administration of anti-PD-1 or chemotherapy in 1274 patients with PD-L1 $\geq 1\%$	Pembrolizumab Chemotherapy	OS in the pembrolizumab group was longer in TPS $\geq 50\%$ than $\geq 20\%$ and $\geq 1\%$ populations (20.0 vs. 17.7 vs. 16.7 months) AEs of grade 3 or worse occurred in 18% of patients treated with ICI
(35)	Reck <i>et al.</i>	2019	Clinical Trial (phase III KEYNOTE-024)	PD-L1 expression	Administration of anti-PD-1 or platinum-based chemotherapy in 305 patients with untreated NSCLC and PD-L1 $\geq 50\%$	Pembrolizumab Chemotherapy	The median OS in the pembrolizumab group was 30.0 months. ICI treatment-related AEs was frequent in 31.2% patients
(36)	Hellmann <i>et al.</i>	2019	Clinical Trial (CheckMate 227 open-label phase 3 trial)	PD-L1 expression	Administration of nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone or chemotherapy in 1379 patients	Nivolumab Ipilimumab Chemotherapy	Median OS was similar between patients with TPS $\geq 1\%$ and $<1\%$ under nivolumab plus ipilimumab (17.1 vs. 17.2 months, respectively) 32% of patients treated with ICI experienced AEs
(37)	Gadgeel <i>et al.</i>	2020	Clinical Trial (KEYNOTE-189)	PD-L1 expression	Administration of pemetrexed and a platinum-based drug plus either pembrolizumab or placebo in 616 patients	Pembrolizumab Pemetrexed Placebo	The median OS was greater in patients expressing TPS $\geq 50\%$ than 1-49% than TPS $<1\%$ (NR vs. 21.8 vs. 17.2 months) AEs occurred in 71% of patients treated with ICI plus chemotherapy

Table 2. Cont.

(38)	Mazieres <i>et al.</i>	2021	Clinical Trial (Phase 2 POPLAR and phase 3 OAK)	PD-L1 expression	Patients of both studies were randomized to chemotherapy or immunotherapy Immunohistochemistry was per- formed to define PD-L1 expres- sion	Atezolizumab Docetaxel	In the OAK study, the median OS was 20.5 months in the TC3 or IC3 group and 11.8 months in the TC0 or IC0 group AEs grade 3 and 4 occurred in a few patients that re- ceived anti-PD-L1
(39)	Rizvi <i>et al.</i>	2020	Clinical Trial (MYSTIC phase 3)	PD-L1 expression TMB	Administration of durvalumab, durvalumab plus tremelimumab or chemotherapy in 1092 pa- tients NGS performed for TMB status	Durvalumab Tremelimumab Chemotherapy	Median OS for patients with TPS <1%, ≥1%, 25-49% and ≥50% was 10.1 vs. 11.1 vs. 14.6 vs. 18.3 months 809 patients with bTMB ≥ 20 mutations showed im- proved OS from durvalumab plus tremelimumab com- pared to bTMB <20 mutations (21.9 vs. 8.5 months) OS for patients with tTMB ≥ 10 mutations was 16.6 months and for tTMB <10 mutations was 8.4 months 37.8% of patients treated with ICI experienced AEs
(40)	Herbst <i>et al.</i>	2020	Clinical Trial	PD-L1 expression TMB	572 patients were randomized to receive anti-PD-L1 or chemother- apy	Atezolizumab Chemotherapy	205 patients who had the highest expression of PD-L1 presented median OS of 20.2 months The median OS among patients with bTMB ≥16 was 13.9 months and 12.9 months for those with bTMB <16 90.2% of the patients receiving atezolizumab had ad- verse events

Table 2. Cont.

(41)	Herbst <i>et al.</i>	2021	Clinical Trial (5-year survival update from KEYNOTE-010)	PD-L1 expression TMB	1034 patients were randomized to pembrolizumab or docetaxel TMB was estimated by WES in 254 patients	Pembrolizumab Docetaxel	Median OS was longer in patients under pembrolizumab with TPS ≥50% than TPS ≥1% (16.9 vs. 11.8 months) Median OS was 14.1 months in patients with tTMB ≥175 mut/exome under pembrolizumab and 9.3 months in pa- tients with low tTMB 67.7% of the patients receiving ICI had adverse events
(42)	Peters <i>et al.</i>	2017	Clinical Trial (BIRCH)	PD-L1 expression Mutation status	Administration of anti-PD-1 as first-line or subsequent therapy, in 667 patients sorted into three cohorts regarding previous ther- apy profile Cohort 1 – no prior chemother- apy Cohort 2- one prior platinum chemotherapy Cohort 3 – at least two prior chemotherapies	Atezolizumab	The median OS was 23.5 vs. 15.5 vs. 13.2 in the three groups The median OS for <i>EGFR</i> -mutant vs. wild-type tumors in cohorts 1, 2, and 3 was 20.1 months vs. NR, 9.8 vs. 16.3 months, and 7.4 vs. 14.7 months, respectively The median OS for <i>KRAS</i> -mutant vs. wild-type tumors in cohorts 1, 2, and 3 was NR vs. 20.1 months, 17.7 vs. 15.1 months, and 12.1 vs. 13.8 months, respectively 65% of patients experienced at least one AE related to treatment
(43)	Garassino <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial (Phase 2, ATLANTIC trial)	PD-L1 expression Mutation status	444 patients were enrolled into three cohorts to receive anti-PD- L1 and to be evaluated its effi- cacy regards to mutations profile	Durvalumab	Median OS was longer in patients with TPS ≥25% com- pared to TPS <25% OS follow-up was lower in patients harboring <i>EGFR</i> ⁺ / <i>ALK</i> ⁺ NSCLC than with <i>EGFR</i> ⁻ / <i>ALK</i> ⁻ NSCLC AEs occurred in 27 of 444 patients

Table 2. Cont.

(44)	Schoenfeld <i>et al.</i>	2020	Clinical Trial	PD-L1 expression Mutation status	Evaluation of PD-L1 and mutation profile in a total of 1586 patients with lung adenocarcinoma using Immunohistochemistry and MSK-IMPACT assay	Anti-PD-(L)1 ± anti-CTLA-4	ORR was lost in <i>EGFR</i> mutant tumors, minimized in patients harboring <i>STK11</i> mutations and high in mutations <i>KRAS</i> and <i>TP53</i>
(26)	Rizvi <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial	PD-L1 expression TMB Mutation status	240 patients treated with ICI were admitted MSK-IMPACT, WES and immunohistochemistry were performed.	Anti-PD-(L)1 ± anti-CTLA-4	High TMB in patients with DCB than NDB (median, 8.5 vs. 6.6 SNVs/Mb) and in patients with CR/PR vs. SD vs. PD (median, 8.5 vs. 6.6 vs. 6.6 SNVs/Mb) DCB was high (50%) in patients high for TMB and PD-L1
(45)	Negrao <i>et al.</i>	2021	Clinical Trial	PD-L1 expression TMB Mutation status	4017 NSCLC patients were recruited to establish the effect of oncogene alterations NGS and immunohistochemistry were performed.	Pembrolizumab Nivolumab Atezolizumab Durvalumab Chemotherapy	High TMB associated with longer OS OS was longer in <i>BRAF</i> group and shorter in <i>EGFR</i> group (35.6 vs. 11.3 months.)

Table 2. Cont.

(46)	Hellmann <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial	TMB	WES performed on tumor tissue and blood from 75 patients treated with ICI as part of the CheckMate-012 study	Nivolumab Ipilimumab	ORR of 51% in patients with high TMB (>median, 158 mutations) compared to 13% of low TMB
(47)	Hellmann <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial (CheckMate 227)	TMB	Administration of nivolumab plus ipilimumab, nivolumab mono-therapy, or chemotherapy in 1189 patients with TPS ≥1 % and in 550 patients with TPS <1%	Nivolumab Ipilimumab Chemotherapy	Median PFS was meaningly longer among patients with high TMB than patients with low TMB (7.2 vs. 3.2 months, respectively) AEs occurred in 31.2% of patients treated with ICI
(48)	Aggarwal <i>et al.</i>	2020	Clinical Trial	pTMB	Administration of first line pembrolizumab or chemotherapy in 66 patients with metastatic NSCLC A 500-gene NGS panel was used to determine pTMB.	Pembrolizumab Pemetrexed	Improved median PFS for patients with pTMB ≥16 mut/Mb that received pembrolizumab compared to pTMB <16 mut/Mb (14.1 vs. 4.7 months) ERBB2 exon 20, <i>STK11</i> , <i>KEAP1</i> , or <i>PTEN</i> mutations associated with no 6-month DCB

Table 2. Cont.

(49)	Kim <i>et al.</i>	2022	Clinical Trial (2 phase B-F1RST trial)	TMB	Evaluation of bTMB by Foundation Medicine bTMB assay in 119 patients undergoing atezolizumab	Atezolizumab	A trend toward increasing OS was observed (23.9 months in the bTMB ≥ 16 group versus 13.4 months in the bTMB < 16) AEs occurred in 76% patients
(50)	Nie <i>et al.</i>	2022	Retrospective study	ctDNA-adjusted bTMB	944 advanced NSCLC patients from three cohorts were included to evaluate ctDNA-adjusted bTMB by FoundationOne CDx, NCC-GP150 and OncoScreen Plus.	Atezolizumab Docetaxel	Median OS significantly longer in patients with High ctDNA-adjusted bTMB (15.9 months <i>versus</i> 9.5 months)
(51)	Biton <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial	Mutation status	Combined analysis based on immunochemistry, flow-cytometry, NGS were performed in different cohorts	Nivolumab Pembrolizumab	A significant longer OS was shown in patients with <i>TP53-Mut/STK11-EGFR- WT</i> tumors compared to tumors with <i>SKT11</i> or <i>EGFR</i> mutations
(52)	Mazieres <i>et al.</i>	2019	Clinical Trial	Mutation Status	A total of 551 patients with at least one oncogenic driver alteration were enrolled to evaluate immunotherapy efficacy Immunohistochemistry and NGS were performed.	Nivolumab Pembrolizumab Atezolizumab Durvalumab	Median OS was in months 10.0 for <i>EGFR</i> mutated patients, 13.5 for <i>KRAS</i> , 17.0 for <i>ALK</i> , 13.6 for <i>BRAF</i> , 20.3 for <i>HER2</i> , 21.3 for <i>RET</i> , and 18.4 for <i>MET</i>
(53)	Liu <i>et al.</i>	2020	Meta-analysis	Mutation status	Four pool analysis were included Immunohistochemistry, gene set enrichment analysis and The Cancer Genome Atlas (TCGA) were used	Nivolumab Atezolizumab Avelumab Pembrolizumab	OS in NSCLC patients with <i>KRAS</i> mutations were significantly better than wild-type <i>KRAS</i> patients

Table 2. Cont.

(54)	West <i>et al.</i>	2022	Clinical Trial (phase III, Impower150)	Mutation status	Mutation status was assessed by ctDNA NGS in 920 patients treated with anti-PD-L1 and/or bevacizumab with chemotherapy	Atezolizumab (A)	Median OS in <i>KRAS</i> -mutated NSCLC patients treated with ABCP, ACP and BCP was 19.8 vs. 11.7 vs. 9.9 months, re- spectively
						Bevacizumab (B)	Median OS in <i>KRAS</i> wild-type NSCLC patients treated with ABCP, ACP and BCP was 18.9 vs. 19.5 vs. 18.2 months, respectively
						Carboplatin/ paclitaxel (CP)	Median OS was shorter in patients with <i>KRAS</i> -mutated and co-occurring <i>STK11</i> and <i>KEAP1</i> mutations compared to <i>KRAS</i> -mutated with wild-type <i>SKT11</i> and/or <i>KEAP1</i> (11.1 vs. 7.9 vs. 8.7 months and 26.2 vs. 21.0 vs. 10.7 months)
							93.7% and 94.5% of patients had AEs when received ABCP and ACP
(55)	Guibert <i>et al</i>	2018	Clinical Trial	CTC	Immunohistochemistry and ISET technology were performed to assess PD-L1 expression and CTCs, correspondingly in 96 met- astatic NSCLC patients	Nivolumab	Patients with high CTC count experienced worse OS
(56)	Goldberg <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial	ctDNA	28 metastatic NSCLC patients were enrolled to evaluate ctDNA levels with radiographic response Multigene NGS assay and CT scans were used	Anti-PD-(L)1 ± anti- CTLA-4	Substantial drop in ctDNA levels in patients with radio- graphic response associated with improved OS

Table 2. Cont.

(57)	Leprieur <i>et al.</i>	2018	Clinical Trial	ctDNA	15 patients treated with PD-L1 therapy were enrolled to evaluate ctDNA by NGS	Nivolumab	OS was 2.0 months for patients with ctDNA >9% at first tumor evaluation vs. NR for patients with ctDNA decrease
(58)	Tamminga <i>et al.</i>	2019	Clinicla Trial	CTC tdEV	104 patients were enrolled to evaluate CTC and tdEV by Cell-Search®	Anti-PD-(L)1	Median OS was 4.5 months for patients with baseline CTC and 12.1 months for patients without CTC Median OS was 3.8 months for patients with tdEV≥ 18 and 9.7 months for patients with tdEV<18
(59)	Zou <i>et al.</i>	2021	Clinical Trial	ctDNA	ctDNA measured by MMPM in 46 patients	Atezolizumab	Median MMPM at 6 weeks with OS had a C index ≥ 0.7 Median survival time not reached in patients with MMPM levels of < 4.79

Legend: AE: adverse effect; ALK: *Anaplastic Lymphoma Kinase*; BRAF: *B-Raf Proto-oncogene Serine/Threonine-protein Kinase*; bTMB: blood TMB; CR: complete response; CTC: circulating tumor cells; ctDNA: circulating tumor DNA; CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; DC: dendritic cells; DCB: durable clinical benefit; DNA: deoxyribonucleic acid; EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*; ERBB2: *Erythroblastic Oncogene B*; ICI: immune checkpoint inhibitor; ISET: isolation by size of tumor cells; KEAP1: *Kelch-like ECH-associated Protein 1*; KRAS: *Kristen Rat Sarcoma*; LC-MS/MS: modified liquid chromatography tandem mass spectrometry; Mb: megabase; MMPM: mutant molecules per milliliter; mRNA: messenger ribonucleic acid; MSK-IMPACT: integrated mutation profiling of actionable cancer targets; NDB: no durable benefit; NGS: next generation sequencing; NR: not reached; NSCLC: non-small cell lung cancer; ORR: overall response rate; OS: overall survival; PD-1: programmed death 1; PD-L1: programmed death-ligand 1; PTEN: *Phosphatase and Tension Homolog Deleted on Chromosome 10*; pTMB: plasma TMB; RET: *Rearranged During Transfection Proto-oncogene*; RT-PCR: real time polymerase chain reaction; SD: stable disease; STK11: *Serine/Threonine Kinase 11*; SNVs: single-nucleotide variants; TC0 or IC0: PD-L1 expression on <1% of tumor cells or immune cells; TC3 or IC3: PD-L1 expression on ≥50% of tumor cells or on ≥10% of immune cells; TILs: tumor infiltrating lymphocytes; tdEV: tumor-derived extracellular vesicle; TMB: tumor mutational burden; TP53: *Tumor Protein 53*; TPS: tumor proportion score; tTMB: tissue TMB; WES: whole exome sequencing.

4. Discussion

In the last few years, NSCLC treatment options outstandingly improved. The use of immunotherapy drugs since FDA approval allowed to have a different perspective on how to treat NSCLC patients. Even though the PD-L1 blockade displays consistent outcomes, many treatment cycles tend to be unsuccessful due to primary or acquired resistance mechanisms. Understanding these mechanisms and what factors are involved enable to define alternative supporting biomarkers for personalized therapy. PD-L1 expression testing is the only companion diagnostic established for routine. The TPS or TC/IC evaluation is performed by immunohistochemistry, using a range of anti-PD-L1 antibodies corresponding to a particular drug: 22C3 clone for pembrolizumab, 28-8, SP142 and SP263 for nivolumab, atezolizumab and durvalumab, respectively (60). Even though patients with positive PD-L1 expression exhibited better responses, diverse clinical trials demonstrated positive responses in patients with TPS < 1%, which makes PD-L1 expression a biomarker equivocal and controversial (36–38). Furthermore, the wide range of available options for anti-PD-L1 antibodies may bias the effectiveness and interpretation of PD-L1 expression for suitable treatment options. Thus, the sensitivity and specificity were reported in the Blueprint project (Blueprint 1 and Blueprint 2) to standardize the diverse PD-L1 assays. The 22C3, 28-8 and SP263 exhibited good concordance in a range of thresholds, however, the SP142 was less sensitive (61,62). Even though some assays are interchangeable, there is currently no gold standard established and the interpretation differs due to unique staining patterns, different scoring criteria and cut-offs (60). The use of SP142, for the use of atezolizumab, targets tumor cells and immune cells, which differs from other assays on quantitative criteria. Moreover, the assays have different cut-offs to consider a sample PD-L1 positive. Studies determined that PD-L1 status is variable between resection specimens and biopsies and between primary tissue and metastatic sites. Additionally, it is reported higher PD-L1 expression in CTC than in tissue samples, and the presence of certain mutations, as stated in the clinical trials by Schoenfeld *et al.* (44) and Negrao *et al.* (45), has an impact on the expression of this molecule. Other reasons, such as previous treatments and heterogeneity across the tumor have been mentioned as intended limitations that should be taken into consideration to define PD-L1 expression as an ideal and single biomarker (63). Since PD-L1 status remains challenging as a robust biomarker, recent studies have been performed to establish potential new biomarkers to complement and provide clinical decisions. TMB demonstrated consistent results in diverse clinical trials across different types of tumors with easy and effective access using targeted sequencing panel assays, including, WES and NGS (MSK-IMPACT and FoundationOne CDx™). The FDA approved pembrolizumab, in 2020, for the treatment of adult and pediatric patients with unresectable or metastatic solid tumors with TMB ≥ 10 mut/Mb (64). The correlation between TMB and ICI responses was demonstrated in various clinical trials such as the previously mentioned (26,39–41,45–49), which reported better and longer responses in patients with high TMB than low TMB. The use of biopsies may be a disadvantage due to the lack of the number of cells present, thus, the assessment of TMB using blood samples has been executed in diverse clinical trials showing great outcomes. However, both tTMB and bTMB remain a weak biomarker to predict ICI responses for first-line therapy. Despite that, TMB may be of value in particular conditions when there is inadequate tissue for PD-L1 expression testing or patients do not express high levels of PD-L1, since no association between both biomarkers were established (49). The findings above mentioned show the potential of TMB, but further investigations and standardizations need to be established. For example, harboring certain mutations affect TMB expression, using diverse methodologies with different cut-offs promote a lack of reproducibility, and some assays analyze different characteristics such as the number of genes and type of mutations (24).

Harboring certain mutations is related to PD-L1 expression and subsequently, ICI response. EGFR and ALK are the most frequent mutations associated with ICI resistance. EGFR mutation is associated with high levels of PD-L1 expression due to constitutive activation of several signal pathways (PI3K/Akt/mTOR, MAPK, JAK/STAT); however, studies also show low levels of PD-L1 and association with low TMB. Furthermore, numerous studies have shown the association between a certain mutation or co-occurring mutations and its influence on immunotherapy including co-occurring KRAS and TP53 which show increased PD-L1 expression through loss of protein function of p53, and STK11 in both KRAS-driven mutation or wild-type patients also associated with low PD-L1 expression as a consequence of decreased T-cell infiltration in opposition to up-regulation

of neutrophil and pro-inflammatory cytokines (24,25,29,65). *KEAP1* mutations are also associated with shorter survival and several studies have shown that *KEAP1* co-mutations promote TIL suppression and induce PD-L1 expression, leading to negative responses (66).

These findings confirm the value of an NGS panel associated with PD-L1 expression in routine which might help to choose the most suitable intervention.

The urgency of complementary approaches to help predict ICI responses leads to the study of using liquid biopsy to complement PD-L1 IHC. Liquid biopsies consist of fluids such as blood, urine and cerebrospinal fluid, in which different targets, including CTCs, ctDNA, exosomes, circulating proteins and cytokines can be analyzed. (67). Results demonstrated that PD-L1 expression was higher in CTCs than in tissues and was associated with a worse prognosis, however, the detection of a suitable amount of CTCs is rare becoming a technical challenge. Additionally, ctDNA may play a crucial role in detecting TMB and specific mutations allowing patient stratification for immunotherapy. Reports show an inverse correlation between the expression of ctDNA and OS, but, some limitations in ctDNA remain a challenge since different methods might detect different populations and the lack of thresholds is poorly defined (59,68) Thus, extra investigations are crucial for the accuracy of using liquid biopsies to evaluate immunotherapy response.

Besides that, other alternative biomarkers have been investigated including HLA, cytokines, TILs, IDO and gut microbiome. However, the lack of prospective validation demand further investigations with a bigger sample size to confirm the specificity and precision of these findings (Figure 3).

The identification of the mechanisms of resistance and potential complementary biomarkers may provide new knowledge for better screening in patients through ICI treatment and offer new therapeutic alternatives to overcome immunotherapy resistance (Figure 3).

Several clinical trials reported the benefit of using PD-1/PD-L1 blockade combined with chemotherapy. In 2018, FDA approved pembrolizumab in combination with chemotherapy for first-line treatment of metastatic non-squamous NSCLC based on KEYNOTE-189 which exhibited good OS improvements in patients that received pembrolizumab combined with pemetrexed compared to pembrolizumab with placebo (37). In the same year, FDA also approved pembrolizumab in combination with carboplatin and either paclitaxel or nab-paclitaxel as first-line treatment of metastatic squamous NSCLC based on KEYNOTE-047 (69).

Another alternative to improve tumor antigenicity is to combine radiotherapy with ICI which allows cell death and increases tumor antigen presentation. The phase III PACIFIC trial demonstrated survival benefits among patients treated with durvalumab after chemoradiotherapy (15,31,70).

Combining anti-PD(L)1 with CTLA-4 has shown good improvements due to the synergistic effect between them as a result of distinct targets. The Checkmate227 exhibited prolonged OS for first-line nivolumab plus ipilimumab. In 2020, FDA approved nivolumab plus ipilimumab, based on Checkmate227, for patients with metastatic NSCLC whose tumors express TPS $\geq 1\%$ without *EGFR* and *ALK* aberrations (31,47)

Furthermore, other ICI combined with anti-PD(L)1 may overcome resistance. Several studies indicated the co-expression of LAG-3 and PD-L1 on TILs, thus, promising studies in NSCLC are ongoing. TIM-3 induces tolerance in T-cell activation and the phase I Amber trial (NCT02817633) testing anti-TIM3 antibody TSR-022 in combination with a PD-1 inhibitor displayed improved clinical activity in refractory NSCLC and melanoma. Finally, the CITYSCAPE trial showed longer PFS and ORR in metastatic NSCLC patients that received tiragolumab plus atezolizumab, demonstrating the positive effect of TIGIT inhibition combined with PD-1/PD-L1 blockade (31,71).

The abnormal vasculature and chaotic blood flow by upregulation of VEGF, promoting hypoxia and neoangiogenesis is normalized by VEGF inhibitors. The IMpower 150 demonstrated clinical benefits using bevacizumab/atezolizumab/carboplatin/paclitaxel (15,54).

Cancer vaccines aim to improve antigen presentation and recognition and oncolytic viruses induce tumor lysis, triggering anti-tumor immunity. Some studies are ongoing to evaluate their potential benefit. A phase I study (NCT02897765) reported a response rate of 25% using a neoantigen vaccine (NEO-PV-01) plus nivolumab in PD-1/PD-L1 naïve NSCLC. Moreover, in KEYNOTE-200 (NCT02043665), patients with advanced NSCLC were treated with an oncolytic virus plus pembrolizumab, showing an overall response of 23% in ICI naïve patients (15).

Clinical investigations are also ongoing in NSCLC patients to combine ICI with IDO inhibitors, DNA damage inhibitors (PARP inhibitors), STING agonists, chemokine receptor antagonists and epigenetic modulators (15,31).

Different factors can influence ICI response and establishing new biomarkers that allow well-founded clinical decisions will conduct to better patient outcomes, as shown in Figure 3. Further investigations must be made on the mentioned biomarkers to overcome any flaws and ambiguity so these complementary tests can be approved. Furthermore, the new therapeutic strategies are promising and combine different targeted therapy with ICI provide synergetic effects that improve PD-(L)1 activity.

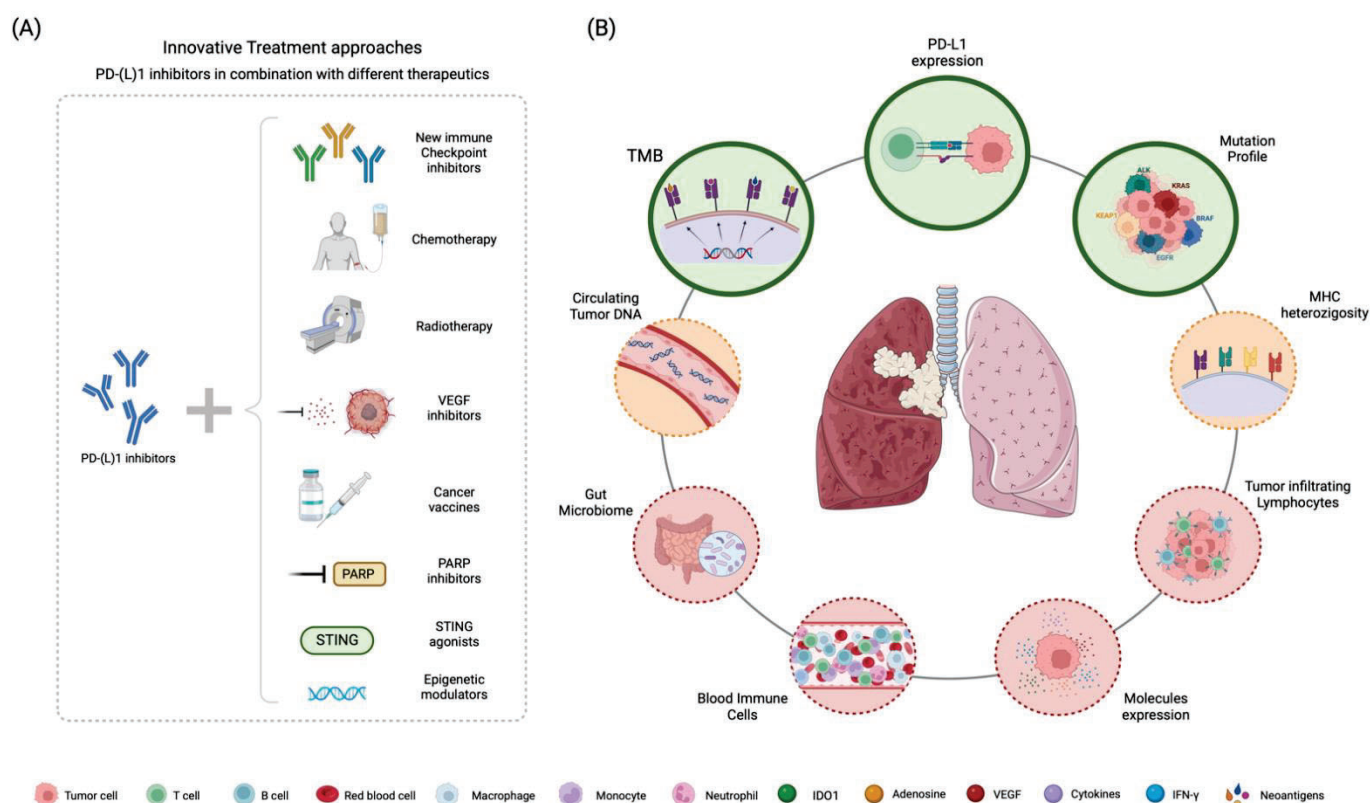


Figure 3. Innovative therapeutic approaches and potential biomarkers associated with immunotherapy response in lung cancer. (A) Diverse treatment approaches have been studied to be implemented to overcome immunotherapy resistance using PD-(L)1 inhibitors in combination with other therapeutics, such as immune checkpoint inhibitors (CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT), chemotherapy, radiotherapy, VEGF inhibitors (e.g., Bevacizumab), cancer vaccines, PARP inhibitors, STING agonists and epigenetic modulators. (B) PD-L1 expression score is the standard companion diagnostic. TMB and mutation profile (green solid figures) are the most promising complementary biomarkers that ease clinical decisions, and the remaining biomarkers, circulating tumor DNA and MHC heterozygosity (orange dotted figures) demand further investigations for implementation and molecules expression, tumor-infiltrating lymphocytes, blood immune cells and gut microbiome (red dotted figures) have shown interesting results that may contribute to immunotherapy adoption hereafter.

5. Conclusions

The only biomarker currently used that contributes to the clinical decision is PD-L1 expression, however, limitations in this test may result in ambiguous and inconsistent conclusions. TMB and mutation profile are the most promising complementary biomarkers to be implemented alongside PD-L1 expression as a result of robust positive results, high reproducibility and accuracy, but further rigorous standardizations are warranted. Furthermore, assessing CTC and ctDNA demonstrates an important step forward that might help to evaluate PD-L1 expression and TMB, identify mutations and easily correlate with predictive and prognostic factors.

The future of immunotherapy is encouraging with experimental and clinical advances rapidly emerging. PD-1/PD-L1 inhibitors are becoming well-established in different types of cancer, assuring a promising outlook for upcoming therapies and favoring clinical outcomes and patient survival.

Supplementary Materials:

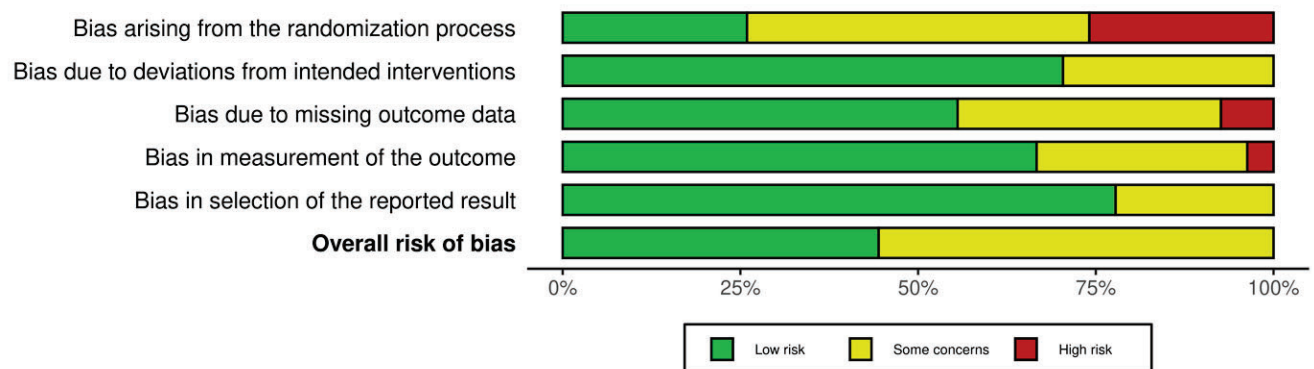
Figure 4. The overall risk of bias of the selected articles for qualitative synthesis.

Author Contributions: Conceptualization, M.F., D.M., M.F.B. and F.M.; methodology, M.F., D.M.; investigation, M.F.; data curation, D.M., M.F.B. and F.M.; writing—original draft preparation, M.F.; writing—review and editing, D.M., M.F.B. and F.M.; supervision, D.M., M.F.B. and F.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Funds via Foundation for Science and Technology (FCT), Portugal through Strategic Projects UID/NEU/04539/2019, UIDB/04539/2020, and UIDP/04539/2020 (CIBB).

Acknowledgments: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the



study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

6. References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 4 [cited 2021 Dec 5];71(3):209–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>
2. Hsu ML, Naidoo J. Principles of Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Surg Clin* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Nov 16];30(2):187–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1547412720300098>
3. Lim SM, Hong MH, Kim HR. Immunotherapy for Non-small Cell Lung Cancer: Current Landscape and Future Perspectives. *Immune Netw* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Dec 10];20(1). Available from: </pmc/articles/PMC7049584/>

4. Broderick SR. Adjuvant and Neoadjuvant Immunotherapy in Non–small Cell Lung Cancer. *Thorac Surg Clin* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Dec 10];30(2):215–20. Available from: <http://www.thoracic.theclinics.com/article/S1547412720300013/fulltext>
5. Hendriks L, Besse B. New windows open for immunotherapy in lung cancer. *Nature* [Internet]. 2018 Jun 12 [cited 2021 Dec 10];558(7710):376–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-05312-9>
6. Silva M, Martins D, Mendes F. The Role of Immune Checkpoint Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Onco* [Internet]. 2022 [cited 2021 Aug 22];2(3):164–80. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-7523/2/3/11>
7. Mondlane ER, Abreu-Mendes P, Martins D, Cruz R, Mendes F. The role of immunotherapy in advanced renal cell carcinoma. *Int Braz J Urol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2021 Aug 22];47(6):1228–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33650838/>
8. Tunger A, Sommer U, Wehner R, Kubasch AS, Grimm MO, Bachmann MP, et al. The evolving landscape of biomarkers for anti-pd-1 or anti-pd-l1 therapy. *J Clin Med* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Mar 27];8(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31557787/>
9. Tsoukalas N, Kiakou M, Tsapakidis K, Tolia M, Aravantinou-Fatorou E, Baxevanos P, et al. PD-1 and PD-L1 as immunotherapy targets and biomarkers in non-small cell lung cancer. *JBUON*. 2019;24(3):883–8.
10. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Nov 25];10(3):727–42. Available from: </pmc/articles/PMC7136921/>
11. Liu Z, Yu X, Xu L, Li Y, Zeng C. Current insight into the regulation of PD-L1 in cancer [Internet]. Vol. 11, *Experimental Hematology and Oncology*. Exp Hematol Oncol; 2022 [cited 2022 Nov 27]. Available from: </pmc/articles/PMC7136921/>
12. Fujiwara Y, Mittra A, Naqash AR, Takebe N. A review of mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors and potential strategies for therapy. *Cancer Drug Resist* [Internet]. 2020 Jun 18 [cited 2021 Dec 6];3(3):252–75. Available from: <https://cdrjournal.com/article/view/3496>
13. Wang F, Wang S, Zhou Q. The Resistance Mechanisms of Lung Cancer Immunotherapy. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Oct 20 [cited 2021 Nov 24];10:568059. Available from: </pmc/articles/PMC7606919/>
14. Schoenfeld AJ, Hellmann MD. Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. Vol. 37, *Cancer Cell*. Cell Press; 2020. p. 443–55.
15. Walsh RJ, Soo RA. Resistance to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: biomarkers and therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2020 Jan 3 [cited 2021 Nov 24];12:175883592093790. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32670423/>
16. Sun J-Y, Zhang D, Wu S, Xu M, Zhou X, Lu X-J, et al. Resistance to PD-1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy: mechanisms, predictive factors, and future perspectives. *Biomark Res* [Internet]. 2020 Dec 26 [cited 2021 May 15];8(1):35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32864132/>
17. Wang Q, Wu X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. Vol. 46, *International Immunopharmacology*. Elsevier; 2017. p. 210–9.
18. Huang Q, Lei Y, Li X, Guo F, Liu M. A Highlight of the Mechanisms of Immune Checkpoint Blocker Resistance. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Dec 4 [cited 2021 Nov 25];8:580140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33344447>
19. Mendes F, Domingues C, Rodrigues-Santos P, Abrantes AM, Gonçalves AC, Estrela J, et al. The role of immune system exhaustion on cancer cell escape and anti-tumor immune induction after irradiation. Vol. 1865, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier; 2016. p. 168–75.
20. Bai R, Chen N, Li L, Du N, Bai L, Lv Z, et al. Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Aug 6 [cited 2021 Nov 25];10:1290. Available from: </pmc/articles/PMC7425302/>
21. Rieth J, Subramanian S. Mechanisms of Intrinsic Tumor Resistance to Immunotherapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 May 2 [cited 2021 Nov 25];19(5):1340. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/5/1340>
22. Tran L, Theodorescu D. Determinants of resistance to checkpoint inhibitors. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
23. Boyero L, Sánchez-Gastaldo A, Alonso M, Noguera-Uclés JF, Molina-Pinelo S, Bernabé-Caro R. Primary and acquired resistance to

- immunotherapy in lung cancer: Unveiling the mechanisms underlying of immune checkpoint blockade therapy [Internet]. Vol. 12, Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Jun 25]. p. 1–36. Available from: [/pmc/articles/PMC7763130/](https://pmc/articles/PMC7763130/)
24. Bravaccini S, Bronte G, Ulivi P. Tmb in nsccl: A broken dream? [Internet]. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2021 [cited 2021 Apr 18]. p. 6536. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6536>
 25. Addeo A, Passaro A, Malapelle U, Luigi Banna G, Subbiah V, Friedlaender A. Immunotherapy in non-small cell lung cancer harbouring driver mutations [Internet]. Cancer Treatment Reviews Elsevier; May 1, 2021 p. 102179. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33798954/>
 26. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D, et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. J Clin Oncol [Internet]. 2018 Mar 3 [cited 2021 May 1];36(7):633–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29337640/>
 27. Amanam I, Mambetsariev I, Gupta R, Achuthan S, Wang Y, Pharaon R, et al. Role of immunotherapy and co-mutations on KRAS-mutant nonsmall cell lung cancer survival. J Thorac Dis. 2020 Sep 1;12(9):5086–95.
 28. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. Cancer Discov [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Mar 27];8(7):822–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29773717/>
 29. Xie M, Xu X, Fan Y. KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup [Internet]. Vol. 11, Frontiers in Oncology. Frontiers Media SA; 2021 [cited 2021 Jul 2]. Available from: [/pmc/articles/PMC8126715/](https://pmc/articles/PMC8126715/)
 30. Rolfo C, Ordóñez-Reyes C, Cardona AF. Immunotherapy Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Rubik’s Cube to Assemble. J Immunother Precis Oncol [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2021 Nov 24];4(4):185–8. Available from: <http://meridian.allenpress.com/innovationsjournals-JIPO/article-pdf/4/4/185/2927675/i2590-017x-4-4-185.pdf>
 31. Horvath L, Thienpont B, Zhao L, Wolf D, Pircher A. Overcoming immunotherapy resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) - novel approaches and future outlook. Mol Cancer [Internet]. 2020 Sep 11 [cited 2021 Nov 20];19(1):141. Available from: [/pmc/articles/PMC7488475/](https://pmc/articles/PMC7488475/)
 32. Bodor JN, Bumber Y, Borghaei H. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC). Cancer [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2021 Jul 16];126(2):260–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.32468>
 33. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews [Internet]. Vol. 372, The BMJ. BMJ; 2021 [cited 2021 Aug 19]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33782057/>
 34. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. Lancet [Internet]. 2019 May 4 [cited 2021 May 29];393(10183):1819–30. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673618324097/fulltext>
 35. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. J Clin Oncol [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Jul 21];37(7):537–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30620668/>
 36. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2019 Nov 21 [cited 2021 Jul 18];381(21):2020–31. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1910231>
 37. Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, et al. Updated analysis from KEYNOTE-189: Pembrolizumab or placebo plus pemetrexed and platinum for previously untreated metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 21];38(14):1505–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150489/>

38. Mazieres J, Rittmeyer A, Gadgeel S, Hida T, Gandara DR, Cortinovis DL, et al. Atezolizumab Versus Docetaxel in Pretreated Patients With NSCLC: Final Results From the Randomized Phase 2 POPLAR and Phase 3 OAK Clinical Trials. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jul 26];16(1):140–50. Available from: <http://www.jto.org/article/S1556086420308029/fulltext>
39. Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn MJ, et al. Durvalumab with or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: The MYSTIC Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020 May 1;6(5):661–74.
40. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Jul 18];383(14):1328–39. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1917346>
41. Herbst RS, Garon EB, Kim DW, Cho BC, Gervais R, Perez-Gracia JL, et al. Five Year Survival Update From KEYNOTE-010: Pembrolizumab Versus Docetaxel for Previously Treated, Programmed Death-Ligand 1–Positive Advanced NSCLC. In: *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. *J Thorac Oncol*; 2021 [cited 2021 May 29]. p. 1718–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34048946/>
42. Peters S, Gettinger S, Johnson ML, Jänne PA, Garassino MC, Christoph D, et al. Phase II trial of atezolizumab as first-line or subsequent therapy for patients with programmed death-ligand 1-selected advanced non-small-cell lung cancer (BIRCH). In: *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2017 [cited 2021 Jul 18]. p. 2781–9. Available from: </pmc/articles/PMC5562171/>
43. Garassino MC, Cho BC, Kim JH, Mazières J, Vansteenkiste J, Lena H, et al. Durvalumab as third-line or later treatment for advanced non-small-cell lung cancer (ATLANTIC): an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Jul 22];19(4):521–36. Available from: </pmc/articles/PMC7771363/>
44. Schoenfeld AJ, Rizvi H, Bandlamudi C, Sauter JL, Travis WD, Rekhtman N, et al. Clinical and molecular correlates of PD-L1 expression in patients with lung adenocarcinomas. *Ann Oncol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Jul 22];31(5):599–608. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S092375342036018X/fulltext>
45. Negrao M V., Skoulidis F, Montesio M, Schulze K, Bara I, Shen V, et al. Oncogene-specific differences in tumor mutational burden, PD-L1 expression, and outcomes from immunotherapy in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2021 Aug 10 [cited 2021 Jul 16];9(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34376553/>
46. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, Creelan BC, Sanchez-Vega F, Ahuja A, et al. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 May 14 [cited 2021 Mar 26];33(5):843–852.e4. Available from: </pmc/articles/PMC5953836/>
47. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 May 31 [cited 2021 Apr 2];378(22):2093–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29658845/>
48. Aggarwal C, Thompson JC, Chien AL, Quinn KJ, Hwang WT, Black TA, et al. Baseline Plasma Tumor Mutation Burden Predicts Response to Pembrolizumab-based Therapy in Patients with Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 May 15 [cited 2021 Jul 21];26(10):2354–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32102950/>
49. Kim ES, Velcheti V, Mekhail T, Yun C, Shagan SM, Hu S, et al. Blood-based tumor mutational burden as a biomarker for atezolizumab in non-small cell lung cancer: the phase 2 B-F1RST trial. *Nat Med* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2021 Jul 11];28(5):939–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35422531/>
50. Nie W, Wang ZJ, Zhang K, Li B, Cai YR, Wen FC, et al. ctDNA-adjusted bTMB as a predictive biomarker for patients with NSCLC treated with PD-(L)1 inhibitors. *BMC Med* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Feb 28];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35509036/>
51. Biton J, Mansuet-Lupo A, Pécuchet N, Alifano M, Ouakrim H, Arrondeau J, et al. TP53, STK11, and EGFR mutations predict tumor immune profile and the response to anti–PD-1 in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Nov 15 [cited 2021 Jul 16];24(22):5710–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29764856/>

52. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, Mhanna L, Cortot AB, Mezquita L, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: Results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Jul 22];30(8):1321–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31125062/>
53. Liu C, Zheng S, Jin R, Wang X, Wang F, Zang R, et al. The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity. *Cancer Lett* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Jul 16];470:95–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31644929/>
54. West HJ, McClelland M, Cappuzzo F, Reck M, Mok TSK, Jotte RM, et al. Clinical efficacy of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in KRAS- mutated non-small cell lung cancer with STK11, KEAP1, or TP53 comutations: Subgroup results from the phase III IMPower150 trial. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2022 Feb 21 [cited 2021 Jul 16];10(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35190375/>
55. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, Boubekeur N, Rouquette I, Clermont E, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Jul 24];120:108–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29748004/>
56. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teyssir J, Carriero NJ, et al. Early assessment of lung cancer immunotherapy response via circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Apr 15 [cited 2021 Jul 24];24(8):1872–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29330207/>
57. Giroux Leprieur E, Herbretau G, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Labrune S, et al. Circulating tumor DNA evaluated by Next-Generation Sequencing is predictive of tumor response and prolonged clinical benefit with nivolumab in advanced non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2018 May 4;7(5).
58. Tamminga M, De Wit S, Hiltermann TJN, Timens W, Schuurin E, Terstappen LWMM, et al. Circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients are associated with worse tumor response to checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2019 Jul 10 [cited 2022 Nov 23];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31291995/>
59. Zou W, Yaung SJ, Fuhlbrück F, Ballinger M, Peters E, Palma JF, et al. ctDNA Predicts Overall Survival in Patients With NSCLC Treated With PD-L1 Blockade or With Chemotherapy. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2021 Nov [cited 2022 Nov 23];5(5):827–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34994614>
60. Wang M, Wang S, Trapani JA, Neeson PJ. Challenges of PD-L1 testing in non-small cell lung cancer and beyond. *J Thorac Dis* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Jul 26];12(8):4541–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3475552/>
61. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Aug 7];12(2):208–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27913228/>
62. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Aug 7];13(9):1302–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29800747/>
63. Wojas-Krawczyk K, Kubiatowski T. Imperfect Predictors for Lung Cancer Immunotherapy—A Field for Further Research. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 2599.
64. Marcus L, Fashoyin-Aje LA, Donoghue M, Yuan M, Rodriguez L, Gallagher PS, et al. FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of tumor mutational burden-high solid tumors. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2021 Sep 9 [cited 2021 Aug 6];27(17):4685–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3416776/>
65. Heeke S, Hofman P. Tumor mutational burden assessment as a predictive biomarker for immunotherapy in lung cancer patients: Getting ready for prime-time or not? [Internet]. Vol. 7, *Translational Lung Cancer Research*. Transl Lung Cancer Res; 2018 [cited 2021 Mar 26]. p. 631–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30505707/>
66. Marinelli D, Mazzotta M, Scalera S, Terrenato I, Sperati F, D'Ambrosio L, et al. KEAP1-driven co-mutations in lung adenocarcinoma unresponsive to immunotherapy despite high tumor mutational burden. *Ann Oncol*. 2020 Dec 1;31(12):1746–54.

67. Hofman P, Heeke S, Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: Is it ready for prime-time use for cancer patients? *Ann Oncol*. 2019 Sep 1;30(9):1448–59.
68. Hita-Millan J, Carracedo A, Fernandez-Rozadilla C. Liquid biopsy biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung carcinoma: Lessons learned and the road ahead. *J Pers Med [Internet]*. 2021 Sep 28 [cited 2021 Apr 24];11(10):971. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34683113/>
69. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med [Internet]*. 2018 Nov 22 [cited 2021 Aug 7];379(21):2040–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30280635/>
70. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol [Internet]*. 2022 Apr 20 [cited 2021 Aug 7];40(12):1301–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35108059/>
71. Cho BC, Abreu DR, Hussein M, Cobo M, Patel AJ, Secen N, et al. Tiragolumab plus atezolizumab versus placebo plus atezolizumab as a first-line treatment for PD-L1-selected non-small-cell lung cancer (CITYSCAPE): primary and follow-up analyses of a randomised, double-blind, phase 2 study. *Lancet Oncol [Internet]*. 2022 Jun 1 [cited 2022 Sep 14];23(6):781–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35576957/>

Artigo

Influência da expressão do recetor de androgénio, p53, BCL2 e Ciclina D1 no prognóstico do cancro de mama nos homens

Paula Ramos^{1*}, Luana Rocha², Tamila Evorá³, Rute Dominguez⁴ e Miguel Cruz⁵¹ Instituto Politécnico de Bragança (IPB); prosienne2000@gmail.com² Instituto Politécnico de Bragança (IPB); lutiisrocha@hotmail.com³ Instituto Politécnico de Bragança (IPB); tamilaevora@gmail.com⁴ Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Pedro Hispano, U L S Matosinhos, Portugal; ruteacdominguez@gmail.com⁵ Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Virgen de la Concha de Zamora; miguelacruz@saludcastillayleon.es

* Correspondência: prosienne2000@gmail.com

Resumo: O cancro de mama nos homens é uma doença rara. No Hospital Virgen de la Concha de Zamora, durante um período de 10 anos, foram registados 23 casos operados. O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma invasivo NST (96%) e o grau histológico predominante foi 2 (74%). No nosso estudo, o painel imunohistoquímico de rotina foi ampliado para incluir o recetor de androgénio, p53, BCL2 e Ciclina D1, com o objetivo de determinar seu impacto na sobrevida dos pacientes e sua relação com as características clínico-patológicas dos tumores. Na amostra, apenas o número de gânglios linfáticos positivos foi preditivo de sobrevida global e sobrevida livre de doença. As análises estatísticas realizadas não mostraram diferenças significativas entre os resultados obtidos no estudo imunohistoquímico ampliado e a sobrevida dos pacientes. Portanto, apesar das limitações da amostra, conclui-se que a ampliação do estudo imunohistoquímico não traz valor prognóstico. Para confirmar isso, seria necessário aumentar o número de indivíduos da amostra, algo que só poderia ser conseguido com a colaboração de vários hospitais devido à raridade da doença.

Palavras-chave: cancro de mama, homens, imunohistoquímica, prognóstico.

1. Introdução

O cancro de mama nos homens é raro e pouco estudado, representando 1% de todos os cancros de mama diagnosticados (1, 2). No entanto, estudos epidemiológicos sugerem que sua incidência está a aumentar em 1,1% ao ano (3). É considerada uma neoplasia hormonodependente, sendo amplamente aceite como doença relacionada ao hiperestrogenismo (2).

O pico de incidência é entre 60-70 anos e tende a ser diagnosticado em estadios mais avançados (4), embora o prognóstico seja o mesmo que nas mulheres quando diagnosticadas em idades e estadios semelhantes (5).

Nos homens e nas mulheres, muitas das características histopatológicas são as mesmas, mas há grande variabilidade em termos de incidência, idade de distribuição, resposta ao tratamento, prognóstico e sobrevida (4). Até agora, os mecanismos que explicam essas diferenças no comportamento dos tumores permanecem desconhecidos, embora diferenças a nível molecular tenham sido descritas (4, 6, 7). Os subgrupos moleculares usados nas mulheres não são utilizados igualmente nos homens, uma vez que os tumores triplos negativos e HER2 positivos são raros nos homens (8).

Em geral, considera-se que o resultado do painel imunohistoquímico de rotina com o recetor de estrogénio (RE) (4) e progesterona (RP), recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e o índice de proliferação (ki67), são fatores prognósticos relevantes no cancro de mama, influenciando a resposta ao tratamento e sobrevida livre de doença (2). Existem poucos artigos descritos sobre o uso de outros biomarcadores no cancro de mama nos homens, sendo o recetor de androgénio (RA) o marcador mais estudado, embora existam dados discordantes sobre sua influência no prognóstico (10, 11, 16).

O nosso objetivo é determinar se a expressão do recetor de androgénio, p53, BCL2 e Ciclina D1 pode ser importante no prognóstico dos pacientes tendo em vista que esses marcadores não são habitualmente realizados no diagnóstico de cancro de mama.

Citation: Ramos P, Rocha L, Evorá T, Dominguez R e Cruz M. Influência da expressão do recetor de androgénio, p53, BCL2 e Ciclina D1 no prognóstico do cancro de mama nos homens.

Trends in Biomedical Laboratory Sciences. 2024 Mar 2; 2(1): 49-55

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: 2 January

Accepted: 5 February

Published: 2 March

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Science.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostra

Segundo o Instituto Nacional de Estatística em 2022, a província de Zamora tem uma população total de 167.215 habitantes, dos quais 82.787 são homens. Através do programa informatizado PatWin© foram selecionados todos os casos existentes de cancro de mama no homem tratados no Hospital Virgen de la Concha. Obteve-se uma amostra de 24 casos que ocorreram entre o ano de 2012 e 2022, totalizando um período de 10 anos. Destes, foi excluído 1 caso de metástase na mama de origem renal, confirmado por estudo imunohistoquímico, restando 23 casos disponíveis para análise.

Dos 23 casos foram coletados os dados clínicos (idade, localização, tipo de cirurgia, tratamento recebido e acompanhamento), as características anatomopatológicas (tamanho, tipo histológico, grau histológico de Nottingham, componente in situ associado, presença de invasão vascular linfática e/ou perineural, metástases nos gânglios linfáticos, estadio) e o perfil imunohistoquímico de rotina realizado no momento do diagnóstico (CK19, recetor de estrogénio, recetor de progesterona, HER2 e ki67).

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Virgen de la Concha em Zamora.

2.2. Imunohistoquímica

Neste estudo, o painel imunohistoquímico realizado no momento do diagnóstico é expandido para incluir o recetor de androgénio, p53, BCL2 e Ciclina D1.

Na Tabela 1 encontra-se o resumo dos clones utilizados, a origem dos anticorpos monoclonais, o padrão de marcação e sua interpretação.

Tabela 1. Marcadores e interpretação. *Estudo imunohistoquímico ampliado.

MARCADORES	ANTICORPOS (CLONE)	ORIGEM	MARCAÇÃO	INTERPRETAÇÃO
RE	anti-ER (SP1)	Coelho	Nuclear	Allred >2
RP	anti-PR (1E2)	Coelho	Nuclear	Allred >2
ki67	anti-Ki67 (30-9)	Coelho	Nuclear	>30%
HER2	anti-HER2 (4B5)	Coelho	Membrana	Protocolo do CAP
RA*	anti-AR (AR441)	Rato	Nuclear	Allred >3
BCL2*	anti-BCL2 (124)	Rato	Citoplasmática	Allred >3
p53*	anti-p53 (DO7)	Rato	Nuclear	Mutado>10%
Ciclina D1*	anti-CyclinD1 (SP4-R)	Coelho	Nuclear	Allred >3

Abreviações: RE (recetor de estrogénio), RP (recetor de progesterona), RA (recetor de androgénio).

Para a realização da técnica foram utilizados blocos de parafina arquivados no serviço de anatomia patológica, cujas amostras foram obtidas por biópsia com agulha grossa (BAG) guiada por ultrassom ou cirurgia para o diagnóstico da doença e foram fixados em formol durante 6 a 24 horas.

Foram realizados 158 cortes histológicos a 3 µm, os quais foram processados seguindo os protocolos estabelecidos pelas empresas comerciais, utilizando um procedimento totalmente automatizado que otimiza a qualidade dos resultados. Em todos os casos, a diaminobenzidina foi usada como cromógeno.

Todas as amostras foram avaliadas por um ou dois patologistas sob um microscópio ótico.

A interpretação do estudo imunohistoquímico foi realizada da seguinte forma para os diferentes biomarcadores:

- Recetor de estrogénio e progesterona: avalia-se a intensidade da marcação nuclear (débil, moderada, intensa) e a percentagem de células tumorais marcadas. A avaliação é feita de acordo com os protocolos do *College of American Pathologists* (CAP) (12) seguindo o score de Allred (13), sendo positivos os casos com score >2.

- HER2: positivo (3+), duvidoso (2+) ou negativo (1+, 0). A marcação da membrana é avaliada de acordo com os protocolos do CAP (14). Os casos categorizados como 2+ são confirmados por hibridação in situ (SISH).

- Ki67 (índice de proliferação): percentagem de células tumorais positivas com marcação nuclear (15). Um ponto de corte de > 30% foi usado.

- Recetor de androgénio (RA): avalia-se a intensidade da marcação nuclear (débil, moderada, intensa) e a percentagem de células tumorais com marcação. Na avaliação segue-se o score de Allred, os casos com score >3 são positivos.

- p53: considerado mutado quando intensa marcação nuclear para p53 é observada em mais de 10% das células tumorais (8).

- BCL2 (marcação citoplasmática) e Ciclina D1 (marcação nuclear): avalia-se a intensidade (débil, moderada, intensa) e a percentagem de células tumorais com marcação. Em alguns estudos estabeleceram 10% de células tumorais positivas como ponto de corte (10, 16). Em nosso estudo, o score de Allred foi utilizado para avaliação, sendo positivos os casos com score >3.

2.3. Análise estatística

A relação entre o estudo imunohistoquímico ampliado e as características clínico-patológicas foi determinada pelo teste exato de Fisher e pelo teste de Mann-Whitney.

Para análise de sobrevida, foram utilizados o método de Kaplan-Meier e a regressão de Cox. A sobrevida livre de doença (DFS) é estabelecida a partir do início do acompanhamento até a recidiva (inclui recorrência local, um novo tumor ou metástase à distância). A sobrevida global (OS) é estabelecida a partir do início do acompanhamento até a morte.

DFS e OS são tempos em anos (na amostra, o mínimo é meio ano e o máximo é onze anos).

Os resultados com $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os pacientes que não faleceram estão a ser acompanhados até ao momento do presente estudo.

3. Resultados

3.1. Características clínico-patológicas da amostra

Na província de Zamora, o cancro de mama nos homens representou 1,5% de todos os casos diagnosticados de cancro de mama num período de 10 anos.

Os 23 casos da amostra pertencem a homens com idades compreendidas entre os 48 e os 89 anos (idade média=71 anos).

Dois pacientes tinham história pessoal de cancro de mama há 29 anos. Nenhum tinha história familiar de cancro de mama. Como fatores de risco, observou-se um caso com exposição prévia a radioterapia, três casos com cirrose hepática, um caso com imunossupressão do HIV e um caso com síndrome de Klinefelter.

Em 22 casos foi realizada mastectomia total, sendo que um dos pacientes apresentou recidiva tumoral local, sendo realizada reintervenção cirúrgica na zona da mastectomia anterior.

A localização mais frequente das neoplasias foi a região retroareolar (78%), seguida do interquadrante superior (22%) e a maioria à esquerda (65%). O tamanho médio do tumor foi de 20 mm de diâmetro máximo, sendo o menor de 10 mm e o maior de 40 mm.

O tipo histológico mais comum, de acordo com a classificação tumoral da OMS (2) foi o carcinoma invasivo NST (no special type), anteriormente conhecido como carcinoma ductal infiltrante (Figura 1). Apenas um caso era do subtipo misto (ductal e micropapilar). 35% dos casos foram associados a um componente in situ.

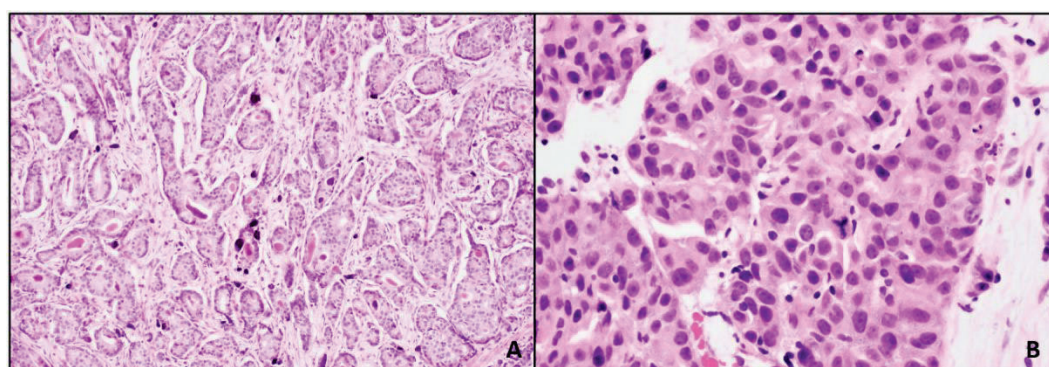


Figura 1. (A) Carcinoma invasivo NST de grau histológico 2 associado a microcalcificações. **(B)** Carcinoma invasivo NST de grau histológico 3.

De acordo com o grau histológico de Nottingham, foram identificados grau 1 (9%), grau 2 (74%) (Figura 1A) e grau 3 (17%) (Figura 1B).

Invasão vascular linfática foi identificada em 56% dos casos e invasão perineural em 52%.

Doze dos pacientes (52%) apresentavam metástases nos gânglios linfáticos ao diagnóstico, quatro deles com mais de dez gânglios linfáticos positivos (estágio pN3). Nenhum dos casos apresentava metástases à distância no momento do diagnóstico.

O estadiamento de acordo com a classificação do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (TNM, 8ª edição) ficou assim distribuído: I (41%), II (27%) e III (32%).

O tratamento recebido foi a hormonoterapia (100%), radioterapia (78%), quimioterapia (65%) e imunoterapia com anti-HER2 (4%).

A sobrevida livre de doença variou de 1 a 11 anos, com média de 6 anos. A sobrevida global variou de 1 a 29 anos, com média de 8 anos. 87% dos pacientes tiveram sobrevida superior a 5 anos. Dois pacientes tiveram 29 anos de sobrevida global porque tiveram seu primeiro tumor de mama em 1994.

Durante o acompanhamento, oito pacientes tiveram recidiva (36%) e cinco foram diagnosticados com metástases à distância (22%). Três dos pacientes morreram durante o período do estudo devido à doença tumoral (14%), e todos apresentavam metástases nos gânglios linfáticos ao diagnóstico.

3.2. Características imunohistoquímicas da amostra

Todos os casos estudados foram positivos para o recetor de estrogénio, recetor de progesterona, recetor de androgénio e Ciclina D1, com diferentes graus de expressão conforme a Figura 2. Apenas um paciente com BCL2 negativo foi identificado. Nenhum dos casos preencheu os critérios necessários para considerar o p53 como mutado.

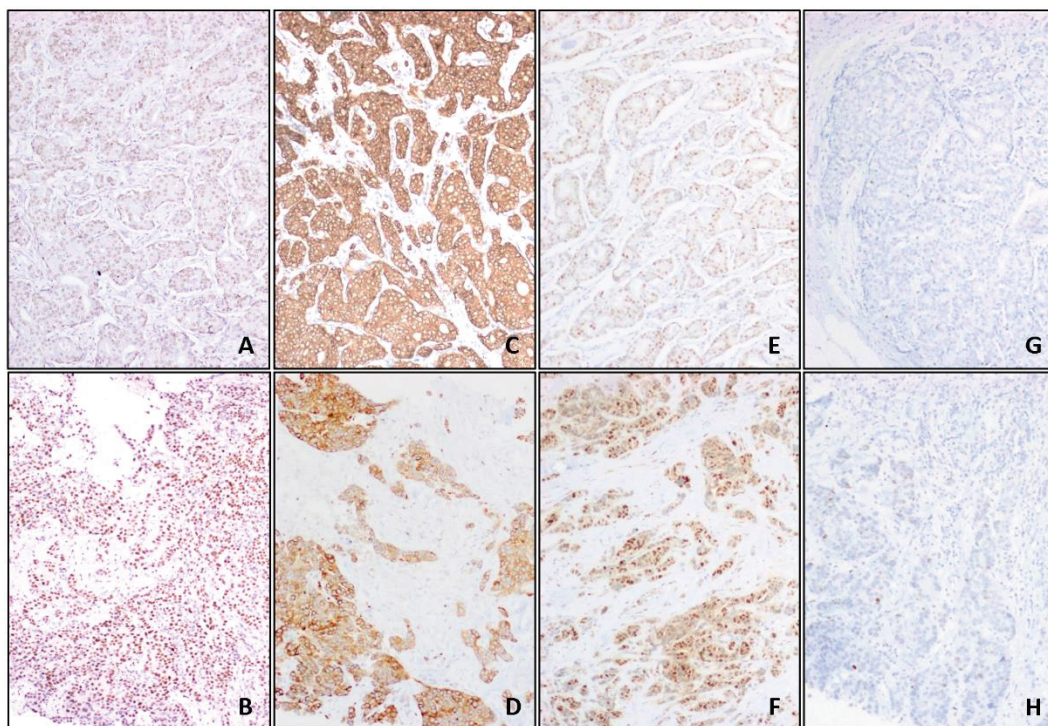


Figura 2. (A) Recetor de androgénio: positivo (débil em 71-80% das células tumorais) **(B) Recetor de androgénio:** positivo (intenso em 91-100% das células tumorais) **(C) BCL2:** positivo (intenso em 91-100% das células tumorais) **(D) BCL2:** positivo (moderado em 81-90% das células tumorais) **(E) Ciclina D1:** positivo (débil em 61-70% das células tumorais) **(F) Ciclina D1:** positivo (intenso em 51-60% das células tumorais) **(G) e (H) p53:** não mutado.

Um dos casos foi CK19 negativo, o único em que o gânglio sentinela não foi analisado pelo método OSNA (*one-step nucleic acid amplification*).

Foi identificado um caso positivo (2+) para HER2 com confirmação de expressão por SISH, o único que recebeu tratamento prévio à cirurgia (terapia neoadjuvante).

Trinta e nove por cento dos pacientes apresentaram índice de proliferação (ki67) maior que 30%.

Verificou-se que todos os casos foram conduzidos corretamente, avaliando-se a presença de controles internos e externos para HER2 e Ciclina D1 nas amostras.

3.3. Correlações e Análise de Sobrevivência

Para facilitar a análise estatística, o estudo imunohistoquímico foi simplificado agrupando o score de Allred em três categorias de acordo com o anticorpo estudado.

- Para o recetor de estrogénio e progesterona: grau 1 (pontuação de 0 a 2), grau 2 (pontuação de 3 a 6) e grau 3 (pontuação de 7 a 8).

- Para o recetor de androgénio, BCL2 e Ciclina D1: grau 1 (pontuação de 0 a 3), grau 2 (pontuação de 4 a 6) e grau 3 (pontuação de 7 a 8).

Foram estudadas as correlações do estudo imunohistoquímico ampliado com os fatores clínico-patológicos e do estudo imunohistoquímico de rotina (Tabelas 2 e 3), sem obter diferenças significativas na análise estatística.

Tabela 2. Características clínico patológicas e estudo imunohistoquímico ampliado dos casos.

VARIAVEIS	TOTAL	RA + (Grau 2)	RA + (Grau 3)	BCL2 - (Grau 1)	BCL2 + (Grau 2)	BCL2 + (Grau 3)	Ciclina D1 + (Grau 2)	Ciclina D1 + (Grau 3)	p53 Mutado	p53 Não mutado
Idade										
≤65 anos	6	0	6	1	1	4	0	6	0	6
>65 anos	17	2	15	0	4	13	4	13	0	17
Grau										
1	2	0	2	0	1	1	0	2	0	2
2	17	2	15	1	3	13	4	13	0	17
3	4	0	4	0	1	3	0	4	0	4
In situ										
NÃO	15	2	13	0	4	11	4	11	0	15
SIM	8	0	8	1	1	6	0	8	0	8
L										
NÃO	10	1	9	0	3	7	3	7	0	10
SIM	13	1	12	1	2	10	1	12	0	13
Pn										
NÃO	11	1	10	0	2	9	3	8	0	11
SIM	12	1	11	1	3	8	1	11	0	12
Estadio T										
T1-T2	21	2	19	1	4	16	4	17	0	21
T3-T4	2	0	2	0	1	1	0	2	0	2
Estadio N										
N0	11	1	10	0	4	7	3	8	0	11
N1-3	12	1	11	1	1	10	1	11	0	12
Exitus										
NÃO	20	2	18	1	3	16	4	16	0	20
SIM	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3
Recada										
NÃO	15	1	14	0	5	10	3	12	0	15
SIM	8	1	7	1	0	7	1	7	0	8

Abreviações: L (invasão vâsculo-linfática), Pn (invasão perineural), RA (recetor de androgénio).

Tabela 3. Estudo imunohistoquímico de rotina e estudo imunohistoquímico ampliado dos casos.

VARIAVEIS	TOTAL	RA + (Grau 2)	RA + (Grau 3)	BCL2 - (Grau 1)	BCL2 + (Grau 2)	BCL2 + (Grau 3)	Ciclina D1 + (Grau 2)	Ciclina D1 + (Grau 3)	p53 Mutado	p53 Não mutado
RE + (Grau 2)	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
RE + (Grau 3)	22	2	20	1	5	16	4	18	0	22
RP + (Grau 2)	3	1	2	0	0	3	1	2	0	3
RP + (Grau 3)	20	1	19	1	5	14	3	17	0	20
HER2 -	22	2	20	1	5	16	4	18	0	22
HER2 +	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
ki67 ≤30%	14	2	12	0	5	9	4	10	0	14
ki67 >30%	9	0	9	1	0	8	0	9	0	9

Abreviações: RE (recetor de estrogénio), RP (recetor de progesterona), RA (recetor de androgénio).

Nas demais variáveis, observou-se relação apenas entre a probabilidade de recidiva e o número de gânglios linfáticos metastáticos positivos ao diagnóstico ($p=0,005$). Na análise de sobrevivência do estudo imunohistoquímico estendido (RA, p53, BCL2, Ciclina D1) realizado com o método de Kaplan-Meier e com regressão de Cox (Figura 3), não foram observadas diferenças significativas nas variáveis, pelo que se estabelece que não existe nenhuma influência desses marcadores no prognóstico dos pacientes.

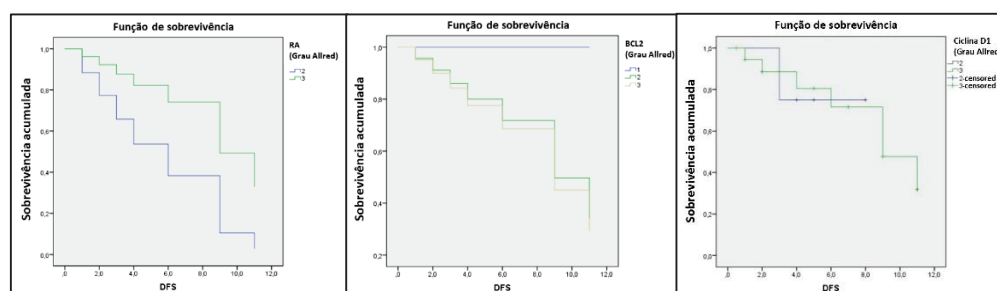


Figura 3. Análise da sobrevivência no estudo imunohistoquímico ampliado.

Método de Kaplan-Meier e regressão de Cox.

É importante levar em consideração que, apenas aumentando o tamanho da amostra, seria possível obter dados estatísticos mais relevantes.

4. Discussão

Na província de Zamora observamos uma incidência ligeiramente superior aos dados registados globalmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2).

O cancro de mama nos homens é tratado seguindo as mesmas diretrizes para o tratamento de cancro de mama nas mulheres. O cancro de mama no homem tem um prognóstico pior do que o cancro de mama nas mulheres, principalmente devido à falta de um sistema de triagem para diagnóstico precoce, o que leva a diagnósticos mais tardios (2). A maioria apresenta metástases nos gânglios linfáticos ao diagnóstico, circunstância que observamos no nosso estudo, destacando a correlação estatística entre o número de gânglios linfáticos positivos ao diagnóstico e a probabilidade de recidiva.

Do ponto de vista clínico-patológico e imunohistoquímico, os resultados obtidos no nosso estudo são muito semelhantes aos observados nos outros estudos publicados (10, 16, 17, 18). Na amostra, todos os pacientes eram positivos para o recetor de estrogénio e progesterona, portanto receberam tratamento hormonal adjuvante com Tamoxifeno, dois dos pacientes interromperam o tratamento nos primeiros dois anos devido a efeitos colaterais. No estudo não foi possível estabelecer que tipo de relação o recetor de androgénio tem na resposta a esse tratamento, pois todos os casos foram positivos. O recetor de androgénio tem sido associado, em alguns casos, a uma pior resposta ao tratamento hormonal com tamoxifeno e, portanto, a uma menor sobrevida em 5 anos (10). Este dado é controverso porque 90-95% dos casos têm o recetor de androgénio positivo. A influência que ele pode ter no tratamento dos pacientes ainda é desconhecida e muitos mais estudos são necessários para entender sua importância (16).

A variabilidade observada no estudo, em relação à intensidade e ao percentual de marcação para os diferentes recetores, provavelmente se deve à heterogeneidade dos tumores.

Os resultados obtidos neste estudo não podem estabelecer uma relação entre o recetor de androgénio, BCL2, p53 e Ciclina D1 com o prognóstico dos pacientes, pelo que se pode deduzir, limitado pela amostra, que não há razão que justifique a extensão do perfil imunohistoquímico que é realizado rotineiramente.

A expressão de BCL2 é considerada um bom fator prognóstico independentemente do tratamento adjuvante recebido, principalmente no estadio inicial da doença (18). Apenas um dos casos foi negativo para BCL2 e apresentou metástases à distância um ano após a intervenção cirúrgica, mas deve-se levar em consideração que havia outros fatores de mau prognóstico muito mais relevantes no momento do diagnóstico, como a presença de estadio ganglionar N3c.

A superexpressão de p53 está correlacionada com mutações no gene e pior prognóstico (4). Foi um marcador de rotina utilizado por muito tempo, mas a dificuldade em estabelecer um ponto de corte para determinar a probabilidade de mutações levou ao abandono de seu uso. Este facto também é observado no nosso estudo, em todos os casos uma marcação nuclear dispersa de baixa intensidade inferior a 10% foi identificada nas células tumorais.

A superexpressão de Ciclina D1 foi preditiva de melhor sobrevida ao cancro de mama nos homens e os dados sugerem que não está relacionada à proliferação (17, 19, 20), embora existam estudos que a associaram à resistência ao tratamento com Tamoxifeno nas mulheres (20). No estudo, nenhuma relação foi observada com o Ki67 ou com a sobrevida.

Nenhuma das suposições feitas na literatura científica para o recetor de androgénio, BCL2 e Ciclina D1, pode ser comprovada no nosso estudo. Os resultados obtidos no p53 estariam de acordo com o pouco uso que lhe é dado atualmente.

É importante ter em conta as limitações da nossa amostra, pelo que se considera fundamental expandir o estudo a mais indivíduos, algo que só poderia ser conseguido através da colaboração com vários hospitais devido à raridade da doença.

5. Conclusões

Na amostra, apenas o número de gânglios linfáticos positivos foi preditivo de sobrevida global e sobrevida livre de doença. As análises estatísticas realizadas não mostraram diferenças significativas entre os resultados obtidos no estudo imunohistoquímico ampliado e a sobrevida, devido principalmente ao pequeno número de pacientes estudados. Portanto, concluímos com a evidência de que muitos estudos adicionais com grandes séries de pacientes ainda são necessários para decifrar a influência do perfil imunohistoquímico no prognóstico dos pacientes, algo considerado fundamental e necessário para entender uma doença ainda pouco estudada como o cancro de mama no homem.

Autores: Paula Ramos, Luana Rocha, Tamila Evorá, Rute Dominguez e Miguel Cruz. Todos os autores leram e concordam com a versão publicada do manuscrito. A autoria é limitada àqueles que contribuíram substancialmente para a conclusão deste trabalho.

Financiamento: Nenhum apoio financeiro foi solicitado para a realização deste projeto.

Agradecimento: Os autores agradecem a Érica Sequeira, Silvia García, Clementina Ballesteros e Rubén López do Hospital Virgen de la Concha de Zamora, e a Luis Chinchilla do Hospital Clínico Universitario de Salamanca pela ajuda na realização deste trabalho.

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

6. Referências

1. Yadav S, Karam D, bin Riaz I, Xie H, Durani U, Duma N, et al. Male breast cancer in the United States: Treatment patterns and prognostic factors in the 21st century. *Cancer*. 2020 Jan 1;126(1):26–36.
2. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2).
3. Sang G, Pan H, Lu C, Sun R, Zha X, Wang S, et al. Clinical features and prognostic factors of male breast cancer vs. female breast cancer. *Transl Cancer Res*. 2021 May 1;10(5):2199–209.
4. Kornegoor R, van Diest PJ, Buerger H, Korsching E. Tracing differences between male and female breast cancer: both diseases own a different biology. *Histopathology*. 2015 Dec;67(6):888–97.
5. Anderson WF, Jatoi I, Tse J, Rosenberg PS. Male breast cancer: a population-based comparison with female breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2010; 28; 232–239.
6. Miao H, Verkooijen HM, Chia KS, et al. Incidence and outcome of male breast cancer: an international population-based study. *J Clin Oncol* 2011; 29:4381–4388.
7. Piscuoglio S, Ng CK, Murray MP, Guerini-Rocco E, Martelotto LG, Geyer FC, Bidard FC, Berman S, Fusco N, Sakr RA, Eberle CA, De Mattos-Arruda L, Macedo GS, Akram M, Baslan T, Hicks JB, King TA, Brogi E, Norton L, Weigelt B, Hudis CA, Reis-Filho JS. The Genomic Landscape of Male Breast Cancers. *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 15;22(16):4045–56.
8. Kornegoor R, Verschuur-Maes AH, Buerger H et al. Molecular subtyping of male breast cancer by immunohistochemistry. *Mod. Pathol*. 2012; 25; 398–404.
9. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474–1481.
10. Wenhui Z, Shuo L, Dabei T, Ying P, Zhipeng W, Lei Z, Xiaohui H, Jingshu G, Hongtao S, Qingyuan Z. Androgen receptor expression in male breast cancer predicts inferior outcome and poor response to tamoxifen treatment. *Eur J Endocrinol*. 2014 Oct;171(4):527–33.
11. Pich A, Margaria E, Chiusa L, Candelaresi G & Dal Canton O. Androgen receptor expression in male breast carcinoma: lack of clinicopathological association. *British Journal of Cancer* 1999; 79; 959–964.
12. Fitzgibbons, PL; Connolly, JL. With guidance from the CAP Cancer and CAP Pathology Electronic Reporting Committees. Version: 1.5.0.1. March 2023. www.cap.org/cancerprotocols.
13. Allred DC. Problems and solutions in the evaluation of hormone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2433–2435.
14. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. HER2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364–1382.
15. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in breast cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656–1664.
16. Humphries MP, Sundara Rajan S, Honarpisheh H, Cserni G, Dent J, Fulford L, Jordan LB, Jones JL, Kan-than R, Litwiniuk M, Di Benedetto A, Mottotese M, Provenzano E, Shousha S, Stephens M, Kulka J, Ellis IO, Titloye AN, Hanby AM, Shaaban AM, Speirs V. Characterisation of male breast cancer: a descriptive biomarker study from a large patient series. *Sci Rep*. 2017 Mar 28; 7:45293.
17. Nilsson C, Koliadi A, Johansson I, Ahlin C, Thorstenson S, Bergkvist L, Hedenfalk I, Fjällskog ML. High proliferation is associated with inferior outcome in male breast cancer patients. *Mod Pathol*. 2013 Jan;26(1):87–94.
18. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*. 2010 Aug 24;103(5):668–75.
19. Kanthan R, Fried I, Rueckl T, et al. Expression of cell cycle proteins in male breast carcinoma. *World J Surg Oncol* 2010; 8:10.
20. Rudas M, Lehnert M, Huynh A, et al. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1767–1774.

Type of the Paper (Article)

Suicídio em Portugal entre os anos de 2017 e 2021

Inês Gago-Rodrigues* ^{1,2}, Raquel Teles ¹, Beatriz Maia ¹, Ana Lopes ¹, Joana Luz ¹, Ana Rita Possante ¹, João Furtado ^{1,2} e Rui Plácido ¹

¹ Universidade do Algarve – Escola Superior de Saúde (ESSUALg) essualg@ualg.pt

² Algarve Biomedical Center Research Institute (ABCRI) abc.ri@abcmedicalg.pt

³ Centro Hospitalar Universitário do Algarve (CHUA) administracao@ch.algarve.min-saude.pt

* Correspondence: igrodrigues@ualg.pt Tel.: +351 919876356

Resumo:

Introdução: Entende-se por suicídio o ato através do qual uma pessoa provoca a sua morte de forma intencionada e violenta. Cerca de três pessoas morrem diariamente por suicídio em Portugal e estima-se que o número de tentativas de suicídio seja 25 vezes superior ao número de suicídios consumados. O suicídio constitui um sério problema de saúde pública, o seu estudo é fundamental para estabelecer fatores de risco individuais, sociais, culturais ou socioeconómicos que permitam a deteção precoce de sintomas e sinais de risco, que permitam identificar situações individuais, que eventualmente levam ao suicídio.

Objetivos: Este estudo teve como principal objetivo caracterizar o suicídio em Portugal, num intervalo de cinco anos (2017-2021), tendo em conta o ano, a região geográfica, a faixa etária e sexo dos indivíduos.

Materiais e Métodos: Foram recolhidos dados de bases estatísticas do Instituto Nacional de Estatística (INE) e Pordata. Para a análise dos dados e discussão crítica, foi considerada informação proveniente de artigos online, revistas e estudos nacionais, bem como artigos científicos da base de dados PubMed.

Resultados: Foram analisados 4881 dados referentes ao número de óbitos por suicídio em Portugal de 2017 a 2021. Verificou-se um número decrescente de mortes por suicídio desde 2017 em Portugal Continental e o inverso nas Regiões dos Açores e Madeira, em que o suicídio tem vindo a aumentar. Observou-se um aumento de mortes por suicídio em homens, com o aumento da idade. Em geral é nas regiões do Alentejo e do Algarve que as taxas de suicídio foram mais elevadas.

Conclusão: Em suma, verifica-se uma descida do número de suicídios ao longo do período de anos estudados em Portugal Continental e o oposto nas Regiões Autónomas. Os indivíduos do sexo masculino, idosos e indivíduos que habitam zonas rurais apresentam, em geral, uma maior taxa de suicídio.

Palavras-Chave: suicídio; fatores de risco para suicídio; morte por suicídio; taxa de suicídio; comportamentos suicidas

1. Introdução

O suicídio é o ato pelo qual um ser humano decide colocar um término à sua vida. É considerada uma morte violenta associada a situações limite, que resultam na desistência da própria sobrevivência. O suicídio é um problema de saúde pública multifacetado, que envolve fatores de risco individuais, familiares, comunitários e sociais. Os seus determinantes são de natureza antropológica, psicológica, biológica e social, e atuam muitas vezes simultaneamente. [1] [2] [3]

Os fatores de risco mais importantes para comportamentos suicidas são os transtornos mentais, os quais estão presentes em mais de 90% daqueles que cometem suicídio. Os antecedentes familiares de comportamentos suicidas, as relações familiares, o género, a idade, o uso de drogas e de substâncias de abuso, a presença de problemas físicos incapacitantes e a situação social desfavorável também constituem fatores de risco para o suicídio. Outros fatores predisponíveis incluem uma tentativa de suicídio anterior, abuso sexual infantil e perda de um progenitor por suicídio na primeira infância. [4]

Citation: Gago-Rodrigues I, et. al.
Suicídio em Portugal entre os anos de
2017 a 2021. *Trends in Biomedical La-
boratory Sciences*. 2024 Mar 2; 2(1): 56-
68

Academic Editor: Diana Martins

Received: 8 February 2024

Accepted: 21 February 2024

Published: 2 March 2024

Copyright: © 2023 by the authors. Sub-
mitted for possible open access publica-
tion under the terms and conditions of
the Trends of Biomedical Laboratory Sci-
ence

No entanto, o suicídio também ocorre na ausência de transtornos mentais identificáveis, como resultado da interação de fatores de risco, que normalmente incluem a solidão, a falta de esperança no futuro, a sobrecarga psicológica e o isolamento social. A combinação de vários fatores de risco com o acesso a meios letais, potenciam os atos suicidas. [4]

A relação entre o suicídio e a sociedade tem sido alvo de estudos principalmente após a divulgação do trabalho de Durkheim em 1986. Este autor defendia que o suicídio, apesar de ser um ato individual, é o resultado do meio social em que se insere um indivíduo. Estudos mais recentes confirmam esta hipótese, apontando fatores de risco inerentes ao contexto individual, social e geográfico das populações [4]

Ao longo dos últimos 5 anos tem-se verificado que a taxa de suicídio em Portugal é inferior à média europeia. De acordo com a base de dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), no ano de 2019 a taxa de suicídio nacional registada foi de 9,5 mortes por 100 000 habitantes, enquanto segundo os números disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), nesse mesmo ano, a taxa de suicídio europeia registada foi de 10,5 mortes por 100 000 habitantes. Contudo, ainda que este não se encontre dentro das maiores causas de morte no país, a Ordem dos Psicólogos Portugueses indica que cerca de três pessoas morrem diariamente por suicídio em Portugal, podendo este número ser ainda maior, uma vez que a classificação das causas de morte pode conter informações contraditórias. Além disso, estima-se que o número de tentativas de suicídio é 25 vezes superior ao número de suicídios consumados. Posto isto, o suicídio é um grave problema de saúde pública e levanta uma grande preocupação a nível da saúde mental das populações. [5] [6] [7]

O estudo e caracterização do suicídio nas populações é de suma importância e visa a criação de estratégias de prevenção ao comportamento suicida. Este estudo de investigação teve como objetivo a recolha, caracterização e análise da informação disponível sobre as taxas de suicídio em Portugal, entre os anos de 2017 a 2021. A análise dos dados recolhidos incluiu as principais variáveis disponíveis, como a região, faixa etária e sexo. Durante a análise dos dados, foi considerado o período de quarentena (de 2020 a 2021) associado à pandemia COVID-19, e a sua contribuição para um maior isolamento social, que representa um fator de risco para comportamentos suicidas.

2. Materiais e Métodos

Para a realização deste estudo foram recolhidos dados de bases estatísticas certificadas nacionais on-line, nomeadamente do Instituto Nacional de Estatística (INE) e da Pordata (PORDATA – Ambiente de Consulta). Os dados recolhidos correspondem ao número de óbitos por suicídio em Portugal do ano de 2017 a 2021 e também às taxas de suicídio por 100 000 habitantes, divididas por sexo, faixa etária e região do país. Os dados foram posteriormente tratados e analisados no software Microsoft Excel®. Foram construídos gráficos e tabelas, de modo a trazer uma imagem mais visual e elucidativa dos dados recolhidos.

Foi também recolhida informação proveniente de matérias, revistas e estudos feitos a nível nacional, bem como artigos científicos da base de dados PubMed, utilizando as palavras-chave: suicídio; fatores de risco para suicídio; morte por suicídio; taxa de suicídio; comportamentos suicidas. Posteriormente foram selecionados os seguintes filtros: artigos publicados entre 2000 a 2023, tipos de artigos: *Books and Documents*, *Meta-Analysis*, *Randomized Controlled Trial*, *Review*, *Systematic Review*. O total de artigos encontrados foram 19 e destes foram selecionados 12. A informação destes artigos foi utilizada para a discussão dos resultados obtidos na análise dos dados recolhidos. Para a obtenção da amostra final de artigos (n=12) foram aplicados os seguintes critérios de inclusão: Obras literárias, artigos e matérias on-line publicados no século XXI, que abordassem a temática dos diversos fatores de risco para o suicídio, tanto a nível nacional, como internacional, escritos em português ou inglês e artigos cujo fosse possível o acesso ao texto íntegro. Como critérios de exclusão elegeram-se as obras literárias, artigos e matérias on-line que não cumpriam os critérios anteriormente descritos, nomeadamente os que apresentavam como população de estudo, indivíduos que tivessem tido uma morte que não fosse classificada como suicídio, abordassem apenas fatores de risco para o suicídio, ou grupos de risco, que não constam nas variáveis estudadas nesta revisão e estudos que tenham sido realizados no século XX.

3. Resultados

Os resultados obtidos são provenientes da análise efetuada em dados recolhidos do Instituto Nacional de Estatística (INE) e da base de dados Pordata, ambas bases estatísticas certificadas em Portugal. Foram recolhidos um total de 4881 casos de óbitos por suicídio em Portugal entre os anos de 2017 a 2021.

3.1. Número de mortes em Portugal entre os anos de 2017 a 2021

O número total de óbitos em Portugal tem vindo a aumentar ao longo dos anos na população portuguesa. No ano de 2017 foram registadas 109 758 mortes, aumentando este valor em 2021 para 124 841. É de salientar o aumento acentuado no número de mortes entre os anos de 2019 e 2020.

Em contraste, o número de mortes por suicídio tem vindo a baixar desde 2017, descendo de 1048 mortes em 2017 para 928 mortes em 2021 (Figura 1).

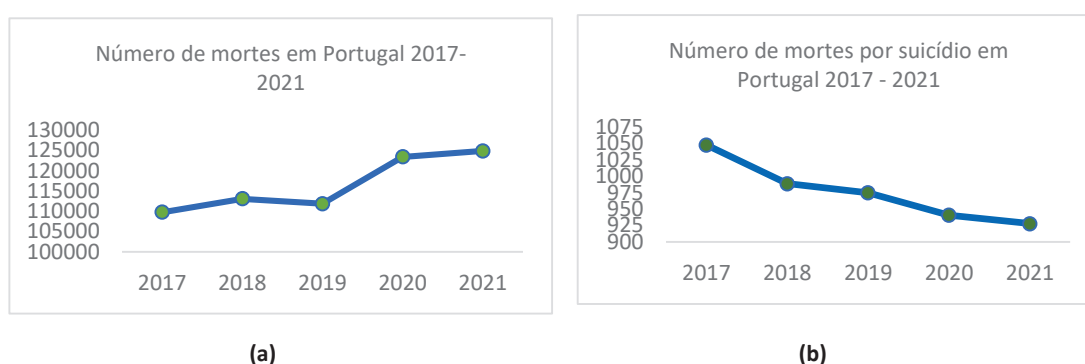


Figura 1. (a) Número total de óbitos em Portugal entre os anos de 2017 a 2021. Ano de 2017: 109758 mortes; ano de 2018: 113051 mortes; ano de 2019: 111843 mortes; ano de 2020: 123396 mortes e ano de 2021: 124841 mortes. **(b)** Número de mortes por suicídio em Portugal entre os anos 2017 a 2021. Ano de 2017: 1048 mortes; ano de 2018: 989 mortes; ano de 2019: 975 mortes; ano de 2020: 941 mortes e ano de 2021: 928 mortes.

3.2. Número de mortes por suicídio segundo a faixa etária

De modo a determinar a distribuição do número de mortes por suicídio, de acordo com a faixa etária, foi efetuada a média das taxas de morte por suicídio ao longo do período de 5 anos (2017-2021), em cada faixa etária identificável (Anexo I).

Verificou-se um aumento da prevalência de mortes por suicídio com o aumento da idade. A faixa etária dos 75 anos ou mais apresenta uma maior prevalência de mortes por suicídio, com 22,52 mortes por 100 000 habitantes, seguindo-se a faixa etária dos 65 aos 74 com 13,68 mortes por 100 000 habitantes. Em contraste, as faixas etárias dos 15 aos 24 anos e dos 25 aos 34 são as que apresentam uma menor taxa de morte por suicídio, representando 3,36 e 6,20 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente (Figura 2).

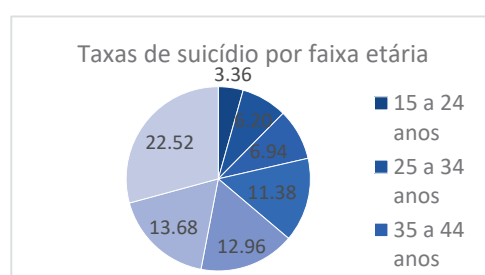


Figura 2. Média das taxas de mortes por Suicídio em Portugal por Faixa Etária, no período de 2017 a 2021. Taxa de mortalidade por suicídio por 100 000 habitantes

3.3. Número de mortes por suicídio segundo o sexo

De modo a determinar a distribuição do número de mortes por suicídio, de acordo com o sexo, foi efetuada a média das taxas de morte por suicídio ao longo do período de 5 anos (2017-2021), em cada faixa etária identificável (Anexo I).

No que diz respeito à prevalência de mortes por suicídio de acordo com o sexo da vítima, verificou-se que a taxa de suicídio nos homens é, em média, 3 vezes superior à taxa de suicídio nas mulheres. No ano de 2017 registou-se uma taxa de 16,0 mortes por suicídio em 100 000 habitantes no sexo masculino, em comparação com o sexo feminino, em que se registou 5,0 mortes por suicídio em 100 000 habitantes. No ano de 2021, apesar de uma ligeira diminuição das taxas em ambos os sexos, a tendência do sexo masculino possuir uma taxa de mortes por suicídio muito superior mantém-se, registando-se 15,5 mortes por 100 000 habitantes nos homens e 3,8 mortes por 100 000 habitantes nas mulheres (Figura 3).

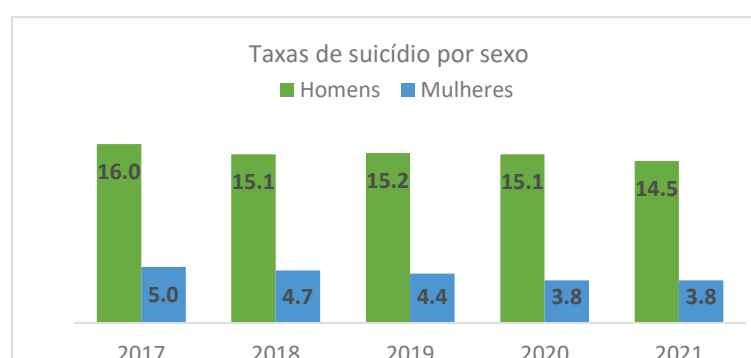


Figura 3. Média das taxas de mortes por Suicídio em Portugal por sexo, no período de 2017 a 2021. Taxa de mortalidade por suicídio por 100 000 habitantes

3.4. Número de mortes por suicídio em homens e mulheres, por faixa etária

Em relação aos valores médios das taxas de mortes por suicídio, em cada faixa etária do sexo masculino (Anexo II), constatou-se um aumento da taxa de suicídio ao longo da idade. A faixa etária na qual prevalece uma maior taxa de mortes por suicídio é na dos 75 anos ou mais, com uma média de 45,5 mortes por 100 000 habitantes, seguindo-se a faixa etária dos 65 aos 74, com o valor de 21,8 mortes por 100 000 habitantes. Em contraste, as faixas etárias mais jovens, dos 15 aos 24 anos e dos 25 aos 34 registam uma menor média das taxas de mortes por suicídio, com 5,1 mortes por 100 000 habitantes e 10,54 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente (Figura 4a).

Para o sexo feminino (Anexo III), verifica-se igualmente um aumento da prevalência de mortes por suicídio com o aumento da idade. A faixa etária na qual prevalece uma maior média de taxa de mortes por suicídio é na dos 75 anos ou mais, com 8,12 mortes por 100 000 habitantes, seguindo-se a faixa etária dos 65 aos 74, com 6,98 mortes por 100 000 habitantes. As faixas etárias mais jovens, dos 15 aos 24 anos e dos 25 aos 34 continuam a registar as menores médias das taxas de mortes por suicídio, com 1,58 mortes por 100 000 habitantes e 1,98 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente (Figura 4b).

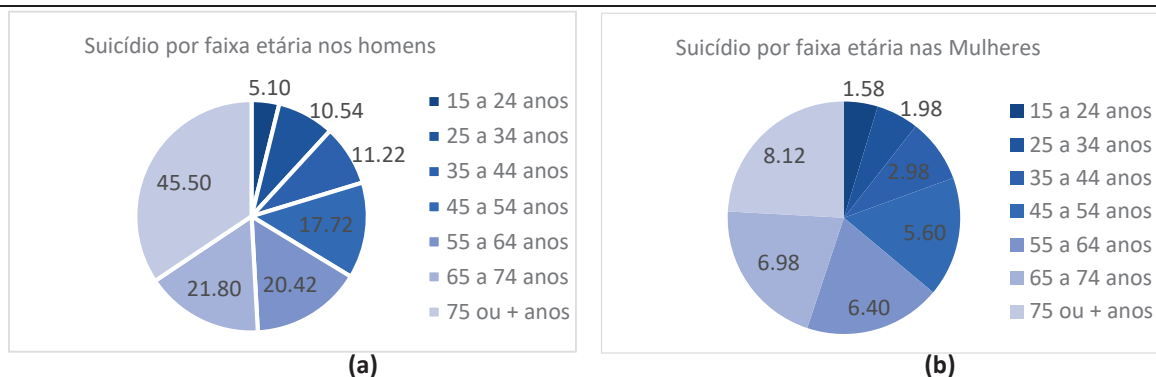


Figura 4. (a) Médias das taxas de morte por suicídio em Portugal nos Homens, de acordo com a faixa etária, entre 2017 e 2021. Taxas de Suicídio por 100 000 habitantes. **(b)** Média das taxas de morte por suicídio em Portugal nas mulheres, de acordo com a faixa etária, entre 2017 e 2021. Taxas de Suicídio por 100 000 habitantes.

3.5 Número de mortes por suicídio de acordo com a região

De modo a determinar a distribuição de mortes por suicídio de acordo com a região de Portugal, foi efetuada a média das taxas de morte por suicídio ao longo do período de 5 anos estudado (2017-2021). (Anexos IV). Observou-se menores taxas de morte por suicídio na região Norte de Portugal e na área metropolitana de Lisboa (AML), com 7,16 mortes por 100 000 habitantes e 8,3 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente. Em contrapartida, nas regiões do Alentejo e do Algarve verificam-se as taxas mais elevadas de morte por suicídio em Portugal, com 18,82 mortes por 100 000 habitantes e 16,76 mortes por 100 000 habitantes, respetivamente (Figura 5).

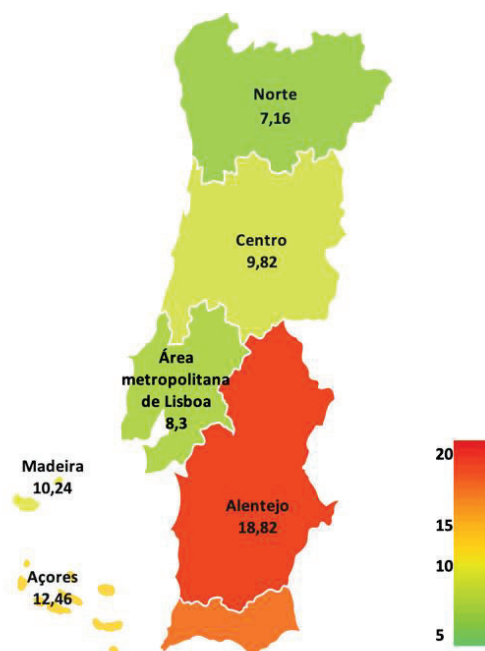


Figura 5. Média das taxas de morte por suicídio em Portugal, de acordo com a região, entre 2017 e 2021. Taxas de Suicídio por 100 000 habitantes.

3.6. Número de mortes por suicídio segundo a região: comparação entre os anos de 2017 e 2021

Fazendo uma comparação entre o ano de 2017 com o ano de 2021, verificou-se uma diminuição das taxas de suicídio em todas as regiões de Portugal continental. No entanto, nas

regiões autónomas dos Açores e da Madeira verificou-se um aumento acentuado destas mesmas taxas (Figura 6).

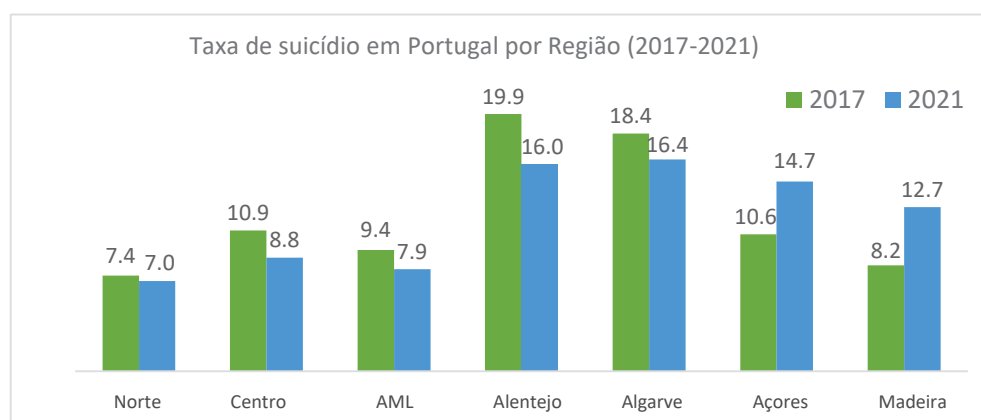


Figura 6. Taxa de Suicídio por 100 000 habitantes em Portugal, de acordo com a região, nos anos 2017 e 2021. Taxas de Suicídio por 100 000 habitantes. AML: área metropolitana de Lisboa.

3.7. Número de mortes por suicídio por região, de acordo com a faixa etária

Como verificado anteriormente, as regiões autónomas dos Açores e da Madeira apresentam discrepâncias na evolução das taxas de suicídio ao longo do período estudado, quando comparadas às regiões continentais. De forma a completar esta análise e para poder discutir estes resultados assertivamente, procedeu-se à análise do número de mortes por suicídio por região, de acordo com a faixa etária (Anexo V).

Ambas as regiões autónomas apresentaram uma média das taxas de suicídio mais elevada nas faixas etárias mais jovens, com destaque para os Açores. Na faixa etária dos 25 aos 34 anos a taxa de suicídio nos Açores é 2 vezes superior às restantes regiões, com uma média de 17,80 mortes por 100 000 habitantes. Por outro lado, a faixa etária dos 75 anos ou mais é a única em que a média da taxa de suicídio, ao longos destes 5 anos é mais elevada no Continente, com 22,7 mortes por 100 000 habitantes (Figura 7).

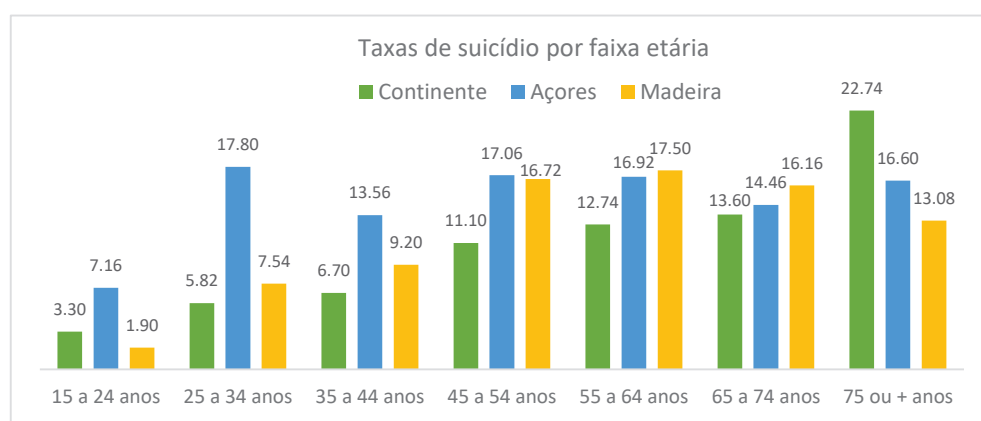


Figura 7. Média das Taxas de Suicídio em Portugal Continental e Regiões Autónomas, de acordo com as Regiões e Faixas Etárias, no período de 2017 e 2021. Taxas de Suicídio por 100 000 habitantes

4. Discussão

No período considerado neste estudo, de 2017 a 2021, foram contabilizados 4881 óbitos por suicídio em Portugal, incluindo todas as regiões. Verificou-se uma descida gradual no número de suicídios ao longo destes 5 anos, sendo que em 2017 foram registadas 1048 mortes, enquanto em 2021 foram registadas 928 mortes por suicídio.

Apesar do número de mortes em Portugal ter aumentado notavelmente a partir do ano de 2019 e até ao ano de 2021, provavelmente devido à contribuição do período de pandemia da COVID-19, verificou-se que o número de mortes por suicídio é decrescente desde 2017 a 2021. O que indica que a taxa de suicídio não foi afetada pelo período de quarentena (entre 2020 e 2021), sendo que o agravamento dos fatores de risco, como a solidão e o isolamento social não contribuíram para um aumento do suicídio em Portugal (Figura 1).

Ao analisar o número de mortes por suicídio de acordo com a faixa etária é possível observar que há uma maior prevalência de suicídios nas faixas etárias mais elevadas, sendo a população mais idosa (> 75 anos) a que apresenta o valor mais elevado (Figura 2).

Verifica-se que, à semelhança de outros países europeus, também em Portugal a idade representa um fator de risco importante para o suicídio, o que vai ao encontro do descrito na literatura. Estudos anteriores, apontam a depressão como o principal fator de risco para o suicídio, sendo esta uma doença prevalente na população idosa, estando muitas vezes associada à idealização de atos e comportamentos suicidas. As elevadas taxas de suicídio na população idosa, são também associadas ao processo individual de envelhecimento, que pode ser afetado negativamente pela perda de relações interpessoais (sendo o conjugue de elevada importância), pela ausência de projetos futuros, pela mudança de casa (para instituições de acolhimento ou casa de familiares), pelo surgimento de patologias e incapacidades físicas e pela perda poder económico. O poder económico por parte da população idosa, em Portugal, representa um flagelo social. De acordo com dados recentes, publicados na base de dados Pordata (2021), o valor anual médio recebido pelos pensionistas é de 5.883,60 euros, o que representa um total de 490,30 euros mensais. [8] [9] [10] [11] [12]

Tendo em conta as taxas de suicídio e a sua distribuição por sexo observou-se que o sexo masculino tem valores bastante mais elevados que o sexo feminino, em qualquer dos anos estudados. Utilizando o ano de 2021 como exemplo, a taxa de suicídio nos homens foi de 14,5 mortes por 100 000 habitantes, enquanto nas mulheres foi apenas de 3,8 mortes por 100 000 habitantes (Figura 3).

Esta discrepância revela-se um padrão, não apenas em Portugal, mas na população em geral e tem sido amplamente estudada de modo a determinar quais os fatores sociodemográficos que possam ter influência no comportamento suicida entre homens e mulheres. Existem, no entanto, alguns fatores que se destacam, como o facto de que os homens tendem a utilizar métodos suicidas físicos, de maior letalidade, como armas de fogo ou o enforcamento, que detêm uma grande taxa de sucesso. Contrariamente às mulheres, que optam mais frequentemente por métodos químicos, como a toma excessiva de fármacos, o que se traduz num aumento da taxa de insucesso. Para além disso, é no sexo masculino que se verifica uma maior prevalência nos consumos de substâncias aditivas e de abuso, como o álcool, o que também é considerado um fator de risco importante para o suicídio. Os fatores culturais também podem representar um fator de risco que afeta particularmente o sexo masculino, uma vez que, apesar de ser perceptível algum progresso nas gerações mais novas, ainda vivemos numa sociedade em que os homens têm uma menor tendência em procurar ajuda profissional em casos de depressão ou vivência de situação psicológicas negativas, o que se traduz na desvalorização da saúde mental. [11] [13] [14] [15]

Analisando a taxa de suicídio por sexo e de acordo com a faixa etária não foi possível observar uma diferença significativa entre os resultados, verificando-se que em ambos os sexos, as taxas de morte por suicídio aumentam com a idade. Esta informação vai ao encontro ao que foi verificado anteriormente, em que, quanto maior é a faixa etária, maior o número de suicídios registados, em ambos os sexos (Figura 4).

Ao efetuar uma análise geográfica da distribuição da taxa de suicídio, verifica-se uma variação de acordo com a região, sendo na região Norte e na AML (áreas urbanas, com tamanho populacional superior a 50 mil habitantes), onde se verificam menores taxas de suicídio, contrariamente às regiões do Alentejo e do Algarve, no total dos 5 anos considerados para o estudo (Figura 5).

As regiões do Alentejo e Algarve apresentam um maior número de zonas rurais (municípios com população < 10 mil habitantes) e semirurais (municípios com população entre 10 mil e 50 mil habitantes), quando comparadas com as regiões Norte, Centro e AML. Estudos anteriores, publicados pela Organização Mundial de Saúde, constataam que o número de mortes por suicídio

na população mundial são mais elevados em zonas rurais, o que se verifica também em Portugal. Adicionalmente, o suicídio em zonas rurais continua a ter mais expressão no sexo masculino, sendo que é nos homens que o número de suicídios consumados é mais elevado, enquanto as mulheres têm o número mais elevado de tentativas de suicídio registadas.

Diversas causas têm sido apontadas como possíveis adjuvantes na ideação e comportamentos suicidas nas zonas rurais e semirrurais, entre elas encontram-se a desertificação, o isolamento social, a falta de dinamismo económico, o acesso facilitado a meios letais (armas, cordas e afins) e o estigma destas pequenas populações em relação à doença mental, que ainda se encontra tradicionalmente enraizado em populações mais pequenas.

Para além dos fatores acima mencionados, deve-se ter em conta que é nas zonas rurais e semirrurais que o acesso aos cuidados de saúde primários é limitado e difícil, o que dificulta ainda mais a identificação de situações de risco e a prevenção precoce de atos suicidas. Em Portugal, o número de profissionais de saúde especializados na área da saúde mental tem vindo a aumentar cada vez mais (em 2022 registavam-se um total de 25 mil psicólogos no país). Contudo, a problemática do acesso aos cuidados de saúde na área da saúde mental revela-se quando não há a integração destes profissionais no setor público, prejudicando os utentes mais vulneráveis economicamente. [3] [16] [17]

De um modo geral, houve uma diminuição nas taxas de suicídio de 2017 a 2021 em Portugal continental. Contudo, observou-se que nas regiões autónomas dos Açores e da Madeira existe uma contradição ao padrão verificado em Portugal continental, uma vez que houve aumento considerável nas taxas de suicídio de 2017 para 2021 (Figura 6). Analisando estes dados em relação à faixa etária, verificou-se que tanto nos Açores como na Madeira, a taxa de suicídio tende a ser mais elevada em faixas etárias mais jovens, contrariamente à tendência geral dos dados, como descrito anteriormente. Nos Açores, a faixa etária dos 25 aos 34 anos destaca-se, apresentando uma taxa de suicídio 2 vezes superior, quando comparada às restantes regiões, com 17,80 mortes por 100 000 habitantes (Figura 7).

Estudos anteriores, realizados em escolas e universidades, com o objetivo de entender quais os comportamentos que podem ser preditivos de ideação suicida nos jovens, defendem que os três principais fatores que aumentam o risco para o suicídio são: fatores psicológicos, como a depressão, ansiedade, tentativas de suicídio prévias; tendências de abuso de álcool e outras substâncias aditivas; historial de eventos traumáticos (como problemas familiares, ou ter presenciado o suicídio de um familiar próximo), associados a traços de personalidade específicos, como o neuroticíssimo e impulsividade, ou à presença de comportamentos frequentes de automutilação deliberada. Foi ainda constatado que, na faixa etária jovem (adolescentes e jovens adultos) os comportamentos auto-lesivos estão diretamente relacionados com tentativas de suicídio, precedendo-as muitas das vezes. Para além destes, as dificuldades psicossociais e falta de apoio terapêutico também representam importantes fatores de risco para o suicídio nas faixas etárias mais jovens. Por este motivo, a prevenção e o reconhecimento precoce destes comportamentos em adolescentes são essenciais e podem ser medidas que salvam vidas. [18] [19] [20]

No entanto, a literatura que sustenta uma justificação relativamente aos valores elevados de suicídio nas regiões autónomas é muito escassa e relativa. É de salientar um estudo observacional, realizado na ilha de São Miguel (Açores), em 2017, com o objetivo de caracterizar os comportamentos auto-lesivos e ideação suicida em jovens residentes (n=1763). Neste estudo foi verificado que 30% dos jovens questionados referiram ter tido pelo menos um comportamento auto-lesivo ao longo da vida, foi observado ainda que a maioria dos jovens com este tipo de comportamento provinha de meios socioeconómicos mais baixos, o que pode dificultar significativamente o acesso aos cuidados de saúde e potenciar a negligência pela saúde mental. [21]

Para além disto, alguns autores apresentam como fatores justificativos do aumento de suicídio entre os jovens açorianos: o maior deslocamento e isolamento da população, a adesão à religião, o que é contraditório aos fatos observados nas regiões autónomas, uma vez que esta população tende a ser mais tradicional e manter hábitos religiosos. Talvez o isolamento e a maior ruralidade existente nas ilhas também contribuam para uma maior instabilidade nos jovens adultos, por falta de oportunidades e menores perspetivas profissionais futuras. [3] [11] [22]

Além dos fatores supramencionados, a população residente nas ilhas apresenta um poder económico muito inferior à população de Portugal continental, exibindo os valores mais elevados das taxas de risco de pobreza de todo o país, de acordo com os dados mais recentes do INE (25,1%

nos Açores e 25,9% na Madeira em 2021). A situação socioeconómica, as elevadas taxas de abandono escolar e o consumo precoce de álcool, tabaco e estupefacientes, são importantes fatores de risco a considerar nas regiões autónomas. Além destes fatores, destacamos o consumo de Novas Substâncias Psicoativas (NSP), que tem vindo a aumentar significativamente nas regiões autónomas. As NSP são de fácil acesso, são legais e dominam os padrões de consumo de substâncias aditivas entre os jovens, principalmente no arquipélago dos Açores. As NSP representam um perigo ao consumidor pois são frequentemente constituídas por misturas com lixívia, fertilizantes e acetonas, sendo responsáveis por provocar surtos psicóticos e destruir as funções cognitivas de quem as consome, contribuindo para o aumento dos internamentos compulsivos por perturbações psiquiátricas. As doenças mentais, como explicado anteriormente, constituem um dos maiores fatores de risco para o suicídio. [23] [24] [25] [26]

O estudo dos padrões de suicídio é de extrema importância para a identificação de comportamentos e fatores de risco que possam orientar os profissionais de saúde na ação e intervenção precoce deste flagelo populacional, no sentido da prevenção. É necessária a realização de mais estudos científicos de observação populacional sobre este tema, principalmente nas populações idosas e residentes em zonas rurais, como também nas populações mais jovens, de forma a prevenir o suicídio tanto na ideação, como na forma tentada e efetiva.

5. Conclusão

O principal objetivo deste estudo foi a caracterização do suicídio em Portugal, entre os anos de 2017 e 2021, de acordo a faixa etária, o sexo e região e tendo em conta os principais fatores de risco associados, tais como fatores individuais, sociais, culturais ou socioeconómicos. Através da análise dos dados disponíveis sobre o suicídio em Portugal, foi possível constatar que este tipo de comportamento, que determina a morte de um indivíduo constitui um grave problema de saúde pública, e apesar da sua representação ser baixa no número total de óbitos em Portugal, não deixa de ser indiferente à sociedade portuguesa, principalmente nas zonas rurais.

Foi notável a descida do número de óbitos por suicídio ao longo do período de anos estudados, verificando-se que mesmo durante a quarentena derivada da pandemia Covid-19, não houve um aumento das taxas de mortalidade por suicídio em Portugal. Em suma, observou-se que é na população idosa que o suicídio é mais frequentemente, o que pode ser justificado pelo isolamento social, incapacidade física ou inadaptação às mudanças que esta fase da vida exige. Em relação às taxas elevadas de suicídio no sexo masculino, quando comparadas às taxas do sexo feminino, verifica-se que em geral, os homens utilizam métodos com maior probabilidade de sucesso, como por exemplo as armas de fogo; as mulheres pelo contrário, utilizam métodos que apresentam uma maior probabilidade de falhar, como a toma de medicamentos em doses elevadas, pelo que representam um maior número de tentativas de suicídio.

Ao analisar os dados por região verificamos que é nas zonas rurais do Alentejo onde o suicídio é mais frequente, provavelmente pelo facto de que também é nestas zonas que a população apresenta um maior número de fatores de risco como a idade avançada, a limitação no acesso aos cuidados de saúde, nomeadamente na área da saúde mental, e o isolamento social. Já o aumento acentuado do suicídio nas regiões autónomas dos Açores e da Madeira, com destaque para os Açores, na população jovem adulta, pode estar relacionado com falta de oportunidades para o futuro e a instabilidade socioeconómica na região, mas também com o abuso de substâncias aditivas.

De um modo geral, este estudo foi elaborado, não só para sensibilizar e consciencializar a população acerca do tema “suicídio” em Portugal, mas também favorecer uma metodologia que permita identificar grupos de risco mais vulneráveis, incentivando a promoção de políticas de intervenção precoce e de atuação na prevenção do suicídio.

O suicídio ainda é um tema pouco estudado em Portugal, a literatura de carácter científico disponível é escassa e os dados disponíveis sobre os fatores de risco são difusos e relativos. Existe a necessidade de se efetuar estudos observacionais que possibilitem a associação entre fatores de risco e comportamentos suicidas em Portugal. A deteção precoce de sinais e sintomas de risco continua a revelar-se a melhor abordagem no combate ao suicídio.

Material Suplementário:

Anexo I. Taxa de Suicídio por 100 mil habitantes em Portugal, por ano e por faixa etária, com respetiva média e erro associado à média (SEM).

ANO	TOTAL	FAIXA ETÁRIA (anos)							
		5 a 14 anos	15 a 24 anos	25 a 34 anos	35 a 44 anos	45 a 54 anos	55 a 64 anos	65 a 74 anos	75 ou + anos
2017	10,2	0,1	3,8	5,2	8,9	13,6	13,2	15,1	23,3
2018	9,6	0,0	2,5	7,4	6,1	11,7	13,6	14,4	23,6
2019	9,5	0,0	3,4	5,5	6,6	12,0	12,9	13,1	23,6
2020	9,1	0,0	3,9	6,7	7,1	9,4	12,1	13,2	22,2
2021	8,9	0,0	3,2	6,2	6,0	10,2	13,0	12,6	19,9
MÉDIA	9,46	0,02	3,36	6,2	6,94	11,38	12,96	13,68	22,52
SEM	0,22	0,02	0,25	0,40	0,53	0,73	0,25	0,46	0,70

Anexo II. Taxa de Suicídio nos Homens por 100 mil habitantes em Portugal, por ano e por faixa etária, com respetiva média e erro associado à média (SEM).

ANO	HOMENS FAIXA ETÁRIA (anos)							
	5 a 14	15 a 24 anos	25 a 34 anos	35 a 44 anos	45 a 54 anos	55 a 64 anos	65 a 74 anos	75 ou + anos
2017	0,0	5,9	7,9	14,2	19,8	20,9	23,4	48,6
2018	0,0	3,4	12,3	10,0	18,4	20,8	22,4	45,8
2019	0,0	5,6	9,4	10,7	18,2	20,7	21,0	47,6
2020	0,0	5,9	12,7	11,9	15,1	19,8	20,9	45,5
2021	0,0	4,7	10,4	9,3	17,1	19,9	21,3	40,0
MÉDIA	0,00	5,10	10,54	11,22	17,72	20,42	21,80	45,50
SEM	0,00	0,48	0,90	0,86	0,78	0,24	0,48	1,49

Anexo III. Taxa de Suicídio nas Mulheres por 100 mil habitantes em Portugal por ano e por faixa etária, com respetiva média e erro associado à média (SEM).

ANO	MULHERES FAIXA ETÁRIA (anos)							
	5 a 14	15 a 24 anos	25 a 34 anos	35 a 44 anos	45 a 54 anos	55 a 64 anos	65 a 74 anos	75 ou + anos
2017	0,0	1,7	2,6	4,0	8,0	6,4	8,4	7,6
2018	0,0	1,5	2,6	2,4	5,6	7,3	7,8	9,9
2019	0,0	1,1	1,8	2,9	6,3	6,1	6,7	8,7
2020	0,0	1,9	0,9	2,7	4,3	5,4	6,8	7,7
2021	0,0	1,7	2,0	2,9	3,8	6,8	5,2	6,7
MÉDIA	0,00	1,58	1,98	2,98	5,60	6,40	6,98	8,12
SEM	0,00	0,14	0,31	0,27	0,75	0,32	0,55	0,55

Anexo IV. Taxa de Suicídio por 100 mil habitantes em Portugal, por ano e região, com respetiva média e erro associado à média (SEM).

ANO	Norte	Centro	Lisboa	Alentejo	Algarve	Açores	Madeira
2021	7	8,8	7,9	16	16,4	14,7	12,7
2020	6,7	9,5	7,3	21,1	16,9	11,5	12,2
2019	7,1	10,4	7,8	21	15,3	12,4	7,9
2018	7,6	9,5	9,1	16,1	16,8	13,1	10,2
2017	7,4	10,9	9,4	19,9	18,4	10,6	8,2
Média	7,16	9,82	8,3	18,82	16,76	12,46	10,24
SEM	0,16	0,37	0,40	1,15	0,50	0,70	0,99

Anexo V. Taxa de Suicídio por 100 mil habitantes em Portugal por ano, região e faixa etária com respetiva média e erro associado à média (SEM).

Regiões	Faixa Etária						
	15 a 24 anos	25 a 34 anos	35 a 44 anos	45 a 54 anos	55 a 64 anos	65 a 74 anos	75 ou + anos
Continente	3,20	5,80	5,80	9,50	12,60	12,10	19,90
	3,90	6,00	6,80	8,90	11,90	13,20	22,60
	3,10	5,40	6,60	12,00	12,60	12,90	23,90
	2,40	6,70	5,80	11,40	13,60	14,40	23,80
	3,90	5,20	8,50	13,70	13,00	15,40	23,50
Média	3,30	5,82	6,70	11,10	12,74	13,60	22,74
SEM	0,28	0,26	0,49	0,87	0,28	0,58	0,75
Açores	7,10	13,50	16,30	27,90	15,30	22,30	17,60
	6,50	29,40	10,50	14,30	12,80	9,60	6,30
	9,70	14,60	7,80	17,20	26,10	14,80	12,90
	6,30	25,90	15,40	11,50	16,70	15,20	19,70
	6,20	5,60	17,80	14,40	13,70	10,40	26,50
Média	7,16	17,80	13,56	17,06	16,92	14,46	16,60
SEM	0,65	4,35	1,89	2,86	2,39	2,26	3,38
Madeira	0,00	15,70	2,80	19,40	23,00	25,30	13,20
	3,20	6,30	15,80	24,60	16,80	12,40	15,40
	6,30	0,00	5,10	7,40	14,40	21,20	15,70
	0,00	12,60	7,50	22,30	11,90	13,00	15,80
	0,00	3,10	14,80	9,90	21,40	8,90	5,30
Média	1,90	7,54	9,20	16,72	17,50	16,16	13,08
SEM	1,26	2,92	2,60	3,42	2,08	3,05	2,00

Contribuição dos autores:

Inês Gago-Rodrigues (autor principal e correspondência): Conceção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos dados. Redação e revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito.

Rui Raposo: Contribuições para a conceção e delineamento, análise e interpretação dos dados. Participação na revisão crítica do artigo. Revisão da versão final do manuscrito

João Furtado, Joana Luz e Ana Rita Possante: Participação na revisão crítica do artigo. Revisão da versão final do manuscrito.

Beatriz Maia, Ana Lopes e Raquel Teles: Participação na investigação da temática e revisão da literatura. Recolha e análise de dados. Interpretação dos dados e elaboração dos primeiros resultados do estudo

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Os autores declaram não ter recebido qualquer financiamento para a realização do estudo.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflitos de interesse.

6. Referências

1. "Instituto Nacional de Estatística. Statistics Portugal," 05 01 2022. [Online]. Available: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0003736&contexto=bd&selTab=tab2. [Acedido em 12 02 2022].
2. J. C. Pedro, S. F. Silva, P. Barbosa e A. M. Pires, "Prevenção do Suicídio: Manual para Jornalistas," pp. 3-19, Novembro 2021.
3. A. Monteiro, "Gerador: Plataforma independente de jornalismo, cultura e educação," 2023. [Online]. Available: <https://gerador.eu/suicidio-em-portugal/#o-que-e-o-suicidio>. [Acedido em 16 Julho 2023].
4. M. Seena Fazel e M. P. D. Bo Runeson, "Suicide," pp. 1-2, 16 09 2020.
5. "Instituto Nacional de Estatística. Statistics Portugal," 23 Maio 2023. [Online]. Available: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0003736&contexto=bd&selTab=tab2. [Acedido em 4 Setembro 2023].
6. OMS, Suicide worldwide in 2019. Global Health Estimates, World Health Organization, 2019.
7. O. d. P. Portugueses, "Vamos falar sobre suicídio?," pp. 3-5, 2021.
8. M. I. L. L.-T. Jorge Valera Ortín, "Suicide related factores in the elderly: A systematic review," pp. 1-5, 8 Outubro 2021.
9. C. Motillon-Toudic e e. al., "Social isolation and suicide risk: Literature review and perspectives," pp. 1-20, 11 Julho 2022.
10. e. a. Brian K. Ahmedani, "Detecting and distinguishing indicators of risk for suicide using clinical records," pp. 2-7, 13 Julho 2022.
11. C. B. Saraiva, Estudos sobre o Para-Suicídio: O que leva os jovens a espreitar a morte, Portugal: Redhorse editor, 2006.
12. "Pordata. Estatísticas sobre Portugal e Europa," Fundação Francisco Manuel dos Santos, 2021. [Online]. Available: <https://www.pordata.pt/portugal/pensao+media+anual+da+seguranca+social+total++de+sobrevivencia++de+invalidez+e+de+velhice-706-5158>. [Acedido em 25 Julho 2023].
13. K. R. Fox e e. al., "Examining the role of sex in self-injurious thoughts and behaviors," pp. 1-9, 28 Setembro 2017.
14. C. H. K. Park e e. al., "Impact of acute alcohol consumption on lethality of suicide methods," pp. 1-8, 2017.
15. C. Moutier, "Manual MSD. Versão para Profissionais de Saúde - Comportamento Suicida," 2021. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/transtornos-psiQUI%3%A1tricos/comportamento-suicida-e-autoles%C3%A3o/comportamento-suicida>. [Acedido em 29 Julho 2023].
16. M. S. Sebastián e e. al, "Rural-urban differences in suicide attempts and mortality among young people in northern Sweden, 1998-2017: A register based-study," pp. 1-20, 11 Julho 2022.
17. N. Guedes, "TSF . Radio de Notícias," 26 Março 2018. [Online]. Available: <https://www.tsf.pt/sociedade/suicidio-e-cada-vez-mais-um-fenomeno-rural-9214150.html>. [Acedido em 29 Julho 2023].
18. J. J. Carballo e e. al, "Psychosocial risk factores for suicidality in children and adolescents," pp. 1-15, 25 Janeiro 2019.
19. T. A. Duarte e et al, "Self-harm as a predisposition for suicide attempts: A study of adolescents deliberate self-harm, suicidal ideation, and suicide attempts," pp. 1-5, 3 Setembro 2020.
20. D. F. Guerreiro e et al, "Clinical features of adolescents with deliberate self-harm: A case control study in Lisbon, Portugal," pp. 1-6, 16 Novembro 2009.

21. C. B. Carvalho e et al, "Biting myself so I don't bite the dust: prevalence and predictors of deliberate self-harm and suicide ideation in Azorean youths," pp. 1-9, 30 Março 2017.
22. F. F. B. d. S. Lima, "Suicídio no grupo oriental dos Açores - Análise casuística," pp. 13-34, 2016.
23. "Instituto Nacional de Estatística. Statistics Portugal," 2023 Fevereiro 02. [Online]. Available: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0009821&contexto=bd&selTab=tab2. [Acedido em 2023 Agosto 31].
24. R. D. Silva, "Droga nos Açores: substâncias sintéticas muito baratas e abundantes viciam jovens e deixam consumidores "no fundo do poço"," Expresso, 2023.
25. T. Pereirinha, "Drogas Sintéticas. 60% das novas substâncias detetadas na Madeira e nos Açores," Observador, 30 Agosto 2023.
26. "Aumento do consumo de droga em Ponta Delgada," RTP Arquivos, 4 Julho 2001.

Review

Óleos Naturais como substitutos do uso de Xileno na etapa de Diafanização do Processamento Histológico- Revisão Sistemática da Literatura

Cátia Pinto¹, Inês Loureiro¹, Luís Bernardo¹, Amadeu Borges-Ferro^{1*}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal.

* Correspondence: amadeu.ferro@estesl.ipl.pt

Abstract: A técnica histológica envolve um conjunto de etapas para preparar tecidos para a análise microscópica, com recurso a vários reagentes, nomeadamente o Xileno, nocivo, problemático para a saúde e ambiente. Assim, é pertinente pesquisar formas de minimizar esta exposição.

Neste sentido, realizou-se uma revisão sistemática sobre a substituição do Xileno no processamento histológico por um agente diafanizador de origem natural que consiga realizar funções semelhantes, mas que possua uma toxicidade menor. Os artigos foram selecionados de acordo com a Metodologia PRISMA, recorrendo às bases de dados *Pubmed* e *Web of Science* inserindo várias combinações das seguintes palavras-chaves “xylene”, “clearing”, “oil” e “natural substitute”. Apenas foram aceites artigos científicos entre os anos de 1990 e 2023, na língua inglesa, que substituíam o Xileno por Óleos naturais na etapa de diafanização. Na pesquisa foram identificados 2614 artigos, dos quais, após aplicar critérios de elegibilidade e controlo da qualidade, restaram 7. Estes foram analisados, recolhendo informações sobre o substituto de origem natural, a tipologia dos tecidos, condições de realização da Diafanização e parâmetros de análise dos resultados obtidos. Todos os Óleos apresentaram resultados semelhantes ou superiores ao Xileno, em todos os parâmetros avaliados.

Observando os resultados, concluiu-se que o Azeite e o Óleo de coco são os possíveis substitutos de origem natural mais adequados. Uma vez que a literatura à cerca do tema de interesse é escassa e são poucos os artigos que abordam esta substituição, seria importante a realização de mais estudos.

Keywords: Xileno, Diafanização, Substituto Natural, Óleos, Processamento Histológico.

Citation: Pinto, Cátia.; Loureiro, I.; Bernardo, L.; Ferro-Borges, Amadeu. Óleos Naturais como substitutos do uso de Xileno na etapa de Diafanização do Processamento Histológico- Revisão Sistemática da Literatura. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2024 Mar 2; 2(1): 69-79

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: 6 February 2024

Accepted: 23 February 2024

Published: 2 March 2024

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Science

1. Introdução

A Anatomia Patológica consiste na área científica que procede à análise morfológica de órgãos, tecidos e células, bem como à análise molecular de proteínas e ácidos nucleicos. Tem como objetivo o diagnóstico de lesões, com implicações na terapêutica, prognóstico de doenças bem como na sua prevenção (1). Tanto num contexto de pesquisa científica como no diagnóstico, para um tecido poder ser analisado microscopicamente, é necessário ser submetido às várias etapas que a técnica histológica abrange (2). Estas começam na Fixação, passo em que a peça é imersa em agente fixador para preservação, seguida pelo Processamento Histológico e posterior Inclusão, na qual o tecido é solidificado em blocos de parafina. Segue-se o corte destes blocos, obtendo-se secções finas (3-4 *micra*) que serão coradas, para permitir a visualização estrutural do tecido (2, 3).

Especificamente, quanto ao Processamento Histológico, este pode ser dividido em 3 fases: a desidratação, a diafanização e a impregnação (4). A diafanização consiste na substituição do agente desidratante (normalmente etanol em concentrações crescentes) no tecido por um solvente da parafina, que será meio de suporte a utilizar na impregnação, visto que esta última não é miscível com o etanol (5,6). Nesta fase o agente mais utilizado é o Xileno, que é nocivo para a saúde, mas também um contaminante ambiental, visto ser volátil. Dependendo da concentração e do tempo de exposição, o uso deste agente pode causar vários danos para a saúde

como: irritação de nariz, olhos e garganta, e efeitos respiratórios, renais, gastrointestinais e reprodutivos. No entanto, o principal alvo será o sistema nervoso central, podendo provocar náuseas, dores de cabeça, tonturas e vômitos (4,7–9).

O Xileno [$C^8 H^{10}$], também conhecido como Dimetilbenzeno ou Xileno, é um hidrocarboneto aromático incolor e com cheiro doce, sob a forma de líquido ou gás inflamável, bastante utilizado na indústria e a nível laboratorial como solvente orgânico (8,10). Este consiste principalmente num composto sintético, mas pode também ser encontrado naturalmente (petróleo, carvão e alcatrão vegetal). Possui três formas isoméricas, que diferem na posição dos grupos Metilo na molécula de Benzeno: Meta-Xileno, Orto-Xileno e Para-Xileno. É ainda composto por resíduos de Tolueno, Trimetil-benzeno, Fenol, Tiofeno, Pirimidinas e Sulfito de Hidrogénio (8,10–13).

O Xileno pode entrar no organismo humano por inalação, ingestão ou contacto direto com a pele e, por isso, as profissões associadas aos laboratórios de anatomia patológica, indústrias de couro e borracha, petroquímica e fabricas de produção de aço apresentam um maior risco de exposição ao Xileno (14). Apesar dos processadores histológicos automatizados utilizados atualmente reduzirem bastante a exposição aos reagentes tóxicos, a necessidade de substituição dos reagentes no equipamento é uma das fontes de maior exposição para o Técnico (8). É de extrema importância e pertinência procurar formas de minimizar a exposição a este químico, quer seja através de boas práticas laboratoriais, quer seja através da sua substituição (8).

1.1 Metabolização do Xileno

Uma vez dentro do organismo, o Xileno é rapidamente absorvido e distribuído pelo corpo através da circulação sanguínea (10,15). A sua biotransformação nos humanos ocorre quando um dos seus grupos metilo é oxidado, no fígado, por enzimas microssomais, com produção de ácidos benzóicos, que por sua vez são conjugados com glicina, formando assim ácidos metil-hipúricos que são eliminados na urina. Esta via de metabolismo aplica-se a quase todo o Xileno absorvido, independentemente do isómero, da via de absorção, da dose administrada ou da duração da exposição (10). Uma vez que esta transformação é realizada por enzimas hepáticas, os hepatócitos são também afetados, existindo aumento do retículo endoplasmático rugoso e dos lisossomas, deformação das mitocôndrias, diminuição dos níveis de glicogénio e ainda alterações dos núcleos hepatocelulares (9,10,15). As outras vias metabólicas incluem a eliminação de Xileno não modificado na urina e no ar exalado, sendo responsáveis por expelir cerca de 10% da dose de Xileno absorvida (10).

1.2 Substitutos de origem natural na Diafanização do Processamento

Na escolha de um reagente alternativo adequado para a realização da Diafanização não se pode deixar de considerar algumas propriedades físicas e químicas que podem influenciar a qualidade de todo o processamento, entre elas a temperatura e a viscosidade, definida como o atrito interno de uma substância líquida que afeta a sua taxa de fluxo através dos tecidos. Estas propriedades são especialmente importantes na etapa de Diafanização (5). A viscosidade é inversamente proporcional à temperatura, sendo que o aumento da temperatura diminui a viscosidade dos reagentes, bem como a duração do processamento (16,17).

Os Óleos Naturais são utilizados numa grande variedade de produtos, desde comida, perfumes e medicamentos e são produtos obtidos a partir de matéria prima vegetal por processos físicos ou mecânicos. Muitos destes óleos fazem parte de uma família de compostos chamada Terpenos que são polímeros de isopreno e independentemente da sua diversidade estrutural, contêm algumas semelhanças estruturais como os múltiplos de cinco átomos de carbono (17,18). Estes substitutos de origem natural possuem várias vantagens como o facto de não serem tóxicos nem altamente inflamáveis, e de serem ambientalmente mais sustentáveis (17,19).

1.3 Objetivos

Partindo da seguinte questão de investigação: “Poderão os Óleos de origem natural ser considerados alternativas viáveis ao Xileno na etapa histológica da diafanização perante os resultados obtidos na literatura publicada?”, definiu-se como objetivo desta Revisão Sistemática, avaliar a substituição do Xileno por agentes de origem natural na etapa de diafanização. Serão avaliados os resultados obtidos de forma a determinar a exequibilidade desta substituição, indicando o substituto mais adequado.

2. Metodologia

Uma revisão da literatura sistemática corresponde a um trabalho desenvolvido com o principal intuito de sintetizar várias descobertas científicas de forma sistemática, clara e reproduzível. Desta forma, trata-se de um tipo de investigação focada numa questão bem definida

que visa identificar, selecionar, avaliar e sintetizar a informação referente e relevante a determinado assunto (20,21).

Utilizando metodologias sistemáticas e explícitas na revisão dos artigos em estudo, é possível minimizar o número de viés presentes, uma vez que se fornecem descobertas fiáveis, das quais se podem retirar conclusões e tomar decisões (20,21).

Com o intuito de alcançar um trabalho imparcial e cientificamente adequado, a pesquisa foi orientada com base nas linhas orientadoras de 2020 definidas pela *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). Tendo esta metodologia como base, é possível mapear o número de artigos identificados, incluídos e excluídos e quais os motivos das exclusões (22–24). Uma revisão sistemática de acordo com esta metodologia contém objetivos definidos e uma metodologia reproduzível e explícita, de forma a recolher sistematicamente bibliografia adequada e que cumpra os critérios de elegibilidade, para possibilitar a avaliação da validade dos resultados e a apresentação e síntese das características dos estudos incluídos (22–24).

2.1 Critérios de inclusão

Tendo em conta o tema desta revisão sistemática, foi necessário aplicar critérios de inclusão pois nem todos os resultados obtidos foram relevantes para o tema em estudo. Assim foram considerados como critérios de inclusão:

- Tipo de publicação: Artigo Científico;
- Linguagem utilizada: inglês;
- Artigos publicados entre os anos 1990 e 2023;
- Acessibilidade: o artigo deve estar disponível na íntegra;
- Tema: Óleos Naturais como substitutos do Xileno na etapa de diafanização do processamento histológico, podendo ocorrer substituições noutras etapas, simultaneamente.

2.2 Fontes de Pesquisa

Foram consultadas duas bases de dados científicas, PubMed e Web of Science. A escolha destas duas plataformas deveu-se à facilidade de uso, acesso gratuito e, principalmente, à reputação e à enorme quantidade de artigos indexados. Na metodologia aplicada à pesquisa efetuada, em cada uma das fontes, foram utilizadas várias combinações de palavras-chaves relacionadas com o tema em estudo, efetuando uma pesquisa avançada destas palavras no título e resumo. Recorreu-se a 5 combinações de palavras-chaves para realizar a pesquisa de artigos:

- “Xylene” AND “clearing”;
- “Xylene” AND “oil”;
- “Xylene” AND “natural substitute” AND “clearing”.
- “Xylene” AND “natural substitute” AND “oil”.
- “Xylene” AND “natural substitute” AND “oil” AND “clearing”.

Apenas foram integrados, nesta pesquisa, artigos disponíveis na língua inglesa uma vez que esta é considerada a primeira língua na literatura científica.

2.3 Controlo da Qualidade

A avaliação da qualidade é um dos passos mais cruciais no desenvolvimento de uma revisão sistemática, é necessário utilizar uma ferramenta validada para avaliar a qualidade de cada estudo recolhido. Os estudos selecionados que respeitem os critérios de inclusão, devem ser submetidos a uma avaliação da qualidade mais refinada, de todo o artigo, pelo uso de guias de avaliação crítica geral. É fundamental que pelo menos dois revisores façam este controlo da qualidade (25,26).

Assim sendo, baseou-se a classificação do controlo da qualidade em Harden (2010) (27). Com base no risco de viés categorizado para cada estudo, foi desenvolvida uma tabela (Tabela 1), permitindo a classificação em “validados” ou “não validados” (26,27). O nível de qualidade foi determinado da seguinte forma: um artigo que apresente três ou mais parâmetros de qualidade baixa é considerado um artigo não validado.

Tabela 1- Parâmetros de classificação da qualidade dos artigos.

Parâmetros	Qualidade alta	Qualidade Baixa
Questão de investigação	Questão de pesquisa clara.	Questão de pesquisa pouco clara.
Tecido em estudo	Descreve o tecido de estudo.	Descreve superficialmente o tecido de estudo.
Processo de colheita de dados	O processo de colheita de dados está presente.	O processo de colheita de dados não está presente.
Resultados	Os resultados são apresentados de forma precisa e detalhada.	Os resultados são apresentados de forma pouco precisa.
Reagente	O reagente de substituição está explicitado.	O reagente de substituição não está explicitado.
Etapas de substituição	A etapa de substituição está explicitada.	A etapa de substituição não está explicitada.
Abordagem da temática	Abordagem profunda e explícita da temática.	Abordagem superficial e pouco explícita da temática.

3. Resultados

Após a pesquisa, foi obtido um total de 2614 resultados, que passaram a 2057, após a remoção dos duplicados.

Nem todos os resultados obtidos foram relevantes para o tema pelo que tiveram de ser aplicados critérios de inclusão. Como é possível observar na Figura 1 (22–24), numa primeira fase (Screening), foram selecionados 7 artigos, com base somente no Título e Abstract.

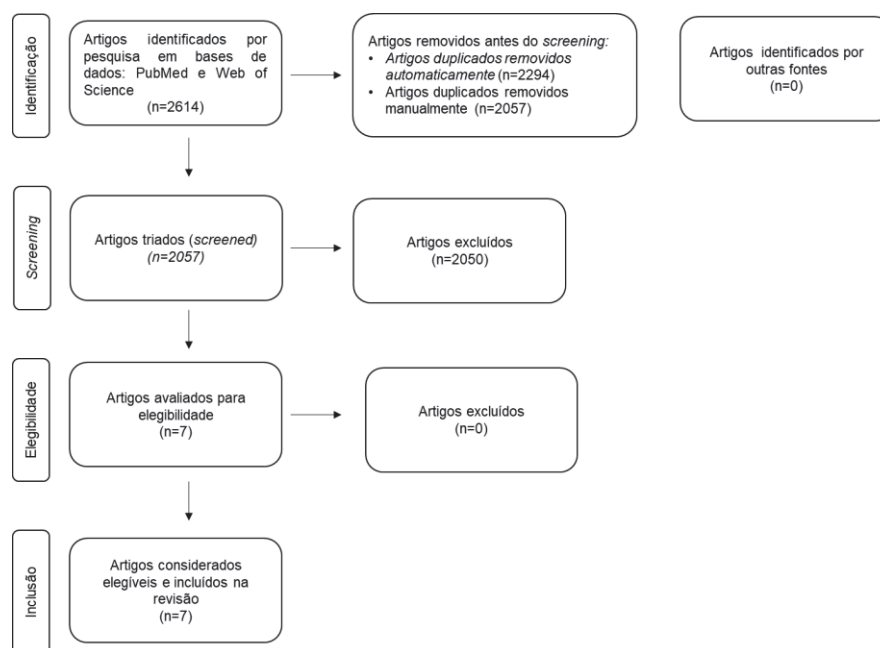


Figura 1 - Diagrama de Fluxo dos artigos incluídos nesta Revisão Sistemática da Literatura (22).

Após a aplicação dos critérios de controlo da qualidade aos artigos recolhidos todos os sete artigos foram validados.

Dos artigos recolhidos, foram analisadas as seguintes características: características da diafanização, informações sobre os tecidos, parâmetros avaliados e resultados obtidos.

Na Tabela 2, encontram-se resumidas as informações obtidas dos artigos recolhidos.

Tabela 2- Tabela resumo da análise dos artigos recolhidos.

Fonte	Óleo Natural	Amostra	Fonte de calor	Temperatura	Tempo de compensação	Resultados obtidos
Thamilselvan et al. (2021)	Óleo de cedro na diafanização	50 casos - Pele, músculo, tecido adiposo e mucosa de carcinoma de células pavimentosas.	Sem indicação	37-39 °C: Temperatura ambiente	Overnight	A coloração nuclear e citoplasmática mostrou resultados superiores com o Óleo de Cedro. Os artefactos e coloração de fundo são mais evidentes no xileno.
Bordoloi et al. (2022)	Óleo de coco na diafanização	45 casos - tecidos moles	Sem indicação	Temperatura ambiente	1 ciclo de 2 horas	Não houve encolhimento significativo e houve menos dobras de corte com óleo de coco. A facilidade de corte, o contorno celular, o detalhe nuclear e a morfologia mostraram-se equivalentes ao xileno.
Sermadi et al (2014)	Óleo de coco na diafanização	60 casos - De pele, mucosa oral, glândula salivar, tendão, músculo e gânglio linfático	Incubadora	Sem indicação	1º Ciclo (1hora) 2º Ciclo (1 hora)	A translucidez foi maior, a rigidez menor e o encolhimento foi não significativo no óleo de coco. Não houve alterações na coloração e o corte e a impregnação não foram afetados negativamente.
Swamy et al. (2015)	Óleo de cenoura, azeite, óleo de pinho e óleo de rosa na diafanização	40 casos	Estufa	60 °C	1º Ciclo (45 min.) 2º Ciclo (45 min.)	Os óleos de rosa, cenoura e pinho apresentaram penetração semelhante à do xileno. Óleo de pinho superior em translucidez e menor encolhimento. Óleo de cenoura e rosa, menor encolhimento e translucidez semelhante ao xileno. Arquitetura celular preservada em todos os óleos, qualidade geral de coloração equivalente à do xileno, corte sem diferenças.
Rasmussen et al. 1992)	Azeite na fase de diafanização e Óleo de coco na desparafinação	232 casos - placenta, mama, útero, testículo, intestino, próstata, vesícula biliar e amígdala	Processador a vácuo	50 °C	1º Ciclo (1 hora) 2º Ciclo (1,5 horas) 3º Ciclo (1,5 horas)	HE: 94% das lâminas – resultados semelhantes/superiores. Técnicas especiais: reações semelhantes, ausência de falsos positivos, negativos e coloração de fundo melhorada.

3.1 Características da Diafanização

Considerando o objetivo desta revisão é de extrema importância ter conhecimento das condições utilizadas – duração, fonte de calor e temperatura. Quanto à duração, todos os estudos dão essa indicação, sendo que Thamilselvan et al (28) realizou somente um ciclo *overnight*, Bordoloi et al (29) realizou somente um ciclo de 2 horas, Sermadi et al (30), Ravindran et al. (31) e Muddana et al (32) realizaram dois ciclos de 1 hora cada, Swamy et al (33) realizou 2 ciclos de 45 minutos cada e Rasmussen et al (34) realizou 3 ciclos, 1 hora no primeiro ciclo e 1 hora e 30 minutos nos dois seguintes.

Quanto à temperatura esta não é mencionada em dois dos artigos enquanto a fonte de calor utilizada não está mencionada em três. Thamilselvan et al (28) e Bordoloi et al (29) realizam a diafanização à temperatura ambiente sem necessitar de uma fonte de calor. Swamy et al (33) e Ravindran et al. (31) realizaram a diafanização a 60 °C sendo que o primeiro autor utiliza como fonte de calor a estufa (hot-air oven) e o segundo não dá indicação. Sermadi et al (30) não indica a que temperatura foi realizada a diafanização, mas menciona que a fonte de calor utilizada é a incubadora. Rasmussen et al (34) realizou a diafanização a 50 °C utilizando como fonte de calor o processador a vácuo.

3.2 Características dos Tecidos

Em todos os estudos são apresentadas informações sobre os tecidos. Em Bordoloi et al. (29) e Muddana et al. (32) foram utilizadas 45 e 30 casos de tecidos moles, respetivamente. No estudo de Ravindran et al. (31), os 20 casos estudados eram de tecidos orais. Nos estudos de Thamilselvan et al. (28), Sermadi et al. (30) e Rasmussen et al. (34) foram utilizados vários tipos de tecidos diferentes sendo que no primeiro estudo foram utilizados 50 tecidos de: pele, músculo, tecido adiposo, glândula e mucosa de carcinoma de células escamosas orais; no segundo estudo 60 tecidos de: pele, mucosa bucal, glândula salivar, tendão, músculo e nódulos linfáticos; no terceiro estudo 232 tecidos de: placenta, mama, útero, testículo, intestino, próstata, vesícula biliar e amígdala. Em Swamy et al. (33) não é referido o tipo de tecidos.

Quanto às dimensões dos tecidos, estas são referidas em 4 artigos. Em Thamilselvan et al. (27) utilizaram tecidos com dimensões de 3-7 mm; em Bordoloi et al. (29) utilizaram dimensões de 0,5 cm x 0,5 cm x 0,3cm; em Sermadi et al. (30) e Muddana et al. (32) utilizaram dimensões de 0,5 cm x 1 cm x 3-5 mm e em Swamy et al. (33) dimensões de 0,5 cm x 0,8 cm x 1,5-3 mm.

No que diz respeito à espessura do corte, esta está indicada em apenas 4 artigos e varia entre 3-5 µm, sendo em Bordoloi et al. (29) e Ravindran et al. (31) de 4 µm, em Thamilselvan et al. 27 de 3 µm e em Rasmussen et al. (34) de 4-5 µm.

Dos sete artigos analisados, cinco especificam que a origem dos tecidos é humana, enquanto os restantes dois, Swamy et al. (33) e Ravindran et al. (31) não apresentam indicação da origem.

3.3 Rigidez dos Tecidos

O parâmetro da rigidez somente foi avaliado em três dos artigos recolhidos. Sermadi et al. (30), Muddana et al. (32) e Swamy et al. (33) avaliaram a rigidez através de scores – 0 para resultados inferiores ao processamento com Xileno, 1 para resultados semelhantes e 2 para resultados superiores.

No estudo de Sermadi et al. (30) e Muddana et al. (32) foi avaliada a rigidez imediatamente após a diafanização, sendo que 73% dos tecidos processados com Óleo de coco apresentaram menor rigidez que o Xileno bem como 67% dos tecidos processados com azeite, enquanto os restantes 27% e 33%, respetivamente, apresentaram uma rigidez semelhante. Na rigidez após a impregnação não se verificaram diferenças entre os grupos em ambos os estudos. Swamy et al. (33), avaliou a rigidez após a diafanização, sendo que todas os tecidos processados com os quatro Óleos apresentaram menor rigidez comparativamente aos tecidos processados com Xileno.

3.4 Translucidez

A translucidez apenas é avaliada em quatro estudos. Swamy et al. (33), Sermadi et al. (30) e Muddana et al. (32) utilizaram três scores – 0 - inferior ao Xileno, 1 - semelhante ao Xileno e 2 - superior ao Xileno. Nos artigos Sermadi et al. (30) e Muddana et al. (32) os tecidos processados com Óleos vegetais apresentaram maior translucidez comparativamente aos processados com Xileno. Também em Swamy et al. (33), os tecidos processados com Óleo de pinho apresentaram maior translucidez, enquanto os processados com o Azeite, Óleo de cenoura e o Óleo de rosas apresentaram translucidez semelhante.

Ravindran et al. (31), avaliou a translucidez através da classificação em adequado ou inadequado. A translucidez esteve presente em 100% dos tecidos processados com Xileno e em apenas 95% dos processados com Óleo de palma.

3.5 Retração

A retração do tecido é avaliada em três estudos. Em Sermadi et al. (30) e Bordoloi et al. (29), este parâmetro sofreu tratamento estatístico, no qual foram calculadas para cada um dos grupos a média e o desvio padrão das áreas métricas dos tecidos antes e depois da diafanização no primeiro estudo e antes e depois do processamento histológico no segundo. Sermadi et al. (30) conclui que o Óleo de coco apresentou uma menor retração que o Xileno. Bordoloi et al. (29) avaliou também este parâmetro utilizando uma escala de 1 a 5, sendo 1 - fraco, 2 - médio, 3 - bom, 4 - muito bom e 5 - excelente. Neste estudo os tecidos processados com Óleo de coco não apresentaram encolhimento significativo contrariamente aos tecidos processados com Xileno. Já no estudo de Swamy et al. (33), este parâmetro foi avaliado com a atribuição de scores de 0 a 2, sendo 0 - inferior, 1 - semelhante e 2 - superior em comparação com o Xileno, verificando-se nos respetivos resultados uma menor retração dos tecidos nos Óleos de rosa, cenoura e de pinho, ao passo que no Azeite a retração foi equivalente à do Xileno.

3.6 Facilidade de Corte

A facilidade de corte é avaliada em quatro estudos. Em Swamy et al. (33), Sermadi et al. (30) e Muddana et al. (32) é avaliada através de três scores – 0 - inferior ao Xileno, 1 - semelhante ao Xileno e 2 - superior ao Xileno. Swamy et al. (33), avaliou a facilidade de corte dos tecidos processados com Óleo de cenoura, pinho, rosa e azeite como semelhante ao Xileno. No estudo de Sermadi et al. (30), o Óleo de coco não afetou negativamente a facilidade de corte, enquanto em Muddana et al. (32) não se observou diferenças significativas.

No estudo de Bordoloi et al. (29), este parâmetro sofreu tratamento estatístico, no qual foram calculadas para cada um dos grupos a média e o desvio-padrão dos scores atribuídos à facilidade de corte e presença de dobras. Avaliou assim este parâmetro utilizando uma escala de 1 a 5, sendo 1 - fraco, 2 - médio, 3 - bom, 4 - muito bom e 5 - excelente. A facilidade de corte foi considerada semelhante ao Xileno. Em relação à presença de dobras, a utilização de Óleo de coco permitiu a obtenção de 62,20% dos cortes sem a presença de dobras, enquanto o Xileno apresentou apenas uma percentagem de 33,30%.

Também foi classificada a facilidade de corte em Ravindran et al. (31), através da escala com os termos fácil ou difícil, sendo que a obtenção de cortes foi fácil em 100% dos tecidos processados com Xileno e 90% nos tecidos processados com Óleo de palma.

3.7 Coloração de Hematoxilina-Eosina

Em Thamilselvan et al. (28) as colorações nuclear e citoplasmática foram avaliadas em 4 níveis: 1-coloração com má preservação da morfologia, 2-coloração mediana, 3-coloração boa ou 4-coloração excelente. Também a coloração de fundo foi avaliada em 4 níveis: 0-nula, 1-leve, 2-

moderada ou 3-intensa. Os artefactos foram avaliados em presentes ou ausentes. Os resultados das amostras foram comparados utilizando o teste U de Mann-Whitney. A análise de subgrupos de casos individuais foi feita recorrendo ao teste de Kruskal-Wallis. Para ambos os testes, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para os parâmetros da coloração nuclear e citoplasmática todos os grupos de tecidos apresentaram resultados superiores quando processados com o Óleo. Os resultados do teste Kruskal-Wallis mostraram valores de p estatisticamente significativos para a coloração nuclear em tecidos de pele e musculares. Para a coloração citoplasmática os casos de tecidos musculares mostraram valores de p estatisticamente significativos. A coloração de fundo foi mais vezes observada nos grupos de tecidos processados com Xileno.

Bordoloi et al. (29) avaliou a coloração nos seguintes critérios: contorno celular, detalhe nuclear, qualidade da coloração e morfologia celular. Cada critério foi classificado numa escala de 1 a 5 sendo que: 1-pobre, 2-média, 3-bom, 4-muito bom e 5-excelente. Os dados foram submetidos a análises estatísticas utilizando o teste U de Mann-Whitney e o teste de coeficiente de correlação de Spearman. Não se observou diferenças, em nenhum critério, utilizando os dois agentes diafanizadores.

Em Sermadi et al. (30), Swamy et al. (33) e Muddana et al. (32) a qualidade de coloração foi avaliada em três níveis: 0-o tecido não conseguiu adquirir a coloração adequadamente, 1-detahes não visualizados ou 2-bom contraste entre o núcleo e o citoplasma, visibilidade dos detalhes e brilho da coloração.

Não foram observadas diferenças entre o grupo de tecidos processado com Xileno e os processados com os substitutos naturais no estudo de Sermadi et al. (30). Em Swamy et al. (33) a coloração foi semelhante à do Xileno, tendo sido considerada boa para o Óleo de pinho e satisfatória para o Óleo de rosas, cenoura e Azeite. Em Muddana et al. (32) apenas 17% dos tecidos apresentaram resultados superiores quando tratados com Azeite, sendo os restantes 83% semelhantes. Já em relação à arquitetura tecidual, os detalhes celulares foram avaliados nos três artigos relativamente à presença (score 1) ou não (score 0) de uma arquitetura distinta e de um contraste núcleo-citoplasma bom e distinto. Os detalhes nucleares foram avaliados relativamente à presença de picnose do núcleo e manchas (score 0) e à presença de cromatina distinta, membrana nuclear proeminente e coloração nítida do núcleo (score 1). Em Muddana et al. (32) não foram observadas diferenças entre os dois grupos em estudo. Em Sermadi et al. (30) e Swamy et al. (33) os dados obtidos foram submetidos a análise estatística usando o teste de pares combinados Wilcoxon e o Teste U de Mann-Whitney. Em Sermadi et al (30) não foram observadas diferenças entre o grupo de tecidos processado com Xileno e os grupos de tecidos processados com os substitutos naturais. Em Swamy et al. (33) a arquitetura tecidual encontra-se bem preservada nos tecidos processados pelos Óleos, existindo uma clara distinção entre o núcleo e o citoplasma.

Em Muddana et al. (32) os cortes foram submetidos ainda a uma análise citomorfométrica usando o software analisador de imagem Pro insight versão 8.0 (Mediacybernetics) para minimizar a variabilidade Intra e inter observador. O teste t e o teste U de Mann-Whitney foram utilizados para análise estatística sendo um valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Foi assim verificado uma menor retração celular no grupo processado com Azeite.

Em Sermadi et al. (30) os cortes foram submetidos também a uma análise citomorfométrica usando o software analisador de imagem Image-Proexpress (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foi assim verificado um menor encolhimento celular estatisticamente significativo no grupo processado com Óleo de coco.

Em Rasmussen et al. (34) avaliou-se as lâminas obtidas na deteção da presença de artefactos, reação da coloração e detalhes citológicos. Verificou-se que em 91% dos casos não existiram diferenças na qualidade da coloração entre os tecidos processados com Xileno e com Azeite. Nos 9% restantes, 6% dos casos obtiveram qualidade superior com o Xileno e 3% com o Azeite.

Ravindran et al. (31) avaliou os parâmetros clareza da coloração, coloração nuclear, coloração citoplasmática, uniformidade da coloração e intensidade da coloração em adequados (score 1) e inadequados (score 0). O teste qui-quadrado e o teste U de Mann-Whitney foram utilizados para análise estatística sendo um valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. As colorações nuclear e citoplasmática foram consideradas adequadas em 95% dos casos em ambos os grupos, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas. A intensidade da coloração e a clareza da coloração foram de 95% no processamento com Xileno e de 100% no processamento com Óleo de palma, enquanto a uniformidade da coloração foi de

95% em ambos os grupos. No entanto em todos os parâmetros a diferença não foi estatisticamente significativa.

A Estabilidade e Longevidade da Coloração foram apenas avaliadas por Swamy et al. (33) e Ravindran et al. (31). Em Swamy et al. (33), estes parâmetros foram avaliados durante mais de um ano, não tendo sido observadas diferenças significativas na qualidade da coloração. Em Ravindran et al. (31), os tecidos foram avaliados um ano depois, tendo sido observados resultados superiores no grupo do Óleo de palma em todos os parâmetros, à exceção da coloração nuclear. Neste o Xileno e o Óleo obtiveram o mesmo número de casos adequados e inadequados.

6.8 Outras Técnicas

Os artigos de Thamilselvan et al. (28), Bordoloi et al. (29), Swamy et al. (33), Ravindran et al. (31), estudaram os respetivos Óleos utilizando apenas a coloração Hematoxilina Eosina. O artigo Sermadi et al. (30), testou ainda a coloração Periodic Acid-Schiff (PAS) nos tecidos de glândula salivar, tendo apresentado resultados semelhantes ao grupo que utiliza Xileno.

O artigo Muddana et al. (32) também testou a coloração PAS e Van Gieson tendo resultados semelhantes em termos de arquitetura celular e qualidade de coloração ao grupo que utiliza Xileno. O artigo Rasmussen et al. (34), realizou várias colorações histoquímicas: coloração de Giemsa, Gordon and Sweets, Reticulina, Gram, Grimelius, Tricrómio de Masson, Orceína, Elastina, Periodic Acid-Schiff -Azul de Alcian, Vermelho Sirius, Azul de Toluidina e Van Gieson. Em todas foi possível verificar resultados semelhantes entre os tecidos processados com Xileno e os tecidos processados com os substitutos de origem natural. Este artigo realizou ainda técnicas de Imunohistoquímica com os anticorpos anti-CD34, anti-Desmina, anti-EMA, anti-Fator VIII, anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM, anti-Queratina, anti-Kappa, anti-Lambda, anti-Mioglobina, anti-NSE, anti-S-100, anti-Vimentina (34) tendo se verificado a ausência de resultados falsamente negativos ou positivos, bem como a ausência de marcação de fundo significativa.

4. Discussão

Os resultados obtidos parecem ser influenciados por diversos fatores, inclusive os diferentes parâmetros associados ao processamento (e.g. temperatura, duração) que vão ter impacto nas características que os tecidos adquirem após o processamento e na coloração (2).

Relativamente aos parâmetros inerentes ao processamento, tanto a temperatura como a duração variam bastante de autor para autor, no entanto constatou-se que os tempos utilizados estão compreendidos entre 1 a 3 ciclos de 45 minutos até à duração *overnight*, e as temperaturas predominavam entre os 40 °C e os 60 °C. Estas variações podem ser justificadas uma vez que os índices de viscosidade dos agentes de origem natural em estudo são superiores ao do Xileno, o que implica que os protocolos tenham de ser ajustados por prolongamento do tempo ou por aumento da temperatura. Com temperaturas superiores a viscosidade diminui e a taxa de infiltração torna-se mais rápida, o que permite a aplicação de tempos mais curtos (15). Caso este ajuste não seja adequadamente realizado, poderão ocorrer diafanização ou infiltração incompletas, pois o meio de impregnação é imiscível com os agentes desidratantes. Consequentemente, uma impregnação incompleta irá refletir-se numa menor rigidez dos tecidos, causada pela falta do suporte fornecido nesta etapa (35,36).

Em relação às dimensões, ao tipo e à origem dos casos em estudo, todos vão influenciar a taxa de infiltração dos reagentes nos tecidos, ao ponto de ser necessário um ajustamento dos tempos do processamento face às mesmas (16,37). A espessura dos cortes histológicos pode provocar variações na coloração, afetando o seu contraste, nitidez e o reconhecimento dos detalhes, tendo sido observado que a espessura mais utilizada foi de 4µm, concordante com a espessura mais utilizada dentro da literatura de referência (2,38,39). Não havendo ainda conhecimento acerca de que forma os agentes de origem natural reagem com os tipos de tecido existentes, poderá ser difícil prever a presença ou não de variações a nível da coloração. Posto isto, é possível perceber que o Azeite estudado em Rasmussen et al. 34 foi o óleo que apresentou um estudo mais completo em relação à quantidade (232) e tipos de tecidos de origem humana. Contrariamente a este, Ravindran et al. (31) apenas estudou o Óleo de palma em 20 casos, não detalhando os tipos de tecidos nem mencionando a sua origem.

Quanto à rigidez, retração e facilidade de corte todos os Óleos que estudaram estes parâmetros, apresentaram resultados equivalentes ou superiores ao Xileno. Em relação à translucidez, apenas o Óleo de palma se apresentou inferior ao Xileno, mas não comprometendo o diagnóstico. Apesar dos resultados obtidos, apenas Swamy et al. (33) e Sermadi et al. (30) avaliaram os seus Óleos em todas estas características resultando num estudo mais completo

acerca destes (Óleo de coco, cenoura, pinho, rosa e Azeite) como diafanizadores, contrariamente a Rasmussen et al. (34) e Thamilselvan et al. (28) que não estudaram nenhuma.

Em relação à coloração de Hematoxilina-eosina, realizada em todos os artigos recolhidos, é possível observar que todos apresentam resultados iguais ou superiores em relação ao Xileno. Em Rasmussen et al. (34) também houve substituição do Xileno na etapa de desparafinação por Óleo de coco (para além do uso de Azeite como diafanizador). No artigo de Ravindran et al. (31) o agente de origem natural também substituiu o Xileno na etapa da desparafinação, sendo que após este passo, as lâminas foram desengorduradas com detergente de loiça a 1,7%. Apesar destas alterações à técnica histológica, exteriores à diafanização, consideramos que estas variáveis não têm impacto suficiente para enviesar os resultados que derivam do reagente da diafanização.

Face a estas situações, é também importante mencionar que Muddana et al. (32) também realizou substituições em duas etapas da técnica histológica, a substituição da Formalina por mel na fixação e o Xileno por Azeite na diafanização. Por este motivo, também este artigo deverá ser analisado à luz desta potencial limitação.

O Azeite, poderá ser o substituto de origem natural mais eficaz, pois apresenta resultados elevados em três estudos (Swamy et al., Rasmussen et al. e Muddana et al.) (32–34) que, para além de estudarem uma grande variedade de tecidos, incluindo tecidos humanos, e elevado número de casos, utilizam também uma grande variedade de colorações histoquímicas e de marcadores imunohistoquímicos. Swamy et al. (33), como referido anteriormente, avaliou este Óleo em todos os parâmetros inerentes ao processamento histológico apresentando resultados de diagnóstico favoráveis. No entanto, apesar do Azeite ter sido estudado de forma aprofundada, é essencial ressaltar que Swamy et al. (33) não indica a origem e tipo de tecidos utilizados e ainda que Rasmussen et al. (34) e Muddana et al. (32) apresentam alterações noutros momentos da técnica histológica que poderão afetar os resultados obtidos.

O Óleo de coco é considerado também um possível substituto eficaz, uma vez que foi testado em Sermadi et al. (30) e Bordoloi et al. (29) em diversos tipos de tecidos humanos, submetido a condições de processamento diferentes e testado ainda na coloração histoquímica Periodic Acid-Shiff. Tal como o Azeite, este agente também apresentou resultados favoráveis ao ser avaliado em todos os parâmetros inerentes ao processamento histológico. No entanto, foi mencionado num dos artigos que existe a possibilidade de a longo prazo este substituto tornar os tecidos “rançosos” [sic].

Os Óleos de rosa, palma, pinho e cenoura são também potenciais candidatos, no entanto, deve ter-se em atenção que estes só foram testados uma única vez, existindo a possibilidade de, ao serem submetidos a protocolos diferentes, serem obtidos resultados diferentes. Para além disto, estes Óleos apenas foram avaliados mediante os parâmetros da coloração de hematoxilina-eosina, não explorando outras áreas complementares.

Por fim, podemos ainda destacar o Óleo de palma pela negativa, como o mais fraco apesar dos resultados favoráveis. Apenas foi estudado num baixo número de casos e submetido a poucos parâmetros de avaliação, necessitando de um estudo mais completo.

5. Conclusões

Após análise dos resultados de todos os artigos recolhidos, foi possível perceber que todos os Óleos de origem natural apresentaram resultados semelhantes ou superiores ao Xileno, dando um ênfase especial ao Azeite e Óleo de coco por serem os que apresentam uma avaliação mais completa.

Na realização desta revisão, o número reduzido de artigos recolhidos foi a única limitação encontrada, uma vez que com um maior número de artigos obter-se-ia uma maior representatividade de resultados acerca do tema de interesse.

Para terminar, sendo este um tema ainda pouco aprofundado, seria benéfico continuar o estudo da substituição do Xileno por agentes de origem natural.

6. References

1. Diário da República. Manual de Boas Práticas Anatomia Patológica. 2007 Jun.

2. Nunes C de S, Cinsa LA. Princípios do processamento histológico de rotina. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais - Animais e Humanos [Internet]. 11 de novembro de 2016 [citado 26 de fevereiro de 2024];8(1). Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/riee/article/view/24028>
3. Antão V. Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações. Pernambuco; 2021.
4. Bancroft JD, Floyd AD, Suvana SK. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7.ª ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier; 2013.
5. Patraquim AC, Ferro AB, Cunha G. Controlo de Qualidade do Processamento Histológico em Histotecnologia: A Realidade de 12 Hospitais Portugueses [Mestrado]. [Lisboa]: Instituto Politécnico de Lisboa, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa ; 2015.
6. Guimarães ACR, de Souza DS, Alves EA, Mota EM, Barbosa HS, Medrado L, et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde - Volume 2. Amendoeira MRR, Molinaro EM, Caputo LFG, editores. Vol. 2. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010.
7. Day CE, editor. Histopathology: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [citado 26 de fevereiro de 2024]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1180). Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1050-2>
8. Kandyala R, Raghavendra SPC, Rajasekharan ST. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. J Oral Maxillofac Pathol. 2010;14(1):1–5.
9. 1. Niaz K, Bahadar H, Maqbool F, Abdollahi M. A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. EXCLI J. 2015;14:1167–86.
10. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological Profile for Xylene [Internet]. [cited 2023 Jun 22]. Available from: <https://www.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=296&tid=53>
11. World Health Organization. Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, editor. Vol. 47. Lyon ; 1989.
12. IARC. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC Monographs during 2015-2019. Lyon; 2014 Apr.
13. National Library of Medicine- National Center for Biotechnology Information. Xylene [Internet]. [cited 2023 Jun 22]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/XYLENE>
14. Salimi A, Talatappe BS, Pourahmad J. Xylene Induces Oxidative Stress and Mitochondria Damage in Isolated Human Lymphocytes. Toxicol Res. julho de 2017;33(3):233–8.
15. Meneses MF da S. Estudo da exposição ocupacional à mistura de solventes orgânicos e dos efeitos para a saúde : estudo de caso numa indústria química portuguesa [Internet] [masterThesis]. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa; 2018 [citado 26 de fevereiro de 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/10197>
16. Woods AE. Laboratory Histopathology: A Complete Reference. Woods A, Ellis RC, editors. Vols. 1–2. Edinburgh; 1994.
17. Digala P, Bollu D, Karthicka C, Vincy SJ, Selvam RME, Kandaswamy S. Alternative To Reduce Occupational Hazards For Paramedical Staffs In Histopathology Department. OSR-JPBS Volume 12, Issue 5 Ver. III (Sep. – Oct. 2017), PP 05-12
18. Akpulu PS. Evaluation of some essential oils as clearing agents on the histology of some selected organs of adult wistar rats. Zaria ; 2015 Jul.
19. Ramamoorthy 1. Ramamoorthy A, Ravi S, Jeddy N, Thangavelu R, Janardhanan S. Natural Alternatives for Chemicals Used in Histopathology Lab- A Literature Review. J Clin Diagn Res. novembro de 2016;10(11):EE01–4.
20. Snyder H. Literature review as a research methodology: An overview and guidelines. Journal of Business Research. 1 de novembro de 2019;104:333–9.
21. Galvão TF, Pereira MG. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. Epidemiologia e Serviços de Saúde. março de 2014;23(1):183–4.
22. PRISMA. PRISMA- Transparent reporting of systematic reviews and meta-analyses [Inter-net]. 2023 [cited 2023 Jun 23]. Available from: <http://www.prisma-statement.org/?AspxAutoDetectCookieSupport=1>
23. Bueno L, Batista J, Trabbold V. Aplicação da metodologia prisma em um estudo de revisão sistemática de literatura sobre as implicações do hpv para a população adolescente-resultados parciais de pesquisa. 2020.
24. PRISMA. PRISMA 2020 checklist. 2020 [cited 2023 Jun 26]; Available from: <http://prisma-statement.org/pris-mastatement/checklist.aspx?AspxAutoDetectCookieSupport=1>
25. Khan KS, Kunz R, Kleijnen J, Antes G. Five steps to conducting a systematic review [Internet]. Vol. 96, J R Soc Med. 2003.
26. CGIAR. Conducting a systematic review: Methodology and steps. 15 de junho de 2021 [citado 26 de fevereiro de 2024]; Disponível em: <https://hdl.handle.net/10568/114124>
27. Harden A. Mixed-Methods Systematic Reviews: Integrating Quantitative and Qualitative Findings. Thomas & Harden; 2010.
28. Thamilselvan S, Sherlin HJ, Jayaraj G, Don KR, Santhanam A. Cedarwood oil as an alternative to xylene as a clearing agent in histopathological tissue processing – A comparative study. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 2021 Aug 25;

29. Bordoloi B, Jaiswal R, Tandon A, Jayaswa A, Srivastava A, Gogoi N. Evaluation and comparison of the efficacy of coconut oil as a clearing agent with xylene. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2022 Jan 26;
30. Sermadi W, Prabhu S, Acharya S, Javali S. Comparing the efficacy of coconut oil and xylene as a clearing agent in the histopathology laboratory. *Journal of Oral and Maxillofacial Pat*. 2014 Sep 18;
31. Ravindran R, Sruthi A, Ameena M, Harish R. Bleached Palm Oil as a Bio-friendly Substitute for Xylene: A Comparative Study. *Oral and Maxillofacial Pathology Journal*. 2018 Dec 9;
32. Muddana K, Muppala J, Dorankula S, Maloth A, Kulkarni P, Thadurari D. Honey and olive oil as bio-friendly substitutes for formalin and xylene in routine histopathology. *Indian Journal of Dental Research*. 2017 Jun 28;
33. Swamy S, Nandan S, Kulkarni PG, Rao T, Palakurthy P. Bio-Friendly Alternatives for Xylene – Carrot oil, Olive oil, Pine oil, Rose oil. *Journal of Clinical e Diagnostic Research*. 2015 Nov 9;
34. Rasmussen B, Hjort K, Møllerup I, Sæther G, Christensen N. Vegetable oils instead of xylene in tissue processing. *Journal Of Pathology Microbiology and Immunology*. 1992;100:827–31.
35. Carson FL, Cappellano CH. *Histotechnology. A self-instructional text*. 3rd ed. ASCP Press, editor. Chicago; 2009.
36. Chapman CM. Troubleshooting in the histology laboratory. Vol. 42, *Journal of Histotechnology*. Taylor and Francis Ltd.; 2019. p. 137–49.
37. Jacobson-Kram D, Keller KitA, editors. *Toxicological Testing Handbook Principles, Applications and Data Interpretation*. 2nd ed. 2006.
38. Matenaers C, Popper B, Rieger A, Wanke R, Blutke A. Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. *PLoS One*. 14 de fevereiro de 2018;13(2):e0192879.
39. Nayak R. *Histopathology Techniques and its Management*. 1st ed. New Delhi : Jaypee Brothers Medical ; 2018.

Revisão

Técnica de disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de cancro colorretal: revisão da literatura

Cátia Alexandre ^{1,2}, Mónica Curado ^{1,3}, Susana Silva ^{3,4} e Regina A. Silva ^{3,5}¹ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (Ipatimup), Porto, Portugal² Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO), Porto, Portugal³ Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, ESS|P.PORTO, Porto, Portugal⁴ Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário do Hospital de S. João, EPE, Porto, Portugal⁵ REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

Resumo: A identificação de metástases ganglionares em peças cirúrgicas de cancro colorretal (CCR) é crucial para o sistema de estadiamento TNM, tendo valor prognóstico. Apesar de ser recomendado isolar um número mínimo de 12 gânglios linfáticos (GL) durante o exame macroscópico, tal nem sempre é conseguido. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os métodos de disseção ganglionar descritos na literatura, para identificar o mais eficaz no isolamento de GL em peças cirúrgicas de CCR e o seu impacto no estadiamento. Dos 41 artigos analisados foram identificados dois métodos para otimização da disseção ganglionar. Um dos métodos baseia-se na utilização de soluções reveladoras de GL que contribuem para o isolamento de GL de menores dimensões, dado que alguns estudos mostram que um maior número de GL pode aumentar a precisão do estadiamento e contribuir para uma decisão terapêutica mais adequada. O outro método foca-se na disseção ganglionar seletiva de acordo com a distância dos GL à região tumoral, pois o número de GL metastizados tende a diminuir com o aumento da distância ao tumor, podendo não haver vantagem na análise total não dirigida dos GL. Embora os resultados destes métodos sejam promissores, são necessários mais estudos multicêntricos para a sua validação.

Palavras-chave: cancro colorretal, gânglios linfáticos, métodos de disseção ganglionar, estadiamento.

Citation: Alexandre, Cátia.; Curado, M.;
Lastname, F. Title. *Trends in Biomedical
Laboratory Sciences* 2024 Mar 2; 2(1):
80-87

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: 9 February 2024

Accepted: 22 February 2024

Published: 2 March 2024

1. Introdução

O cancro colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais frequentes em todo mundo, desenvolvendo-se de forma insidiosa, facto que contribuiu para não ser detetado numa fase precoce da doença (1,2).

O exame anatomopatológico das ressecções cirúrgicas do CCR tem um papel determinante no prognóstico do paciente, assim como na seleção do tratamento adjuvante mais adequado (2). Uma abordagem sistemática e concisa das características do tumor no exame macroscópico e microscópico destas peças cirúrgicas é fundamental para garantir um correto diagnóstico e estadiamento (3).

O sistema de estadiamento mais utilizado para o CCR é o sistema TNM (do inglês, *Tumor, Node and Metastasis*) desenvolvido e atualizado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (4). Este sistema de estadiamento classifica o CCR segundo a profundidade de invasão do tumor primário (T), o envolvimento dos gânglios linfáticos (GL) regionais por metástases identificadas microscopicamente (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (4).

O número de GL metastizados isolados neste tipo de peças cirúrgicas desempenha um papel crucial no estadiamento N destes doentes e, consequentemente, na decisão terapêutica (3,5). A AJCC recomenda que para este tipo de peças cirúrgicas sejam isolados no mínimo 12 GL (6).

A disseção ganglionar em peças cirúrgicas de CCR é realizada através de um método convencional que consiste em seccionar o tecido mesocólico/mesorreto em fatias com uma espessura de 5 a 10 mm e a sua posterior palpação e inspeção para identificação e isolamento de GL. Este método é trabalhoso e minucioso, sendo despendido muito tempo ao patologista ou técnico que o executa. Além disso, este método nem sempre é eficaz para o isolamento de GL com dimensões inferiores a 5mm (7-10).

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Science

A identificação de métodos que permitam otimizar a disseção ganglionar em peças cirúrgicas de CCR num curto espaço de tempo é essencial, de forma a permitir isolar o maior número de GL possível, garantindo a precisão do estadiamento N e, simultaneamente, evitar o atraso na emissão do relatório anatomopatológico (3,5,7,11).

O presente trabalho tem como objetivos pesquisar os diferentes métodos de disseção ganglionar descritos na literatura, de forma a identificar qual o mais eficaz no isolamento de GL nas peças cirúrgicas de CCR. Pretende-se, ainda, avaliar a contribuição destes métodos para o aumento do número de GL dissecados, nomeadamente de GL metastizados, e avaliar o seu impacto no estadiamento dos pacientes e consequente decisão terapêutica, assim como no processo laboratorial e no tempo para obtenção do diagnóstico.

2. Métodos

A presente revisão bibliográfica foi realizada, tendo por base a metodologia PRISMA, a partir de artigos presentes nas bases de dados PubMed, B-On e Google Scholar. Para essa pesquisa foram usadas palavras-chave *colon cancer*, *rectal cancer*, *lymph node*, *lymph node yield*, *revealing solutions* e *distance from tumor* (12). Na pesquisa foram usados os seguintes critérios de inclusão: estudos observacionais ou experimentais, usando peças cirúrgicas de CCR. Os critérios de exclusão foram estudos realizados noutras topografias ou em animais.

Na Figura 1 estão representadas as fases de seleção dos artigos para a redação da presente revisão.

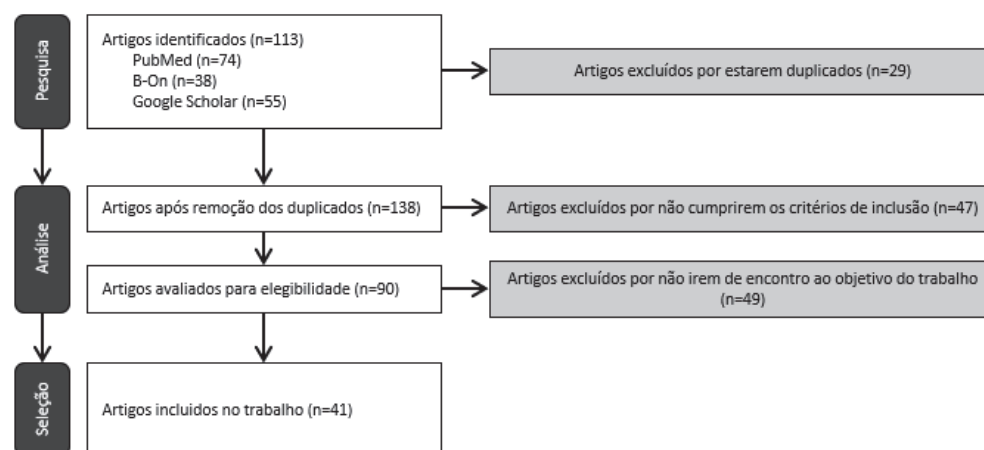


Figura 1. Esquema representativo do processo de seleção dos artigos para leitura e redação do presente estudo, baseado na metodologia PRISMA (14).

3. Otimização do método de disseção ganglionar

Nas últimas décadas têm vindo a ser estudadas novos métodos de disseção ganglionar em CCR na tentativa de otimizar o método convencional, no que concerne à rapidez e eficácia do método. Na literatura estão descritos diferentes métodos de disseção ganglionar, que podem ser categorizados em dois grandes grupos: os métodos com recurso a soluções reveladoras de GL e os métodos de disseção seletiva, de acordo com a distância do GL à região do tumor.

3.1. Soluções reveladoras de gânglios linfáticos

Vários estudos têm vindo a ser realizados na tentativa de melhorar a disseção ganglionar, onde são utilizados métodos que permitem clarear o tecido mesocólico/mesorretico e métodos que evidenciam os GL através da injeção intra-arterial com azul de metileno (13).

Na pesquisa bibliográfica efetuada foi possível identificar estudos que utilizaram seis soluções reveladoras de GL, nomeadamente, a solução de GEWF (do inglês, *Glacid acetic acid*, *absolute Ethanol*, *distilled Water* e *Formaldehyde 40%*), a solução de RE-GEWF (do inglês, *Recycle*, *Eosin*, *Glacid acetic acid*, *absolute Ethanol*, *distilled Water* e *Formaldehyde 40%*), soluções enzimáticas, solução de Carnoy, soluções de *fat clearance* e a solução de azul de metileno (Tabela 1).

A solução de GEWF, constituída por ácido acético glacial, etanol absoluto, água destilada e formaldeído a 40% foi descrita pela primeira vez por Lillie *et al* em 1949, como sendo uma solução segura para o utilizador, de baixo custo, de fácil preparação e utilização quando comparada com

outras soluções (7,8). A solução de RE-GEWF é semelhante à solução de GEWF, embora seja usado etanol reciclado (filtrado a partir do etanol utilizado na etapa de desidratação na coloração de hematoxilina e eosina (HE)) e o corante eosina, que permite identificar facilmente os GL por adquirirem uma tonalidade rosada (8).

Nos métodos de dissociação do tecido mesocólico/mesorreto são utilizadas soluções enzimáticas, como a solução de collagenase, tripsina ou lipase, que por digerirem parcialmente o tecido permitem uma melhor identificação dos GL (14). Contudo, a duração máxima da digestão enzimática não deve ultrapassar uma hora, para não ocorrerem efeitos adversos na coloração de HE nem nos resultados de Imunohistoquímica (IHQ) (14).

A solução de Carnoy, além de preservar a morfologia do tecido e permitir a realização de técnicas complementares, promove o clareamento do tecido mesocólico/mesorreto, através do uso de etanol absoluto e do ácido acético glacial, e confere uma tonalidade esbranquiçada aos GL através do uso do clorofórmio (13,15).

As soluções de *fat clearance* têm vindo a ser descritas como úteis para a deteção de GL de menores dimensões (7). No entanto, métodos que utilizam este tipo de soluções não são muito usuais devido à toxicidade de alguns componentes dessas soluções, como o xilol, acetona ou etanol, e por serem muito demorados (cinco a sete dias, dependendo do tipo de amostra), sendo este um procedimento reservado para os casos onde são isolados um baixo número de GL (7).

O azul de metileno é um corante vital e é injetado nas artérias das peças cirúrgicas de CCR logo após a cirurgia para evidenciar os GL com uma cor azul (16,17).

Uma comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos que usam soluções reveladoras de GL revela que o valor médio de GL isolados com recurso a soluções reveladoras foi superior ao obtido com o método convencional, resultado que tem impacto na qualidade da disseção ganglionar. Adicionalmente, é possível verificar que o número mínimo de 12 GL é atingido na maioria dos casos em que são utilizadas soluções reveladoras de GL (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos descritos na literatura que usam soluções reveladoras de gânglios linfáticos (GL): composição, procedimento técnico, tonalidade dos GL, razão entre os valores médios dos GL isolados, número médio de GL metastizados e número de peças onde foram isolados um número de GL inferior a 12.

Soluções reveladoras de GL	Composição	Procedimento		Tonalidade dos GL	Razão entre os valores médios dos GL isolados ¹	Número médio de GL metastizados		Número de peças cirúrgicas com <12 GL isolados	
		Técnica	Duração			MC	MSR	MC	MSR
GEWF (10)	10L etanol absoluto + 3,4L água destilada + 1,6L formaldeído a 40% + 1,0L ácido acético glacial	Submersão do tecido adiposo	12h a 14h	Esbranquiçados	1,5	1,3	2,3	SI	SI
RE-GEWF (8)	1280mL etanol absoluto filtrado + 160mL formaldeído a 40%+ 160mL ácido acético glacial + 0,3mL eosina-Y aquosa	Submersão do tecido adiposo	14h a 16h	Rosados	1,9	1,3	1,5	33	11
Soluções enzimáticas (14,18)	1mg/mL de collagenase + tripsina + tampão salino	Incubação com a solução (1mL por cada 3g) a 40°C	30 a 60 min	Esbranquiçados	1,1	0	0	SI	SI
	0,5mg/mL de collagenase + 5mg/mL de lipase + tampão salino	Incubação com a solução (1mL por cada 3g) a 40°C	10min						
Solução de Carnoy (13,15)	60% etanol absoluto + 30% clorofórmio + 10% ácido acético glacial	Submersão do tecido adiposo	24h a 48h	Esbranquiçados	1,5	0,8	1,1	22	6
Solução de <i>fat clearance</i> (19-20)	Acetona	Submersão do tecido adiposo	24h	Esbranquiçados	1,5	2	2	39	15
	Xilol	Submersão do tecido adiposo (num processador de tecidos)	18h						
	Etanol absoluto	Submersão do tecido adiposo	24h						
Solução de azul de Metileno (22)	5mL de azul de metileno + 15mL de solução salina a 0,9%	Injeção da solução na artéria da amostra	2 a 5min	Azulados	2,0	1,0	1.2	8	1

¹ Razão entre os valores médios de GL isolados com a solução reveladora e o método convencional.

GEWF - Glacid acetic acid, absolute Ethanol, distilled Water e Formaldehyde 40%; RE-GEWF - Recycle, Eosin, Glacid acetic acid, absolute Ethanol, distilled Water e Formaldehyde 40%; MC – método convencional; MSR – método com solução reveladora; SI – sem informação

3.2. Dissecção ganglionar seletiva de acordo com a distância dos gânglios linfáticos ao tumor

O isolamento sistemático de GL localizados em regiões do tecido mesocólico/mesorreto mesocólico/mesorreto mais distantes da região primária do tumor em peças cirúrgicas de CCR não só acarreta custos para o laboratório como também aumenta o tempo despendido nesta tarefa, existindo poucos estudos que abordem o potencial impacto destes GL mais distantes no estadiamento N (23).

Ueno *et al*, Cserni *et al* e M. Pusztaszeri *et al* tentaram, de forma similar, perceber a distribuição dos GL pela ressecção cirúrgica de CCR e quais as vantagens de uma dissecção ganglionar seletiva (23–25).

De forma a atingir os seus objetivos, todos os autores realizaram a divisão do tecido mesocólico/mesorreto em diferentes regiões tendo em conta a distância ao tumor primário. O tecido mesocólico/mesorreto foi separado segundo as regiões definidas pelos autores, e a dissecção ganglionar de cada região foi realizada individualmente, permitindo posteriormente comparar o número de GL isolados e o número de GL metastizados por região (Figura 2).

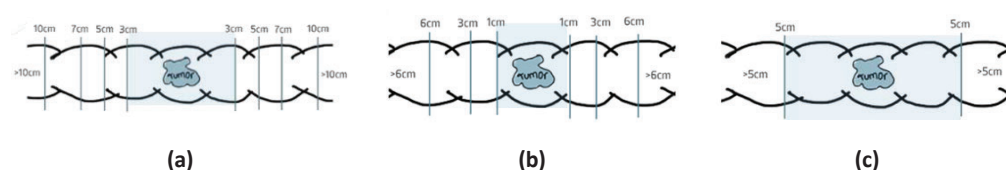


Figura 2. Esquemas representativos da divisão do tecido mesocólico durante a dissecção ganglionar, de acordo com cada metodologia. (a) Ueno *et al* (24); (b) Cserni *et al* (25); (c) M. Pusztaszeri *et al* (23). A área sombreada representa a região peritumoral.

Todos os autores verificaram que, na região peritumoral, o valor médio de GL isolados é superior ao encontrado nas regiões mais distantes (Ueno *et al*: 5,1 vs. 1,1; Cserni *et al*: 10,6 vs. 2,0; M. Pusztaszeri *et al*: 13,5 vs. 4,9), observando-se que este número diminui à medida que aumenta a distância ao tumor primário (24,25). Em relação à percentagem de GL metastizados, foi possível verificar que a maior percentagem de GL metastizados encontrada foi na região peritumoral (Cserni *et al*: 82,3% e M. Pusztaszeri *et al*: 85%), diminuindo a percentagem de GL metastizados à medida que a distância ao tumor aumenta (Cserni *et al* obtido 1,1% e M. Pusztaszeri *et al*: 15% de GL metastizados) (19,20).

4. Discussão

No CCR, o estadiamento N após a ressecção cirúrgica é crucial para o prognóstico e para a decisão terapêutica (26). Para além da cirurgia, nenhum tratamento é recomendado quando não existe evidência de GL metastizados ou de metástases à distância (26). Contudo, existem algumas condições bem definidas que podem determinar a realização de tratamento adjuvante em alguns casos, nomeadamente, o isolamento de um número de GL menor do que 12 (27).

O método convencional, que consiste na dissecção baseada na inspeção manual e palpação do tecido mesocólico/mesorreto, para identificar os GL, é trabalhosa e morosa. Apesar de ser o método comumente aceite para a dissecção ganglionar de peças cirúrgicas de CCR, nem sempre permite isolar o número mínimo de GL recomendado. As peças cirúrgicas de CCR com terapia neoadjuvante são desafiantes, pois os GL são mais pequenos e fibrosos comparativamente aos encontrados nas peças que não foram submetidas a tratamento, não sendo possível isolar um mínimo de 12 GL, mesmo após uma segunda observação do tecido mesocólico/mesorreto (8). Este tipo de evento leva a que GL de menores dimensões, onde podem existir micrometástases (0,2-2mm) ou até macrometástases (>2mm), possam não ser detetados e isolados, o que pode causar que pacientes com CCR possam ter um estadiamento incorreto (7,8,23,28).

No presente estudo, foi possível identificar dois métodos descritos na literatura que tornam a dissecção ganglionar uma tarefa mais facilitada, assegurando a sua qualidade. Estes métodos são baseados no uso de soluções reveladoras ou na dissecção ganglionar seletiva, de acordo com a distância dos GL ao tumor.

Os métodos que usam soluções reveladoras tornam os GL mais facilmente identificáveis, dado que estas soluções, usualmente, alteram a cor dos GL tornando-os distinguíveis do tecido mesocólico/mesorreto circundante (7). Foi possível constatar que o número de GL isolados, bem como o número de GL metastizados encontrados nas peças em que se usaram estes métodos, foram superiores aos encontrados nas peças onde foi usado o método de dissecção convencional.

Estas soluções parecem também aumentar a eficácia da disseção de GL de menores dimensões, uma vez que se verifica que com o recurso a qualquer uma das soluções reveladoras, a dimensão média dos GL isolados é inferior à encontrada no método convencional (18). As soluções enzimáticas mostraram ser as que apresentaram a razão mais baixa entre os valores médios de GL isolados com a solução reveladora e o método convencional quando comparado com as restantes soluções (29).

A injeção da solução de azul de metileno demonstrou ser o método com melhores resultados, uma vez que são isolados duas vezes mais GL do que com o uso do método convencional. Este é um método rápido e seguro que parece aumentar a eficácia da disseção ganglionar (16).

No entanto, a sua injeção requer conhecimento e experiência para a canulação das artérias mesentéricas, o que não é um procedimento fácil (30). Na maioria dos estudos a injeção foi realizada pelo cirurgião, imediatamente após a cirurgia. Por isso, é necessário a realização de estudos adicionais que verifiquem a utilidade desta solução se a injeção for realizada no momento do exame macroscópico, de forma a mimetizar a realidade dos laboratórios.

Não existe consenso relativamente a ser melhor usar os métodos em que se utilizam soluções reveladoras de GL comparativamente ao método convencional. Apesar de estudos mostrarem bons resultados, estas soluções têm vindo a ser associadas a algumas limitações, como o aumento do tempo despendido para a realização dos procedimentos, a eventual toxicidade das soluções utilizadas e os custos por exame, uma vez que havendo um aumento de número de GL isolados há em simultâneo um aumento do número de blocos por exame (7,31).

O facto de na maioria dos estudos efetuados com soluções reveladoras não ter sido possível identificar alterações significativas no estadiamento dos pacientes, pode ser questionado o real benefício da utilização destes métodos. Por isso, a questão não passa tanto por qual solução deverá ser utilizada, mas sim se os pacientes beneficiam da sua utilização (7). Em casos em que através do método convencional já são isolados 4 a 6 GL metastizados (estadiamento N2), o recurso às soluções reveladoras não adiciona informação adicional no que diz respeito ao prognóstico ou tratamento, o que torna questionável se o aumento de GL isolados será relevante para os pacientes (7).

Contudo, deve ser tido em consideração que apesar dos resultados obtidos e das desvantagens verificadas pelas soluções, estas podem ter um papel importante em situações mais específicas, onde o número mínimo de GL recomendado não é atingido. Em casos submetidos a terapias neoadjuvantes, ressecções cirúrgicas de segmentos curtos de cólon/reto e ressecções retais com mesorreto incompleto e ainda na eventualidade de pouca experiência na realização da disseção ganglionar, o uso de soluções reveladoras poderá ser uma mais-valia (19). Por esse motivo, é necessário efetuar mais estudos direcionados para validar os resultados obtidos nestes estudos.

Recentemente têm surgido estudos que demonstram que os GL não se distribuem da mesma forma ao longo de todo o tecido mesocólico/mesorreto adjacente ao segmento do cólon e do reto, e que a sua localização está essencialmente relacionada com a proximidade à região do tumor primário, levantando a questão da importância do isolamento dos GL mais distantes ao tumor, algo que até então muito raramente foi abordado na literatura (23).

Apesar de alguns autores sugerirem que devem ser isolados o maior número possível de GL, na opinião M. Pusztaszeri *et al* o dilema não está necessariamente relacionado com o número de GL que deve ser isolado, mas sim como detetar os GL que são mais suscetíveis de serem metastizados (23). Assim, realizar uma disseção seletiva diminuiria o tempo necessário para isolar os GL no tecido mesocólico/mesorreto, permitindo ainda efetuar um estadiamento adequado (25).

Em relação à distância dos GL à região peritumoral, Ueno *et al*, Csernni *et al* e M. Pusztaszeri *et al*, obtiveram resultados semelhantes, verificando que o valor médio do número de GL isolados nas regiões mais distantes ao tumor é significativamente inferior ao encontrado nas regiões mais próximas (23-25). Este dado está de acordo ao postulado, em que o número de GL isolados depende da distância à região peritumoral (se não existirem doenças inflamatórias associadas), sendo que a distâncias superiores a 5cm serão encontrados GL de menores dimensões, sendo menos provável a identificação de GL metastizados (23). Verificaram também que o número de GL aumenta linearmente com o estadiamento T, isto é, com o tamanho do tumor (23-25).

Cserni *et al* e M. Pusztaszeri *et al* demonstraram ainda que a acurácia do estadiamento depende principalmente dos GL isolados no tecido mesocólico mais próximo do tumor primário (23,25). Tendo em conta estes resultados e sendo que a tarefa de disseção ganglionar depende

muito tempo e acarreta custos para os laboratórios de Anatomia Patológica, o isolamento de GL mais distantes pode não adicionar uma contribuição significativa para o estadiamento.

5. Conclusões

Com o presente estudo de revisão não foi possível obter um consenso sobre o número ótimo de GL isolados devendo-se manter as recomendações de isolar um número mínimo de 12 GL. No que diz respeito ao uso de soluções reveladoras de GL, apesar do seu uso levar a um maior número de GL isolados, são necessários mais estudos multicêntricos para demonstrar o impacto deste aumento no estadiamento, assim como o impacto destas soluções nas técnicas complementares de diagnóstico, como nas técnicas de imunohistoquímica e de biologia molecular. No global, o uso destas soluções reveladoras de GL aumenta o tempo de resposta do exame anatomopatológico, pelo que será benéfico definir critérios para a sua utilização em situações específicas.

Em relação à distância dos GL ao tumor primário, sugere-se iniciar a disseção ganglionar pelo tecido mesocólico localizado a 5cm distais/proximais da região do tumor primário como uma forma de rentabilizar o tempo despendido nesta tarefa, contudo, são necessários mais estudos para comprovar que esta disseção seletiva não terá implicações no estadiamento.

Com este estudo, propõe-se ainda que sejam utilizados os dois métodos descritos de forma complementar. Tendo em conta a categorização em estadios de CCR, sugere-se inicialmente a realização de uma disseção ganglionar seletiva nos 5cm proximais e distais à região do tumor. Em casos em que não sejam encontrados 12 GL, então recorre-se à extensão da área de disseção e ao uso das soluções reveladoras. Este procedimento permitirá realizar o exame macroscópico com maior celeridade, promovendo ainda a eficiência da disseção ganglionar e consequente estadiamento adequado.

Os autores leram e concordaram com a versão publicada do trabalho.

Financiamento: O estudo não recebeu financiamento externo.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

6. Referências

1. World Health Organization. Cancer today [Internet]. Globocan. 2020 [cited 2023 Apr 1]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=620&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&
2. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Elsevier; 2018. 630–634 p.
3. Klepšte E, Evaldas Samalavičius N. Injection of methylene blue solution into the inferior mesenteric artery of resected rectal specimens for rectal cancer as a method for increasing the lymph node harvest. *Tech Coloproctol*. 2012;16(3):207–11.
4. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. Organization of the AJCC Cancer Staging Manual. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer; 2018. p. 31–6.
5. Švec A, Horák L, Novotný J, Lysy P. Re-fixation in a lymph node revealing solution is a powerful method for identifying lymph nodes in colorectal resection specimens. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32(4):426–9.
6. Jessup JM, Goldberg RM, Brierley JD, Compton CC, Goodman KA, Schumacher-Penberthy LT. Colon and Rectum. In: *Cancer AJC on*, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. 2016. p. 252–71.
7. Yeh CC, Pan CF, Liu HW, Lin JC, Fang LH, Lee HS, et al. Using the Fat-Clearing Technique to Improve Lymph Node Retrieval in Colorectal Cancer. *Int J Surg Pathol*. 2021;29(4):385–91.
8. Ma XL, Ye JX, Su J, Qi FF, Meng QY, Shi XY. A modified GEWF solution is cost-saving and effective for lymph node retrieval in resected colorectal carcinoma specimens. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2014;210(9):543–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.05.004>
9. McDonald JR. Lymph node harvest in colon and rectal cancer: Current considerations. *World J Gastrointest Surg*. 2012;4(1):9.

10. Newell KJ, Sawka BW, Rudrick BF, Driman DK. GEWF Solution: An Inexpensive, Simple, and Effective Aid for the Retrieval of Lymph Nodes From Colorectal Cancer Resections. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(May).
11. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. 2022.
12. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst Rev*. 2021;10(1):1–11.
13. Flynn SM, Burchette RJ, Ghassemi M, Ratner O, Mandel D, Tomassi MJ, et al. Carnoy's solution fixation with compression significantly increases the number of lymph nodes yielded from colorectal cancer specimens. *J Surg Oncol*. 2019;119(6):766–70.
14. Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Ito A, Yasui M, Ogino T, et al. A new fat-dissociation method to detect lymph nodes in colorectal cancer: a prospective randomized study. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8.
15. Dias AR, Pereira MA, De Mello ES, Nahas SC, Cecconello I, Ribeiro U. Lymph node yield after neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer specimens: A randomized trial comparing two fixatives. *Dis Colon Rectum*. 2018;61(8):888–96.
16. Albatanony A, Alseesi A, Ammar M, Shaaban M. Improving lymph node harvest in colorectal cancer by intra-arterial injection of methylene blue: a randomized trial. *Egypt J Surg*. 2015;34(2):99.
17. ID N, MJ A, AK ORL. Tumours of colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. *Digestive System Tumours*. 5th ed. 2019. p. 157–77.
18. Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Noura S, Tomita Y, Yano M, et al. New enhanced and effective method for staging cancer to detect lymph nodes after fat-dissociation. *Oncol Rep*. 2014;32(3):922–6.
19. Leung CAW, Fazzi GE, Melenhorst J, Rennspies D, Grabsch HI. Acetone clearance of mesocolic or mesorectal fat increases lymph node yield and may improve detection of high-risk Stage II colorectal cancer patients. *Color Dis*. 2018;20(11):1014–9.
20. Prabhudesai AG, Dalton P, Kumar D, Finlayson CJ. Mechanised one-day fat clearance method to increase the lymph node yield in rectal cancer specimens. *Br J Biomed Sci*. 2005;62(3):120–3.
21. Wang H, Safar B, Wexner SD, Denoya P, Berho M. The clinical significance of fat clearance lymph node harvest for invasive rectal adenocarcinoma following neoadjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2009;52(10):1767–73.
22. Märkl B, Kerwel TG, Wagner T, Anthuber M, Arnholdt HM. Methylene blue injection into the rectal artery as a simple method to improve lymph node harvest in rectal cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2007;20(7):797–801. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800824>
23. Pusztaszeri M, Matter M, Kuonen A, Bouzourene H. Nodal staging in colorectal cancer: should distant lymph nodes be recovered in surgical specimens? *Hum Pathol* [Internet]. 2009;40(4):552–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2008.08.016>
24. Ueno H, Hase K, Shiomi A, Shiozawa M, Ito M, Sato T, et al. Optimal bowel resection margin in colon cancer surgery: prospective multicentre cohort study with lymph node and feeding artery mapping. *Lancet Reg Heal - West Pacific* [Internet]. 2023;100680. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2022.100680>
25. Cserni G, Tarján M, Bori R. Distance of lymph nodes from the tumor: An important feature in colorectal cancer specimens. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(2):246–9.
26. Zhang CH, Li YY, Zhang QW, Biondi A, Fico V, Persiani R, et al. The prognostic impact of the metastatic lymph nodes ratio in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2018;8(DEC).
27. Schrembs P, Martin B, Anthuber M, Schenkirsch G, Märkl B. The prognostic significance of lymph node size in node-positive colon cancer. *PLoS One*. 2018;13(8):1–13.
28. Ghezzi TL, Pereira MP, Corleta OC, Kalil AN. Carnoy solution versus GEWF solution for lymph node revealing in colorectal cancer: a randomized controlled trial. *Int J Colorectal Dis*. 2019;34(12):2189–93.
29. Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Ito A, Yasui M, Ogino T, et al. A new fat-dissociation method to detect lymph nodes in colorectal cancer: a prospective randomized study. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77195-8>
30. Reima H, Saar H, Innos K, Soplepmann J. Methylene blue intra-arterial staining of resected colorectal cancer specimens improves accuracy of nodal staging: A randomized controlled trial. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2016;42(11):1642–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2016.06.001>

31. Gregurek SF, Wu HHJ. Can GEWF solution improve the retrieval of lymph nodes from colorectal cancer resections? *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(1):83–6.

