



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIEL LIMA LOPES

ESTUDO DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIANTES GENÔMICAS E
MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ

LONDRINA

2023

GABRIEL LIMA LOPES

ESTUDO DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIANTES GENÔMICAS E
MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia
Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Estadual de Londrina,
para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Panis

LONDRINA

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L864p Lopes, Gabriel Lima.
Estudo de correlação entre variantes genômicas e marcadores anátomo-clínicos de biópsias de pacientes portadores de câncer de pulmão no Estado do Paraná / Gabriel Lima Lopes. - Londrina, 2023.
150 f. : il.

Orientador: Carolina Panis.
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas - Tese. 2. Genômica - Tese. 3. Mutações - Tese. 4. Inibidores de Checkpoint Imunológico - Tese. I. Panis, Carolina . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 61

GABRIEL LIMA LOPES

**ESTUDO DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIANTES GENÔMICAS E
MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Gilberto de Castro Junior
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

Londrina, 29 de setembro de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico essa Dissertação à minha família, que sempre me transmitiu os valores cristãos e me proporcionou uma vida de íntimo convívio e amor abundantes; vocês sempre souberam dizer as palavras de incentivo e compreensão, imprescindíveis para conseguirmos atingir quaisquer objetivos que tenhamos em nossas carreiras, mas também de direcionamento e foco. Porém, vocês foram muito além por mim, e para mim. Quero manifestar publicamente o que uma família com raízes sólidas perante a Deus é capaz de transformar, quero registrar aqui que quando o amor é verdadeiro e recíproco não há barreiras capazes de impedir que juntos possamos traçar os nossos objetivos. Portanto, dedicar essa conquista a vocês por terem estado ao meu lado e terem me dado de volta a vida e a lucidez quando nem eu mesmo acreditava mais que seria possível prosseguir, é nada menos do que um enorme prazer para mim hoje. Luiz Carlos, Heloisa, Izabella, Stephanie e Sophia: eu não tenho palavras que meramente conseguirão transcrever o carinho diário que recebo de cada um de vocês, não há frases que possam minimamente representar o sentimento da minha eterna gratidão por tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim, simplesmente por amor. O meu coração é de vocês, para sempre.

Dedico este título a você meu pai, por ter me ensinado tudo sobre o valor da família, o foco nos estudos e no trabalho com honestidade e a hombridade de uma vida correta segundo os caminhos do Senhor. Você é o espelho da minha vida, seu exemplo de pai, filho, irmão e de profissionalismo tornaram minhas escolhas sempre mais fáceis, e é por isso que você será para sempre o meu herói. Espero conseguir ser o homem para minha família como você foi para todos nós, que eu possa todo dia continuar olhando para trás e ter a convicção de que eu fiz ou agi conforme os seus ensinamentos.

Dedico este título a você minha mãe, por ter sido os meus pés quando eu não conseguia mais caminhar, os meus olhos quando eu não conseguia mais enxergar e até mesmo a minha mente quando eu já nem conseguia mais pensar. Sem o seu infinito amor incondicional, sua paciência e sua mansidão eu certamente nem estaria mais aqui; suas doces palavras, o seu toque único que tira qualquer dor, seus sábios conselhos e nossas gargalhadas da vida me ajudaram a ter êxito em simplesmente todos os momentos da minha

vida. Tenho uma alegria imensa em compartilhar a vida contigo e dou graças a Deus por ter tido a bênção de ser seu filho.

Dedico este título a você Iza, minha irmãzinha, minha melhor amiga, meu porto seguro, meu amorzinho à primeira vista! A certeza de que você está sempre aqui comigo há 33 anos é um bálsamo, é realmente um presente ... como é possível explicar um sentimento que não cabe no peito?! A sua companhia é transformadora sobre a vida de cada um que você toca, Deus te concedeu o dom da bondade que você exerce de uma forma única mesmo. Poder compartilhar cada pedacinho da minha vida contigo é uma felicidade imensurável: a sua vida é o que traz paz à minha.

Dedico este título às minhas meninas, Stephanie e Sophia. Obrigado meus amores pela compreensão por tantos momentos em que precisei me ausentar, e acima de tudo obrigado por me fazerem sentir de volta aquela minha fé inabalável e a minha alegria de viver. Obrigado por acreditarem em mim e não me deixarem nunca perder o foco sobre o valor da nossa família, determinante para que eu conseguisse vencer tantos obstáculos que vivemos juntos recentemente, e ter tido a capacidade de lutar mais uma vez.

Dedico este título a você Stephanie, meu amor, pois suas palavras me guiaram durante esses difíceis anos que passamos e conduziram a nossa vida à conquista dessa jornada juntos. Aprofundar-me como médico, professor, administrador e pesquisador transformou-se na sua luta também, e sem o seu companheirismo nada disso teria sido possível. A conclusão de mais essa etapa da nossa vida pessoal e profissional é sua também!

Dedico este título a você minha filha Sophia, o seu sorriso foi definitivamente o combustível dos meus dias, a sua pureza e a sua felicidade são verdadeiramente as minhas razões de estar vivo! A experiência de ser o seu pai enriqueceu a minha alma e me trouxe tudo o que estava faltando para ser capaz de seguir em frente e me transformar num ser humano melhor. Papai te ama muito, e muito além dessa vida!!

Dedico este título a vocês também Salomon e Rose, agradeço por essa amizade verdadeira que fomos cultivando desde o nosso primeiro encontro e, claro, por terem estado ao meu lado em momentos tão duros como fiéis amigos. Suas histórias, conhecimentos, bom humor e seus valorosos conselhos a este novo filho transformaram a minha vida nesses anos de convívio, e também me ajudaram a atingir essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois após inúmeras tribulações que passei me permitiu ter força e perseverança para continuar no Seu caminho de retidão. Agradeço a Ti por ter me mostrado que mesmo quando a vida e a lógica fecham várias portas em nossa jornada, o Seu amor e misericórdia são infinitamente maiores que as nossas preocupações e o Seu cuidado é sempre perfeito. Agradeço a Ti por ter me conduzido a novas possibilidades e a tantas oportunidades durante a minha trajetória, Tu proveste todo o suporte com tamanha generosidade e tornaste possível a construção desse sonho. Buscar a Ti dia a dia me tornou um médico e um pai melhores, buscar a Ti me trouxe de volta o sentimento da gratificante esperança pelo o que ainda está por vir pelos meus pacientes.

À Prof. Dra. Carolina Panis, cuja sabedoria e dedicação foram fundamentais para a idealização e a conclusão desse projeto. Minha profunda gratidão, admiração e carinho por ter me acompanhado e guiado durante toda essa trajetória com tamanha leveza, tranquilidade, clareza e inteligência em sua mentoria. Sem você com toda a sua calma e empolgação simultâneas, suas brilhantes idéias e orientações para trabalharmos mais os dados e melhorarmos mais um pouco as correlações científicas com a literatura de um assunto tão vasto e complexo, certamente não teríamos chegado tão longe juntos. A concretização dessa Dissertação e a publicação desse artigo não teriam sido executados em sua plenitude sem você à frente do projeto.

À Prof. Dra. Márcia Regina Eches Perugini, que em meio a tantas interações, cirurgias, afastamentos e dificuldades pessoais teve a sensibilidade não só de ser uma coordenadora de pós-graduação, mas também de ser uma amiga. Te agradeço por ter verdadeiramente me estendido as mãos, oportunizando a finalização deste estudo e o crescimento almejados neste projeto junto à UEL.

Aos demais professores do Mestrado da UEL, que com suas aulas e ensinamentos contribuíram muito para o meu aprendizado. Foi uma experiência incrível, sinto-me honrado em ter conhecido profissionais tão competentes e dedicados à docência médica.

Aos colegas Oncologistas da clínica ProOnco – OncoClínicas Londrina, Dr Mário Liberatti, Dr Filipe Dias Cunha Casão e Dr Renato Marinho Furoni, às colegas

Oncologistas Dra Elise Nara Sanfelice e Dra Karina Costa Maia Vianna da Clínica CIONC de Curitiba, e ao Dr Adriel Barbi Braz, médico residente em Oncologia Clínica do Hospital das Clínicas da UFPR, que dispuseram de seu tempo para o acesso das informações de seus pacientes, cruciais para a efetivação desse estudo. Agradeço imensamente pelo companheirismo e a paciência dispensados a mim durante toda a etapa de coleta de dados, é nítido para mim hoje que vocês têm uma clara seriedade e preocupação em priorizar a melhor assistência e a promoção científica dentro da nossa difícil missão como médicos, a Oncologia Clínica. Apenas com a colaboração de vocês foi possível atingir a robustez e a relevância à sociedade esperados com esse projeto de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Castro Jr, meu amigo e mentor que desde os primeiros anos de Residência médica em Oncologia Clínica no Hospital Sírio-Libanês e no ICESP me mostrou a beleza sobre cuidar de pessoas com câncer, me ensinou sobre a importância de elegantemente aplicarmos as rotinas acadêmicas em nossas práticas do cotidiano, e sobre o amor em estudar e praticar a Medicina personalizada na Oncologia Torácica. Sua brilhante carreira e currículo irretocáveis me inspiraram muito, você é o exemplo de médico que levarei comigo para sempre; os seus ensinamentos detalhistas e o seu cuidado impecável com os pacientes marcaram de forma definitiva a minha vida.

Aos pacientes e seus familiares, que tornaram esse trabalho uma realidade. Em suas lutas diárias contra o câncer de pulmão, vocês encontraram um espaço para compartilhar conosco a sua história na forma de valiosas informações clínicas. Meu sentimento de gratidão a vocês estará completo ao saber que dessa forma consegui colaborar com a construção de novos conhecimentos na Oncologia, traduzido no dia a dia com o afeto e a esperança que a Ciência nos traz e que, como médicos, precisamos transmitir ativamente às pessoas que estão atravessando essa doença.

RESUMO

LOPES, Gabriel Lima. **Estudo de correlação entre variantes genômicas e marcadores anátomo-clínicos de biópsias de pacientes portadores de câncer de pulmão no Estado do Paraná.** 2023. 150 folhas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2023.

Introdução: O câncer de pulmão não-pequenas células (*NSCLC*) é a principal causa de morte oncológica no mundo. Novos mecanismos de carcinogênese e progressão tumoral vêm sendo estudados e, portanto, novas vias de transdução de sinal, metastatização e de escape imune surgem como futuros horizontes clínicos no *NSCLC* não-escamoso. O tratamento de 1ª linha se limitava à quimioterapia com platina, atingindo-se medianas de sobrevida de 9 meses, porém após a incorporação das terapias-alvo e da imunoterapia foi possível ultrapassar-se a fronteira dos 30 meses. O banco genômico em *NSCLC* cresce de forma exponencial, e é de grande interesse que subpopulações sejam reconhecidas nacional e regionalmente. **Objetivos:** O objetivo desse estudo é caracterizar o perfil genômico e clínico-patológico de pacientes com *NSCLC* das cidades de Londrina e Curitiba e compará-lo ao do *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, além de: traçar o perfil clínico-patológico da amostra; realizar estudo de bioinformática dos processos celulares e interações com as mutações; determinar o perfil genômico e compará-lo ao *TCGA*, e investigar sua correlação com as variantes genômicas regionais; identificar uma assinatura mutacional regional. **Metodologia:** Este é um estudo longitudinal retrospectivo observacional com 133 pacientes. Para a análise funcional das informações anátomo-clínicas e genômicas foi realizado um estudo *in silico* (software *Funrich* 3.1). Para a obtenção do perfil mutacional genômico mundial utilizou-se os dados do *TCGA* e para a comparação do perfil dos genes utilizou-se o *Two-way ANOVA*. A caracterização da amostra foi feita pelo teste Qui-Quadrado e, para a correlação dos genes nos estádios iniciais da doença, utilizou-se o teste de Correlação de Pearson e a análise de correspondência. Assumiu-se um nível de significância estatístico de 5%. **Resultados:** A maioria dos pacientes tem entre 60 e 79 anos, são mulheres, tabagistas leves e não-obesos. A carga mutacional entre as populações não é diferente, entretanto o perfil de expressão gênica é distinto. Observou-se aumento na frequência de *EGFR*, *MYC*, *RAD21*, *PDL-1*, *MTAP*, *DNMT3A*, *CDK4*, *MDM2*, *NFKBIA*, *AURKA* e *CCND1* (pelo menos 2 vezes), com destaque para *TP53*, *EGFR* e *PDL-1*. Esses genes têm funções de comunicação celular e transdução de sinais (proliferação celular), com foco nas vias do *IFN-γ*, *MET*, *PDGFRα*, *IGF-1*, *ErbB* e *EWSR1*. Houve interconexões entre os genes *ERBB4*, *SMAD4*, *STK11*, *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *BRCA1*, *BRCA2* e *MYC* no Interactoma, com o *TP53* evidenciado como elemento central, porém sem associação com a variante patogênica *R337H*. Houve grande número de amostras com *status* microssatélite e *TMB* indeterminados. Constatou-se 14% hiper-expressores, 33% hipó-expressores e 52% não-expressores de *PDL-1*, o que foi estatisticamente distinto quando comparado à literatura mundial e semelhante à maior evidência nacional. **Conclusões:** O perfil e a frequência da expressão gênica e as interconexões moleculares da amostra é diferente do observado em outros estudos populacionais. Identificou-se uma possível assinatura genômica regional, com enriquecimento de mutações em *EGFR* e *TP53*, menor prevalência das alterações em *KRAS-NRAS*, *STK11-KEAP1* e *MTAP-CDKN2A/B* e maior imunoexpressão de *PDL-1*. Comprovamos, assim, a importância da individualização

diagnóstica e da personalização terapêutica em *NSCLC*, considerável agora também no âmbito de estudos clínicos regionais.

Palavras-chave: Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas. Terapia Alvo-Molecular. Imunoterapia. Genômica. Mutações. Inibidores de Checkpoint Imunológico. Receptor de Morte Celular Programada 1.

ABSTRACT

LOPES, Gabriel Lima. **Correlation study between genomic variants and clinical-pathologic markers from patient biopsies with lung cancer at Parana State.** 2023. 150 pages. Dissertation (Master's degree). Post-Graduate Program in Clinical and Laboratory Pathophysiology. Health Sciences Center. State University of Londrina. Londrina. 2023.

Introduction: Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of death by cancer worldwide. New carcinogenesis mechanisms and tumor progression have been studied and, therefore, new signal transduction pathways, metastasis and immune escape emerge as future clinical horizons in non-squamous NSCLC. First-line treatment was limited to platinum-based chemotherapy, reaching median overall survival rates of 9 months, however after the incorporation of targeted-therapies and the immunotherapy, it has been possible to exceed the 30-month boundary. NSCLC genomic database grows exponentially and it is of great interest that subpopulations can be nationally and regionally recognized. **Goals:** The aim of this study is to characterize the genomic and clinical-pathologic profile of NSCLC patients from the cities of Londrina and Curitiba, and to compare it to The Cancer Genome Atlas (TCGA), in addition to: draw the clinical-pathologic profile of the sample; perform bioinformatics studies of cellular processes and interactions with the mutations; determine the genomic profile and compare it to TCGA, and investigate its correlation with the regional genomic variants; identify a regional mutational signature. **Methods:** This is a longitudinal retrospective observational study with 133 patients. For the functional analysis of the clinical-pathological and genomic informations, an *in silico* study was performed (*Funrich* 3.1 software). To obtain the world genomic mutational profile data from TCGA were used, and to compare the genes profile *Two-way ANOVA* was used. The sample characterization was performed using Chi-Square test and for the genes correlation in the initial stages of the disease, Pearson's correlation test and correspondence analysis were used. A statistical significance level of 5% was assumed. **Results:** Most patients are between 60 and 79 years-old, are female, light smokers and non-obese. The mutational burden between the populations is not different, however the gene expression profile is different. An increase in the frequency of *EGFR*, *MYC*, *RAD21*, *PDL-1*, *MTAP*, *DNMT3A*, *CDK4*, *MDM2*, *NFKBIA*, *AURKA* and *CCND1* genes (at least 2-fold) was observed, with emphasis on *TP53*, *EGFR* and *PDL-1*. These genes have functions of cellular communication and signal transduction (cell proliferation), focusing on the *IFN-γ*, *MET*, *PDGFRα*, *IGF-1*, *ErbB* and *EWSR1* pathways. There were interconnections between *ERBB4*, *SMAD4*, *STK11*, *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *BRCA1*, *BRCA2* and *MYC* genes in the Interactome, with *TP53* evident as a central element, but without association with the classical pathogenic variant *R337H*. There were a large number of samples with undetermined microsatellite status and TMB. 14% of patients were found to be hyper-expressors, 33% hypo-expressors and 52% non-expressors for *PDL-1*, which was statistically different when compared to the world literature, but similar to the largest national available evidence. **Conclusions:** The profile and the frequency of gene expression and the molecular interconnections of the sample is different from that observed in other populational trials. A possible regional genomic signature was identified, with the enrichment of *EGFR* and *TP53* mutations, a lower prevalence of *KRAS-NRAS*, *STK11-KEAP1* and *MTAP-CDKN2A/B* alterations and higher *PDL-1* immunoexpression. Thus, we've proved the importance of diagnostic individualization and therapeutic personalization in NSCLC, also considerable now in regional clinical trials context.

Keywords: Carcinoma, Non-Small-Cell Lung. Molecular Targeted Therapy. Immunotherapy. Genomics. Mutations. Immune Checkpoint Inhibitors. Programmed Cell Death 1 Receptor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição dos casos (incidência) dos 10 tipos de cânceres mais comuns no mundo em 2020, em ambos os sexos 31
- Figura 2** – Distribuição dos óbitos (mortalidade) dos 10 tipos de cânceres mais comuns no mundo em 2020, em ambos os sexos 32
- Figura 3** – Taxas padronizadas por idade de incidência específica por região do mundo para câncer de pulmão entre homens e mulheres em 2020, em ordem decrescente da taxa padronizada por idade de incidência por 100.000 habitantes 33
- Figura 4** – Taxas de incidência e mortalidade padronizadas dos 15 cânceres mais comuns do mundo no sexo masculino, em ordem decrescente da taxa geral padronizada por idade, em países com índice de desenvolvimento humano (*HDI*) alto/muito alto vs países com *HDI* baixo/médio em 2020.....34
- Figura 5** – Taxas de incidência e mortalidade padronizadas dos 15 cânceres mais comuns do mundo no sexo feminino, em ordem decrescente da taxa geral padronizada por idade, em países com índice de desenvolvimento humano (*HDI*) alto/muito alto vs países com *HDI* baixo/médio em 2020..... 35
- Figura 6** – Tendências em taxas de incidência para cânceres selecionados por sexo nos EUA entre 1975 e 2011 36
- Figura 7** – Tendências em taxas de mortalidade por câncer, por topografias, selecionado pelo sexo nos EUA entre 1930 e 2011 37
- Figura 8** – Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer no Brasil, segundo sexo e localização primária (números arredondados para múltiplos de 10) 38
- Figura 9** – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2023 por sexo, exceto pele não-melanoma (números arredondados para múltiplos de 10) 39

Figura 10 – Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de pulmão por 100.000 habitantes homens, estimada para o ano de 2023 no Brasil, segundo unidades da federação	41
Figura 11 – Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de pulmão por 100.000 habitantes mulheres, estimada para o ano de 2023 no Brasil, segundo unidades da federação	42
Figura 12 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 na região sul do Brasil por sexo, exceto pele não-melanoma (números arredondados para múltiplos de 10)	44
Figura 13 – Taxas brutas de incidência estimadas para 2023 no Estado do Paraná, segundo sexo e localização primária (números arredondados para múltiplos de 10)	46
Figura 14 – Mecanismos de escape imune em <i>NSCLC</i>	51
Figura 15 – Gráfico de distribuição dos pacientes segundo o estadiamento <i>TNM</i> do câncer de pulmão ao diagnóstico, na população geral da amostra Londrina-Curitiba/PR	63
Figura 16 – Gráfico de distribuição dos pacientes segundo o estadiamento <i>TNM</i> do câncer de pulmão ao diagnóstico da amostra Londrina-Curitiba/PR, excluindo-se os pacientes com resultados indeterminados e inconclusivos.....	64
Figura 17 – Gráfico de distribuição da modalidade de terapia sistêmica segundo a intenção de tratamento, na amostra Londrina-Curitiba/PR	64
Figura 18 – Gráfico com a distribuição das principais variantes genômicas de interesse clínico encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR	67
Figura 19 – Gráfico simétrico das variáveis em 2 eixos - Análise de correspondência com os principais genes mutados	73
Figura 20 – Gráfico de distribuição da variável <i>Tumor Mutational Burden</i> na população de interesse do estudo	76
Figura 21 – Gráfico de distribuição da variável expressão imuno-histoquímica de <i>PDL-1</i> por <i>TPS</i> na população de interesse do estudo	78

Figura 22 – Análise comparativa do perfil de expressão dos genes sequenciados na amostra de pacientes do estudo e do perfil da população mundial disponível no <i>TCGA</i>	83
Figura 23 – Localização celular dos elementos transcritos pelos genes sequenciados na amostra de pacientes	85
Figura 24 – Processos biológicos com base nos genes sequenciados na amostra de pacientes	86
Figura 25 – Vias de sinalização mediadas pelos genes sequenciados na amostra de pacientes	87
Figura 26 – Interactoma dos genes sequenciados na amostra de pacientes	89
Figura 27 – Perfil de correlações significantes ($p < 0,05$) entre os genes sequenciados na amostra de pacientes	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Casos novos e óbitos por câncer no mundo em 2020, dentre os 12 tumores mais incidentes	30
Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2023 do número de casos novos de câncer no Brasil, por unidade da federação (números arredondados para múltiplos de 10)	40
Tabela 3 – Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas (população-padrão mundial) de incidência por 100.000 habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária, na região sul do Brasil (números arredondados para múltiplos de 10)	43
Tabela 4 – Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas (população-padrão mundial) de incidência por 100.000 habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária, no Estado do Paraná (números arredondados para múltiplos de 10)	45
Tabela 5 – Comparação dos desfechos oncológicos entre quimioterapia convencional baseada em <i>doublets</i> de platina e inibidores de tirosina-quinase, nos cenários de tratamento de 1ª e 2ª linha em <i>mNSCLC</i> não-escamoso com mutações condutoras conhecidas	49
Tabela 6 – Comparação dos desfechos oncológicos entre quimioterapia convencional baseada em <i>doublets</i> de platina e imunoterapia anti-PD1, no cenário de tratamento de 1ª linha de <i>mNSCLC</i> não-escamoso sem mutações condutoras conhecidas	53
Tabela 7 – Características dos pacientes da amostra Londrina-Curitiba/PR, com as frequências absolutas e frequências relativas das variáveis qualitativas dos indivíduos, excluindo-se os pacientes com resultados indeterminados e inconclusivos	62
Tabela 8 – Frequências absolutas e frequências relativas em relação às variantes genômicas encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR	66
Tabela 9 – Frequências relativas das principais variantes genômicas encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura mundial	69

Tabela 10 – Frequências relativas das principais variantes genômicas encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura nacional	70
Tabela 11 – Frequências absolutas e frequências relativas nos estádios clínicos da doença ao diagnóstico em relação às variáveis genômicas identificadas.....	71
Tabela 12 – Frequências absolutas e frequências relativas das variáveis qualitativas referentes ao câncer quanto aos achados anátomo-patológicos, moleculares e ao perfil de expressão gênica, excluindo-se os pacientes com resultados indeterminados e inconclusivos	75
Tabela 13 – Correlação entre as variáveis <i>TMB</i> , tabagismo e presença de mutações condutoras em <i>NSCLC</i> na amostra Londrina-Curitiba/PR	77
Tabela 14 – Frequências relativas da expressão IHQ de <i>PDL-1</i> por <i>TPS</i> encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura mundial na população com adenocarcinoma	79
Tabela 15 – Frequências relativas da expressão IHQ de <i>PDL-1</i> por <i>TPS</i> encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura nacional na população com adenocarcinoma	79
Tabela 16 – Frequência comparativa dos genes sequenciados na amostra de pacientes e nas amostras do <i>TCGA</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<i>GLOBOCAN</i>	Estatísticas globais do câncer (inglês: <i>Global Cancer Statistics</i>)
<i>HDI</i>	Índice de Desenvolvimento Humano (inglês: <i>Human Development Index</i>)
<i>SEER</i>	Vigilância, epidemiologia e resultados finais (inglês: <i>Surveillance, Epidemiology and End-Results</i>)
<i>EUA</i>	Estados Unidos da América
<i>INCA</i>	Instituto Nacional Câncer
<i>PR</i>	Paraná
<i>SCLC</i>	Câncer de pulmão de pequenas células (inglês: <i>Small Cell Lung Cancer</i>)
<i>NSCLC</i>	Câncer de pulmão não-pequenas células (inglês: <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
<i>mNSCLC</i>	Câncer de pulmão não-pequenas células metastático (inglês: <i>metastatic Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
<i>OS</i>	Sobrevida global (inglês: <i>Overall Survival</i>)
<i>PFS</i>	Sobrevida livre de progressão (inglês: <i>Progression Free Survival</i>)
<i>QoL</i>	Qualidade de vida (inglês: <i>Quality of Life</i>)
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucléico (inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
<i>PCR</i>	Reação em cadeia pela polimerase (inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>RFLP</i>	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
<i>NGS</i>	Sequenciamento de nova geração (inglês: <i>Next Generation Sequencing</i>)
<i>TKI</i>	Inibidores de tirosina-quinase (inglês: <i>Tyrosine Kinase Inhibitors</i>)
<i>ORR</i>	Taxa de resposta objetiva (inglês: <i>Objective Response Rate</i>)
<i>DOR</i>	Duração de resposta (inglês: <i>Duration Of Response</i>)
<i>HR</i>	Taxa de risco (inglês: <i>Hazard Ratio</i>)
<i>NR</i>	Não atingida (inglês: <i>Not Reached</i>)
<i>NA</i>	Indisponível (inglês: <i>Not Available</i>)

<i>HLA</i>	Antígeno humano leucocitário (inglês: <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
<i>TILs</i>	linfócitos infiltrantes tumorais (inglês: <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>)
<i>CTLA-4</i>	Proteína-4 associada ao linfócito T citotóxico (inglês: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4</i>)
<i>PD1</i>	Proteína de morte celular programada 1 (inglês: <i>Programmed Death protein 1</i>)
<i>PDL-1</i>	Ligante da proteína de morte celular programada 1 (inglês: <i>Programmed Death protein Ligand-1</i>)
<i>IFN-γ</i>	Interferon-gama (inglês: <i>interferon-gama</i>)
<i>ALK</i>	Gene da quinase do linfoma anaplásico (inglês: <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>)
<i>EGFR</i>	Gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (inglês: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
Treg	<i>Linfócito T regulatório</i> (inglês: <i>regulatory T cell</i>)
<i>ITT</i>	<i>População de intenção de tratamento</i> (inglês: <i>intention-to-treat population</i>)
<i>TCGA</i>	O atlas do genoma do câncer (inglês: <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
CIONC	Centro Integrado de Oncologia de Curitiba
UFPR	Universidade Federal do Paraná
AP	anátomo-patológico(s)
IHQ	imunohistoquímica(o)
<i>RET</i>	Gene da reorganização durante a transfecção (inglês: <i>Rearranged during Transfection</i>)
<i>KEAP1</i>	Gene da proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (inglês: <i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i>)
<i>MYC</i>	Proto-oncogene da mielocitomatose (inglês: <i>Myelocytomatosis</i>)
<i>MYCL1</i>	Proto-oncogene da mielocitomatose pulmonar 1 (inglês: <i>Myelocytomatosis-Lung 1</i>)
<i>BCL2L1</i>	Gene da proteína 1 semelhante ao linfoma de células B-2 (inglês: <i>B-cell lymphoma 2-like protein 1</i>)

<i>CDKN1B</i>	Gene do Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (inglês: <i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1B</i>)
<i>CDKN2A</i>	Gene do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (inglês: <i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A</i>)
<i>RAD21</i>	Gene do papel da radiação 21 (inglês: <i>Role of Radiation 21</i>)
<i>TP53</i>	Gene da proteína tumoral 53 (inglês: <i>Tumor Protein 53</i>)
<i>ROS1</i>	Proto-oncogene do receptor de tirosina quinase 1 (inglês: <i>proto-oncogene receptor tyrosine kinase-1</i>)
<i>CHEK2</i>	Gene da quinase de checkpoint 2 (inglês: <i>Checkpoint Kinase 2</i>)
<i>GNAS</i>	Gene do alfa-polipeptídeo de estimulação da atividade da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (inglês: <i>Guanine Nucleotide binding protein Alpha Stimulating activity polypeptide</i>)
<i>KRAS</i>	Homólogo oncogênico do vírus <i>Kirsten</i> do sarcoma de rato (inglês: <i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homologue</i>)
<i>NRAS</i>	Homólogo oncogênico do vírus do Neuroblastoma do sarcoma de rato (inglês: <i>Neuroblastoma Rat Sarcoma viral oncogene homologue</i>)
<i>EWSR1</i>	Gene da proteína-1 de ligação ao RNA do Sarcoma de Ewing (inglês: <i>Ewing Sarcoma RNA Binding Protein 1</i>)
<i>STK11</i>	Gene da quinase serina/treonina 11 (inglês: <i>Serine/Threonine Kinase 11</i>)
<i>BCORL1</i>	Gene da proteína-1 semelhante ao co-repressor BCL-6 (inglês: <i>BCL-6 Co-Repressor-Like Protein 1</i>)
<i>CTNNB1</i>	Gene da proteína beta-1 associada à catenina-caderina (inglês: <i>Catenin - Cadherin-associated protein Beta 1</i>)
<i>PTEN</i>	Gene da fosfatase e tensina (inglês: <i>Phosphatase and Tensin</i>)
<i>MTAP</i>	Gene da metiltioadenosina fosforilase (inglês: <i>Methylthioadenosine phosphorylase</i>)
<i>RB1</i>	Gene da proteína do retinoblastoma 1 (inglês: <i>Retinoblastoma protein-1</i>)
<i>BRAF</i>	Gene do fibrossarcoma rapidamente acelerado-B (inglês: <i>B-Rapidly Accelerated</i>)

Fibrosarcoma)

<i>IRF2</i>	Gene do fator de regulação do Interferon-2 (inglês: <i>Interferon Regulatory Factor 2</i>)
<i>SMARCA4</i>	Gene do regulador de cromatina associado à matriz dependente de actina relacionado a SWI/SNF subfamília 4 membro 4 (inglês: <i>SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A Member 4</i>)
<i>DNMT3A</i>	Gene da DNA metiltransferase 3A (inglês: <i>DNA Methyltransferase 3A</i>)
<i>TERT</i>	Gene da transcriptase reversa da telomerase (inglês: <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
<i>NF1</i>	Gene da neurofibromatose 1 (inglês: <i>Neurofibromatosis 1</i>)
<i>ATM</i>	Gene da ataxia-telangiectasia mutada (inglês: <i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>)
<i>CDH1</i>	Gene da E-caderina 1 (inglês: <i>E-Cadherin 1</i>)
<i>MET</i>	Gene do receptor do fator de crescimento de hepatócito (inglês: <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>)
<i>CDK4</i>	Gene da quinase dependente de ciclina 4 (inglês: <i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i>)
<i>MDM2</i>	Gene do minuto duplo do camundongo 2 (inglês: <i>Mouse Double Minute 2</i>)
<i>MDM4</i>	Gene do minuto duplo do camundongo 4 (inglês: <i>Mouse Double Minute 4</i>)
<i>AXIN1</i>	Gene da proteína de inibição da axis 1 (inglês: <i>Axis Inhibition protein 1</i>)
<i>BRCA1</i>	Gene do câncer de mama 1 (inglês: <i>Breast Cancer gene 1</i>)
<i>BRCA2</i>	Gene do câncer de mama 2 (inglês: <i>Breast Cancer gene 2</i>)
<i>ERBB2</i>	Gene do receptor do fator do crescimento epidérmico humano 2 (inglês: <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
<i>ERBB4</i>	Gene do receptor do fator do crescimento epidérmico humano 4 (inglês: <i>Human Epidermal growth factor Receptor 4</i>)
<i>NFKBIA</i>	Gene do fator nuclear do inibidor-alfa Kappa-B (inglês: <i>Nuclear Factor of Kappa-B Inhibitor Alpha</i>)

<i>NKX2-1</i>	Gene da proteína homeobox NK-2 ou <i>TTF1</i> (inglês: <i>Homeobox Protein NK-2 gene; Thyroid Transcription Factor 1</i>)
<i>QKI</i>	Gene homólogo quaking de ligação de RNA do domínio KH (inglês: <i>Quaking homolog, KH domain RNA binding</i>)
<i>PIK3CA</i>	Gene da fosfatidilinositol 3-quinase, subunidade alfa-catalítica (inglês: <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic subunit Alpha</i>)
<i>ERRFI1</i>	Gene do inibidor-1 do receptor de feedback do ERBB (inglês: <i>ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1</i>)
<i>FLCN</i>	Gene da foliculina (inglês: <i>Folliculin</i>)
<i>SMARCB1</i>	Gene do regulador de cromatina associado à matriz dependente de actina relacionado a SWI/SNF subfamília B membro 1 (inglês: <i>SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily B Member 1</i>)
<i>CCNE1</i>	Gene da ciclina E1 (inglês: <i>Cyclin E1</i>)
<i>MAP2K2</i>	Gene da proteína quinase 2 de especificidade dupla ativada por mitógeno (inglês: <i>Dual specificity Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 2</i>)
<i>MAP2K4</i>	Gene da proteína quinase 4 de especificidade dupla ativada por mitógeno (inglês: <i>Dual specificity Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 4</i>)
<i>FGFR1</i>	Gene do receptor do fator de crescimento fibroblástico 1 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>)
<i>AURKA</i>	Gene da aurora quinase A (inglês: <i>Aurora Kinase A</i>)
<i>NSD3</i>	Gene da proteína 3 do domínio SET de ligação ao receptor nuclear (inglês: <i>Nuclear receptor binding SET Domain protein 3</i>)
<i>TERC</i>	Gene do componente de RNA da telomerase (inglês: <i>Telomerase RNA Component</i>)
<i>ZNF703</i>	Gene da proteína dedo de zinco 703 (inglês: <i>Zinc Finger Protein 703</i>)
<i>NF2</i>	Gene da neurofibromatose 2 (inglês: <i>Neurofibromatosis 2</i>)
<i>RBM10</i>	Gene da proteína de motivo de ligação de RNA 10 (inglês: <i>RNA Binding Motif</i>)

protein 10)

<i>ZNF217</i>	Gene da proteína dedo de zinco 217 (inglês: <i>Zinc Finger Protein 217</i>)
<i>CXCR4</i>	Gene do receptor 4 da quimiocina C-X-C (inglês: <i>C-X-C Chemokine Receptor type 4</i>)
<i>MSH2</i>	Gene da proteína MutS Homóloga 2 (inglês: <i>MutS Homolog 2</i>)
<i>NFE2L2</i>	Gene do fator nuclear eritróide-2 relacionado ao fator 2 (inglês: <i>Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2</i>)
<i>CRKL</i>	Gene do regulador CT10 do proto-oncogene semelhante à quinase (inglês: <i>CT10 Regulator of Kinase-Like proto-oncogene</i>)
<i>CCND1</i>	Gene da Ciclina D1 (inglês: <i>Cyclin D1</i>)
<i>CCND2</i>	Gene da Ciclina D2 (inglês: <i>Cyclin D2</i>)
<i>FGF19</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 19 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 19</i>)
<i>FGF10</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 10 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 10</i>)
<i>FGF3</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 3 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 3</i>)
<i>FGF4</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 4 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 4</i>)
<i>FGF6</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 6 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 6</i>)
<i>FGF23</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 23 (inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 23</i>)
<i>U2AF1</i>	Gene do fator auxiliar-1 de RNA nuclear pequeno U2 (inglês: <i>U2 small nuclear RNA Auxiliary Factor 1</i>)
<i>PRKCI</i>	Gene da proteína quinase C iota (inglês: <i>Protein Kinase C Iota</i>)
<i>IRS2</i>	Gene do substrato 2 do receptor de insulina (inglês: <i>Insulin Receptor Substrate 2</i>)

<i>PAX5</i>	Gene da caixa emparelhada 5 (inglês: <i>Paired box 5</i>)
<i>MUTYH</i>	Gene da MutY DNA glicosilase (inglês: <i>MutY DNA glycosylase</i>)
<i>RICTOR</i>	Gene do companheiro insensível à rapamicina do alvo mamífero da rapamicina (inglês: <i>Rapamycin-Insensitive Companion of mammalian Target Of Rapamycin</i>)
<i>TET2</i>	Gene da Tet Metilcitosina deoxigenase 2 (inglês: <i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>)
<i>PARK2</i>	Gene da proteína parkinson 2 (inglês: <i>Parkinson protein 2</i>)
<i>FBXW7</i>	Gene da proteína 7 de domínio F-Box e WD-40 (inglês: <i>F-Box and WD-40 domain-containing protein 7</i>)
<i>ATRX</i>	Gene da talassemia alfa/síndrome de retardo mental ligada ao X (inglês: <i>Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked</i>)
<i>FAM123B</i>	Gene da família com similaridade de sequência 123B (inglês: <i>Family with sequence similarity 123B</i>)
<i>SETD2</i>	Gene do domínio SET2 de histona lisina metiltransferase (inglês: <i>SET Domain containing 2, histone lysine methyltransferase</i>)
<i>IDH1</i>	Gene da isocitrato desidrogenase 1 (inglês: <i>Isocitrate DeHydrogenase 1</i>)
<i>MEN1</i>	Gene da neoplasia endócrina múltipla 1 (inglês: <i>Multiple Endocrine Neoplasia 1</i>)
<i>NOTCH1</i>	Gene da proteína homóloga do locus neurogênico 1 (inglês: <i>Neurogenic locus homolog protein 1</i>)
<i>CDC73</i>	Gene do ciclo de divisão celular 73 (inglês: <i>Cell Division Cycle 73</i>)
<i>PMS2</i>	Gene da proteína de segregação pós-meiótica aumentada 2 (inglês: <i>PostMeiotic Segregation increased 2</i>)
<i>APC</i>	Gene da polipose adenomatosa colônica (inglês: <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>)
<i>SMAD4</i>	Gene do pequenas mães contra o homólogo decapentaplégico 4 (inglês: <i>Small Mothers Against Decapentaplegic homolog 4</i>)
<i>PDGFRα</i>	Gene do receptor-alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (inglês: <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha</i>)

<i>JUN</i>	Proto-oncogene Jun, subunidade do fator de transcrição AP-1 (inglês: <i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>)
<i>TPS</i>	Pontuação de proporção tumoral (inglês: <i>Tumor Proportion Score</i>)
<i>RECIST</i>	Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (inglês: <i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumours</i>)
<i>IMC</i>	Índice de Massa Corporal
<i>TMB</i>	Carga mutacional tumoral (inglês: <i>Tumor Mutational Burden</i>)
<i>MSI</i>	Instabilidade microssatélite (inglês: <i>Microsatellite Instability</i>)
<i>TNM</i>	Tumor Nodo Metástase (inglês: <i>Tumor Node Metastasis</i>)
<i>AJCC</i>	Comitê misto americano sobre o câncer (inglês: <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
<i>LR</i>	Doença loco-regional
<i>M1</i>	Doença metastática
<i>FA</i>	Frequências absolutas
<i>FR%</i>	Frequências relativas
<i>LDN-CBA</i>	Amostras dos pacientes de Londrina-Curitiba/PR
<i>IC 95%</i>	Intervalo de confiança de 95%
<i>IGF-1</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (inglês: <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>)
<i>SUS</i>	Sistema Único de Saúde
<i>MSKCC</i>	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
<i>MSK-IMPACT</i>	<i>Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profile of Actionable Cancer Targets</i>
<i>TNFα</i>	Fator de necrose tumoral alfa (inglês: <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
<i>GBOT</i>	Grupo Brasileiro de Oncologia Torácica
<i>AMPK</i>	Proteína quinase ativada de adenosina monofosfato (inglês: <i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>)

<i>NRF2</i>	Fator nuclear eritróide 2 (inglês: <i>Nuclear Factor Erythroid 2</i>)
<i>LACOG</i>	Grupo cooperativo de oncologia latino-americano (inglês: <i>Latin American Cooperative Oncology Group</i>)
<i>ctDNA</i>	DNA circulante tumoral (inglês: <i>circulating tumor Deoxyribonucleic Acid</i>)
<i>PDGF</i>	Fator de crescimento derivado de plaquetas (inglês: <i>Platelet-Derived Growth Fator</i>)
<i>LAG-3</i>	Gene de ativação linfocitária-3 (inglês: <i>Lymphocyte Activation Gene-3</i>)
<i>TGF-β</i>	Fator transformador de crescimento beta (inglês: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	OBJETIVOS	55
3	METODOLOGIA	56
4	RESULTADOS	
4.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES DA AMOSTRA LONDRINA-CURITIBA/PR	61
4.2	VARIANTES GENÔMICAS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES DE LONDRINA-CURITIBA/PR – CARACTERÍSTICAS E CORRELAÇÕES	65
4.3	EXPRESSÃO COMPARATIVA ENTRE O PERFIL DE GENES MUTADOS SEQUENCIADOS NAS AMOSTRAS DE LONDRINA-CURITIBA/PR E NAS AMOSTRAS DE PACIENTES DO BANCO DE DADOS DO TCGA.....	81
4.4	ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES MUTADOS SEQUENCIADOS NAS AMOSTRAS DE LONDRINA- CURITIBA/PR	84
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICES	
	APÊNDICE A – Declaração de concordância de instituição co-participante	125
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	126
	APÊNDICE C – Termo de Confidencialidade e Sigilo	128

APÊNDICE D – Quadro dos genes mutados de maior interesse clínico do estudo, obtidos das avaliações genômicas	130
APÊNDICE E – Instrumento para coleta de dados clínicos	136
APÊNDICE F – Quadro-resumo dos laudos de <i>NGS</i> utilizando a plataforma <i>Foundation One CDx</i> dos indivíduos que apresentaram mutações nos genes <i>EGFR</i> e <i>TP53</i> no estudo	137
APÊNDICE G – Quadro de associação entre a carga mutacional tumoral (<i>TMB</i>), a presença de mutações condutoras/acionáveis e <i>status</i> do tabagismo, obtidos dos laudos de <i>NGS</i> dos pacientes que realizaram a análise genômica através da plataforma <i>Foundation One CDx</i>	140
APÊNDICE H – Tabela com as frequências absolutas e frequências relativas distribuídas nos diferentes estadios iniciais ao diagnóstico da doença, em relação às variáveis ligadas ao câncer e ao número de genes mutados.....	143
APÊNDICE I – Tabela com as frequências absolutas e frequências relativas em relação às variáveis clínico-moleculares ligadas ao câncer e ao número de genes mutados nos indivíduos que realizaram tratamento adjuvante.....	144
APÊNDICE J – Tabela com as frequências absolutas e frequências relativas em relação às variáveis clínico-moleculares ligadas ao câncer e ao número de genes mutados nos indivíduos que realizaram tratamento sistêmico de 1ª linha.....	145
APÊNDICE K – Expressão tecidual dos genes sequenciados na amostra de pacientes.....	146

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos 148

1 INTRODUÇÃO

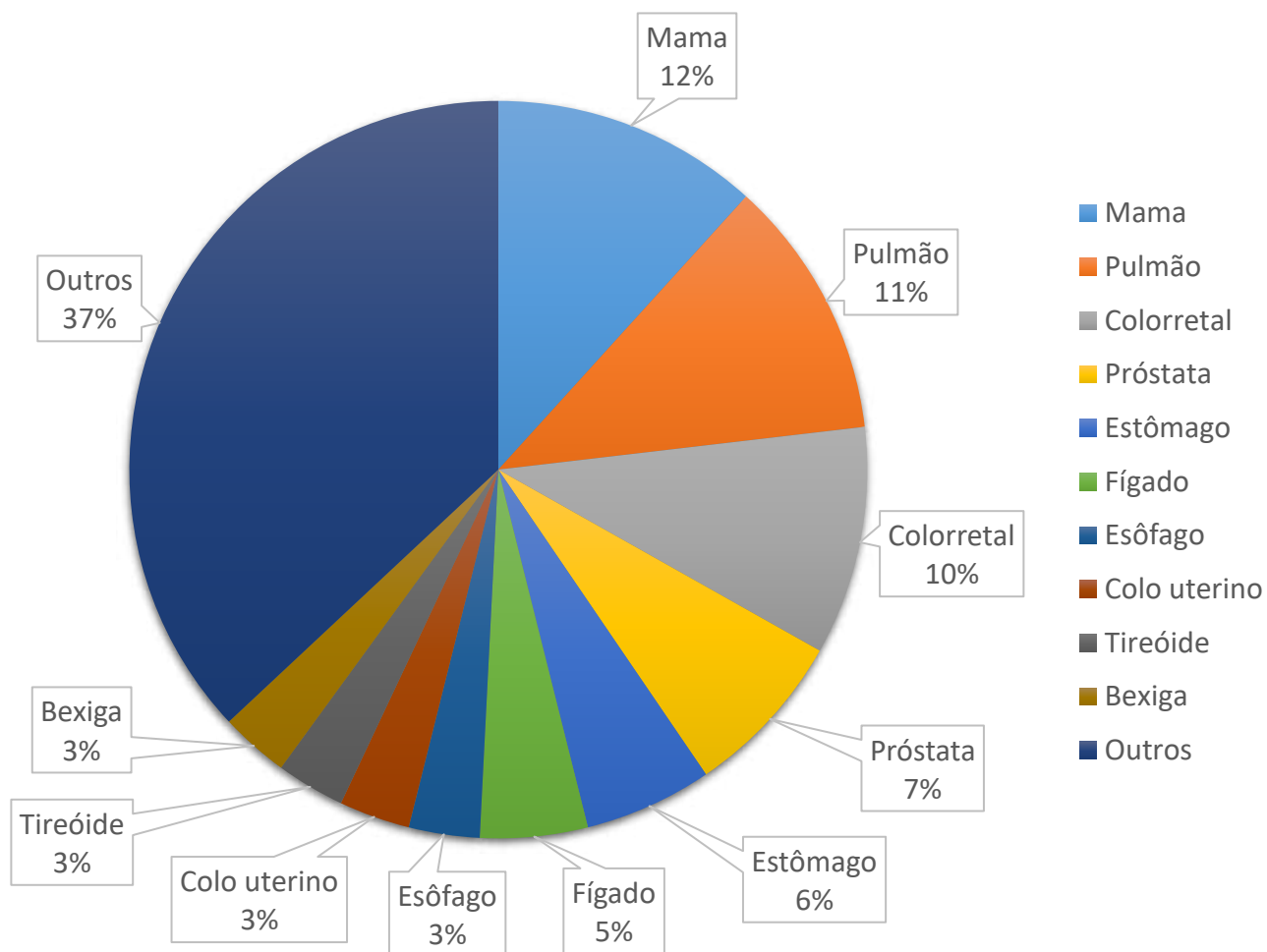
O câncer de pulmão é considerado a neoplasia maligna de principal causa de mortalidade câncer-específica em todo o mundo, permanecendo como um grande desafio para a Oncologia moderna (Tabela 1). Segundo o *Global Cancer Statistics 2020 (GLOBOCAN)*, estimam-se 2.200.000 novos casos e 1.800.000 óbitos anualmente, representando cerca de 11,4% dos diagnósticos de câncer e 18% das mortes ocasionadas por tumores malignos e ocupando o 2º lugar para esses 2 elementos epidemiológicos mundialmente (Figuras 1 a 5). A maioria dos casos, aproximadamente 55%, ocorre em países em desenvolvimento (SUNG *et al.*, 2021; LOPES *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Casos novos e óbitos por câncer no mundo em 2020, dentre os 12 tumores mais incidentes.

Localização do tumor	nº casos novos (%)	nº óbitos (%)
Mama feminina	2.261.419 (11,7)	684.996 (6,9)
Pulmão	2.206.771 (11,4)	1.796.144 (18)
Próstata	1.414.259 (7,3)	375.304 (3,8)
Pele não-melanoma	1.198.073 (6,2)	63.731 (0,6)
Cólon	1.148.515 (6,0)	576.858 (5,8)
Estômago	1.089.103 (5,6)	768.793 (7,7)
Fígado	905.677 (4,7)	830.180 (8,3)
Reto	732.210 (3,8)	339.022 (3,4)
Colo uterino	604.127 (3,1)	341.831 (3,4)
Esôfago	604.100 (3,1)	544.076 (5,5)
Tireóide	586.202 (3,0)	43.646 (0,4)
Bexiga	573.278 (3,0)	212.536 (2,1)

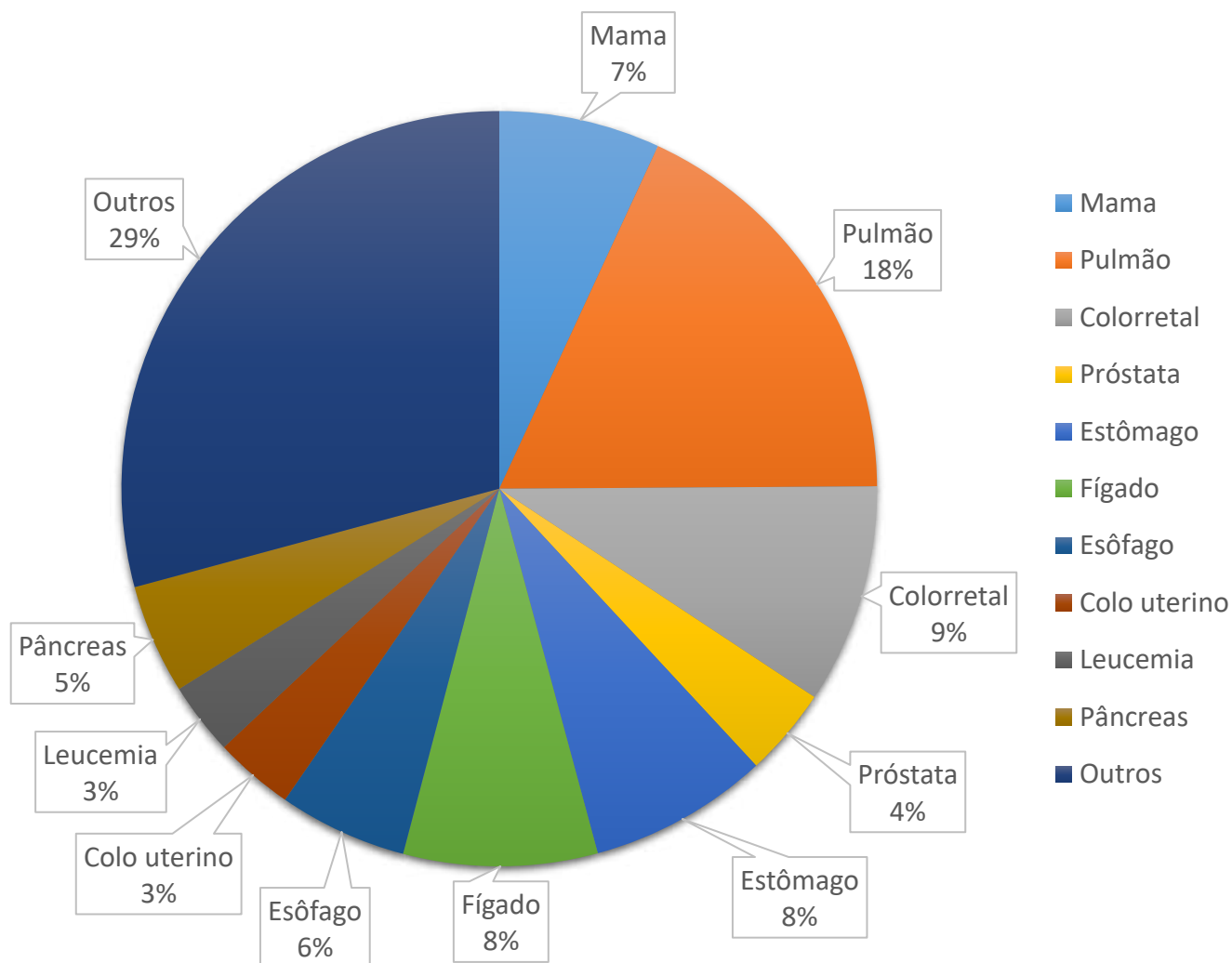
Fonte: GLOBOCAN 2020 (SUNG *et al.*, 2021)

Figura 1 – Distribuição dos casos (incidência) dos 10 tipos de cânceres mais comuns no mundo em 2020, em ambos os sexos.



Fonte: GLOBOCAN 2020 (SUNG *et al.*, 2021)

Figura 2 – Distribuição dos óbitos (mortalidade) dos 10 tipos de cânceres mais comuns no mundo em 2020, em ambos os sexos.



Fonte: GLOBOCAN 2020 (SUNG *et al.*, 2021)

Figura 3 – Taxas padronizadas por idade de incidência específica por região do mundo para câncer de pulmão entre homens e mulheres em 2020, em ordem decrescente da taxa padronizada por idade de incidência por 100.000 habitantes.

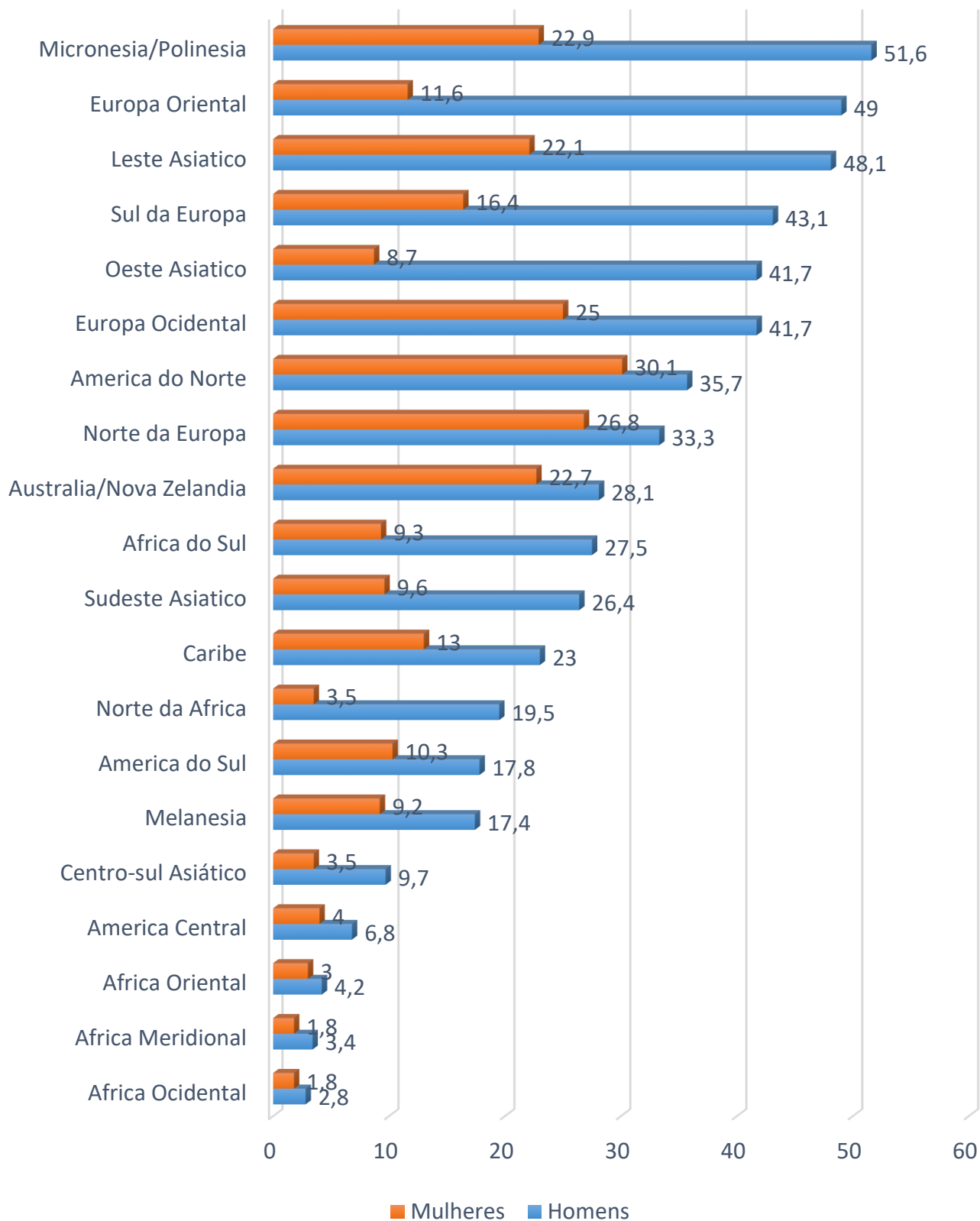
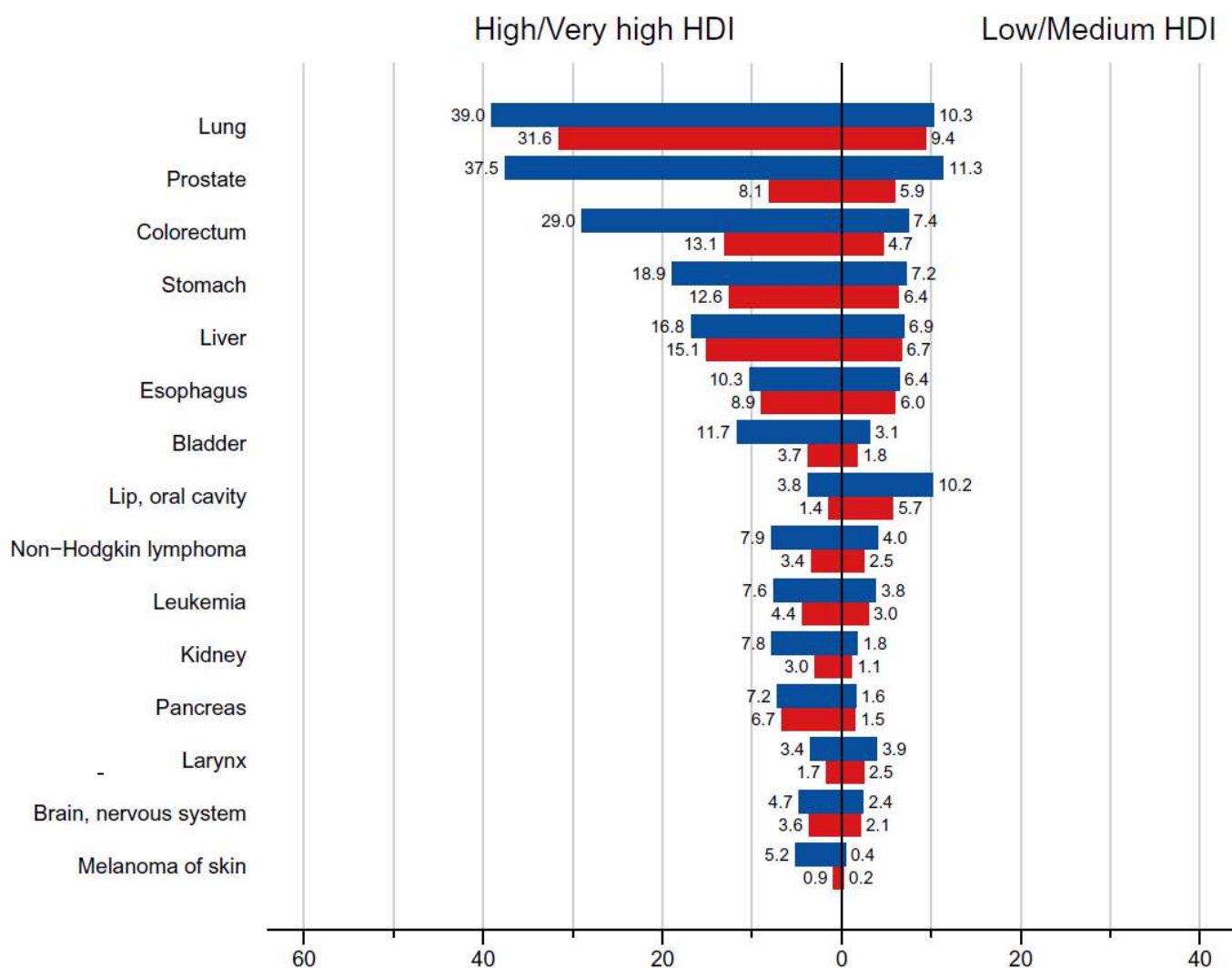


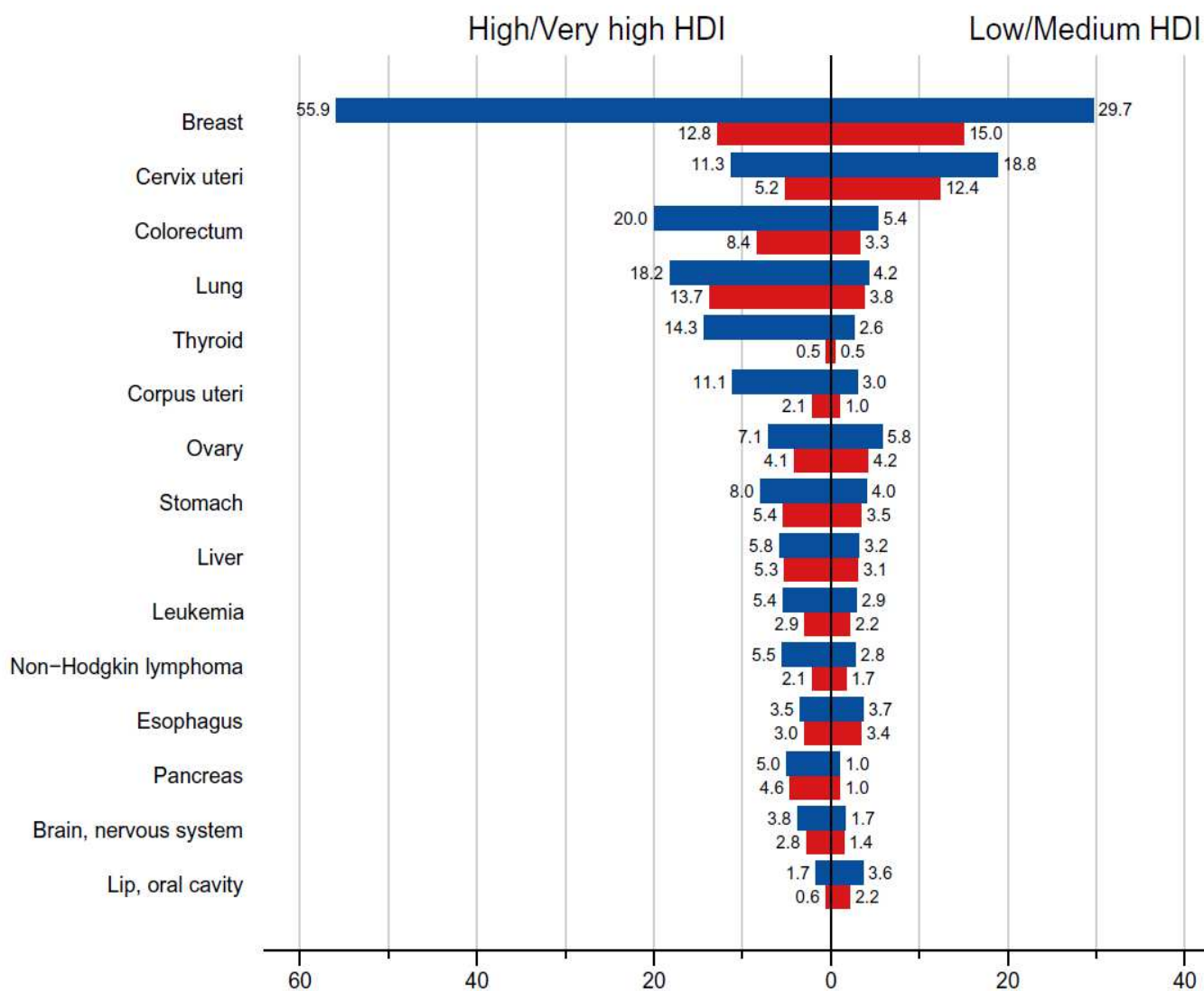
Figura 4 – Taxas de incidência e mortalidade padronizadas dos 15 cânceres mais comuns do mundo no sexo masculino, em ordem decrescente da taxa geral padronizada por idade, em países com índice de desenvolvimento humano (*HDI*) alto/muito alto vs países com *HDI* baixo/médio em 2020.



Legenda: *HDI*: *Human Development Index* (Índice de Desenvolvimento Humano); barras azuis: taxas de incidência; barras vermelhas: taxas de mortalidade

Fonte: *GLOBOCAN 2020* (SUNG *et al.*, 2021)

Figura 5 – Taxas de incidência e mortalidade padronizadas dos 15 cânceres mais comuns do mundo no sexo feminino, em ordem decrescente da taxa geral padronizada por idade, em países com índice de desenvolvimento humano (*HDI*) alto/muito alto vs países com *HDI* baixo/médio em 2020.

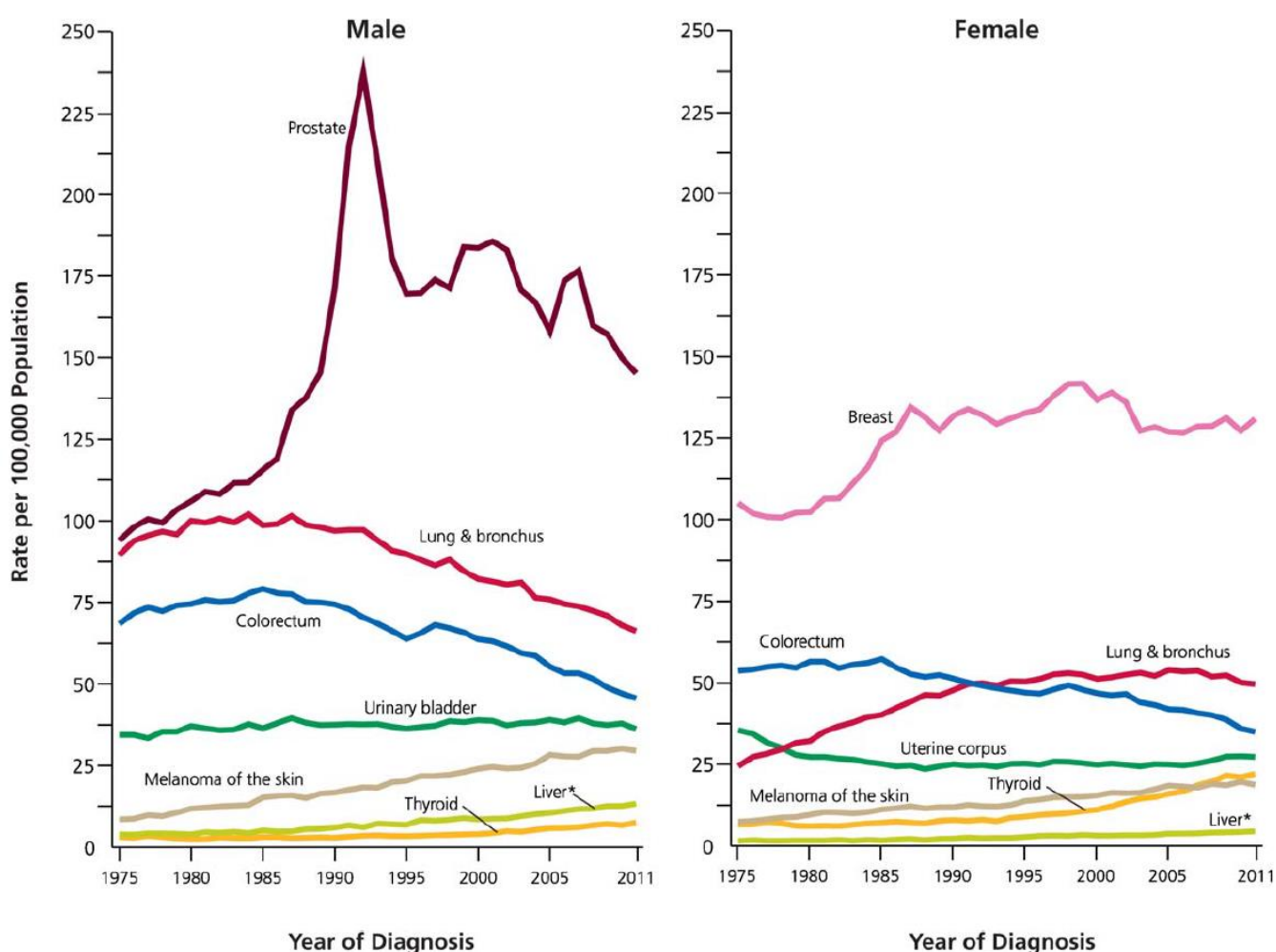


Legenda: *HDI*: *Human Development Index* (Índice de Desenvolvimento Humano); barras azuis: taxas de incidência; barras vermelhas: taxas de mortalidade

Fonte: *GLOBOCAN 2020* (SUNG *et al.*, 2021)

Segundo os dados do *Surveillance, Epidemiology and End-Results* americano (SEER) publicados desde 2015, as tendências em incidência global por câncer são fortemente influenciadas pelo grupo das 4 neoplasias mais prevalentes: pulmão, mama, próstata e colorretal. Desde a década de 1980, observa-se o aumento da incidência de câncer de pulmão em mulheres, entretanto vem ocorrendo uma redução dessa taxa em homens progressivamente (cerca de 3% ao ano). Segundo os autores tal fenômeno reflete a epidemia do tabaco observada nesta década para o gênero feminino, onde vem se observando a iniciação do hábito tabágico em faixas etárias mais precoces e também uma redução dos índices de cessação do tabagismo (Figura 6) (SIEGEL *et al.*, 2015).

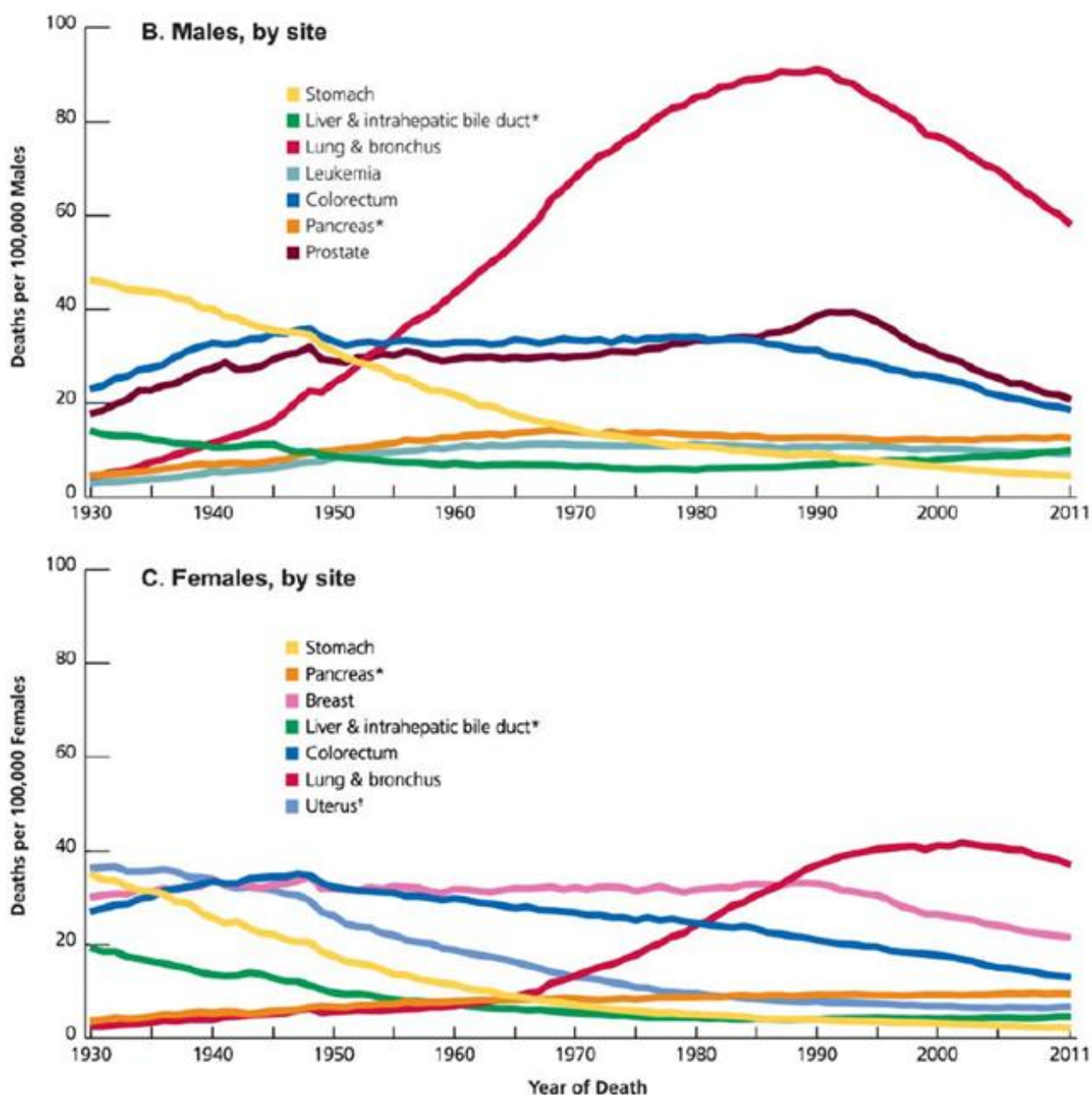
Figura 6 – Tendências em taxas de incidência para cânceres selecionados por sexo nos EUA entre 1975 e 2011.



Fonte: SEER (SIEGEL *et al.*, 2015)

Além disso, mais de um quarto de todas as mortes nos Estados Unidos (EUA) por neoplasias malignas são ocasionadas por câncer de pulmão (27% da casuística do SEER), com marcante aumento da letalidade por essa neoplasia na população masculina entre as décadas de 1960 e 1990, com redução desses índices de mortalidade logo após este período, e aumento da letalidade na população feminina a partir da década de 1970, atingindo-se um platô por volta dos anos 2000 (SIEGEL *et al.*, 2015), conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Tendências em taxas de mortalidade por câncer, por topografias, selecionado pelo sexo nos EUA entre 1930 e 2011.



Fonte: SEER (SIEGEL *et al.*, 2015)

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mais atualizadas para 2023 sobre a incidência e a mortalidade de câncer de pulmão demonstram taxas proporcionalmente semelhantes dessa neoplasia em nosso país comparados aos dados mundiais. São estimados para o triênio 2023-2025 mais 32.560 novos casos da doença, correspondendo a 15,06 casos por 100.000 habitantes e ocupando, portanto, a 4ª posição dentre os tumores malignos mais frequentes em nosso país (Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer, 2022). As estimativas absolutas e de distribuição segundo o sexo para o ano de 2023 estão representadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 8 - Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer no Brasil, segundo sexo e localização primária (números arredondados para múltiplos de 10).

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	73.610	66,54	41,89	73.610	66,54	41,89
Próstata	71.730	67,86	55,49	-	-	-	71.730	67,86	55,49
Cólon e reto	21.970	20,78	12,43	23.660	21,41	11,06	45.630	21,10	11,43
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	17,06	12,73	14.540	13,15	9,26	32.560	15,06	10,52
Estômago	13.340	12,63	9,51	8.140	7,36	4,92	21.480	9,94	7,08
Colo do útero	-	-	-	17.010	15,38	13,25	17.010	15,38	13,25
Glândula tireoide	2.500	2,33	1,84	14.160	12,79	6,68	16.660	7,68	4,83
Cavidade oral	10.900	10,30	7,64	4.200	3,83	2,61	15.100	6,99	4,95
Linfoma não Hodgkin	6.420	6,08	4,55	5.620	5,08	3,00	12.040	5,57	3,79
Leucemias	6.250	5,90	4,75	5.290	4,78	3,95	11.540	5,33	4,43
Sistema nervoso central	6.110	5,80	4,56	5.380	4,85	3,80	11.490	5,31	4,33
Bexiga	7.870	7,45	3,96	3.500	3,14	1,58	11.370	5,25	2,75
Esôfago	8.200	7,76	5,46	2.790	2,49	1,43	10.990	5,07	3,38
Pâncreas	5.290	5,00	3,74	5.690	5,15	3,22	10.980	5,07	3,31
Fígado	6.390	6,06	5,18	4.310	3,89	3,14	10.700	4,95	4,29
Pele melanoma	4.640	4,37	2,24	4.340	3,90	1,56	8.980	4,13	1,88
Corpo do útero	-	-	-	7.840	7,08	4,13	7.840	7,08	4,13
Laringe	6.570	6,21	5,07	1.220	1,09	0,72	7.790	3,59	2,68
Ovário	-	-	-	7.310	6,62	5,01	7.310	6,62	5,01
Linfoma de Hodgkin	1.500	1,40	0,84	1.580	1,41	0,78	3.080	1,41	0,75
Outras localizações	41.730	39,49	26,17	33.970	30,69	19,70	75.700	34,99	21,96
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	239.430	226,56	185,61	244.160	220,75	154,08	483.590	223,59	169,63
Pele não melanoma	101.920	96,44	-	118.570	107,21	-	220.490	101,95	-
Todas as neoplasias	341.350	323,00	-	362.730	327,96	-	704.080	325,53	-

Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

Figura 9 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2023 por sexo, exceto pele não-melanoma (números arredondados para múltiplos de 10).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

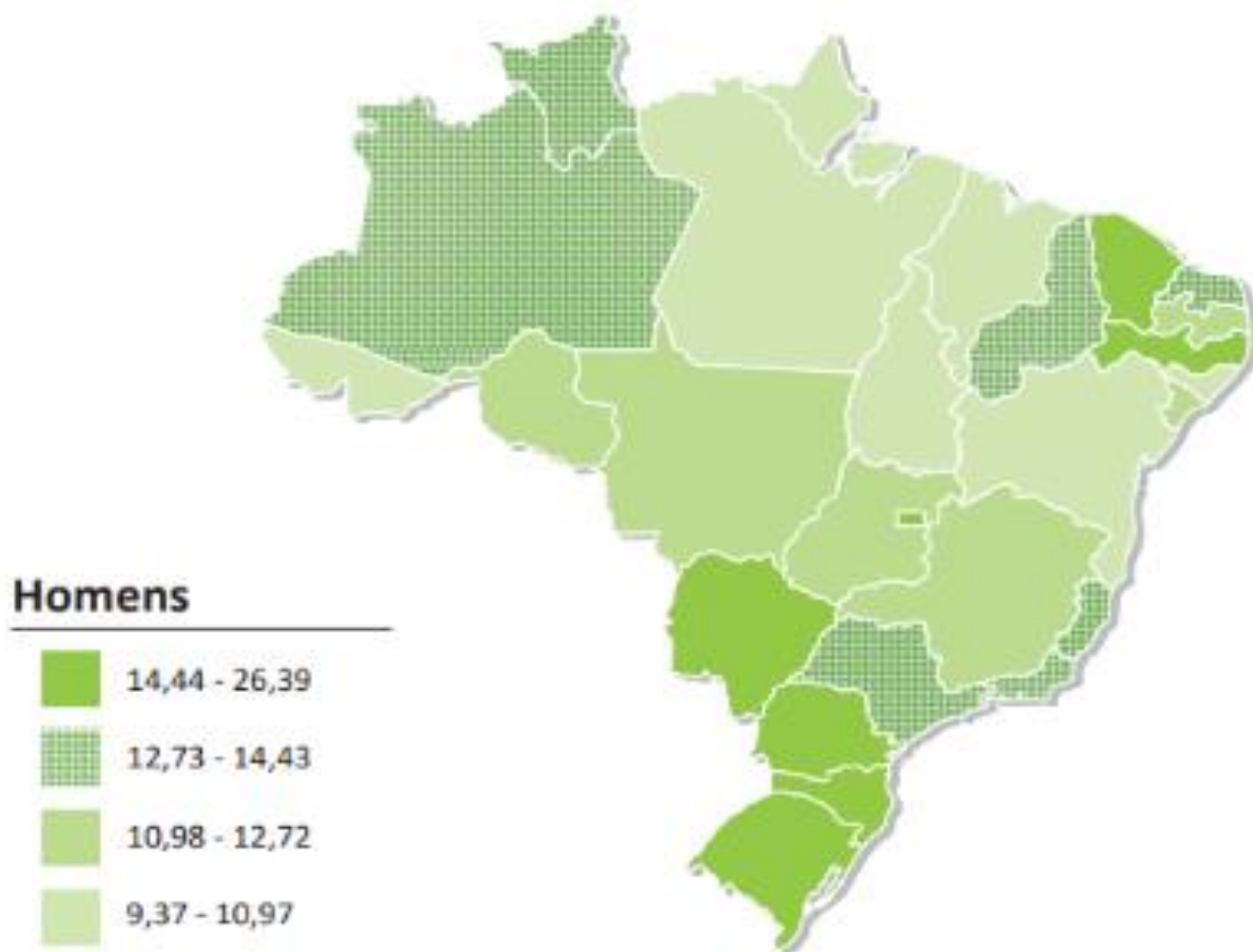
Na região sul do Brasil, são observadas taxas de incidência de câncer de pulmão ainda mais elevadas, tanto para homens quanto para mulheres: são esperados cerca de 8.060 novos casos para 2023, representando 24,7% dos casos diagnosticados anualmente em todo o país. Na população sulista masculina, este é o segundo tumor mais frequente, com 31,54 casos por 100.000 habitantes, representando a região com maior densidade de casos por essa neoplasia maligna. Especificamente, no Estado do Paraná (PR) são esperados 2.270 novos casos por ano, constituindo 19,27 casos por 100.000 habitantes (Tabelas 2 a 4) (Figuras 10 a 13) (Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer, 2022).

Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2023 do número de casos novos de câncer no Brasil, por unidade da federação (números arredondados para múltiplos de 10).

Unidades da Federação	Mama feminina	Próstata	Cólon e reto	Traqueia, brônquio e pulmão	Estômago	Colo do útero	Glândula tireoide	Cavidade oral
Acre	100	120	50	70	50	70	30	20
Amapá	80	110	40	50	80	100	20	40
Amazonas	500	570	300	370	440	610	130	140
Pará	1.020	1.050	640	650	980	830	160	260
Rondônia	320	310	210	190	150	150	40	70
Roraima	70	90	40	50	30	40	20	30
Tocantins	320	510	150	150	100	180	50	70
Alagoas	690	930	430	290	270	370	180	230
Bahia	4.230	6.510	1.940	1.360	1.250	1.160	950	900
Ceará	3.080	3.120	1.210	1.400	1.460	1.030	1.190	760
Maranhão	1.060	2.000	520	560	480	800	460	180
Paraíba	1.180	1.650	400	520	410	290	430	250
Pernambuco	2.880	2.930	1.180	1.320	950	770	670	580
Piauí	860	1.190	360	380	240	360	330	140
Rio Grande do Norte	1.140	1.450	570	500	430	280	410	260
Sergipe	570	870	420	240	190	220	200	200
Distrito Federal	1.030	460	710	470	300	240	160	170
Goiás	1.970	2.500	1.110	990	570	660	650	390
Mato Grosso	1.040	1.020	500	500	270	220	220	210
Mato Grosso do Sul	910	1.230	600	480	290	320	190	180
Espírito Santo	900	1.740	610	580	420	260	90	360
Minas Gerais	7.670	7.970	4.630	3.120	2.240	1.670	1.720	1.820
Rio de Janeiro	10.290	7.930	5.880	3.000	1.600	1.540	1.470	1.430
São Paulo	20.470	16.830	14.980	7.260	4.690	2.550	5.540	4.260
Paraná	3.650	3.430	2.560	2.270	1.350	790	550	920
Rio Grande do Sul	3.720	3.510	3.120	3.700	1.080	620	450	580
Santa Catarina	3.860	1.700	2.470	2.090	1.160	880	350	650
Brasil	73.610	71.730	45.630	32.560	21.480	17.010	16.660	15.100

Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

Figura 10 – Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de pulmão por 100.000 habitantes homens, estimada para o ano de 2023 no Brasil, segundo unidades da federação.



Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

Tabela 3 – Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas (população-padrão mundial) de incidência por 100.000 habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária, na região sul do Brasil (números arredondados para múltiplos de 10).

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	11.230	71,44	41,06	11.230	71,44	41,06
Próstata	8.640	57,23	33,94	-	-	-	8.640	57,23	33,94
Cólon e reto	4.060	26,89	19,44	4.090	26,04	14,99	8.150	26,46	16,72
Traqueia, brônquio e pulmão	4.760	31,54	24,19	3.300	20,98	15,54	8.060	26,15	18,55
Estômago	2.260	15,02	9,28	1.330	8,41	4,31	3.590	11,65	6,33
Colo do útero	-	-	-	2.290	14,55	9,77	2.290	14,55	9,77
Glândula tireoide	300	1,93	1,40	1.050	6,63	3,00	1.350	4,33	2,52
Cavidade oral	1.590	10,52	9,16	560	3,60	2,03	2.150	6,99	5,39
Linfoma não Hodgkin	1.490	9,94	7,22	1.130	7,17	3,19	2.620	8,53	4,72
Leucemias	1.100	7,28	5,57	1.090	6,97	4,33	2.190	7,12	4,90
Sistema nervoso central	1.290	8,54	6,06	1.120	7,12	4,66	2.410	7,82	5,31
Bexiga	1.580	10,43	5,83	550	3,50	1,95	2.130	6,89	3,67
Esôfago	1.990	13,16	9,57	680	4,34	2,67	2.670	8,66	5,55
Pâncreas	1.220	8,02	5,88	1.230	7,87	4,49	2.450	7,94	5,22
Fígado	1.410	9,31	8,04	860	5,47	3,61	2.270	7,35	5,41
Pele melanoma	1.240	8,25	4,83	1.160	7,39	3,30	2.400	7,81	3,98
Corpo do útero	-	-	-	1.080	6,85	4,23	1.080	6,85	4,23
Laringe	1.120	7,37	5,24	210	1,31	0,70	1.330	4,28	3,07
Ovário	-	-	-	1.090	6,90	5,26	1.090	6,90	5,26
Linfoma de Hodgkin	270	1,79	0,84	370	2,35	1,33	640	2,07	1,21
Outras localizações	7.960	52,72	32,59	6.020	38,36	19,88	13.980	45,40	25,55
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	42.280	280,21	213,49	40.440	257,36	170,62	82.720	268,55	189,22
Pele não melanoma	20.500	135,86	-	25.900	164,79	-	46.400	150,62	-
Todas as neoplasias	62.780	416,07	-	66.340	422,19	-	129.120	419,19	-

Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

Figura 12 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 na região sul do Brasil por sexo, exceto pele não-melanoma (números arredondados para múltiplos de 10).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	8.640	20,4%	Homens	Mulheres	Mama feminina	11.230	27,8%
Traqueia, brônquio e pulmão	4.760	11,3%			Cólon e reto	4.090	10,1%
Colon e reto	4.060	9,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	3.300	8,2%
Estômago	2.260	5,3%			Colo do útero	2.290	5,7%
Esôfago	1.990	4,7%			Estômago	1.330	3,3%
Cavidade oral	1.590	3,8%			Pâncreas	1.230	3,0%
Bexiga	1.580	3,7%			Pele melanoma	1.160	2,9%
Linfoma não Hodgkin	1.490	3,5%			Linfoma não Hodgkin	1.130	2,8%
Fígado	1.410	3,3%			Sistema nervoso central	1.120	2,8%
Sistema nervoso central	1.290	3,1%			Leucemias	1.090	2,7%

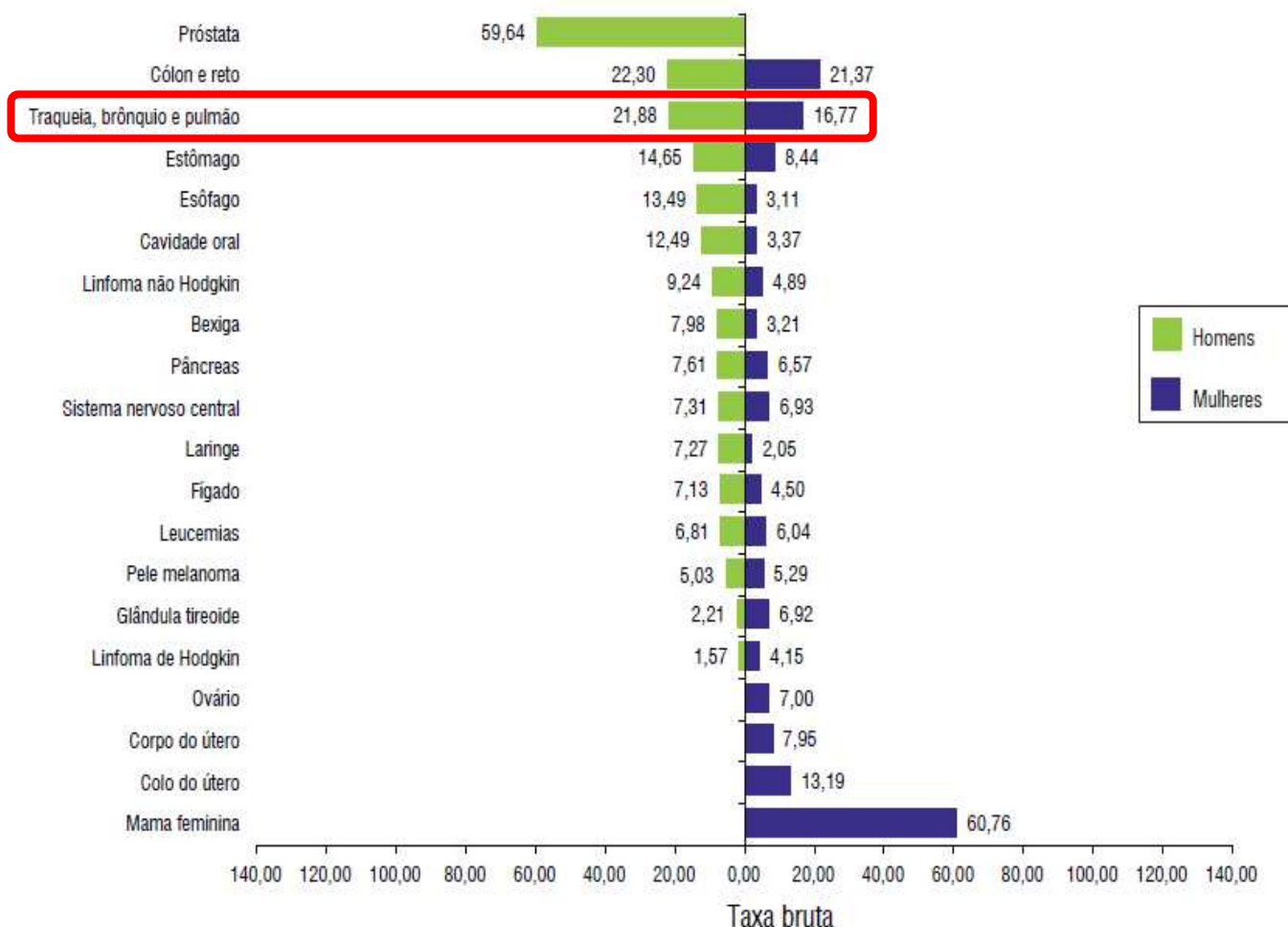
Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

Tabela 4 – Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas (população-padrão mundial) de incidência por 100.000 habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária, no Estado do Paraná (números arredondados para múltiplos de 10).

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	3.650	60,76	41,06	3.650	60,76	41,06
Próstata	3.430	59,64	35,94	-	-	-	3.430	59,64	35,94
Cólon e reto	1.280	22,30	18,63	1.280	21,37	14,99	2.560	21,83	16,52
Traqueia, brônquio e pulmão	1.260	21,88	15,24	1.010	16,77	12,04	2.270	19,27	12,80
Estômago	840	14,65	9,28	510	8,44	4,31	1.350	11,48	6,33
Colo do útero	-	-	-	790	13,19	9,77	790	13,19	9,77
Glândula tireoide	130	2,21	1,77	420	6,92	2,68	550	4,62	2,52
Cavidade oral	720	12,49	9,16	200	3,37	2,03	920	7,83	5,39
Linfoma não Hodgkin	530	9,24	7,22	290	4,89	3,00	820	7,02	4,72
Leucemias	390	6,81	5,57	360	6,04	4,33	750	6,42	4,90
Sistema nervoso central	420	7,31	6,06	420	6,93	4,66	840	7,12	5,31
Bexiga	460	7,98	5,83	190	3,21	1,95	650	5,55	3,67
Esôfago	780	13,49	9,57	190	3,11	2,05	970	8,19	5,55
Pâncreas	440	7,61	5,87	390	6,57	3,22	830	7,08	5,22
Fígado	410	7,13	5,83	270	4,50	3,14	680	5,79	4,30
Pele melanoma	290	5,03	3,97	320	5,29	3,13	610	5,16	3,55
Corpo do útero	-	-	-	480	7,95	4,23	480	7,95	4,23
Laringe	420	7,27	5,24	120	2,05	1,44	540	4,60	3,07
Ovário	-	-	-	420	7,00	5,26	420	7,00	5,26
Linfoma de Hodgkin	90	1,57	0,68	250	4,15	3,36	340	2,89	1,21
Outras localizações	2.520	43,79	32,59	1.850	30,88	19,88	4.370	37,20	25,55
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	14.410	250,63	183,13	13.410	223,44	152,23	27.820	236,74	166,67
Pele não melanoma	4.780	83,14	-	4.300	71,57	-	9.080	77,24	-
Todas as neoplasias	19.190	333,76	-	17.710	295,09	-	36.900	314,01	-

Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

Figura 13 – Taxas brutas de incidência estimadas para 2023 no Estado do Paraná, segundo sexo e localização primária (números arredondados para múltiplos de 10).



Fonte: Ministério da Saúde e INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil (2022)

O tabagismo segue sendo o principal fator etiológico dessa neoplasia, responsável por dois-terços dos óbitos relacionados ao câncer de pulmão, porém outros fatores externos também podem contribuir para a sua gênese, como a poluição ambiente em grandes centros urbanos, com taxas atingindo até 14% e podendo representar índices ainda mais relevantes em alguns países do sudeste asiático, como a China (20,5%). Juntos, o tabagismo e a exposição passiva aos compostos da combustão do alcatrão são responsáveis por 85% dos casos diagnosticados dessa neoplasia maligna; esses, portanto, são dados epidemiológicos globais ainda preocupantes, mesmo com a implementação de políticas de

saúde pública com intervenções de cessação do tabagismo e de redução da iniciação ao vício (SUNG *et al.*, 2021).

Classicamente, os cânceres de pulmão são divididos em 2 grandes grupos morfológicos: o de pequenas células (*SCLC*), com aproximadamente 15% dos casos, e o de não-pequenas células (*NSCLC*), com aproximadamente 85% dos casos. Dentre os subtipos histológicos mais prevalentes em *NSCLC*, são conhecidos o adenocarcinoma, o carcinoma epidermóide, o carcinoma neuroendócrino de grandes células e tumores mistos do tipo adenoescamoso, porém também são reconhecidas outras variantes anátomo-patológicas mais raras. Atualmente, para melhor abordagem médica cotidiana, são considerados 2 grandes subgrupos dentro da família *NSCLC*: os tumores escamosos e os não-escamosos (LEIGHL, 2012; SUNG *et al.*, 2021).

A sobrevida global do *NSCLC* em 5 anos após o diagnóstico de doença metastática (*mNSCLC*) com o tratamento convencional baseado em quimioterapia citotóxica flutua na literatura médica em torno de 7% a 10%, sendo excepcionalmente maior em alguns países, como o Japão (33%), Israel (27%) e a Coreia do Sul (25%) (SUNG *et al.*, 2021). Os principais objetivos do tratamento do *NSCLC* avançado são melhorar os índices de sobrevida global (*OS*), de sobrevida livre de progressão (*PFS*) e de qualidade de vida (*QoL*) dos pacientes. Antes da disponibilidade da terapia-alvo molecular e da imunoterapia como ferramentas terapêuticas, o tratamento limitava-se ao uso de combinações de quimioterapia baseada em *doublets* de platina no cenário de tratamento de 1ª linha (com ou sem o uso de terapias de manutenção) e de esquemas de quimioterapia em monoterapia na 2ª linha e nas demais linhas subsequentes. Essas estratégias foram capazes de oferecer medianas de sobrevida global observadas em estudos clínicos na ordem de 9 a 10 meses (GERBER; SCHILLER, 2013; LEIGHL, 2012; SCHILLER *et al.*, 2002).

Mecanismos de carcinogênese, de promoção e de progressão tumoral, conhecidos como *Hallmarks* do câncer, vêm sendo descritos desde o início dos anos 2000. O desenvolvimento e a expansão de certas capacidades celulares vêm clarificando e modificando a forma como entendemos o câncer de pulmão, e novos conceitos vêm ocupando uma posição de destaque na tumorigênese e na disponibilização de novos tratamentos para essas neoplasias, como a descrição das várias vias de transdução de sinal por meio de receptores tirosina-quinase (responsáveis pelo crescimento celular sustentado e autônomo por eventos de autofosforilação de proteínas citoplasmáticas, levando à ativação

de fatores mitogênicos nucleares), a neoangiogênese, as modificações estruturais e promoções imunológicas do microambiente tumoral, a sobrevivência em tecidos à distância, os mecanismos de metastatização, os mecanismos anti-apoptóticos e a habilidade das células tumorais de evasão imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A partir do conhecimento desses *Hallmarks* nas últimas 2 décadas e, especialmente, da expressão do fenótipo tumoral através dessas vias de sinalização celular identificadas por meio de novos exames de biologia molecular, foi possível refinar o diagnóstico do *NSCLC* e, assim, ampliar o armamentário clínico capaz de impedir a progressão tumoral em inúmeros subtipos de neoplasias, sobretudo nos tumores não-escamosos. Essas ferramentas moleculares foram inicialmente exploradas por *Sanger et al.* (1977) com o sequenciamento direto do ácido desoxirribonucléico (*DNA*), seguido por métodos de reação em cadeia da polimerase (*PCR*) e do uso de enzimas de clivagem do material genético em pontos específicos (como o polimorfismo de comprimento de fragmentos de *DNA* - *RFLP*), atingindo-se hoje tecnologias capazes de sequenciar praticamente todo o *DNA* tumoral, sendo possível identificar desde defeitos genéticos pontuais até a presença de grandes lotes genômicos aberrantes com a técnica de *Next Generation Sequencing* – os chamados painéis *NGS* (LOPES *et al.*, 2015).

Esse conhecimento genômico permitiu o desenvolvimento das terapias alvo-moleculares com os inibidores de tirosina-quinase (*TKI*), trazendo benefícios em múltiplos desfechos oncológicos quando comparados à quimioterapia convencional, como representado na Tabela 5. Como observado em recentes ensaios clínicos, fármacos anti-*ALK* e anti-*EGFR* de 3ª geração, como o lorlatinibe e o osimertinibe respectivamente, atingiram taxas de resposta objetiva (*ORR*) em torno de 76% a 80%, medianas de duração de resposta (*DOR*) que superam os 17 meses, índices de *PFS* em torno de 80% em 12 meses e de *OS* em torno de 90% em 12 meses (CAMIDGE *et al.*, 2021; DRILON *et al.*, 2020; MOK *et al.*, 2009, 2017; PAIK *et al.*, 2020; PETERS *et al.*, 2017; PLANCHARD *et al.*, 2017; ROSELL *et al.*, 2012; SHAW *et al.*, 2014, 2020; SKOULIDIS *et al.*, 2021; SORIA *et al.*, 2018; WOLF *et al.*, 2020).

Tabela 5 – Comparação dos desfechos oncológicos entre quimioterapia convencional baseada em *doublets* de platina e inibidores de tirosina-quinase, nos cenários de tratamento de 1ª e 2ª linha em *mNSCLC* não-escamoso com mutações condutoras conhecidas.

Tratamento	Desfechos em 1ª linha			
	ORR	DOR	PFS	HR
Quimioterapia ^a	20%	7,8	5	-
Gefitinibe	71%	8,3	9,6	0,74
Erlotinibe	71%	8	9,7	0,37
Osimertinibe	80%	17,2	18,9	0,46
Alectinibe	83%	33,1	34,8	0,43
Brigatinibe	71%	33,2	24	0,49
Lorlatinibe	76%	NR	NR	0,28
Crizotinibe ^b	72%	17,6	19,2	NA
Sotorasibe	37%	11,1	6,8	NA
Dabrafenibe + Trametinibe	64%	15,2	14,6	NA
Selpercatinibe	85%	17,5	16,5	NA
Tepotinibe	56%	11,1	8,5	NA
Capmatinibe	68%	12,6	12,4	NA

Legenda: a: braço comparador com Quimioterapia em *doublet* de platina; b: Crizotinibe em 1ª linha para pacientes com *mNSCLC* portadores de fusão em *ROS1*; ORR: Taxa de resposta objetiva; DOR: mediana de duração de resposta (em meses); PFS: mediana de sobrevida livre de progressão (em meses); HR: taxa de risco em estudos randomizados; NR: *not reached* (mediana não atingida); NA: *not available* (indisponível).

Fonte: o próprio autor

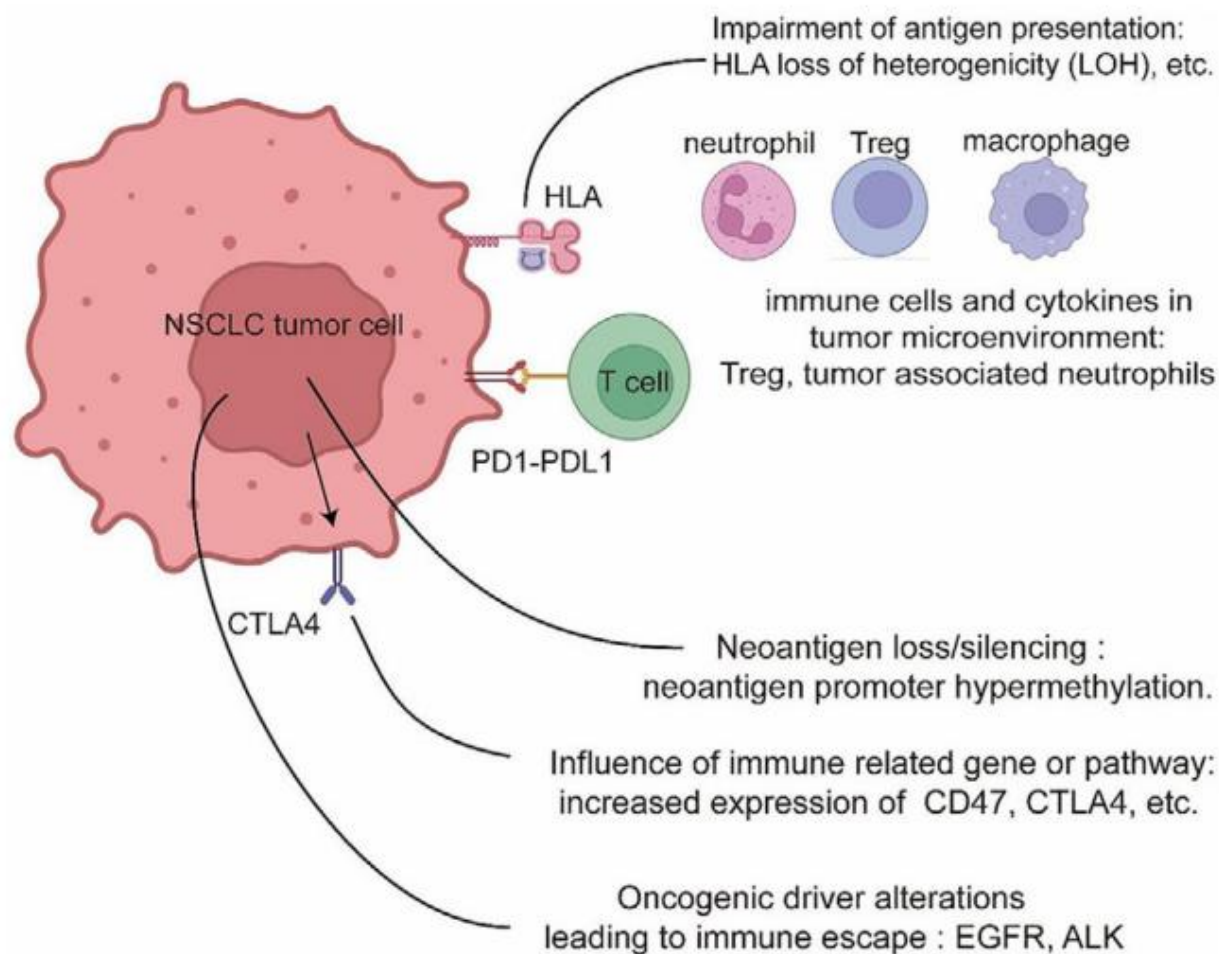
Mecanismos de escape imunológico também são considerados *Hallmarks* do câncer e vêm chamando a atenção na área de *NSCLC* nos últimos 10 anos. Uma etapa crucial e até mais precoce dessa via de sinapses celulares, é a apresentação neoantigênica, que pode ocorrer por meio de algumas células apresentadoras de antígenos, especialmente as células dendríticas, podendo haver ainda a mediação dessa apresentação de epítomos tumorais por meio da hipermetilação da região do antígeno humano leucocitário de classe 1 (*HLA-1*) no cromossomo 6. A *downregulation* ou perda subclonal da heterozigiosidade de um

dos alelos de um dos 3 genes do *HLA* (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) pode resultar na redução da apresentação de peptídeos intra-celulares ao receptor de célula T e, conseqüentemente, na redução dos linfócitos infiltrantes tumorais (*TILs*), o que leva, portanto, à facilitação da evasão imune no câncer de pulmão. Tal evento genético pode ser identificado até bem precocemente nas neoplasias pulmonares, com polimorfismos que levam à perda da expressão de *HLA* em até 40% dos pacientes com *NSCLC* iniciais, escamosos e não-escamosos (MCGRANAHAN *et al.*, 2017).

Por serem capazes de promover a inibição da resposta celular anti-tumoral eficaz, os receptores inibitórios ou *immune checkpoints* presentes em linfócitos T [como a proteína-4 associada ao linfócito T citotóxico (*CTLA-4*), a proteína de morte celular programada 1 (*PD1*), os co-receptores *B7* e *CD28* e os ligantes do *PD1* (o *PDL-1* e o *PDL-2*)] inibem os mecanismos de reconhecimento antigênico, necessários para que ocorra a atividade citotóxica contra as células neoplásicas (FREEMAN *et al.*, 2000; KEIR *et al.*, 2008). O funcionamento normal dessa via de *checkpoints* na resposta imune objetiva regular as respostas imunológicas dos linfócitos através da distribuição de sinais modulatórios negativos para os linfócitos T. Portanto, a superexpressão de *CTLA-4* e de *PD1/PDL-1* em células tumorais exerce o mesmo papel; inibindo-se a capacidade infiltrativa e funcional dessas células, geram-se desertos imunológicos que favorecem a progressão tumoral (DONG *et al.*, 2002; VESELY *et al.*, 2011).

Outras vias biológicas também vêm sendo implicadas como vias de escape imune, como a seleção de células neoplásicas com altas cargas mutacionais, o silenciamento epigenético, a hipermetilação promotora de neoantígenos, alterações em *oncogenic drivers*, *upregulation* de genes capazes de promover a imunossupressão do microambiente tumoral (como o *CD47*, *B7-H3*, *CTLA-4*, *TIGIT*, *IDO-1* e o *CD276*), alteração de células imunes efetoras (como linfócitos Treg e células mielóides, disfunção ou exaustão de monócitos CD16+, células T, células *Natural-Killer* e de células dendríticas CD141+), aumento de citocinas inibitórias [como a granzima-B, interleucina-10, interleucina-6, interferon-gama (*IFN-γ*), citocinas TH1 e perforina-1, capazes de reduzir a presença de células T e NK, ou pelo aumento de citocinas TH2, de macrófagos M0 imunossupressores e de neutrófilos tumor-associados] e inúmeros outros mecanismos, como exemplificado na Figura 14 (ANICHINI *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022).

Figura 14 – Mecanismos de escape imune em NSCLC.



Legenda: ALK: anaplastic lymphoma kinase; CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; EGFR: epidermal growth factor receptor; HLA: human leukocyte antigen; NSCLC: non-small cell lung cancer; PD1: programmed cell death protein 1; PDL-1: programmed death-ligand 1; Treg: regulatory T cell.

Fonte: CHEN *et al.*, 2022

A modulação da resposta imune no *mNSCLC* sem mutações condutoras conhecidas por meio da inibição da sinapse entre o *PD1* e *PDL-1* vem sendo demonstrada sucessivamente em novos ensaios clínicos prospectivos randomizados controlados, inicialmente no cenário de terapia de 2ª linha, favorecendo a imunoterapia isolada quando comparada à quimioterapia com docetaxel. Neste contexto, esperavam-se tradicionalmente uma *ORR* em torno de 12% a 14% e uma mediana de *OS* de 8 a 9 meses, atingindo-se então uma *ORR* de cerca de 20% e uma mediana de *OS* de 14 a 15 meses com a terapia anti-*PD1*, observando-se ainda um incremento absoluto de 11% em *PFS* em 1 ano, com todos os

desfechos atingindo significância estatística (BORGHAEI *et al.*, 2015; BRAHMER *et al.*, 2015; HERBST *et al.*, 2016; RITTMEYER *et al.*, 2017).

Tal fato motivou o desenho de novos estudos de fase III para o tratamento de 1ª linha do *mNSCLC*, para responder se seria possível maximizar o potencial imunogênico dessa estratégia através dos efeitos citotóxicos da combinação da imunoterapia anti-*PD1* à quimioterapia convencional, tais como o aumento da apresentação de antígenos às células dendríticas após a destruição das células neoplásicas, a inibição de células mielóides supressoras e o aumento da relação entre células T citotóxicas e células T regulatórias (BRACCI *et al.*, 2014; ROSELLI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

A disponibilização à comunidade médica dos inibidores de *immune checkpoints*, como o pembrolizumab, o atezolizumab, o cemiplimab, o durvalumab, o nivolumab e o ipilimumab, sejam em monoterapia ou em associações a outros anti-neoplásicos, permitiu a otimização de praticamente todos os desfechos oncológicos nesse contexto de tratamento de 1ª linha, elevando-se a *ORR* de 19% a 25% para 38% a 47% (chegando até 67% no subgrupo de pacientes hiper-expressores para o *PDL-1*), alcançando-se medianas de *OS* superiores a 30 meses, conforme demonstrado na Tabela 6. Com isso, houve mudanças no manejo clínico cotidiano desses pacientes na última década após as sucessivas publicações nesse tema, independente do cenário histológico em *mNSCLC* ou da expressão imunohistoquímica do *PDL-1* (GANDHI *et al.*, 2018; HELLMANN *et al.*, 2019; LANGER *et al.*, 2016; MOK *et al.*, 2019; PAZ-ARES *et al.*, 2018; PAZ-ARES *et al.*, 2021; RECK *et al.*, 2016; SEZER *et al.*, 2021; SOCINSKI *et al.*, 2018).

Tabela 6 – Comparação dos desfechos oncológicos entre quimioterapia convencional baseada em *doublets* de platina e imunoterapia anti-PD1, no cenário de tratamento de 1ª linha de *mNSCLC* não-escamoso sem mutações condutoras conhecidas.

Tratamento	Desfechos em 1ª linha				
	ORR	DOR	PFS	OS	HR
Quimioterapia ^a	20%	7,8	5	11,3	-
CM 227	35,9%	23,2	5,1	17,1	NA
CM 9LA	38,2%	11,3	6,7	17	0,66
IMpower-130	49,2%	8,4	7	18,6	0,64
IMpower-150	63,5	9	8,3	19,2	0,62
KN-42 ^b	27,5%	8,3	5,4	16,7	0,81
KN-42 ^c	39,7%	10,8	6,1	20	0,69
KN-24	44,8%	NR	10,3	30	0,50
KN-189 ^d	47,6%	12,4	8,8	NR	0,49
KN-189 ^e	61,4%	15,1	11,1	NR	0,42
EMPOWER-Lung 1	39%	16,7	8,2	NR	0,57

Legenda: a: braço comparador com Quimioterapia em *doublet* de platina; b: análise do braço de *PDL-1* com *TPS* 1% a 49%; c: análise do braço de *PDL-1* com *TPS* \geq 50%; d: análise dos pacientes *PDL-1* “*all comers*”; e: análise do braço de *PDL-1* com *TPS* \geq 50%; f: análise da população *ITT* (*intention-to-treat*); *ORR*: Taxa de resposta objetiva; *DOR*: mediana de duração de resposta (em meses); *PFS*: mediana de sobrevida livre de progressão (em meses); *OS*: mediana de sobrevida global (em meses); *HR*: taxa de risco em estudos randomizados; *NR*: *not reached* (mediana não atingida); *NA*: *not available* (indisponível).

Fonte: o próprio autor

Tendo em vista que a base de dados genômicos em câncer de pulmão cresce a cada ano no mundo, é de grande interesse médico que essas populações sejam reconhecidas também no âmbito nacional e regional. Em nosso país, recentemente, tivemos dados bem discrepantes quanto à prevalência conhecida de mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e na expressão do *PDL-1* num estudo retrospectivo com a experiência do grupo do Hospital do Câncer de Barretos, com análise de

amostras de 302 pacientes, comparado ao apresentado nos últimos estudos multicêntricos internacionais (PINTO *et al.*, 2022).

Infelizmente não temos ainda à disposição os dados comparativos das peculiaridades genômicas do Estado do PR, nem ao menos das suas 2 cidades mais populosas (Londrina e a capital Curitiba). Por isso, a análise dessas informações regionais de biologia molecular justifica-se a fim de que se possa conhecer a frequência das variantes genômicas e fazer comparações diretas e indiretas dos pacientes inseridos nos diferentes subgrupos de *NSCLC*, especialmente na população não-escamosa, sendo promissora a individualização dos próprios testes moleculares hoje já disponíveis no Brasil, assim como a personalização do tratamento do câncer de pulmão nos cenários peri-operatório e paliativo.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo é correlacionar as variantes genômicas e os marcadores clínico-patológicos de biópsias de pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células não-escamoso de 3 centros oncológicos oriundos de 2 cidades populosas do Estado do PR (Londrina e Curitiba), e compará-lo ao perfil genômico mundial disponível no *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*.

Como objetivos específicos e exploratórios desse estudo, almeja-se:

- a) Traçar o perfil clínico-patológico da população estudada;
- b) Realizar estudo de bioinformática do perfil mutacional obtido através de ferramentas de predição, para análise dos principais processos celulares, vias de sinalização e interações entre as mutações expressas nesta população, envolvidos nesse tipo de câncer de pulmão;
- c) Determinar o perfil genômico mutacional quali e quantitativo das amostras estudadas, compará-lo com a base de dados mundial disponível no *TCGA* e investigar a sua correlação com as variantes genômicas observadas;
- d) Identificar uma possível assinatura mutacional genômica na amostra estudada.

3 METODOLOGIA

Este é um estudo longitudinal retrospectivo observacional, com informações médicas de pacientes com o diagnóstico de *NSCLC* não-escamoso atendidos no período de abril de 2018 a abril de 2023 em 3 centros oncológicos das cidades de Londrina e Curitiba no Estado do PR: Clínica ProOnco – OncoClínicas Londrina, Clínica CIONC (Centro Integrado de Oncologia de Curitiba) e no Departamento de Oncologia do Hospital de Clínicas da UFPR (Universidade Federal do Paraná) (Apêndice A). Portanto, foram incluídos pacientes com confirmação clínica e histológica, isto é, anátomo-patológica (AP) e imuno-histoquímica (IHQ) de carcinoma de origem pulmonar, seja no cenário de tratamento definitivo loco-regional para o câncer (com ou sem o uso de terapia sistêmica adjuvante) seja no cenário de tratamento de 1ª linha onde, portanto, os pacientes ainda não deveriam ter recebido nenhuma modalidade de terapias sistêmicas para o tratamento da doença metastática.

O recrutamento das informações clínicas para o estudo foi obtido por meio de coleta de dados de prontuário num período de 11 meses, de junho de 2022 a abril de 2023. Foram recrutados consecutivamente para o estudo: 103 pacientes da clínica ProOnco – OncoClínicas Londrina, 20 pacientes da clínica CIONC e 10 pacientes do Hospital de Clínicas da UFPR, totalizando uma casuística de 133 pacientes.

Esta proposta foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CAAE 22943019.1.0000.0107 – Anexo A), e os pacientes vivos ou responsáveis legais de pacientes falecidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta dos dados e receberam o Termo de Confidencialidade e Sigilo assinado pelo investigador principal (Apêndices B e C).

Como esse trabalho científico tratou da avaliação, interpretação e processamento de dados clínicos de prontuários, a política de financiamento do estudo resumiu-se apenas aos custos da sua análise estatística, provisionados por meios próprio do investigador principal, totalizando cerca de R\$ 1.700,00.

Os genes de maior interesse incluídos nesse estudo encontram-se pormenorizados no Apêndice D. As informações moleculares dos pacientes foram obtidas diretamente dos laudos dos exames genômicos, não tendo sido feito nenhum tipo de curadoria adicional a partir dos resultados encontrados.

Foram incluídos no estudo laudos de expressão IHQ do *PDL-1* e plataformas genômicas comercialmente disponíveis, com as seguintes metodologias:

1. Gene *ALK*: exame imunohistoquímico com o kit *Ventana BenchMark* (Roche) – clone D5F3 CDx assay;
2. Gene *EGFR*: *real-time PCR* (Cobas, Roche) e Pirosequenciamento (método *QI Agen Pyro Mark Q24* – Laboratório Mantis de Curitiba);
3. Painel de sequenciamento de mutações acionáveis do setor de Patologia molecular do Hospital AC Camargo – *NGS/PCR multiplex* dos genes *KRAS*, *NRAS*, *EGFR* e *BRAF*: plataforma *Torrent Suite Software* e *CLC Genomics Workbench*;
4. Painel “Oncobásico” de mutações somáticas: *NGS* dos genes *KRAS*, *NRAS*, *EGFR* e *BRAF* (*Software Ion Reporter, Life Technologies*);
5. *Foundation One CDx*: painel *NGS* da *Foundation Medicine* que contempla um total de 333 genes, sendo 315 genes relacionados ao câncer e 28 íntrons de genes que representam rearranjos e fusões, além da determinação da carga mutacional tumoral (*Tumor Mutational Burden*) e da avaliação somática de Instabilidade Microsatélite (*MSI*);
6. *PDL-1*: exame imunohistoquímico com os kits *Dako Autostainer Link 48* (clone 22C3 *pharmDx*) e *Ventana BenchMark* (Roche - clone SP263), com a quantificação da expressão da proteína feita através do *Tumor Proportion Score (TPS)*.

Foram utilizados como critérios de inclusão do estudo: pacientes com idade superior a 18 anos com diagnóstico anátomo-patológico e imunohistoquímico confirmado de carcinoma de pulmão do tipo não-pequenas células não-escamoso; avaliação da expressão tecidual de *PDL-1* por *TPS* (clones aceitos para a análise: 22C3, 28-8 e SP263); avaliação molecular somática do tumor; diagnóstico de doença loco-regional passível de tratamento potencialmente curativo ou de doença metastática mensurável nas imagens de estadiamento por *Response Evaluation Criteria In Solid Tumours (RECIST)* versão 1.1 e que não tenha recebido nenhuma terapia sistêmica previamente.

Foram utilizados como critérios de exclusão do estudo: diagnóstico histológico de *SCLC*; diagnóstico histológico de *NSCLC* escamoso; cenário de tratamento de 2ª linha ou de linhas subsequentes; avaliação da expressão tecidual de *PDL-1* com outro clone, como o SP142; não ter realizado avaliação IHQ; não ter realizado avaliação molecular.

Como política de tabulação, armazenamento e gerenciamento dos dados clínicos, anátomo-patológicos e moleculares dos pacientes, foi utilizada a planilha do Microsoft Excel®, sendo então possível traçar quais as correlações seriam tecnicamente possíveis, assim como quais as análises estatísticas seriam relevantes para o perfil identificado neste subgrupo de pacientes. As informações dos prontuários foram obtidas através de um instrumento de coleta de dados sistematizado (Apêndice E), tendo sido feita a investigação com os seguintes itens: idade ao diagnóstico; sexo; peso, altura e cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) ao diagnóstico; histórico de tabagismo (sim vs não; e se sim, foi feito o cálculo da carga tabágica em anos/maço); subtipo histológico; expressão IHQ de *PDL-1* por *TPS*; achados dos exames moleculares, descrevendo também o *Tumor Mutational Burden (TMB)* e o *Microsatellite Instability (MSI)* caso presentes nos laudos; estadiamento inicial ao diagnóstico segundo a classificação *TNM (Tumor Node Metastasis)* e a 7ª e 8ª edições da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, classificando os pacientes como “doença loco-regional” ou “doença metastática”; uso de terapias adjuvantes (sim vs não; e se sim, descrever qual foi o tratamento) e uso de terapia sistêmica para o tratamento de 1ª linha da doença metastática (sim vs não; e se sim, descrever qual foi o tratamento).

A fim de melhor caracterizar as variáveis obtidas das avaliações clínico-patológicas e moleculares, utilizaram-se os seguintes *cutoffs*:

1. *Status* de expressão de *PDL-1* por *Tumor Proportion Score*: negativo se *TPS* < 1%, hipo-expressores ou expressão moderada se *TPS* entre 1% e 49% e hiper-expressores se *TPS* ≥ 50% (GARON *et al.*, 2015; HERBST *et al.*, 2016; LANGER *et al.*, 2016; GANDHI *et al.*, 2018);
2. *Tumor Mutational Burden*: alto se *TMB* ≥ 10 Mutações/Megabase ou baixo se *TMB* < 10 Mutações/Megabase (MARABELLE *et al.*, 2020);
3. *Status* Microssatélite: estável ou instável (MARABELLE *et al.*, 2019);
4. Perfil da expressão gênica dividido em categorias numerais de 0 a 4: 0 (indivíduo em que não foi observada nenhuma mutação nos genes listados), 1 (proliferação), 2 (reparo), 3 (inflamação e resposta imune) e 4 (oncogênese);
5. Idade: faixas de progressão etária a cada 10 anos (SIEGEL *et al.*, 2015);
6. Carga tabágica: alta se > 10 anos/maço ou baixa se ≤ 10 anos/maço (MOK *et al.*, 2009);

7. Índice de Massa Corporal: abaixo do peso se $IMC < 18,5$, peso normal ou eutrófico se IMC entre 18,5 e 24,9, sobrepeso se IMC entre 25 e 29,9, obesidade grau I se IMC entre 30 e 34,9, obesidade grau II se IMC entre 35 e 39,9 e obesidade grau III ou obesidade mórbida se $IMC \geq 40$ (BHASKARAN *et al.*, 2014; DEWI *et al.*, 2016; RENEHAN *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2013).

Para a análise funcional das informações anátomo-clínicas e genômicas das amostras foi realizado estudo *in silico* do grupo de genes sequenciados nessa população, utilizando-se o software *Funrich* 3.1 (disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201400515>) . A análise funcional incluiu a identificação da sua localização celular, processos biológicos, vias de sinalização, Interactoma gênico e perfil de expressão tecidual.

Para a obtenção do perfil de mutação dos genes da população mundial utilizou-se a base de dados do *The Cancer Genome Atlas - TCGA*: para fins comparativos, foram obtidos dados de pacientes portadores de câncer de pulmão (adenocarcinoma, $n=517$ e carcinoma de pequenas células, $n = 485$, total de 1.002 pacientes) referentes à frequência média (%) de mutação dos mesmos genes sequenciados na população de pacientes de Londrina-Curitiba/PR, utilizando-se a ferramenta *TIMER* 2.0 (disponível em: <http://timer.cistrome.org/>) - módulo de mutação gênica.

Para as análises estatísticas, a comparação do perfil dos genes e da carga mutacional entre as amostras de Londrina e Curitiba/PR e do *TCGA* foi realizada através de *Two-way ANOVA*. A frequência comparativa dos genes entre os dois perfis, para obtenção dos genes *up* e *down*-regulados, foi obtida a partir dos genes com *foldchange* maior ou igual a 2 (para obtenção dessa razão de expressão relativa entre os genes foi considerado um grau de significância de $p < 0,05$, segundo o teste t de Mann-Whitney). O perfil de correlação entre os genes das amostras de Londrina-Curitiba/PR foi analisado através da correlação de Spearman. Todas as análises utilizaram o software *GraphPad Prism* 9.0 (EUA), considerando-se como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

A partir dos dados obtidos e devidamente tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel®, também foi realizada a caracterização da amostra por meio de estatística descritiva e do teste de Qui-Quadrado para aderência, a fim de verificar as diferenças estatísticas significativas entre as categorias de cada variável. Algumas

informações clínicas não foram possíveis ser descritas no estudo por indisponibilidade de alguns prontuários físicos, alterando o n amostral final de algumas subanálises (como tabagismo, carga tabágica e o estadiamento clínico ou patológico inicial).

Foram realizados testes de Qui-Quadrado de independência, a fim de verificar a associação entre o estágio inicial da doença [loco-regional (LR) ou metastática (M1)], do tratamento adjuvante e do tratamento de 1ª linha, todos em relação às seguintes variáveis: *Status* Microssatélite, *PDL-1*, número de genes mutados e subtipo histológico. Foi realizado um Teste Exato de Fisher para verificar as significâncias positivas e negativas dentro de cada variável.

Para o teste de Correlação de Pearson, foi utilizado como critério aqueles genes que apresentaram mutações em mais de 15 indivíduos. Desta forma os resultados se apresentaram com mais clareza, já que utilizar todos os genes diminuiria drasticamente a visualização dos dados, bem como as suas significâncias. O teste foi realizado com o objetivo de verificar a correlação dos genes em relação aos estágios iniciais da doença. Os mesmos genes foram submetidos à Análise de Correspondência, para que fosse verificado quanto esses genes influenciam num possível diagnóstico molecular do câncer estudado.

Devido ao grande número de pacientes que apresentaram resultado indeterminado ou inconclusivo, especialmente para as variáveis *TMB* e *Status* microssatélite, foi considerada a necessidade de refinamento das informações para, assim, aumentar a relevância dos achados do presente estudo do ponto de vista de aplicabilidade clínica dos resultados. Portanto, foi realizada uma segunda análise estatística eliminando-se os dados considerados como “*undetermined*”, efetuando-se também o cálculo do novo p-valor. As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico *XLSTAT*, versão anual 2017.19.02 (ADDINSOFT, 2018), sendo que em todas as análises assumiu-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES DA AMOSTRA LONDRINA-CURITIBA/PR:

Foram analisadas as informações de 133 pacientes, totalizando a amostra oriunda dos 3 centros oncológicos das cidades paranaenses selecionadas para o estudo, cuja representação demográfica encontra-se na Tabela 7. A partir da realização da análise estatística descritiva dos dados, observou-se que a maior parte dos pacientes avaliados nesta pesquisa tem mais de 60 anos, havendo 40 indivíduos na faixa entre 60 e 69 anos (30,08% da amostra) e 42 indivíduos na faixa entre 70 e 79 anos (31,58% da amostra) ($p < 0,0001$). Com relação ao gênero, 57% dos indivíduos analisados é do sexo feminino ($n = 76$) e cerca de 43% é do sexo masculino ($n = 57$) ($p = 0,083$).

Constatou-se que 52,94% dos pacientes são tabagistas, e que 46,16% deles possuem uma carga tabágica acima de 10 anos/maço (considerados, portanto, indivíduos com alta carga tabágica), porém não houve diferença estatisticamente significativa para essa variável ($p = 0,513$). Em geral, os pacientes não se apresentaram como obesos no momento da coleta de dados, havendo 51,33% da amostra com peso normal ($n = 58$;) e 37,17% com sobrepeso ($n = 42$), de acordo com o cálculo de seu IMC ($p < 0,0001$).

O subtipo histológico predominante foi o adenocarcinoma, compondo praticamente 98% da amostra ($p < 0,0001$); foram identificados apenas 2 casos de carcinoma de grandes células e 1 caso de tumor misto, cuja confirmação da histologia adenoescamosa foi finalizada apenas após uma nova revisão anátomo-patológica local, já transcorrido o período de inclusão inicial dos pacientes durante a tabulação dos dados do estudo.

Tabela 7 – Características dos pacientes da amostra Londrina-Curitiba/PR, com as frequências absolutas e frequências relativas das variáveis qualitativas dos indivíduos, excluindo-se os pacientes com resultados indeterminados e inconclusivos.

Variável	Categorias	FA	FR%	p-valor
Idade	Até 49 anos	10	7,52	
	De 50 a 59 anos	22	16,54	
	De 60 a 69 anos	40	30,08	
	De 70 a 79 anos	42	31,58	
	Acima de 80 anos	19	14,29	< 0,0001
Sexo	Feminino	76	57,14	
	Masculino	57	42,86	0,083
Tabagismo	Não	56	47,06	
	Sim	63	52,94	0,582
Carga Tabágica	≤ 10 anos/maço	63	53,84	
	> 10 anos/maço	54	46,16	0,513
IMC	Abaixo do peso	5	4,42	
	Peso normal	58	51,33	
	Sobrepeso	42	37,17	
	Obesidade grau I	3	2,65	
	Obesidade grau II	5	4,42	
	Obesidade grau III	0	0,00	< 0,0001
Subtipo histológico	Adenocarcinoma	130	97,75	
	Carcinoma Adenoescamoso	1	0,75	
	Carcinoma de Grandes Células não-escamoso	2	1,50	< 0,0001
Estadiamento inicial	Doença LR	31	25,62	
	Doença M1	90	74,38	< 0,0001

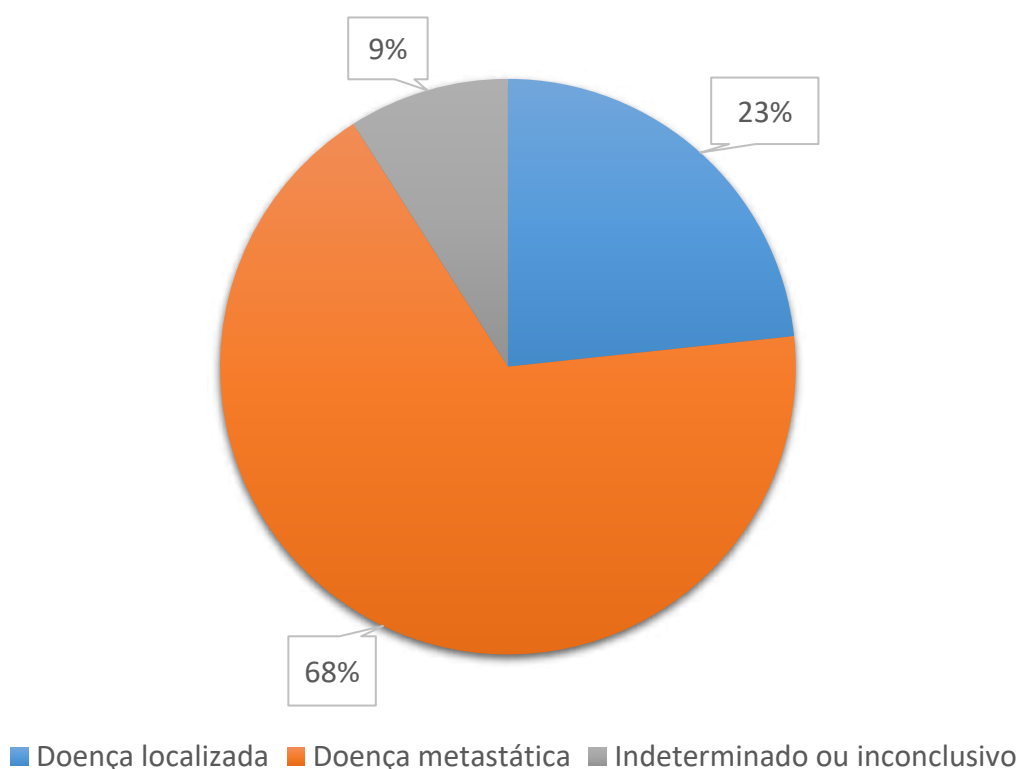
Legenda: FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas; LR: Doença loco-regional; M1: Doença metastática; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

Em relação ao estadiamento *TNM* no momento do diagnóstico, não foi possível obter as informações de estadiamento no prontuário de 12 pacientes (9% da amostra). Identificou-se que 90 pacientes tinham doença metastática (67,7% da amostra global ou 74,3% dos pacientes com acesso a essas informações nos prontuários) e que 31 pacientes tinham doença localizada ou loco-regional (23% da amostra global ou 25,6% dos prontuários disponíveis) (Figuras 15 e 16). Após a realização dos testes de associação relacionados ao estadio inicial da doença, não foi verificada associação significativa para nenhuma das variáveis, e não foi possível calcular o p-valor para o *Status* microssatélite por haver apenas uma categoria para essa variável nesta análise (Apêndice H).

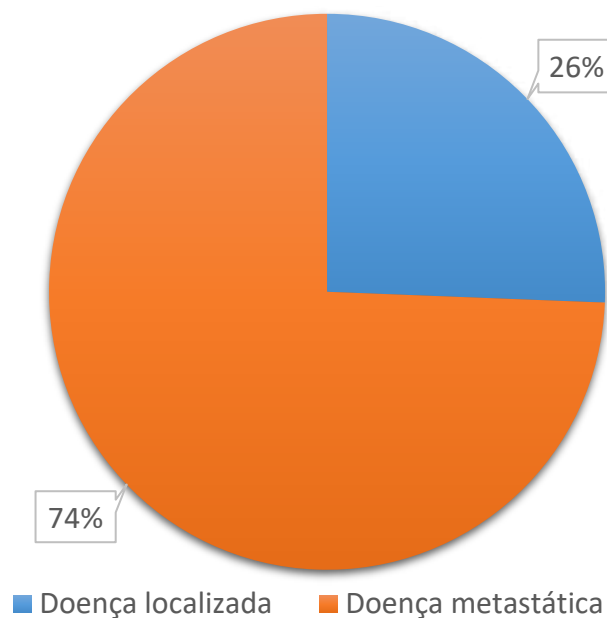
Na população de doença avançada, 5,5% dos pacientes não receberam o tratamento sistêmico de 1ª linha conforme planejado, seja por óbito precoce ou por encaminhamento para cuidados paliativos; já na população operada ou submetida à radioterapia (doença LR), 25 dos 31 pacientes receberam alguma modalidade de terapia sistêmica adjuvante, correspondendo a 80% desse subgrupo de indivíduos. A Figura 17 ilustra a distribuição global dos pacientes segundo a intenção de tratamento.

Figura 15 – Gráfico de distribuição dos pacientes segundo o estadiamento *TNM* do câncer de pulmão ao diagnóstico, na população geral da amostra Londrina-Curitiba/PR.



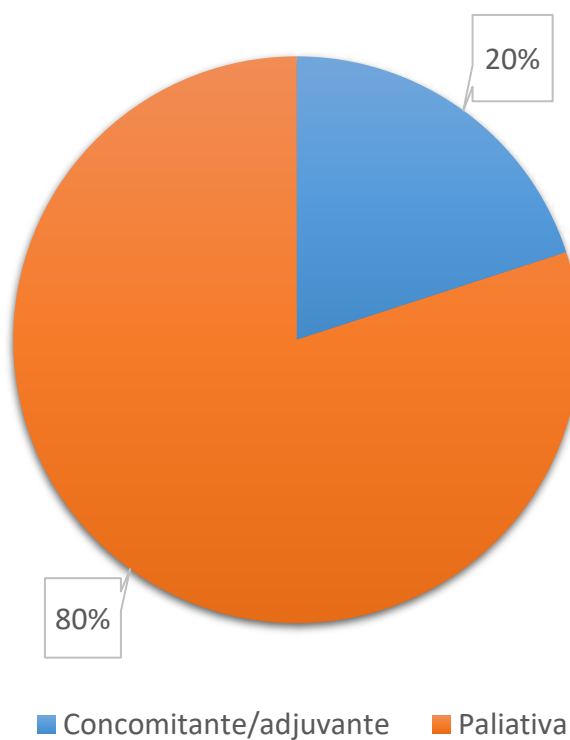
Fonte: o próprio autor

Figura 16 – Gráfico de distribuição dos pacientes segundo o estadiamento *TNM* do câncer de pulmão ao diagnóstico da amostra Londrina-Curitiba/PR, excluindo-se os pacientes com resultados indeterminados e inconclusivos.



Fonte: o próprio autor

Figura 17 – Gráfico de distribuição da modalidade de terapia sistêmica segundo a intenção de tratamento, na amostra Londrina-Curitiba/PR.



Fonte: o próprio autor

4.2 VARIANTES GENÔMICAS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES DE LONDRINA-CURITIBA/PR – CARACTERÍSTICAS E CORRELAÇÕES:

A informações genômicas das amostras dos pacientes de Londrina-Curitiba/PR estão discriminadas a seguir e foram obtidas a partir dos laudos de exames de biologia molecular. Importante destacar que 78 dos 133 pacientes fizeram a suas avaliações moleculares por meio de painel *NGS* da plataforma *Foundation One CDx*, compondo, portanto, 59% do total de exames da amostra desse estudo. Foram encontrados ainda 76 genes mutados considerados pouco prevalentes nessa casuística (< 5% incidência nos laudos), habitualmente encontrados em exames de 1 único paciente e que, portanto, não serão ilustrados a seguir.

As variantes genômicas dos indivíduos, ou seja, as mutações condutoras e as co-mutações dos genes sequenciados na população de Londrina-Curitiba/PR, estão resumidas na Tabela 8 e na Figura 19. Na Tabela 8 estão contidas as informações de frequências absolutas e relativas de todas as principais mutações identificadas na amostra, estabelecido aqui para a representação gráfica um *cutoff* de pelo menos 5% de prevalência. Além disso, pelo especial interesse clínico devido à disponibilidade atual de estratégias de terapias alvo-moleculares ou de imunoterapias, destacamos alguns genes que também foram incluídas nessa etapa mais discriminativa, como o *KEAP1*, *STK11*, *PIK3CA*, *SMARCA4*, *BRAF V600E*, *MET*, *RET* e o *ROS1*.

Já na Figura 18, encontra-se o gráfico com a distribuição das consideradas principais mutações condutoras de relevância clínica para tomada de condutas no cotidiano do médico oncologista na amostra Londrina-Curitiba/PR.

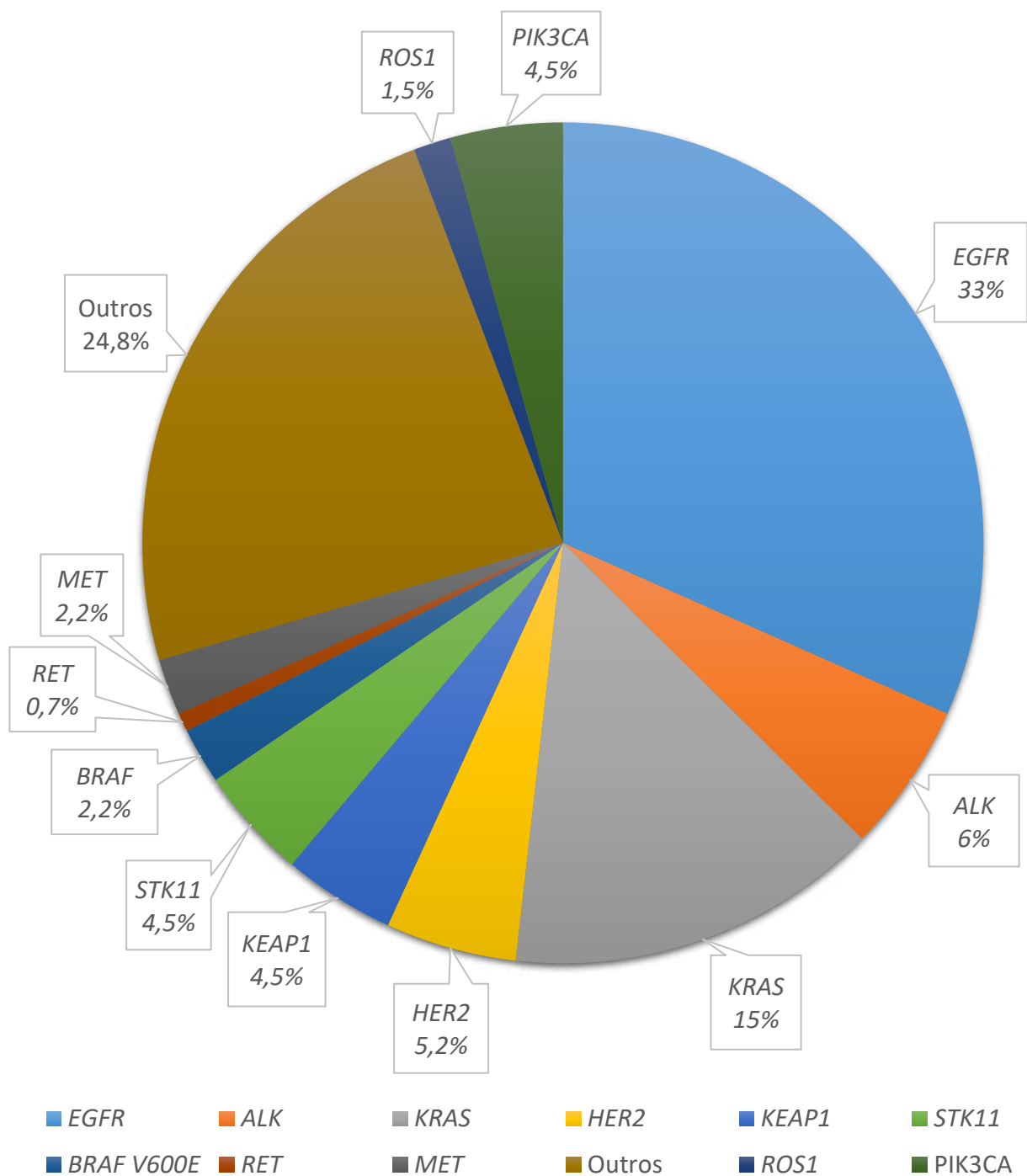
Tabela 8 – Frequências absolutas e frequências relativas em relação às variantes genômicas encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR.

Variante genômica	FA	FR%
<i>TP53</i>	46	34,5% e 59% ^a
<i>EGFR</i>	44	33%
<i>KRAS</i>	20	15%
<i>CDKN2A/B</i>	19	14,2%
<i>MTAP</i>	16	12%
<i>MYC</i>	10	7,5%
<i>CTNNB1</i>	10	7,5%
<i>DNMT3A</i>	9	6,7%
<i>ALK</i>	8	6%
<i>CDK4</i>	8	6%
<i>RBM10</i>	8	6%
<i>NF1</i>	7	5,2%
<i>HER2</i>	7	5,2%
<i>KEAP1</i>	6	4,5%
<i>STK11</i>	6	4,5%
<i>PIK3CA</i>	6	4,5%
<i>SMARCA4</i>	4	3%
<i>BRAF V600E</i>	3	2,2%
<i>MET</i>	3	2,2%
<i>ROS1</i>	2	1,5%
<i>RET</i>	1	0,7%
<i>NTRK</i>	0	0%

Legenda: a: as mutações em *TP53* representaram 34,5% de toda a amostra, porém quando considerados apenas os pacientes que realizaram sua análise genômica através da plataforma *Foundation One CDx* essas representaram 59% dos indivíduos; FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas.

Fonte: o próprio autor

Figura 18 – Gráfico com a distribuição das principais variantes genômicas de interesse clínico encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR.



Fonte: o próprio autor

Foi realizada uma comparação direta entre a incidência (frequências relativas) observada das variantes genômicas encontradas nas amostras de Londrina-Curitiba/PR com os dados disponíveis na literatura mundial e nacional, respectivamente representadas nas Tabelas 9 e 10 (AWAYA *et al.*, 2004; CAMIDGE *et al.*, 2021; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; CHEN *et al.*, 2022; DEARDEN *et al.*, 2013; DRILON *et al.*, 2020; JORDAN *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2022; MOGI *et al.*, 2011; MOK *et al.*, 2009; PAIK *et al.*, 2020; PLANCHARD *et al.*, 2017; ROSELL *et al.*, 2012; SHAW *et al.*, 2014; SKOULIDIS *et al.*, 2018; SKOULIDIS; HEYMACH, 2019; TAM *et al.*, 2013; WEST *et al.*, 2022; WOLF *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2017).

Tabela 9 – Frequências relativas das principais variantes genômicas encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura mundial.

Variante genômica	FR% - LDN-CBA	FR% - pop. mundial	p-valor
<i>TP53</i>	59%	50%	
<i>EGFR</i>	33%	20%	
<i>KRAS</i>	15%	30%	
<i>CDKN2A/B</i>	14,2%	24%	
<i>MTAP</i>	12%	13%	
<i>ALK</i>	6%	5%	
<i>RBM10</i>	6%	6,5%	
<i>HER2</i>	5,2%	3%	0,0134
<i>KEAP1</i>	4,5%	16%	
<i>STK11</i>	4,5%	16%	
<i>PIK3CA</i>	4,5%	5%	
<i>SMARCA4</i>	3%	5%	
<i>BRAF V600E</i>	2,2%	2,5%	
<i>MET</i>	2,2%	3,5%	
<i>ROS1</i>	1,5%	1%	
<i>RET</i>	0,7%	1,5%	

Legenda: FR% - LDN-CBA: frequências relativas das amostras dos pacientes de Londrina-Curitiba/PR; FR% - pop mundial: frequências relativas da média das mutações na população mundial, segundos diversos ensaios clínicos; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

Tabela 10 – Frequências relativas das principais variantes genômicas encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura nacional.

Variante genômica	FR% - LDN-CBA	FR% - pop. Brasil	p-valor
<i>TP53</i>	59%	53,6%	
<i>EGFR</i>	33%	22,5%	
<i>KRAS</i>	15%	24,2%	
<i>ALK</i>	6%	5,4%	
<i>HER2</i>	5,2%	4,9%	
<i>STK11</i>	4,5%	11,6%	0,0195
<i>PIK3CA</i>	4,5%	8,8%	
<i>BRAF V600E</i>	2,2%	5,2%	
<i>MET</i>	2,2%	4,7%	
<i>ROS1</i>	1,5%	2,2%	
<i>RET</i>	0,7%	2,4%	

Legenda: FR% - LDN-CBA: frequências relativas das amostras dos pacientes de Londrina-Curitiba/PR; FR% - pop Brasil: frequências relativas (médias) das mutações na população brasileira; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor; MASCARENHAS *et al.*, 2021

A fim de se procurar alguma diferença de expressão das variantes genômicas comparativamente no cenário de doença localizada vs doença metastática, realizou-se a correlação entre os genes mais frequentemente mutados nos indivíduos analisados em relação ao estadio inicial da doença, porém não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os mesmos, denotando a provável natureza troncular dessas alterações genômicas (“*truncal mutations*”) (Tabela 11).

Tabela 11 – Frequências absolutas e frequências relativas nos estadios clínicos da doença ao diagnóstico em relação às variáveis genômicas identificadas.

Variável	Categorias	LR		M1		p-valor
		FA	FR%	FA	FR%	
<i>EGFR</i>	Não	22	70,97	59	65,56	0,581
	Sim	9	29,03	31	34,44	
<i>CDKN2A/B</i>	Não	28	90,32	75	83,33	0,346
	Sim	3	9,68	15	16,67	
<i>TP53</i>	Não	24	77,42	54	60,00	0,081
	Sim	7	22,58	36	40,00	
<i>KRAS-NRAS</i>	Não	27	87,10	74	82,22	0,529
	Sim	4	12,90	16	17,78	
<i>MTAP</i>	Não	28	90,32	78	86,67	0,594
	Sim	3	9,68	12	13,33	

Legenda: FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas; LR: Doença loco-regional; M1: Doença metastática; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Independência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

Ao realizar a análise de correspondência de componentes principais, representado no gráfico simétrico das variáveis em 2 eixos apenas com os genes selecionados de maior prevalência na amostra, foi possível observar a contribuição dos mesmos para um possível diagnóstico, com o objetivo de identificar a existência de uma assinatura gênica mutacional específica nessa população. Com esta análise, pôde-se notar como os principais genes mutados podem ser agrupados, mostrando como um gene pode estar correlacionado com a mutação do outro ou não.

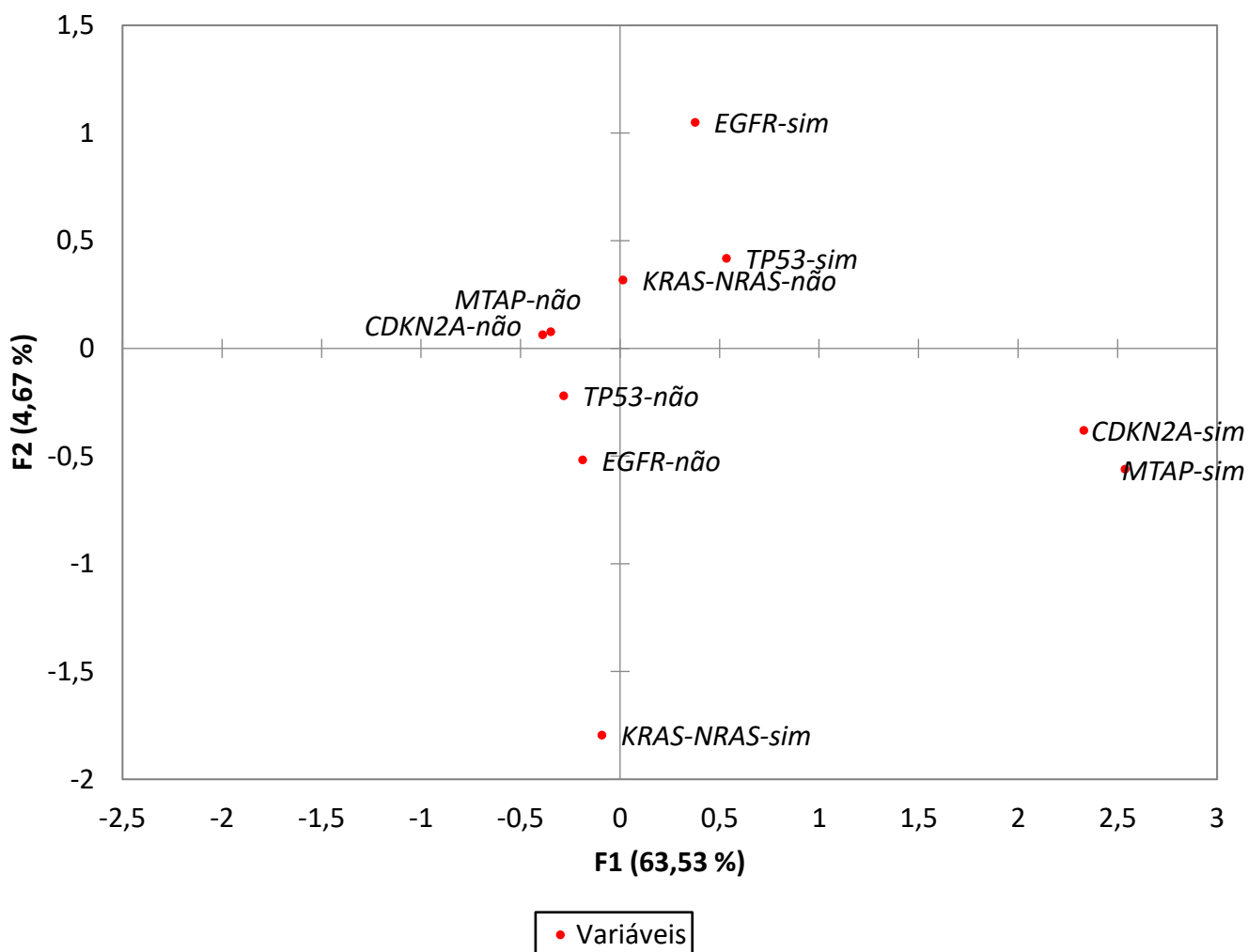
Neste caso, pode-se visualizar que as respostas “sim” para os genes *EGFR* e *TP53* estão correlacionadas. O contrário do que se pode ver com os genes *KRAS-NRAS* e *EGFR*, na qual a correlação deles é oposta; enquanto que para o primeiro encontramos a resposta “sim” em um quadrante, para o outro a sua resposta “sim” está em um quadrante oposto, indicando que os mesmos não apresentam correlação entre suas mutações. Já para

os genes *CDKN2A/B* e *MTAP*, vê-se o agrupamento dos mesmos, indicando a sua correlação para o aparecimento de possíveis mutações. Em relação à explicabilidade do gráfico, o conjunto dos eixos F1 e F2 apresenta uma confiabilidade de 68,2% para este resultado, demonstrado na Figura 19.

Como conclusão dessa subanálise, em relação ao perfil de expressão gênica, os resultados sugerem a existência de 2 populações de pacientes com perfis de mutação completamente distintos. A primeira encontra-se alocada nos quadrantes 2 e 3 do gráfico, sugerindo que na população estudada a assinatura gênica mutante predominante seria de pacientes com mutação nos genes *EGFR-TP53* e sem mutação nos genes *KRAS-NRAS*; e o oposto também foi verificado nesse diagrama: quando há mutação em *KRAS-NRAS*, os genes *EGFR-TP53* não se encontram mutados.

A segunda subpopulação é de pacientes alocados nos quadrantes 1 e 4, confirmando que quando os indivíduos que são portadores de mutação no gene *MTAP* habitualmente carregam como co-mutação a alteração em *CDKN2A/B*; após checado detalhadamente em nossa tabulação de dados, confirmou-se que 100% dos indivíduos que apresentaram mutações com perda de *MTAP* também apresentaram mutação com perda de *CDKN2A/B* (Figura 19).

Figura 19 – Gráfico simétrico das variáveis em 2 eixos - Análise de correspondência com os principais genes mutados.



Legenda: F1: eixo horizontal; F2: eixo vertical

Fonte: o próprio autor

Dessa forma, entendendo a alta prevalência de mutações e heterozigosidades com perda de função do gene *TP53*, já bem conhecidas nessa região do nosso país, estabeleceu-se a necessidade de se explorar mais detalhadamente os casos em que foi realizada a avaliação genômica por meio da plataforma de *NGS - Foundation One CDx* e onde havia sido comprovado o diagnóstico de mutação somática *R337H* do *TP53*, que é sabidamente patognomônica para o diagnóstico de uma importante síndrome oncogênica no Brasil: a síndrome de Li-Fraumeni.

Contudo, para o presente estudo de variantes genômicas somáticas (portanto, estudadas apenas no tecido tumoral), não tivemos acesso aos dados clínicos envolvendo possíveis mutações germinativas concomitantes nos pacientes. Assim, encontrou-se 46 indivíduos portadores de mutações em *TP53* (34% da amostra total, composta pelos 133 pacientes analisados, correspondendo a 59% dos 78 pacientes que realizaram essa análise por meio da plataforma *Foundation One CDx*) e, nesta população de mutados, identificou-se apenas 1 caso (indivíduo 62) de mutação somática *R337H* no *TP53*. No Apêndice F estão demonstradas de forma mais detalhada as mutações identificadas em todos os pacientes portadores de alterações genômicas em *EGFR* e *TP53*.

Ao analisar o perfil da expressão gênica, observou-se que os perfis que mais ocorreram entre os indivíduos foram o de proliferação (27,82% apresentaram apenas proliferação, enquanto que 47,37% foi o somatório dos indivíduos que também apresentaram proliferação [1, 2] [1, 2, 3] [1, 2, 4] [1, 2, 3, 4] [1, 3] [1, 3, 4] [1, 4], juntamente com outros perfis de expressão gênica, fazendo com que esse fosse o perfil mais significativo). Os conjuntos de perfis de expressão gênica que mais ocorreram entre os indivíduos foram de proliferação e reparo (1 e 2), e proliferação, reparo e oncogênese (1, 2 e 4), ambos encontrados em 12,78% dos indivíduos ($p < 0,0001$) (Tabela 12).

Um total de 59 indivíduos tiveram de 1 a 3 genes mutados (44,36% da amostra) e 34 indivíduos apresentaram de 4 a 6 genes mutados (25,56% da amostra) ($p < 0,0001$). Observou-se que 90 indivíduos apresentaram a doença no estadió metastático (74,38%) ($p < 0,0001$). Ficou constatado que 25 pacientes realizaram tratamento adjuvante (20,66%) ($p < 0,0001$) e 97 pacientes realizaram tratamento sistêmico de 1ª linha (80,83%) ($p < 0,0001$) (Tabela 12). Novamente, reforçamos que as informações moleculares quantitativas dos pacientes foram obtidas diretamente dos laudos dos exames genômicos, não tendo sido feito nenhum tipo de curadoria adicional a partir dos resultados encontrados.

Em relação à variável *TMB*, observou-se em 70 indivíduos um resultado “undetermined” (correspondendo a 52,63% da amostra), porém considerando-se apenas os dados válidos com significância clínica, ou seja, excluindo-se da análise os pacientes com resultados indeterminados ou inconclusivos, 87,3% dos indivíduos analisados tiveram um resultado de *TMB* baixo, enquanto 12,7% das amostras tiveram *TMB* alto ($p < 0,0001$). Esses achados se encontram representados na Tabela 12 e na Figura 20.

Tabela 12 – Frequências absolutas e frequências relativas das variáveis qualitativas referentes ao câncer quanto aos achados anátomo-patológicos, moleculares e ao perfil de expressão gênica, excluindo-se os pacientes com resultados indeterminados e inconclusivos.

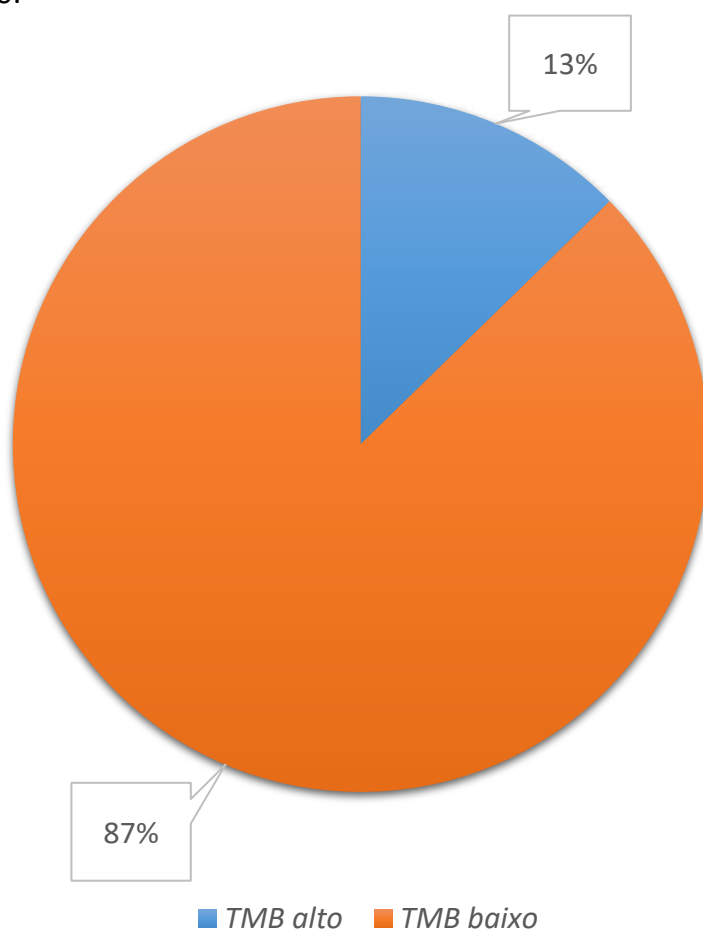
Variável	Categorias	FA	FR%	p-valor
Subtipo histológico	Adenocarcinoma	130	97,75	
	Carcinoma Adenoescamoso	1	0,75	
	Carcinoma de Grandes Células não-escamoso	2	1,50	< 0,0001
<i>TMB</i>	< 10 Mutações/Megabase	55	87,3	
	≥ 10 Mutações/Megabase	8	12,7	< 0,0001
<i>Status</i> Microssatélite	Estável	60	100	
	Instável	0	0	-
<i>PDL-1</i> (TPS em %)	Hiper-expressor (≥ 50%)	17	14,66	
	Hipo-expressor (1% a 49%)	38	32,76	
	Negativo (< 1%)	61	52,59	< 0,0001
Perfil da Expressão Gênica	0	30	22,56	
	1	37	27,82	
	1,2,3	9	6,77	
	1,2	17	12,78	
	1,2,4	17	12,78	
	1,2,3,4	10	7,52	
	1,3	2	1,50	
	1,3,4	4	3,01	
	1,4	4	3,01	
	2,3,4	1	0,75	
	2,3	1	0,75	
	2,4	1	0,75	< 0,0001
	Nº genes mutados	De 1 a 3	59	44,36
De 4 a 6		34	25,56	
Acima de 6		10	7,52	

Nenhum	30	22,56	< 0,0001
--------	----	-------	----------

Legenda: FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

Figura 20 – Gráfico de distribuição da variável *Tumor Mutational Burden* na população de interesse do estudo.



Legenda: *TMB* alto: > 10 Mutações/Megabase; *TMB* baixo: \leq 10 Mutações/Megabase.

Fonte: o próprio autor

Entendendo a possível conexão entre *TMB* e o tabagismo e uma relação inversamente proporcional entre *TMB* e a presença de mutações condutoras (consideradas de interesse clínico e terapêutico atual em *NSCLC*), realizou-se uma nova análise nesses subgrupos da amostra. Identificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as variáveis “*TMB*” e “mutações condutoras” e “tabagismo” e “mutações condutoras”, que se comportaram de forma oposta, ou seja, quando houve o diagnóstico de alguma mutação condutora esta não foi acompanhada de alto *TMB* ou de hábito tabágico. Todavia, não foi detectada qualquer diferença estatística entre as variáveis “*TMB*” e “tabagismo” (Tabela 13). Os dados completos da análise desses subgrupos estão expostos no Apêndice G.

Tabela 13 – Correlação entre as variáveis *TMB*, tabagismo e presença de mutações condutoras em *NSCLC* na amostra Londrina-Curitiba/PR.

Correlação analisada	Valor de R	IC 95%	p-valor
<i>TMB</i> vs tabagismo	0,2359	- 0,02686 a 0,4681	0,0696
<i>TMB</i> vs mutação condutora	- 0,249	- 0,4754 a 0,008356	0,0499
Tabagismo vs mutação condutora	- 0,3071	- 0,5260 a - 0,05002	0,0170

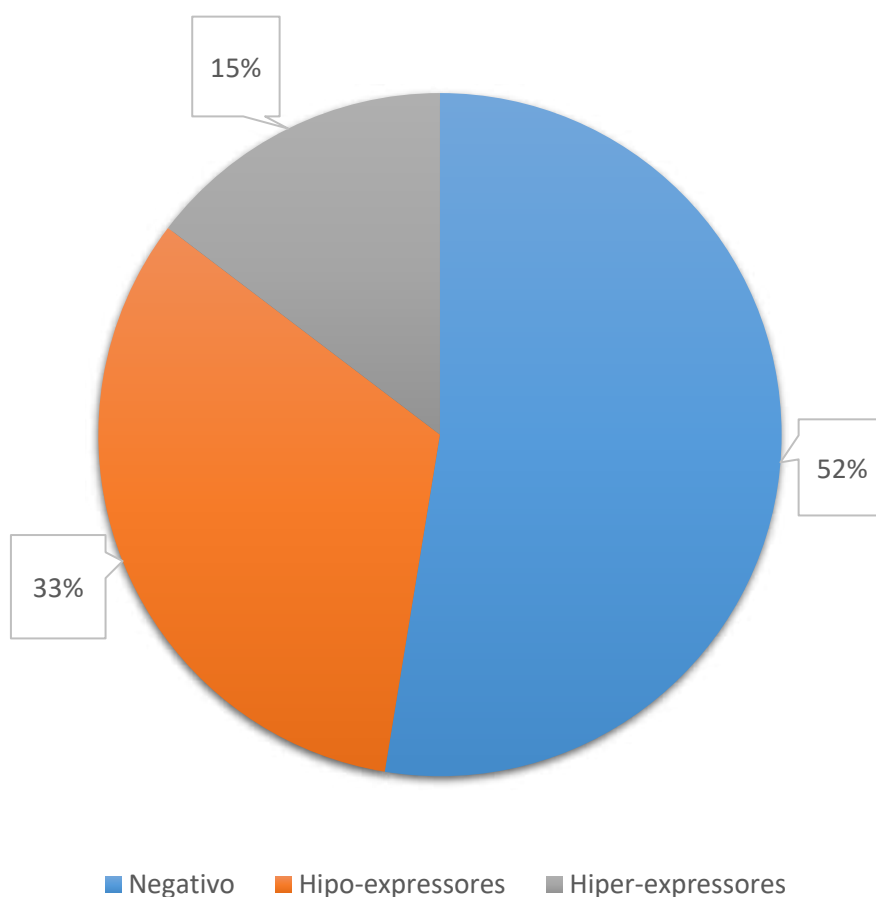
Legenda: Valor de R: valor da correlação de Spearman; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

Em relação ao *Status* Microsatélite, observou-se em 73 indivíduos um resultado “*undetermined*” (correspondendo a 54,88% da amostra) e em 60 indivíduos (45,11% da amostra) o *Status* microsatélite foi categorizado como estável; nenhum paciente apresentou *Status* instável. Contudo, considerando-se apenas os dados válidos com significância clínica, ou seja, excluindo-se da análise os pacientes com resultados indeterminados ou inconclusivos, todos os 60 pacientes (100% dos indivíduos analisados) apresentaram resultado de estabilidade microsatélite. Todavia, nesta análise não foi possível calcular o p-valor por haver apenas uma categoria para essa variável (Tabela 12).

Já para a variável *PDL-1*, 17 indivíduos apresentaram-se como hiper-expressores (14,6% da amostra), 38 indivíduos apresentaram-se como hipo-expressores (32,7% da amostra) e 61 indivíduos apresentaram-se como não-expressores (52,5% da amostra). Esses achados atingiram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$) e ainda se encontram representados na Tabela 12, também ilustrados na Figura 21.

Figura 21 – Gráfico de distribuição da variável expressão imuno-histoquímica de *PDL-1* por *TPS* na população de interesse do estudo.



Legenda: Hiper-expressores: $TPS \geq 50\%$; Hipo-expressores: TPS entre 1% e 49%; Negativo $TPS < 1\%$.

Fonte: o próprio autor

Foi também realizada uma comparação direta entre as frequências relativas observadas da expressão IHQ de *PDL-1* por *TPS* encontradas nas amostras de Londrina-Curitiba/PR com os dados disponíveis na literatura mundial e nacional, respectivamente representadas nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 – Frequências relativas da expressão IHQ de *PDL-1* por *TPS* encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura mundial na população com adenocarcinoma.

Expressão de <i>PDL-1</i>	FR% - LDN-CBA	FR% - MSKCC	FR% - EXPRESS	p-valor
Negativa	52,59%	66,6%	48%	
Moderada	32,76%	18%	30%	0,040
Hiper-expressão	14,66%	15,4%	22%	

Legenda: FR%: frequências relativas; LDN-CBA: amostras dos pacientes de Londrina-Curitiba/PR; MSKCC: amostras dos pacientes do estudo do grupo do hospital *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (EUA) com adenocarcinomas; EXPRESS: amostras dos pacientes do estudo clínico “EXPRESS”; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor; DIETEL *et al.*, 2019; SCHOENFELD *et al.*, 2020.

Tabela 15 – Frequências relativas da expressão IHQ de *PDL-1* por *TPS* encontradas na amostra Londrina-Curitiba/PR, comparadas aos dados de literatura nacional na população com adenocarcinoma.

Expressão de <i>PDL-1</i>	FR% - LDN-CBA	FR% - pop. Brasil	p-valor
Negativa	52,59%	60,6%	
Moderada	32,76%	23,21%	0,5162
Hiper-expressão	14,66%	16,19%	

Legenda: FR% - LDN-CBA: frequências relativas das amostras dos pacientes de Londrina-Curitiba/PR; FR% - pop Brasil: frequências relativas (médias) das mutações na população brasileira; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Aderência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor; GELATTI *et al.*, 2020.

Por fim, quando analisados individualmente os dados dos pacientes que foram diagnosticados com estadios precoces vs estadios avançados, não foi observada nenhuma associação significativa em relação às variáveis apresentadas. O mesmo também foi identificado ao se compararem os dados dos pacientes que fizeram tratamento adjuvante vs tratamento de 1ª linha, novamente denotando a provável natureza precoce e, portanto, troncular dessas alterações genômicas (“*truncal mutations*”), como demonstrado nas tabelas contidas nos Apêndices H, I e J, respectivamente. Para essas subanálises, não foi possível calcular o p-valor para o *Status* microssatélite por haver apenas uma categoria para essa variável.

4.3 EXPRESSÃO COMPARATIVA ENTRE O PERFIL DE GENES MUTADOS SEQUENCIADOS NAS AMOSTRAS DE LONDRINA-CURITIBA/PR E NAS AMOSTRAS DE PACIENTES DO BANCO DE DADOS DO TCGA:

Foi realizada a análise comparativa dos perfis mutacionais dos genes sequenciados entre as amostras de Londrina-Curitiba/PR e do banco de dados do TCGA, após o recrutamento de 133 pacientes para esse estudo. Observou-se que a carga mutacional entre as duas populações não é diferente ($p > 0,05$); entretanto, o perfil de expressão dos genes mutados é significativamente distinto ($p < 0,001$).

Observou-se aumento na frequência de genes mutados nas amostras de Londrina-Curitiba/PR em relação às amostras do TCGA de pelo menos duas vezes (Tabela 16), para os genes *EGFR*, *MYC*, *KRAS-NRAS*, *RAD21*, *PDL-1*, *MTAP*, *DNMT3A*, *CDK4*, *MDM2*, *NFKBIA*, *AURKA* e *CCND1*. Destaca-se a expressão aumentada de *PDL-1*, que apresentou um *foldchange* de 105,2 vezes nas amostras de Londrina-Curitiba/PR. Observou-se redução na expressão ou frequência dos genes *KEAP1*, *RET*, *ROS1*, *STK11*, *BCORL1*, *BRAF*, *CDH1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ERBB4*, *QKI*, *PI3KCA*, *FLCN*, *NSD3*, *NF2*, *APC*, *SMAD4* e do receptor-alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFR α*) (Tabela 16) (Figura 22).

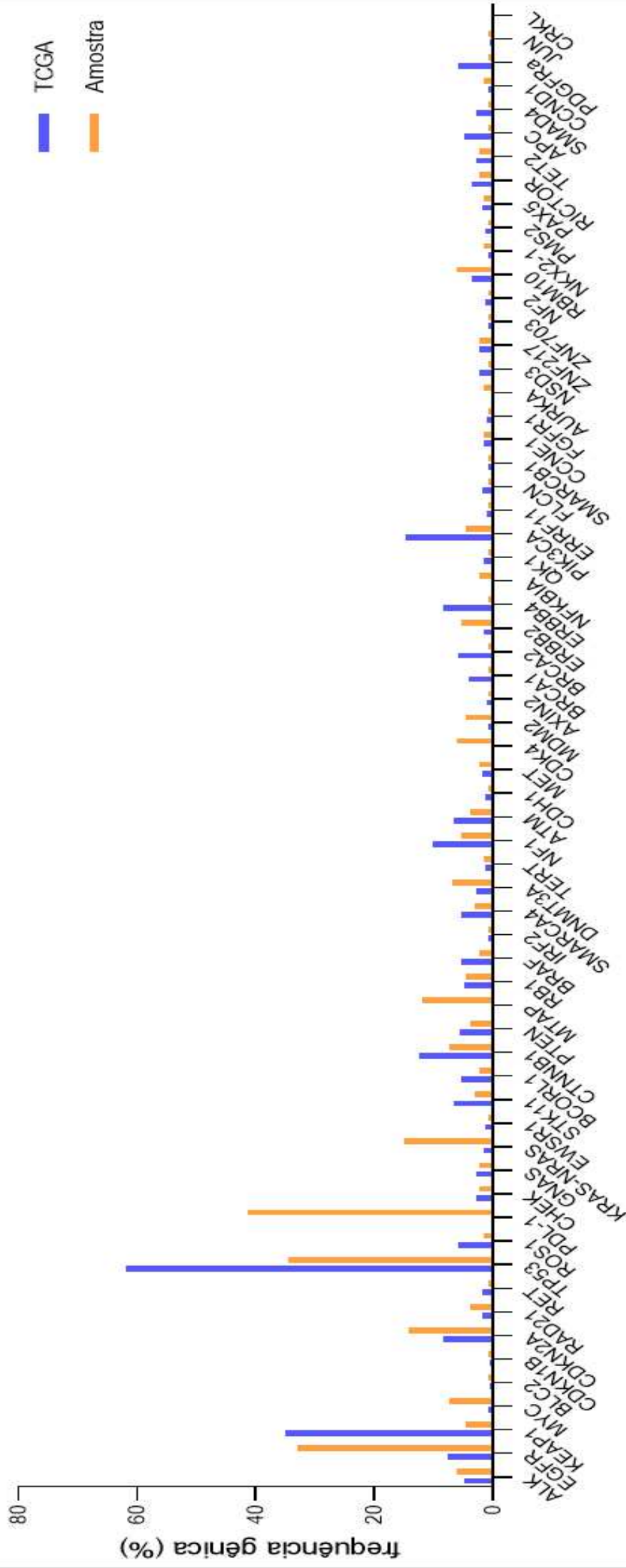
Tabela 16 – Frequência comparativa dos genes sequenciados na amostra de pacientes e nas amostras do TCGA.

Gene	Score do TCGA	Score da amostra	Foldchange	Expressão
<i>EGFR</i>	7,7	33	4,3	<i>Up</i>
<i>KEAP1</i>	35,1	4,5	-7,8	<i>Down</i>
<i>MYC</i>	0,8	7,5	9,4	<i>Up</i>
<i>RAD21</i>	1,9	3,8	2	<i>Up</i>
<i>RET</i>	1,7	0,7	-2,5	<i>Down</i>
<i>ROS1</i>	5,9	1,5	-4	<i>Down</i>
<i>PDL-1 (CD274)</i>	0,4	41,35	105,2	<i>Up</i>
<i>KRAS-NRAS</i>	1,5	15,03	9,7	<i>Up</i>
<i>STK11</i>	6,7	3	-2,2	<i>Down</i>
<i>BCORL1</i>	5,3	2,3	-2,3	<i>Down</i>
<i>MTAP</i>	0,3	12,03	39,7	<i>Up</i>
<i>BRAF</i>	5,4	2,3	-2,4	<i>Down</i>
<i>DNMT3A</i>	2,9	6,8	2,4	<i>Up</i>
<i>CDH1</i>	1,4	0,7	-2	<i>Down</i>
<i>CDK4</i>	0,4	6,01	15,3	<i>Up</i>
<i>MDM2</i>	0,9	4,5	5	<i>Up</i>
<i>BRCA1</i>	4,0	0,7	-5,7	<i>Down</i>
<i>BRCA2</i>	5,9	0,7	-8,4	<i>Down</i>
<i>ERBB4</i>	8,3	0,7	-11,8	<i>Down</i>
<i>NFKBIA</i>	0,4	2,2	5,5	<i>Up</i>
<i>QKI</i>	1,5	0,7	-2,1	<i>Down</i>
<i>PIK3CA</i>	14,7	4,5	-3,3	<i>Down</i>
<i>FLCN</i>	1,7	0,7	-2,4	<i>Down</i>
<i>AURKA</i>	0,2	1,5	7,3	<i>Up</i>
<i>NSD3 (WHSC1L1)</i>	2,4	0,7	-3,5	<i>Down</i>
<i>NF2</i>	1,4	0,7	-2	<i>Down</i>
<i>APC</i>	4,8	0,7	-6,9	<i>Down</i>
<i>SMAD4</i>	2,9	0,7	-4,1	<i>Down</i>
<i>CCND1</i>	0,7	1,5	2,1	<i>Up</i>
<i>PDGFRα</i>	5,9	0,7	-8,5	<i>Down</i>

Legenda: Scores quantificados em percentuais (%); TCGA: *The Cancer Genome Atlas*.

Fonte: o próprio autor

Figura 22 – Análise comparativa do perfil de expressão dos genes sequenciados na amostra de pacientes do estudo e do perfil da população mundial disponível no TCGA.

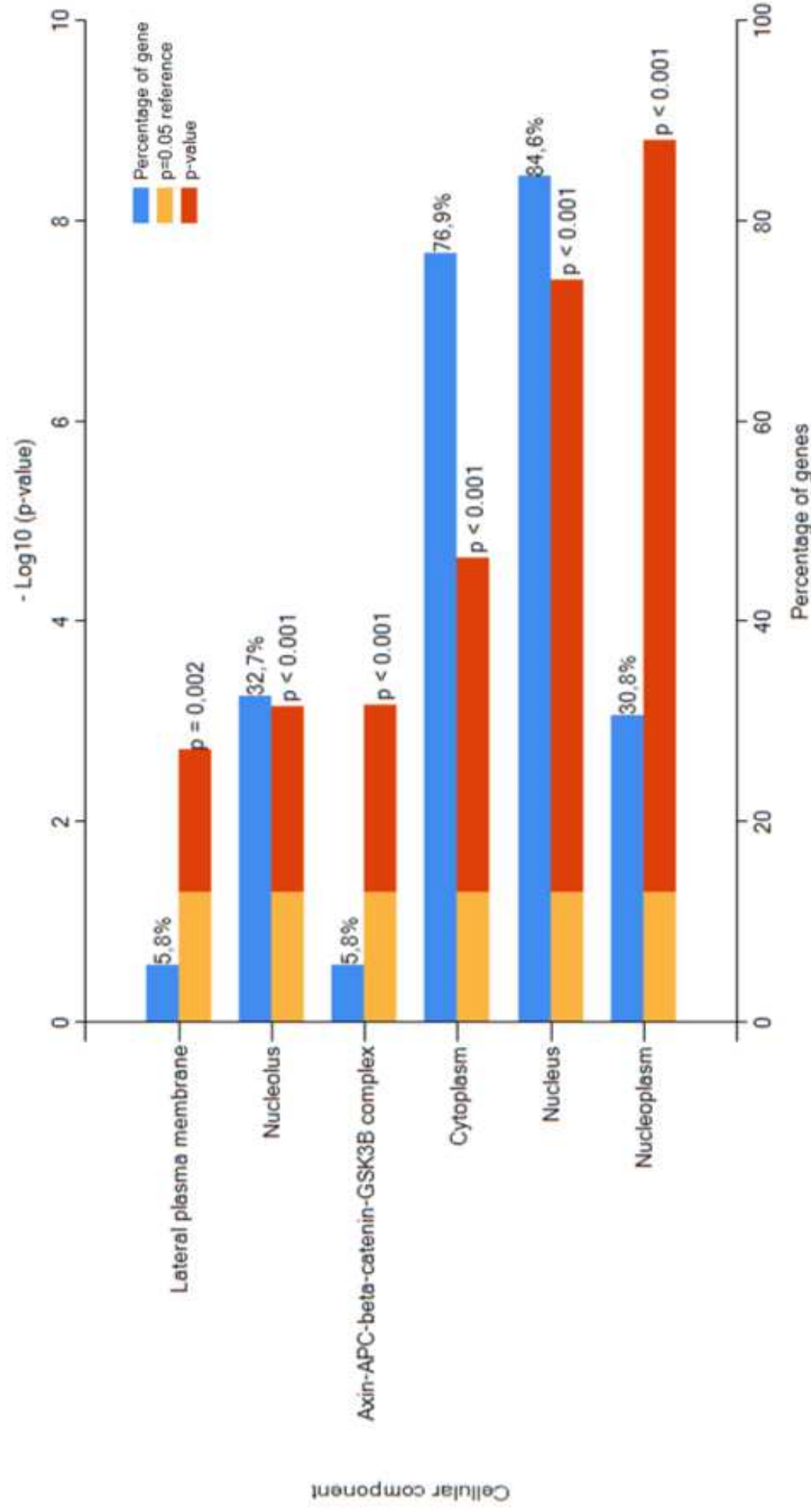


Legenda: eixo horizontal: nomes dos genes identificados na amostra de pacientes analisados; eixo vertical: frequência dos mesmos na amostra em percentual; TCGA: The Cancer Genome Atlas.
 Fonte: o próprio autor.

4.4 ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES MUTADOS SEQUENCIADOS NAS AMOSTRAS DE LONDRINA-CURITIBA/PR:

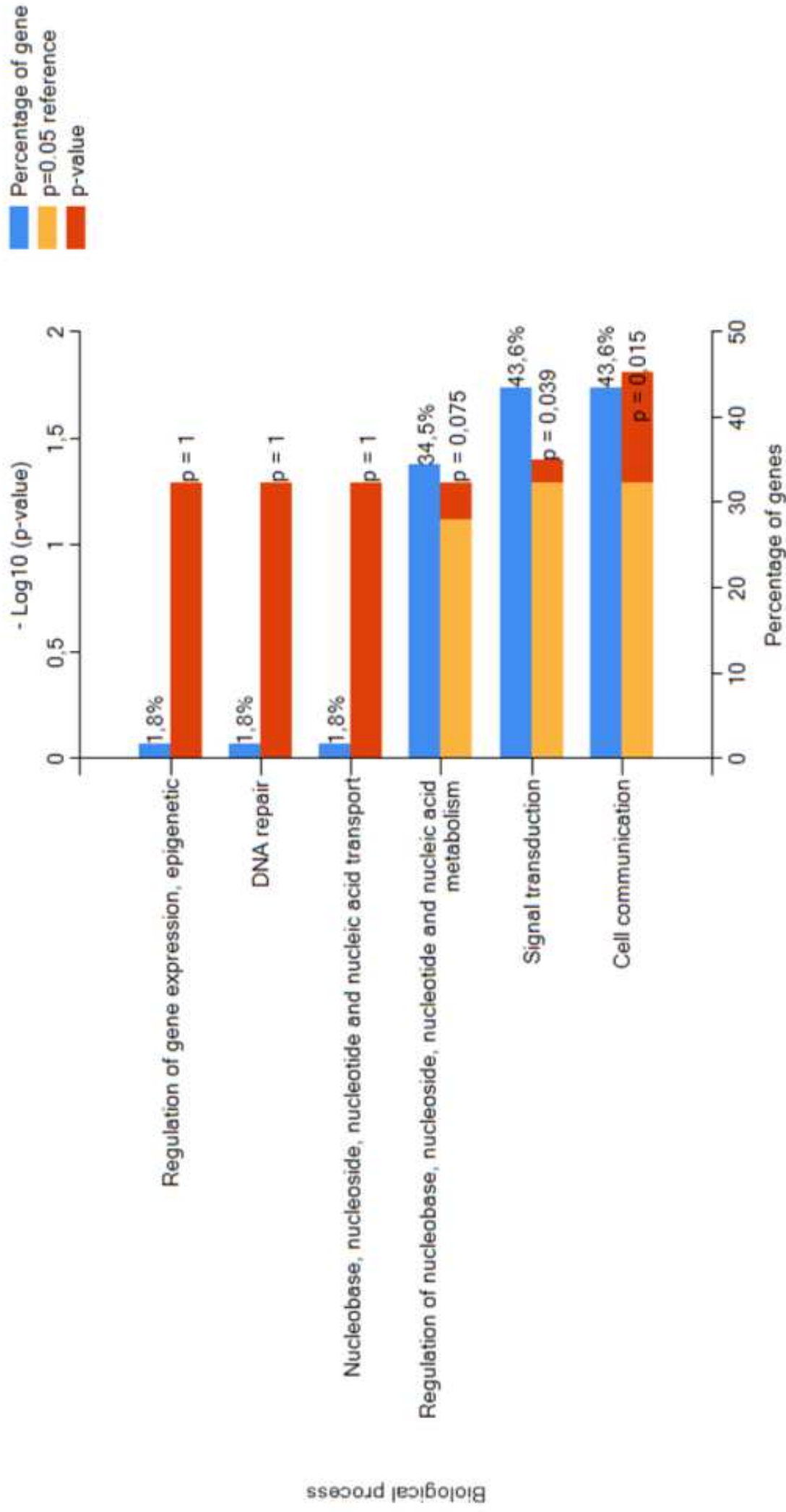
Os resultados da análise de enriquecimento dos genes mutados sequenciados na população de Londrina-Curitiba/PR estão demonstrados nas Figuras 23 a 25. O perfil de localização celular mostra que a maioria dos genes sequenciados está relacionada a transcrição de elementos encontrados na região nuclear (84,6%) e a proteínas traduzidas que tem localização no citoplasma (76,9%) (Figura 23). Suas funções celulares (Figura 24) incluem comunicação celular (43,6%) e transdução de sinais (43,6%), com foco nas vias de sinalização do *IFN- γ* , do *MET*, da sinalização do *PDGFR α* , do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF-1*), do *ErbB* e da sinalização do *EWSR1* (Figura 25).

Figura 23 – Localização celular dos elementos transcritos pelo genes sequenciados na amostra de pacientes.



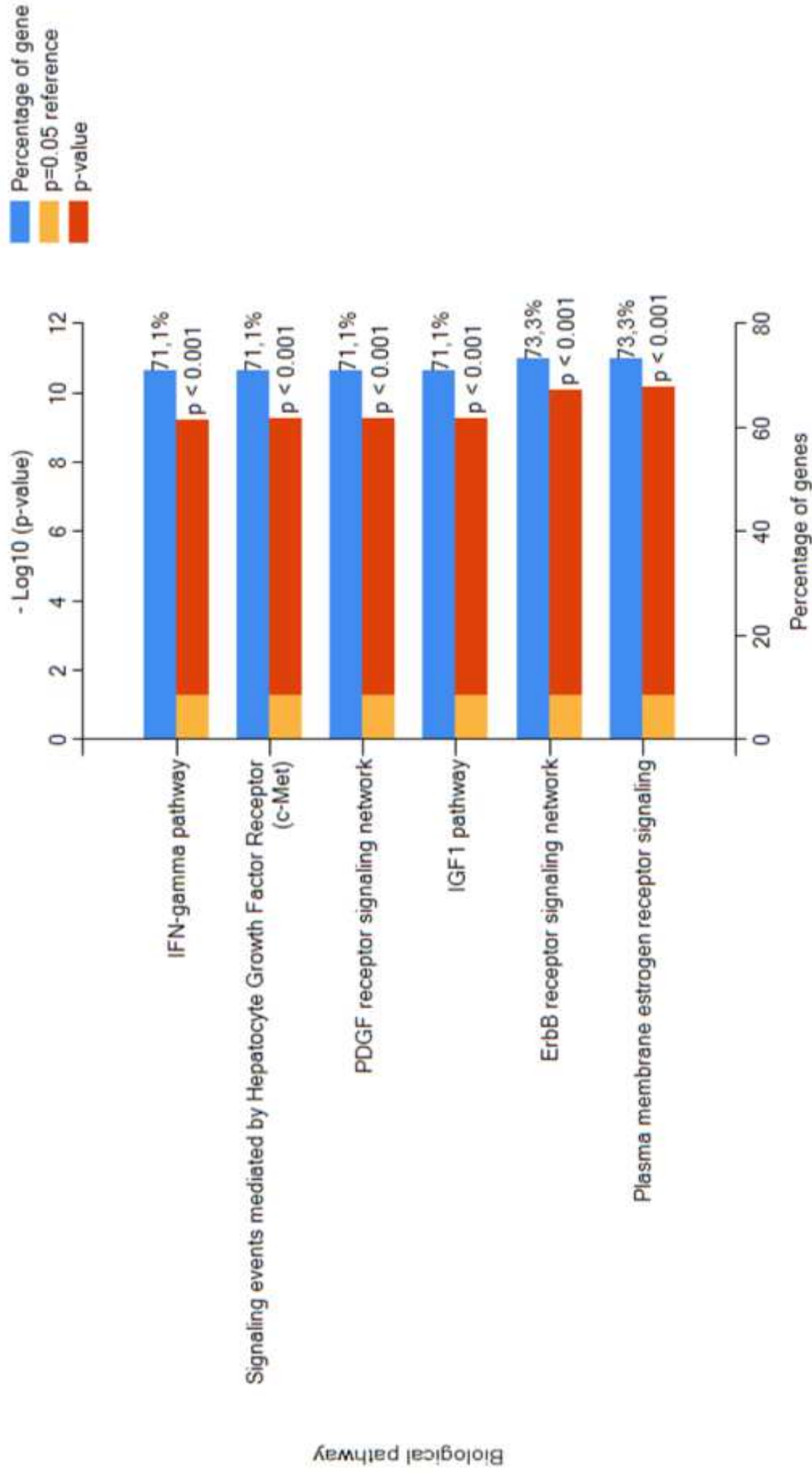
Legenda: Utilizando-se o software *Funrich*, foi possível obter um gráfico de barras contendo as seis localizações celulares dos genes identificados com base no valor P e na porcentagem de genes, onde os componentes com valor $p < 0,05$ são estatisticamente significativas (destacadas pelo retângulo vermelho). A barra azul representa o percentual do evento na amostra analisada. A barra vermelha indica o valor de p calculado pelo software para o evento em questão e a barra laranja serve como barra de referência do software para fins de comparação (indica o valor de $p = 0,05$). O eixo X representa a porcentagem de genes (calculada com base no mapeamento de genes da amostra em relação ao total de genes coexistentes na via) e o eixo Y indica quais foram os componentes celulares identificados na amostra estudada. Os valores de p foram calculados com base no mapeamento de interseção de genes da amostra com genes do banco de dados do programa.
 Fonte: o próprio autor.

Figura 24 – Processos biológicos com base nos genes sequenciados na amostra de pacientes.



Legenda: Utilizando-se o software *Furrich*, foi possível obter um gráfico de barras contendo as seis localizações celulares dos genes identificados com base no valor P e na porcentagem de genes, onde os componentes com valor $p < 0,05$ são estatisticamente significativas (destacadas pelo retângulo vermelho). A barra azul representa o percentual do evento na amostra analisada. A barra vermelha indica o valor de p calculado pelo software para o evento em questão e a barra laranja serve como barra de referência do software para fins de comparação (indica o valor de $p = 0,05$). O eixo X representa a porcentagem de genes (calculada com base no mapeamento de genes da amostra em relação ao total de genes coexistentes na via) e o eixo Y indica quais foram os componentes celulares identificados na amostra estudada. Os valores de p foram calculados com base no mapeamento de interseção de genes da amostra com genes do banco de dados do programa.
 Fonte: o próprio autor.

Figura 25 – Vias de sinalização mediadas pelos genes sequenciados na amostra de pacientes.



Legenda: Utilizando-se o software *Furrich*, foi possível obter um gráfico de barras contendo as seis localizações celulares dos genes identificados com base no valor P e na porcentagem de genes, onde os componentes com valor $p < 0,05$ são estatisticamente significativas (destacadas pelo retângulo vermelho). A barra azul representa o percentual do evento na amostra analisada. A barra vermelha indica o valor de p calculado pelo software para o evento em questão e a barra laranja serve como barra de referência do software para fins de comparação (indica o valor de $p = 0,05$). O eixo X representa a porcentagem de genes (calculada com base no mapeamento de genes da amostra em relação ao total de genes coexistentes na via) e o eixo Y indica quais foram os componentes celulares identificados na amostra estudada. Os valores de p foram calculados com base no mapeamento de genes da amostra com genes do banco de dados do programa.

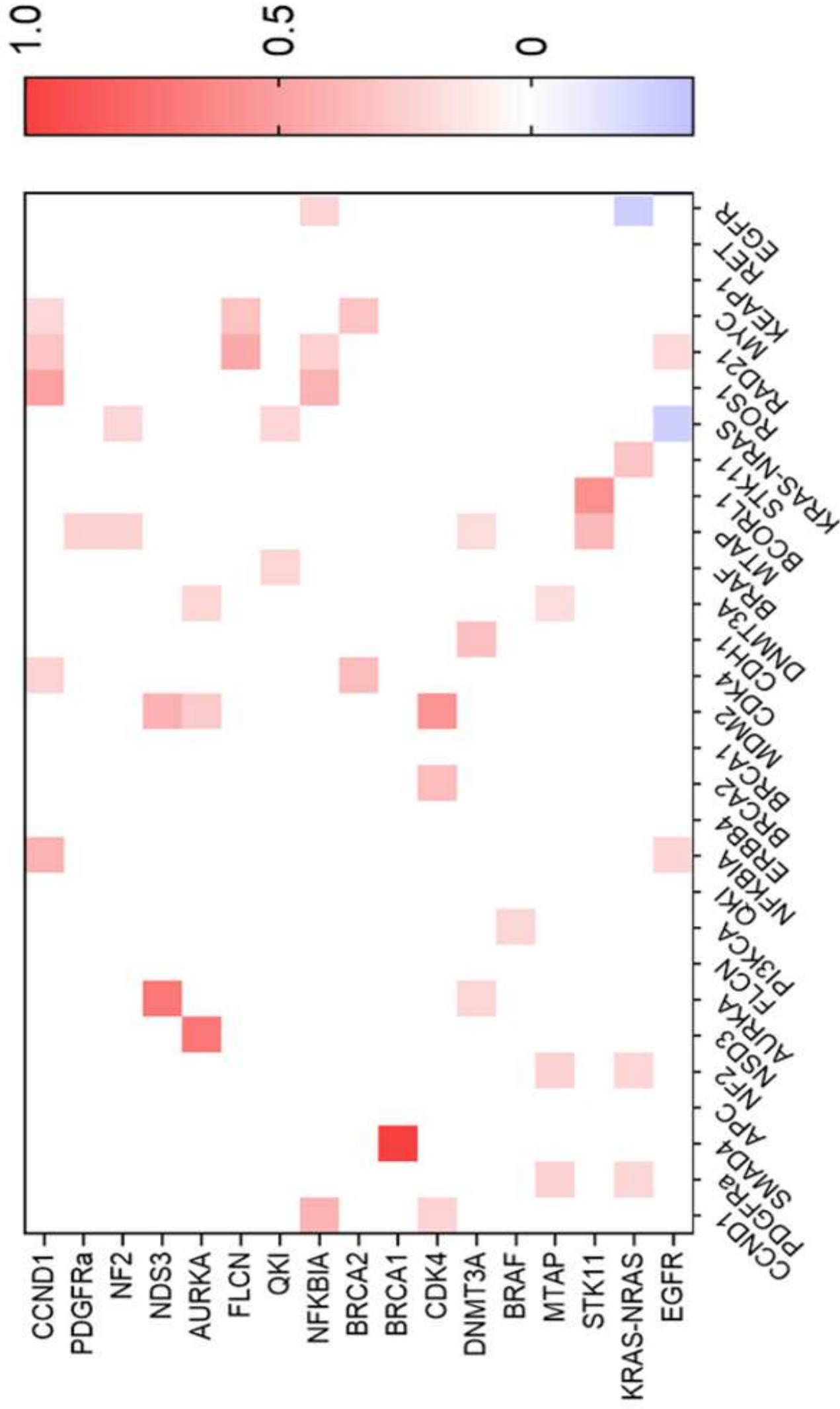
Fonte: o próprio autor.

A análise do Interactoma gênico (Figura 26) demonstra a existência de interconexões entre os genes analisados, destacando-se os genes *ERBB4*, *SMAD4*, *STK11*, *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *BRCA1*, *BRCA2* e *MYC*. Importante ressaltar que o gene *TP53* encontra-se no Interactoma posicionado como um elemento central da análise molecular.

Também foi observada a existência de correlações significantes entre os genes mutados que apresentaram *foldchange* acima de 2, com destaque para as fortes correlações identificadas entre *BRCA1* e *SMAD4*, *AURKA* e *NSD3*, *MDM2* e *CDK4*, *BCORL1* e *STK11*, e para a ausência de correlação entre o *EGFR* e os genes *KRAS-NRAS* (Figura 27).

A análise funcional também permitiu identificar o perfil de expressão tecidual dos genes selecionados, destacando que os mesmos são expressos tanto no período fetal como na vida adulta em diversos tecidos e tipos celulares, confirmando que se tratam de genes do desenvolvimento humano. Alguns genes como o *GNAS*, *MTAP*, *CTNNB1* e *NF2* apresentam ampla distribuição em diversos tecidos, incluindo os pulmões (Apêndice K).

Figura 27 – Perfil de correlações significantes ($p < 0,05$) entre os genes sequenciados na amostra de pacientes.



Legenda: Heatmap construído no software *GraphPad Prism 9.0* com base nos valores obtidos através da correlação de Spearman entre os genes expressos na amostra, o número de genes mutados, a expressão IHQ de *PDL-1* e a carga mutacional. Os retângulos azuis representam correlação negativa e os vermelhos correlação positiva. Quanto mais forte a correlação, mais intensa a coloração vermelha do retângulo; quanto mais fraca, mais azul a coloração.
 Fonte: o próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Para iniciarmos a discussão dos achados desse estudo, acreditamos que é importante frisar que as informações obtidas para todas as análises foram baseadas na busca de dados de vida real, portanto da prática médica cotidiana dos 3 centros oncológicos paranaenses elegidos para o recrutamento clínico. O escopo principal dessa pesquisa foi justamente trazer à tona o “cenário genômico” atual dos pacientes com *NSCLC* das cidades de Londrina e Curitiba, entendendo a vasta literatura já disponível a respeito desses temas tanto do ponto de vista de evidências nacionais quanto internacionais.

A maioria dos pacientes do estudo era oriunda do cenário de prática médica privada (n = 123, ou seja, 92,5%), por conseguinte há um claro enriquecimento da nossa amostra com pacientes não-tabagistas e com diagnóstico de doença metastática, o que acaba configurando um viés de seleção. Além disso, outro viés de amostragem do nosso estudo situa-se no fato de que muitos pacientes realizaram suas avaliações por meio de plataformas *Hotspots*, onde dispomos de uma avaliação com menos genes, devido ao cenário de planejamento de terapia adjuvante ou pela ausência de reembolso das fontes pagadoras pelos testes ou ainda por porque alguns pacientes foram recrutados de um centro oncológico majoritariamente atendido pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Outra limitação do nosso estudo é que muitas das comparações foram realizadas com os dados do *TCGA*, onde sabidamente a maioria das amostras foi obtida de peças cirúrgicas (cerca de 80%), onde esperam-se mais pacientes tabagistas e virgens de tratamento. Porém, no decorrer dessa explanação serão feitas algumas comparações com o cenário de outros estudos retrospectivos robustos de biologia molecular no cenário de biópsias obtidas em pacientes com doença avançada, como os ensaios do grupo de Oncologia do hospital *Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)*, que utilizaram a sua plataforma própria de *NGS*, o *MSK-Integrated Mutation Profile of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT)*, e analisaram 100% de indivíduos com doença metastática *de novo* ou recorrente (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; JORDAN *et al.*, 2017).

Dando introdução aos achados clínico-demográficos da nossa casuística, identificamos que a maioria dos pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão encontra-se na faixa etária entre 60 e 80 anos (61,6%), cujo perfil de incidência se aproxima muito do publicado por Siegel *et al.* (2015), baseado nos dados americanos do *SEER*. Nessa

amostragem unicêntrica, identificou-se um risco acumulado de até 6,6 vezes maior de desenvolver neoplasia maligna invasiva de pulmão e brônquios segundo a progressão através das faixas etárias, principalmente a partir dos 60 anos (SIEGEL *et al.*, 2015).

Identificamos que 57% da nossa amostra é constituída de indivíduos do sexo feminino, o que contrasta um pouco com os dados de incidência publicados no *SEER* americano, com 47,7% da população pertencente a este gênero, e também com os dados do *GLOBOCAN 2020*, onde se identificou que a relação de incidência entre os gêneros chega ser 1,2 a 5,6 vezes maior no sexo masculino. Uma explicação dos autores para esse comportamento epidemiológico nos EUA seria o resultado da redução da prevalência do tabagismo em homens a partir da década de 1990, desde quando vem sendo observado o aumento do hábito tabágico e redução nos índices de cessação precoce do tabagismo na população feminina. Essa mesma inversão do perfil epidemiológico vem sendo documentada em diversos estudos que utilizam novas estratégias terapêuticas para o subgrupo de pacientes com *mNSCLC* não-escamoso, como as terapias-alvo moleculares (SIEGEL *et al.*, 2015; SUNG *et al.*, 2021). Entretanto, populações com adenocarcinomas com mutações no gene do *EGFR* têm uma tendência de promover maior enriquecimento demográfico para o sexo feminino, enquanto perdas de função em *RBM10* (gene localizado no cromossomo X) acabam enriquecendo epidemiologicamente as populações com câncer de pulmão no sexo masculino (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; ZHAO *et al.*, 2017).

A maioria dos pacientes do estudo eram tabagistas (cerca de 53%), contudo confirmamos em nossos dados que não houve uma diferença estatística significativa em relação ao hábito tabágico nessa população ($p = 0,582$). Esses dados se correlacionam de forma semelhante ao publicado em outros estudos descritivos de patologia com pacientes com adenocarcinoma de pulmão, com cerca de 54% de prevalência do hábito tabágico nessa histologia, explicando uma possível ausência de significância estatística para esse subtipo histológico quando comparado aos pacientes com carcinomas epidermóides e com o carcinoma de pequenas células, situações clínicas onde já se esperam maiores índices populacionais de alta carga tabágica (PARRA *et al.*, 2020).

Ainda sobre o tópico tabagismo, a maioria dos indivíduos foi considerada como “tabagistas leves” (53,8%), isto é, com carga tabágica ≤ 10 anos/maço, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa para o subgrupo “tabagistas pesados” na amostra ($p = 0,513$). Esse *cutoff* para comparações amostrais baseia-se nos clássicos dados

publicados no estudo clínico IPASS, cujos dados incluíram pacientes não-tabagistas ou ex-tabagistas leves (MOK *et al.*, 2009). Contudo, em nosso estudo não se utilizou o critério de interrupção do tabagismo por pelo menos 15 anos para considerar os pacientes como ex-tabagistas, pois não tivemos acesso a essas informações nos prontuários.

Em relação às faixas antropométricas avaliadas segundo o IMC, descrevemos nesse estudo que a maioria dos pacientes se encontrava eutrófica ou com leve sobrepeso ao diagnóstico (juntos constituíram cerca de 88,5% da amostra), o que chama a atenção tendo em vista a clássica associação entre neoplasias malignas agressivas diagnosticadas mais tardiamente e a síndrome de anorexia-caquexia tumoral (DEWI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2013). Em contrapartida, várias outras evidências vêm tentando correlacionar a causalidade de alguns cânceres com a obesidade, como já observado no adenocarcinoma de cólon, de endométrio, de esôfago, de vesícula biliar, de rim e de fígado (BHASKARAN *et al.*, 2014; RENEHAN *et al.*, 2015). É importante salientar que em todos esses estudos, especialmente no estudo de coorte retrospectiva do Reino Unido com mais de 5 milhões de pacientes, há uma clara limitação dessa análise estatística pelos vieses de seleção e de confundimento devido à importância da variável “*status* tabágico” em câncer de pulmão (BHASKARAN *et al.*, 2014).

Diversos autores vêm buscando outras ferramentas estatísticas de associação entre o IMC e risco de desenvolvimento do câncer de pulmão, como a randomização mendeliana, tentando correlacionar o baixo IMC com o adenocarcinoma e alto IMC com o carcinoma de pequenas células e o carcinoma epidermóide. Esses dados, entretanto, não encontraram suporte metodológico fidedigno pois, mais uma vez, ao se incluir o tabagismo na análise multivariável onexo causal é completamente perdido, mantendo-se ainda a dúvida em relação à teoria da causalidade reversa (o tabagismo e a própria evolução da doença levariam à perda pré-clínica de peso). Isso comprova que o efeito do tabaco na carcinogênese dessa doença é mais relevante do que outros fatores ainda considerados exploratórios neste contexto, como a insulina, o *IGF-1*, os hormônios sexuais e a sinalização celular através da interleucina-6, do Fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) e de várias outras adipocinas pró-inflamatórias (BHASKARAN *et al.*, 2014; CARRERAS-TORRES *et al.*, 2016; RENEHAN *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2021).

Segundo a literatura mais tradicional em Histo-Patologia do pulmão e dos carcinomas pulmonares, a Organização Mundial da Saúde e o próprio Colégio Americano de

Patologia, o epitélio brônquico normal é do tipo pseudo-estratificado cilíndrico/colunar ciliado, composto também por células colunares sensoriais, células basais, células caliciformes e células granulares (que regulam a secreção de muco das células caliciformes e o batimento ciliar); já os alvéolos pulmonares são compostos pelos pneumócitos (tipo 1 - que revestem o epitélio colunar dos alvéolos, tipo 2 - que secretam o surfactante, e tipo 3 - as células de Clara, que são estruturas secretoras não-ciliadas com função progenitora e de produção de muco e proteínas) e por células neuroendócrinas ou células de Kulchitsky. O adenocarcinoma é, de fato atualmente, a variante morfológica mais comum em *NSCLC* (em torno de 60% a 65% dos casos), tanto em peças cirúrgicas quanto em biópsia de metástases (KUMAR *et al.*, 2020; MARCUZZO, 2023; NICHOLSON *et al.*, 2022). Praticamente todos os pacientes incluídos no nosso estudo tinham como subtipo histológico o adenocarcinoma (n = 130 pacientes; 98% da amostra).

Cerca de 74% da amostra do estudo foi composta por pacientes com doença metastática ao diagnóstico. Essa informação se aproxima dos dados publicados pelo *SEER* americano, onde apenas 15% dos pacientes são diagnosticados com a doença ainda na fase mais precoce ou localizada (SIEGEL *et al.*, 2015), porém ressaltamos novamente o possível viés de amostragem em nosso estudo para essa subanálise, devido ao menor hábito prescritivo em relação à disponibilização de testes moleculares pelos médicos aos pacientes com doença localizada ou loco-regional - até poucos anos atrás, não era habitual realizar pesquisas genômicas de forma cotidiana para indivíduos que não tivessem o diagnóstico já firmado de disseminação hematogênica do tumor (estadio IV).

Por volta de 20% da nossa amostra realizou alguma modalidade de tratamento loco-regional e/ou adjuvante, e 80% dos indivíduos realizaram tratamento sistêmico de 1ª linha. Porém, do total de 31 pacientes com doença loco-regional, apenas 6 (19,3%) não receberam nenhuma terapia sistêmica, demonstrando um *compliance* bem adequado para o tratamento adjuvante nesta casuística (portanto, 80% dos indivíduos fizeram quimioterapia concomitante e/ou adjuvante).

Desde o início dos anos 2000, a evidência dos estudos clínicos em cenário adjuvante nos aponta que aproximadamente metade dos pacientes consegue receber toda a dose pré-planejada de algum esquema quimioterápico baseado em platina. Alam *et al.* (2004) demonstraram que 52% dos pacientes receberam toda a dose programada de cisplatina e vinorelbine, assim como Dediu *et al.* (2006) apontaram que 50% dos pacientes

receberam toda a dose programada de algum regime baseado em cisplatina. Em dados mais recentes, Désage *et al.* (2022) publicaram um estudo de análise retrospectiva de vida real com 210 indivíduos, comprovando que 55,7% conseguiram receber toda a dose planejada de quimioterapia adjuvante baseada em *doublets* de platina. Entendemos, portanto, que a nossa amostra foi composta por pacientes majoritariamente tratados com máxima intensidade oncológica curativa, porém deve-se considerar o pequeno *n* amostral para a análise desse subgrupo (*n* = apenas 31 pacientes com doença loco-regional).

Nosso estudo demonstrou que o perfil mutacional gênico do câncer de pulmão das 2 maiores cidades do Estado do Paraná é distinto quando comparado aos dados genômicos atualmente catalogados e do *TCGA*, entretanto a frequência das variantes gênicas guarda algumas similaridades com a população brasileira e mundial. Também documentamos a existência de um perfil clínico-patológico distinto daquele descrito na literatura para outras populações, destacando a importância de estudos regionalizados que possibilitem a obtenção do perfil gênico direcionado a populações específicas.

O *TCGA* é uma iniciativa pública global conjunta do *National Cancer Institute* e do *National Human Genome Research* que serve de referência para o mapeamento do perfil genômico de mais de 33 topografias de câncer e que reúne dados de diversos lugares do mundo (WEINSTEIN *et al.*, 2013). Como já comentado anteriormente, a grande maioria das amostras de carcinomas pulmonares do *TCGA* são oriundas de peças cirúrgicas e, conseqüentemente, tratam-se de pacientes tabagistas ativos ou ex-tabagistas (81% da amostra). Portanto, há um viés de seleção a ser considerando: essa é uma amostra um tanto distinta da analisada na casuística do nosso estudo (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014).

Em 2014, foi publicado pelo grupo o primeiro *dataset* de todos os subtipos histológicos de adenocarcinoma de pulmão do *TCGA*, demonstrando o perfil de expressão gênica mutante de 230 pacientes. Este estudo detectou taxas de mutações somáticas em 18 genes (média de *TMB* = 8.9), incluindo *MYC*, *EGFR*, *NF1*, *MET* e *ERBB2*, sugerindo uma assinatura gênica determinante de prognóstico da doença (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014). Desde então, diversos estudos começaram a surgir neste contexto globalmente, incluindo o Brasil, com assinaturas gênicas mutacionais variadas, associadas inclusive a mutações no gene do *PD1* (ANDREIS *et al.*, 2019; ASHOK *et al.*, 2023;

COLLISSON *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2023; PARVAR *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023; XIA *et al.*, 2023; ZHU *et al.*, 2023).

Identificamos em nossa amostra uma alta prevalência de mutações em *TP53* e *EGFR* (59% e 33%, respectivamente) e uma baixa prevalência esperada para *KRAS*, *STK11* e *KEAP1* (15%, 4,5% e 4,5%, respectivamente), confirmados na análise de interconexões gênicas do Interactoma e no gráfico de Análise de correspondência. Comparando-se com as frequências médias esperadas nos maiores estudos recentes dessa área, consideramos que foi evidenciado um dado regional verdadeiramente distinto na população paranaense (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; JORDAN *et al.*, 2017).

Como já previamente reportado, não encontramos diferenças marcantes no predomínio das mutações através dos diferentes estadios ao diagnóstico (doença loco-regional vs doença metastática), confirmando a hipótese de que essas mutações adquiridas funcionam de fato como alterações genômicas tronculares precoces na carcinogênese do *NSCLC* (“*truncal mutations*”) (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; CHEN *et al.*, 2022).

A identificação das mutações condutoras no gene do *EGFR* é considerada imprescindível para a melhor prática médica em Oncologia torácica já há 2 décadas, devido à gama de boas oportunidades terapêuticas atualmente disponíveis aos médicos e aos pacientes nessa doença singular. Desde a descoberta dessa via de transdução de sinal em *NSCLC* em 2004 e, subsequentemente, com o lançamento do 1º tratamento sistêmico com o *TKI* anti-*EGFR* gefitinibe em 2009, os pacientes vêm experimentando respostas muitas vezes dramáticas e duradouras com a terapia-alvo, considerando-se tanto a velocidade quanto a profundidade de resposta, que não eram documentadas habitualmente com a quimioterapia citotóxica convencional (MOK *et al.*, 2009; SKOULIDIS *et al.*, 2019). Com medianas de *PFS* aproximando-se dos 20 meses (SORIA *et al.*, 2018), essa estratégia vem sendo incorporada progressivamente na prática médica e hoje é considerado como o tratamento “*gold-standard*” para essa doença. Isso reforça o conceito de medicina de precisão para se atingir melhores desfechos com a personalização do tratamento do câncer.

Quando analisado no contexto de países ocidentais, são esperados nos adenocarcinomas de pulmão incidências para mutação no *EGFR* na faixa dos 10% a 15% nos EUA e Europa e de 25% a 34% na América Latina; já para as mutações em *TP53* e *KRAS*, são

estimados índices de 55% a 60% e 25% a 30%, respectivamente. Isto posto, essa é conhecida hoje como uma das áreas de maior variabilidade étnica em Oncologia torácica: essas prevalências são completamente distintas das observadas em populações asiáticas, onde mutações em *EGFR* chegam a atingir 39% a 57,7%, enquanto verificam-se índices de mutações em *TP53* em torno de 33% e em *KRAS* de 7,4% a 11% (CHEN *et al.*, 2022; DEARDEN *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015; ZHUANG *et al.*, 2019).

Em nossa amostra regional, constatou-se a mutação em *EGFR* em 33% dos casos, atingindo significância estatística ao se comparar com as prevalências internacional e nacional mais recentes (JORDAN *et al.*, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2021). Utilizamos métodos de sequenciamento por *PCR*, pirosequenciamento e *NGS* para os diagnósticos, comprovando que temos no estado do PR uma população majoritariamente tabagista (53%), porém ainda assim com alta incidência dessa mutação ativadora quando confrontada com outros dados nacionais.

Dispondo das mesmas metodologias, a casuística reportada pelo grupo do Hospital AC Camargo em 2020 constatou mutações nesse gene em 25,4% dos 1.316 adenocarcinomas pulmonares sequenciado; outra evidência multicêntrica brasileira, publicada ainda neste mesmo ano, reportou 24% de alterações no *EGFR* em 391 indivíduos. Todavia, no ano anterior a essas publicações, um estudo regional com uma casuística completamente sulista proveniente de 22 centros (majoritariamente oriundos do estado do Rio Grande do Sul), havia identificado apenas 19,2% de mutações em *EGFR* em 619 pacientes com adenocarcinoma. Posteriormente, os dados do Grupo Brasileiro de Oncologia Torácica (GBOT) comprovaram taxas semelhantes de prevalência dessa mutação, encontradas em 22,5% nas amostras de 513 pacientes sequenciados (ANDREIS *et al.*, 2019; CRONEMBERGER *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2020; MASCARENHAS *et al.*, 2021).

Após a diagramação dos genes e de suas interconexões no Interactoma e, principalmente, na Análise de correspondência de componentes principais, ficou claro que temos nessa amostra de pacientes uma assinatura genômica regional específica: presença de mutação condutora em *EGFR* e co-mutação em *TP53*, que foi nitidamente excludente para mutação em *KRAS-NRAS*. Essa associação negativa também já vem sendo demonstrada em várias séries retrospectivas; num estudo do *MSKCC*, apenas 2 dos 860 pacientes sequenciados apresentaram mutações concomitantes em *EGFR* e *KRAS* (CHEN *et al.*, 2022; JORDAN *et al.*, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2021).

O espectro de enriquecimento de co-alterações genômicas nos pacientes portadores de mutação em *EGFR* vem aumentando na última década de pesquisas. Essa associação entre as mutações do *EGFR* e do *TP53* já é bem conhecida, sendo este o principal parceiro encontrado nas avaliações genômicas somáticas de populações enriquecidas por mutações no *EGFR*. Essa precoce co-mutação troncular de perda de função por homo ou heterozigiosidade chega a ser diagnosticada em 54,6% a 64% dos casos de *mNSCLC* e pode estar associada a curtos intervalos livre de doença e a resistência terapêutica, configurando menor durabilidade de resposta aos *TKIs* anti-*EGFR* (em particular nos casos de deleção do éxon 19 do *EGFR*). Num estudo conduzido por várias instituições do estado do Rio Grande do Sul, identificou-se que mutações em *EGFR* ocorreram em 57,1% dos pacientes portadores de tumores com a mutação somática em *TP53*. Contudo, outras co-mutações também já estão estabelecidas nesse cenário acompanhando o *EGFR*, como o *RB1* (9,5% a 12,5%), *CTNNB1* (5,3% a 9,6%), *PIK3Ca* (9% a 12,4%), *NKX2-1* (12,2% a 16,7%) e genes de ciclinas como o *CDK4*, *CDK6* e *CCNE1* (até 10% dos casos, especialmente nos casos de mutação *T790M*) (MASCARENHAS *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2021; SKOULIDIS *et al.*, 2019).

O *TP53* é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 17, contém 11 éxons e possui inúmeras funções e processos celulares, como reparo do *DNA*, controle do ciclo celular, apoptose, autofagia, senescência celular e metabolismo. Sua mutação na linhagem somática está presente em inúmeros cânceres, existindo em aproximadamente 50% dos casos de *NSCLC*, e costuma ser um evento precoce na carcinogênese das neoplasias epiteliais do pulmão. Está relacionado frequentemente a maior disseminação linfática, mesmo na doença localizada, e a pior prognóstico e resistência terapêutica em câncer de pulmão metastático (muitos estudos indicam a radio e quimiorresistência desses tumores mutados *in vitro* e *in vivo*). Entretanto, ainda não dispomos de nenhuma terapia-alvo para esse cenário diagnóstico, apesar de haver certo respaldo na literatura quanto ao benefício do uso de bloqueadores de *immune checkpoints* para os pacientes com mutação em *KRAS* e co-mutação no *TP53* (MOGI *et al.*, 2011; SCHOENFELD *et al.*, 2020). Em nossa amostra, a mutação em *TP53* foi identificada em 34% de todos os indivíduos, representando 59% dos pacientes que realizaram avaliação genômica por painel de *NGS* (*Foundation One CDx*), o que foi consistente com o observado previamente na literatura, apesar de numericamente maior na amostra de pacientes de Londrina-Curitiba/PR.

Ainda, ao se estudar sobre as mutações em *TP53* em nosso país, é importante ressaltar que especialmente na região sul e sudeste é comum encontrarmos altas prevalências de mutações patogênicas na linhagem germinativa desse gene. Localizada no domínio de oligomerização do éxon 10 do gene *TP53*, as mutações com perda em heterozigose de 1 dos alelos do *TP53* são observados na população geral em 1 : 5000 pessoas, porém essas taxas se aproximam de 1 : 300 indivíduos na nossa região. Essa situação clínica confere um risco aumentado de penetrância carcinogênica familiar, elevando a chance de aparecimento de diversas neoplasias antes dos 45 anos (inclusive na infância) na chamada síndrome de Li-Fraumeni, como o câncer de adrenal, de mama, sarcomas de alto grau de extremidades, tumores cerebrais, leucemias e o câncer de pulmão em não-tabagistas, especialmente o adenocarcinoma subtipo lepidico (ACHATZ *et al.*, 2007, 2009; PALMERO *et al.*, 2008; RICORDEL *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2021).

No estado do PR, conhecido pela ampla diversidade étnica e forte histórico de colonização européia (a ancestralidade teuto-italo-alemã está presente em 80% a 90% da população da região do sul do Brasil), a clássica variante germinativa fundadora c.1010G>A ou R337H [*p.(Arg337His)*], patognomônica da síndrome de Li-Fraumeni, é esperada em 0,3% nessa população. Sua presença na linhagem germinativa está relacionada a expressivo aumento na incidência de adenocarcinomas pulmonares carregando mutações somáticas no *EGFR* (57,1% vs 17,6%) e em *HER2*. Portanto, neste cenário clínico o sequenciamento genômico do *NSCLC*, especialmente em pacientes não-tabagistas com menos de 50 anos, torna-se obrigatório. Duas recentes evidências apontam para uma taxa elevada de alterações somáticas em *EGFR* na população portadora da síndrome de Li-Fraumeni, atingindo índices de até 90% (ACHATZ *et al.*, 2007, 2009; ANDREIS *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2020; MASCARENHAS *et al.*, 2021; MEZQUITA *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021).

Em nosso estudo, apesar do gene *TP53* ter sido revelado como um elemento central no painel funcional de interconexões moleculares (o Interactoma gênico), não foi realizada a análise do perfil de mutações germinativas dos indivíduos recrutados, e conseguimos identificar apenas 1 caso de mutação somática clássica R337H no subgrupo de pacientes com mutação no gene *TP53*. Sabendo que essa variante genômica é muito raramente vista na linhagem somática dos *NSCLC*, inferimos que essa questão do nexo de causalidade genômica regional ainda permanece como uma hipótese, sendo logicamente

uma limitação do nosso estudo, o que decerto reforça a necessidade da discussão do aconselhamento genético para todos esses pacientes e seus familiares.

Mutações no gene *KRAS* são eventos que ocupam uma posição de destaque em *NSCLC*, pois são consideradas as alterações oncogênicas “drivers” mais prevalentes nessa doença. O tabagismo está altamente associado a esse grupo heterogêneo de mutações e de grande diversidade de comportamento clínico, e também a maiores cargas mutacionais e de expressão de *PDL-1* no tumor. Mais comuns na população masculina e ocidental (25% a 40% dos casos) do que na Ásia (aproximadamente 10% dos casos), essa é uma mutação que frequentemente está associada a outras co-mutações, com o *STK11* (também conhecido como *LKB1*), *KEAP1*, *CDKN2A/B* e *TP53*, sendo conhecidamente um subgrupo de pacientes com tumores de difícil tratamento. Em contrapartida, a presença de mutação em *KRAS* habitualmente reduz muito a chance de *overlapping* com outras alterações genômicas do receptor de tirosina-quinase da família *RAS-RAF*, como *EGFR*, *HER2*, *BRAF*, *NF1*, assim como em *ALK*, *ROS1* e *RET* (por conseguinte, são consideradas mutações mutuamente excludentes). Especial atenção vem sendo dada à mutação *KRAS G12C*, onde ocorre a substituição do aminoácido glicina por uma cisteína na posição correspondente ao seu códon 12, pelos resultados iniciais obtidos com a terapia-alvo, em câncer de pulmão e também em outras neoplasias com essa alteração somática com o sotorasibe e o adagrasibe (SKOULIDIS; HEYMACH, 2019; WEST *et al.*, 2022).

Em nossa amostra identificamos apenas 15% de indivíduos com a mutação em *KRAS*, o que atribuímos a uma menor prevalência de pacientes grandes tabagistas nessa casuística, quando comparado aos recentes dados nacionais de sequenciamento gênico do GBOT e do Hospital AC Camargo, que flutuam entre 24% e 27%, respectivamente, e internacionais com prevalências de cerca de 24,5% (FREITAS *et al.*, 2020; MASCARENHAS *et al.*, 2021; WEST *et al.*, 2022). Notadamente, mutação no gene *KRAS* na presença de co-mutações em *STK11/LKB1* e *KEAP1* é um indicador de mau prognóstico, com baixos índices de sobrevida mesmo no contexto de expressão de *PDL-1* e de disponibilidade de esquemas baseados na combinação de quimioterapia com platina, terapia anti-angiogênica e imunoterapia anti-*PD1/PDL-1*, como demonstrado no estudo IMpower-150 e em outros dados retrospectivos, diferente do observado em pacientes com mutação em *KRAS* e *TP53*. Além disso, para outras mutações no *KRAS* (que não-*G12C*) e co-mutações em *STK11/LKB1* e

KEAP1 ainda não dispomos de terapias alvo-moleculares eficazes (SCHOENFELD *et al.*, 2020; WEST *et al.*, 2022).

O *STK11* codifica uma quinase do tipo serina-treonina responsável pela homeostase energética, regulação do metabolismo celular e do crescimento e polarização celular através da fosforilação da *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK)*. Sua inativação está associada a inúmeros eventos de escape imune do câncer, tornando o microambiente tumoral “frio” ou “inerte” pela redução da densidade do infiltrado de linfócitos T CD8+, exclusão de linfócitos T CD3+, linfócitos B e de células *NK* via interleucina-23 e da quimiocina *CCL9*, redução do recrutamento de células dendríticas por *downregulation* por outras quimiocinas e pela ausência de expressão tumoral de *PDL-1* (mesmo na presença de *TMB* mais elevados), levando a um mecanismo intrínseco maior de resistência à terapia com os bloqueadores do *PD1*. Essas alterações genômicas em *STK11* devem ser diagnosticadas preferencialmente por exames de biologia molecular, mas também podem ser encontradas em exames de IHQ (BONANNO *et al.*, 2017; KOTTAKIS *et al.*, 2016; KOYAMA *et al.*, 2016; SHACKELFORD *et al.*, 2009; SKOULIDIS; HEYMACH, 2019; TANG *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2015).

Por sua vez, o *KEAP1* é um gene responsável pela mediação da ubiquitinação e degradação de proteossomas através do *Nuclear Factor Erythroid 2 (NRF2)*, relacionado à transcrição de importantes elementos que funcionam como fatores antioxidantes celulares, síntese e metabolismo da glutathiona, fatores anti-inflamatórios e, portanto, de cito-proteção (“desintoxicação celular”). As mutações que levam à inativação do *KEAP1* por hipermetilação resultam no acúmulo de *NRF2* e, por conseguinte, no desbalanceamento de inúmeras vias bioquímicas de homeostase e de anabolismo celular. Essas modificações epigenéticas levam a um fenótipo tumoral altamente agressivo e quimiorresistente e também se caracterizam como um indicador prognóstico negativo independente (JARAMILLO; ZHANG, 2013; SKOULIDIS; HEYMACH, 2019).

Em nosso estudo, identificamos apenas 4,5% de prevalência de mutações tanto em *STK11* quanto em *KEAP1* e, novamente, atribuímos esse achado a um menor predomínio de pacientes grandes tabagistas nessa casuística, quando comparado aos recentes dados nacionais de sequenciamento gênico do GBOT e internacionais, de cerca de 11,6%. Consideramos a análise dessas co-mutações importante, pois elas também implicam

em piores resultados em sobrevida e em resposta à moderna imunoterapia anti-*PD1* (14,5% a 15,5%) (FREITAS *et al.*, 2020; MASCARENHAS *et al.*, 2021; WEST *et al.*, 2022).

Outro dado em absoluta congruência com a literatura atual identificado no gráfico simétrico das variáveis em 2 eixos, foi a associação entre mutações que levam à perda de função de *MTAP* e hipermetilação e/ou perda de função por heteroziguidade do *CDKN2A/B*, ambos encontrados no cromossomo 9p21 e presentes precocemente na carcinogênese do câncer de pulmão de pacientes grandes tabagistas. Descrito em poucos trabalhos na literatura sobre esse tema, as alterações em *MTAP* são acompanhadas por mutações em *CDKN2A/B* em 98% dos casos; em nossa amostra essa associação foi diagnosticada em 100% dos casos. O gene *MTAP* é responsável pela transcrição da enzima Metiltioadenosina fosforilase, responsável por regenerar a metionina e a adenina no ciclo celular via inibição do *PRMT5*, tendo, portanto, um importante papel na teoria da letalidade sintética, sendo também um possível futuro alvo terapêutico em *NSCLC*. Já o gene *CDKN2A/B* é o responsável pela transcrição de importantes proteínas supressoras tumorais (p14, p15 ou INK4b e, principalmente, p16 ou INK4a – a expressão dessas proteínas leva à apoptose e parada do ciclo celular por inativação do *MDM2*, degradação da proteína p53 e inibição das ciclinas CDK4 e CDK6), cujas alterações levam a piores desfechos em sobrevida (AWAYA *et al.*, 2004; TAM *et al.*, 2013). Quando encontrados em tumores com mutação ativadora do *EGFR* levam também a piores respostas à terapia anti-*EGFR*, mesmo com osimertinibe segundo a análise *post-HOC* do estudo FLAURA (KUMAR *et al.*, 2023).

Considerando as outras variantes genômicas acionáveis clinicamente relevantes, ou seja, com importância médica atual pela disponibilidade comercial de terapias-alvo no Brasil como *ALK*, *ROS1*, *MET*, *HER2*, *BRAF V600E* e *RET*, foram identificadas frequências semelhantes às descritas previamente em coortes nacionais e internacionais (AWAYA *et al.*, 2004; CAMIDGE *et al.*, 2021; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014; CHEN *et al.*, 2022; DEARDEN *et al.*, 2013; DRILON *et al.*, 2020; JORDAN *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2022; MASCARENHAS *et al.*, 2021; MOGI *et al.*, 2011; MOK *et al.*, 2009; PAIK *et al.*, 2020; PLANCHARD *et al.*, 2017; ROSELL *et al.*, 2012; SHAW *et al.*, 2014; SKOULIDIS *et al.*, 2018; SKOULIDIS; HEYMACH, 2019; TAM *et al.*, 2013; WEST *et al.*, 2022; WOLF *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2017).

A presença de mutação no *PDL-1* foi observada com maior expressão diferencial entre a nossa população e as amostras do *TCGA*, com uma variação (*foldchange*)

de mais de 100 vezes. Esse gene pode ser um preditor de pior prognóstico e tem sido amplamente debatido como um importante alvo de tratamento no câncer de pulmão e também como um importante biomarcador de resposta, tanto pela magnitude quanto pela duração de resposta à imunoterapia em diversos momentos da doença (GANDHI *et al.*, 2018; RITTMAYER *et al.*, 2016).

Num recente estudo japonês, demonstrou-se a associação entre a expressão de *PDL-1* e a presença de infiltração metastática dos linfonodos mediastinais em peças cirúrgicas. Os autores ainda citam que a presença desse marcador em células tumorais com maior taxa de neoantígenos pode estar relacionada à apresentação e ao reconhecimento antigênico por células dendríticas, esperado nesta topografia, aumentando o gradiente de citocinas estromais, o que levaria a um maior fluxo linfático e, conseqüentemente, de células tumorais em direção aos linfonodos (OSOEGAWA *et al.*, 2023). Tal explicação enquadra-se numa necessidade clínica atual, e muito promissora, em se utilizar a terapia anti-*PD1* no cenário de doença mais precoce (leia-se, pré-operatória), pois essa manipulação na doença metastática de células imunes circulantes e no microambiente tumoral exaurido após o uso de quimioterapia citotóxica pode ter uma menor eficácia em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global (AHN *et al.*, 2023; OSOEGAWA *et al.*, 2023).

Em relação à expressão observada na IHQ, optou-se em nosso estudo por limitar os laudos de *PDL-1*, selecionando-se apenas os clones 22C3, 28-8 e SP263. Já é bem conhecida na literatura a alta concordância entre esses 3 imunomarcadores do ponto de vista técnico e de validação inter-observador, corroborados numa revisão sobre esse tema em 2017, quando se observou a intercambialidade entre os *cutoffs* escolhidos com esses 3 clones diferentes, além de uma concordância satisfatória entre os laudos de diferentes patologistas que compuseram a amostra (> 86%), chegando a uma taxa de reproducibilidade intra-observador de até 91% e inter-observador de até 84%. Tal resultado já não foi identificado ao se comparar esses 3 clones com a metodologia utilizada com o clone SP142, no qual não se analisa a expressão IHQ do *PDL-1* apenas nas células tumorais, mas também nas células imunes do microambiente tumoral (BÜTTNER *et al.*, 2017). Por esta razão este clone não foi incluído no nosso estudo.

As maiores evidências na literatura mundial a respeito desse tema são provenientes dos dados do grupo do *MSKCC* e do estudo clínico EXPRESS. Examinando a

expressão de *PDL-1* e o *NGS (MSK-IMPACT)* de 1.023 pacientes com *NSCLC*, Rizvi *et al.* (2019) evidenciaram que 61% das amostras eram negativas para *PDL-1* e, dos 39% com *TPS* positivo, 18% eram hiper-expressores e 21% tinham expressão moderada. Esse mesmo grupo, no ano seguinte, comprovou esses dados em pacientes apenas com adenocarcinomas ($n = 1.585$), confirmando que numericamente essa histologia carrega mais portadores de tumores sem expressão de *PDL-1* (66,6% com *TPS* < 1%, 18% com *TPS* entre 1% e 49% e 15,4% com *TPS* $\geq 50\%$). Em ambos os estudos, a alta expressão de *PDL-1* foi significativamente enriquecida na população com doença metastática vs biópsias de tumor primário ($p < 0,001$) (RIZVI *et al.*, 2019; SCHOENFELD *et al.*, 2020).

O “*EXPRESS trial*” foi o maior estudo que analisou os dados de expressão IHQ do *PDL-1*. Neste estudo retrospectivo observacional multicêntrico global, 2.435 pacientes ($n = 2.368$ amostras tumorais) com *NSCLC*, estadios IIIB e IV segundo a 7ª edição da *AJCC*, de 45 centros oriundos de 18 países tiveram seus tumores avaliados apenas pelo clone 22C3 *pharmDx assay*, com o objetivo primário de se determinar a prevalência global, regional e “país-específica” da expressão de *PDL-1* por *TPS*. Como resultado global do estudo, foi observada a seguinte distribuição: 48% das amostras com expressão negativa, 30% com expressão moderada e 22% com hiper-expressão de *PDL-1*. Não foi encontrada nenhuma característica demográfica, geográfica ou clínico-patológica associada às diferentes prevalências do *PDL-1*, apesar de alguns pacientes com alterações em *EGFR* e *ALK* terem sido incluídos; porém, nesse estudo não foi observada diferença estatística em relação à origem da peça biopsiada (metástase vs tumor primário) (DIETEL *et al.*, 2019).

A elevada expressão IHQ de *PDL-1* por *TPS* encontrada em nosso estudo indica a possibilidade de um perfil genômico regional distinto: 52,5% da nossa amostra não tem expressão de *PDL-1* (*TPS* < 1%), enquanto que 48% são expressores; dentre os pacientes expressores, encontramos 14,6% de hiper-expressores (*TPS* $\geq 50\%$) e 32,7% com expressão moderada (*TPS* entre 1% a 49%).

Nossos dados de expressão de *PDL-1* são numericamente diferentes dos 3 estudos citados, todavia se aproximam dos publicados numa recente série chinesa unicêntrica. Nesse estudo que analisou 1.090 peças cirúrgicas, 51,93% dos espécimes não tinham expressão de *PDL-1*, 31,19% tinham expressão moderada e 16,88% tinham hiper-expressão. Segundo os autores, a análise univariada sugere que altas expressões teciduais de *PDL-1* são mais comumente vistas em pacientes do sexo masculino, com invasão

angiolímfática, componente sólido predominante de alto grau e em estadios mais avançados ($p < 0,001$), vindo de acordo com dados de outros estudos de patologia, não havendo uma relação estatisticamente significativa para outras variáveis, como idade e invasão pleural (ZHU *et al.*, 2023).

Entretanto, numa comparação direta com os dados dessas diferentes literaturas internacionais aqui expostas, pôde-se observar uma maior prevalência em nossa casuística de pacientes com expressão positiva e moderada de *PDL-1*, porém com taxas de hiper-expressão ($TPS > 50\%$) comparáveis às experiências reportadas por outros autores. Realizamos, então, uma análise estatística que comprovou uma diferença estatisticamente significativa na nossa amostra paranaense ($p = 0,04$), denotando que temos em nossa região uma expressão mais enriquecida para esse imunomarcador.

Com relação ao padrão de expressão tecidual do *PDL-1* publicado por outros grupos brasileiros, encontramos em nosso estudo informações um tanto distintas. O grupo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre descreveu, num estudo retrospectivo com 799 indivíduos, positividade para *PDL-1* em apenas 35,1% dos 202 casos analisados por IHQ utilizando o clone SP263 (21,3% de expressão moderada e 13,8% de hiper-expressão); portanto, aproximadamente 65% das amostras tinham $TPS < 1\%$. Dados semelhantes foram observados na região nordeste numa análise retrospectiva com 158 casos de adenocarcinomas pulmonares ressecados, revelando 59,5% de amostras sem expressão de *PDL-1*, 24% com expressão moderada e 16,5% de pacientes hiper-expressores (ANDREIS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

Contudo, a maior evidência nacional com dados de vida real que temos atualmente publicada, inclusive para fins de comparações regionais, encontra-se no estudo retrospectivo transversal realizado pela parceria entre o LACOG (*Latin American Cooperative Oncology Group*) e o GBOT. Publicado em 2020, esse estudo compilou os dados de expressão de *PDL-1* utilizando o clone 22C3 oriundos de 6 laboratórios brasileiros certificados de patologia, com biópsias de 1.512 pacientes diagnosticados com *NSCLC* localmente avançado irrissecável ou metastático. Majoritariamente composto por tumores não-escamosos (cerca de 82%) e sem mutação condutora em *EGFR* ou *ALK* (88% e 96%, respectivamente), o estudo revelou uma população de 56,54% de indivíduos com TPS negativo, 25,63% com expressão moderada de *PDL-1* e 17,83% de hiper-expressores, porém sem uma diferença estatisticamente significante quanto à distribuição geográfica. Ao se analisar

especificamente o subgrupo de adenocarcinomas, foi evidenciado que 60,6% dos pacientes tinham *TPS* negativo, 23,2% tinham expressão moderada e 16,2% eram hiper-expressores (GELATTI *et al.*, 2020).

Com isso, ao nos depararmos com um perfil regional numericamente de maior expressão para o *PDL-1* (isto é, mais enriquecida para o estrato *TPS* entre 1% a 49% e com menor prevalência de negatividade para o *PDL-1*), realizamos uma nova análise estatística; entretanto, comparando-se os dados desses 2 estudos não foi possível demonstrar uma diferença significativa ($p = 0,5162$). Não obstante, essa discussão não deixa de ser útil para reforçar a necessidade que temos frente à obtenção, manejo, preservação e acondicionamento dessas biópsias teciduais para evitarmos erros diagnósticos processuais e de leitura dos testes, que vão desde questões pré-analíticas, como a técnica de coleta, logística e tempo para o transporte do material ao laboratório e do uso de meios de fixação com formol tamponado 10% adequado, até o treinamento constante da equipe médica intervencionista, de patologistas e de oncologistas para a interpretação final correta dos laudos. Isto pode afetar a condução individual personalizada dos pacientes com *mNSCLC* (por exemplo, candidatos à monoterapia em 1ª linha com inibidores de *immune checkpoints*) e até mesmo se considerada a termos de políticas de saúde locais, ambos tão almejados na Oncologia como um todo, mas especialmente nas neoplasias torácicas, tendo em vista o enorme desafio clínico enfrentado nessa área.

Apesar da larga utilização da imunoterapia anti-*PD1* para a doença metastática em nossa amostra ($n = 27$, correspondendo a 42,1% dos indivíduos sem mutações ativadoras), nosso estudo carece de evidências quanto à sua utilização no cenário de doença localizada ou localmente avançada submetida à radioterapia. Reportamos apenas 4 indivíduos, correspondendo a 16% dos pacientes alocados para tratamento adjuvante na doença loco-regional, porém salienta-se a grande dificuldade de acesso dos pacientes a essa estratégia no contexto de saúde pública em nosso país, entendendo que as amostras de alguns dos nossos pacientes foram oriundas de um serviço majoritariamente atendido pelo SUS em Curitiba.

O *Tumor Mutational Burden* é a forma de quantificação do número total de mutações somáticas por área codificada de um genoma tumoral, incluindo ambas as substituições de bases e deleções/inserções curtas (BODOR *et al.*, 2020). Inicialmente realizado através do sequenciamento de todo o exoma (*Whole-Exome Sequencing*), esse

dado molecular é hoje mensurado através de técnicas de *NGS* e vem sendo postulado como um potencial biomarcador de resposta à imunoterapia em várias neoplasias (HELLMANN *et al.*, 2019). Segundo um estudo com 240 pacientes sequenciados com câncer de pulmão, tratados no *MSKCC*, demonstrou-se benefício em *PFS* e *DOR* nos indivíduos com altos níveis de neoantígenos e mutações não-sinônimas com o uso da terapia anti-*PD1* em monoterapia ou associada à terapia anti-*CTLA-4* (RIZVI *et al.*, 2018).

O *cutoff* ideal para subestratificar os pacientes com câncer de pulmão segundo o *TMB* vem sendo debatido na literatura. Os valores hoje mais aceitos para classificar o *TMB* em baixo ou alto utilizam como corte \leq ou $>$ 10 Mutações/Megabase, respectivamente, havendo uma ligeira maior probabilidade de os pacientes apresentarem baixa carga tumoral (54% a 58%) do que alta carga tumoral (42% a 45%) (HELLMANN *et al.*, 2018, 2019; MARABELLE *et al.*, 2020).

Nosso estudo demonstrou que 6% dos pacientes tinham *TMB* alto, 41,3% tinham *TMB* baixo e 52,6% tiveram a avaliação do *TMB* como indeterminada ou inconclusiva ($p < 0,0001$). Ao nos depararmos com este dado, foi definido então pelos investigadores por prosseguir com o refinamento dessa informação com a exclusão dos resultados de pacientes com *TMB* “undetermined” para nova análise quantitativa e estatística, comprovando na verdade que a população com alto *TMB* compunha apenas 13% da amostra (ou seja, cerca de 87% dos indivíduos analisados tiveram um resultado de *TMB* $<$ 10 Mutações/Megabase).

Na 1ª publicação dos dados do estudo CHECKMATE-227, foi observado que 44,2% dos indivíduos apresentaram alto *TMB* (\geq 10 Mutações/Megabase) e que neste subgrupo, independente do status de expressão do *PDL-1* e do subtipo histológico, houve benefício em *ORR* e em *PFS* para os pacientes que receberam a combinação de imunoterapias com ipilimumab e nivolumab *versus* quimioterapia convencional. Isso trouxe um ganho absoluto em *PFS* em 1 ano de quase 30%, com 43% de pacientes mantendo resposta clínica sustentada; já na população *TMB* baixo não foi observada qualquer diferença para esses desfechos, até mesmo com uma tendência de efeito detrimental do tratamento experimental (*HR* 1,07 para *PFS*; IC 95% 0,84-1,35). Com isso, os autores concluíram que esse *cutoff* de *TMB* pode ser considerado um biomarcador eficaz para melhor seleção terapêutica dos pacientes com *mNSCLC*, reforçando a necessidade do duplo bloqueio dos *immune checkpoints* (HELLMANN *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que tanto na sua publicação inicial em 2018 quanto na divulgação final dos dados CHECKMATE-227 em 2019, apenas cerca de 58% dos pacientes conseguiram fazer este tipo de avaliação molecular, denotando a dificuldade técnica muitas vezes encontrada para se conseguir amostras teciduais adequadas (quali e quantitativamente) para a determinação dessa subanálise genômica, mesmo no ambiente de um grande ensaio clínico controlado multicêntrico – por essa razão optamos por prosseguir com o refinamento dos dados numa 2ª avaliação estatística (HELLMANN *et al.*, 2018, 2019).

Na atualização desse ensaio clínico em 2019, constatou-se que no braço experimental foram identificados 42% de pacientes com *TMB* alto e cerca de 58% de pacientes com *TMB* baixo, não tendo sido comprovada uma diferença estatisticamente significativa de ganhos em *OS* para os pacientes que receberam a combinação de imunoterapias com ipilimumab e nivolumab *versus* a quimioterapia, em relação aos *cutoffs* pré-estabelecidos para o *TMB*, contrariando os dados anteriores de um possível maior benefício dessa nova estratégia na população *TMB* alto (HELLMANN *et al.*, 2018, 2019).

Esse achado de grande número de exames com resultado indeterminado ou inconclusivo nos leva à conclusão de que para realizar fidedignamente essa avaliação genômica é sempre necessário lançar mão de testes moleculares de sequenciamento amplo do *DNA* do tecido tumoral por *NGS*. Contudo, mesmo no cenário de um ambiente altamente controlado como ocorre nos grandes estudos clínicos prospectivos, essa é uma avaliação difícil e a sua baixa reprodutibilidade externa em dados de vida real torna-se, portanto, já assim esperada. Muitos dos pacientes do nosso estudo realizaram suas avaliações por meio de plataformas *Hotspots*, onde dispomos de uma avaliação com menos genes, devido ao cenário de planejamento de terapia adjuvante ou pela ausência de reembolso das fontes pagadoras pelos testes ou ainda por alguns pacientes recrutados estarem inseridos num centro oncológico majoritariamente atendido pelo SUS.

O maior estudo nacional com dados de vida real a respeito do tema *TMB* pertence, novamente, ao GBOT. Nesse estudo retrospectivo publicado em 2021, as análises moleculares foram obtidas por meio das plataformas *Foundation One CDx* e *Foundation ACT*, portanto utilizando tanto o tecido tumoral quanto o *DNA* circulante tumoral do plasma (*ctDNA*). As avaliações de *TMB* conseguiram ser acessadas em 80,5% dos indivíduos, tendo sido diagnosticados apenas 5,5% de casos com alto *TMB* (o *cutoff* utilizado nesse estudo foi \geq

10 Mutações/Megabase), especialmente encontrado em pacientes com mutações nos genes *TP53*, *STK11*, *PIK3CA* e *NTRK*. Esses dados de base nacional se assemelham muito aos que descrevemos no nosso estudo (MASCARENHAS *et al.*, 2021).

Singal *et al.* também descreveram esses achados genômicos de carga mutacional tumoral numa revisão sistemática americana com 4.064 pacientes com *NSCLC* publicada em 2019 e 2020. Alto *TMB* foi significativamente associado a pacientes tabagistas e com mutações em *KRAS* e *PIK3CA*, enquanto que mutações em *EGFR*, *ALK*, *ROS1* e *RET* foram encontradas mais comumente entre indivíduos com *TMB* baixo. Além disso, os pacientes com alto *TMB* (especialmente se ≥ 20 Mutações/Megabase) tiveram melhora de *OS* com a terapia anti-*PD1*, maior *DOR* e melhores taxas de benefício clínico comparado aos indivíduos com *TMB* baixo (SINGAL *et al.*, 2019, 2020).

Analisando o evidente perfil mutacional da nossa amostra, procuramos estabelecer de forma exploratória se haveria alguma relação entre as variáveis “*TMB*”, “mutações condutoras” e “tabagismo”. Evidenciamos que há uma correlação estatística antagônica nessa casuística na comparação entre “*TMB*” e a “presença de mutações ativadoras” e entre “tabagismo” e “presença de mutações ativadoras” ($p < 0,05$). Ou seja, nos pacientes portadores de *NSCLC* com mutações condutoras observam-se mais taxas de *TMB* baixo e indivíduos não-fumantes (sendo o oposto também verdadeiro para essas correlações). Contudo, não identificamos diferenças estatisticamente significantes na análise entre as variáveis “*TMB*” e “tabagismo” ($p > 0,05$).

Sobre o tema *MSI*, o KEYNOTE-158, um estudo aberto multicêntrico não-randomizado de fase 2, sugeriu a correlação entre o fenômeno da instabilidade microssatélite, uma deficiência do sistema enzimático de reparo do *DNA* (*Mismatch Repair Deficiency*), e a expressão de *PDL-1* com resposta objetiva à imunoterapia. Tal evento genético pode levar ao aumento de linfócitos T-infiltrantes e ao *up-regulation* de *PD1*, *CTLA-4* e do gene de ativação linfocitária-3 (*LAG-3*), levando ao aumento do infiltrado linfocitário no microambiente tumoral e da carga tumoral mutacional, resultando em mais proteínas ou neoantígenos mutados. Com isso, nos tumores com *MSI-high* haveria aumento subsequente do *TMB*, sugerindo que esse também pode ser um biomarcador tecidual útil para predição de melhores respostas aos inibidores de *immune checkpoints*, o que levou à aprovação agnóstica recente do pembrolizumab em monoterapia em alguns países como os EUA, Japão e Austrália. Entretanto, este é um evento genômico raro, representando apenas 2% a 4% de

todos os cânceres, podendo estar inserido no contexto de uma síndrome hereditária, como a síndrome de Lynch, ou mais comumente em casos esporádicos (MARABELLE *et al.*, 2019, 2020), porém reiteramos que essa é uma circunstância extremamente incomum em *NSCLC*.

Como citado anteriormente em relação ao grande número de resultados inconclusivos ou indeterminados para o *TMB*, exatamente o mesmo fenômeno foi constatado em nossa amostra quanto à presença ou não do fenômeno da instabilidade microssatélite (54,8% da amostra, $p < 0,0001$), o que nos leva a concluir também que para realizar fidedignamente essa avaliação genômica é sempre necessário lançar mão de testes moleculares de sequenciamento amplo do *DNA* do tecido tumoral por *NGS* (como já foi mencionado, alguns pacientes realizaram suas avaliações por meio de plataformas *Hotspots*). Em nosso estudo não foram encontrados casos de *MSI-high*, confirmando a excepcionalidade desse evento genômico na população *NSCLC*.

A análise funcional do conjunto de genes mutados na população estudada revelou que boa parte destes são fatores de transcrição, responsáveis pela transdução de sinal e pela comunicação celular. Essas mutações estão associadas principalmente a ganhos de função, potencializando vias de sinalização aberrantes formadas por componentes como o *IFN- γ* , o *MET*, o Fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF*), o *IGF-1* e o *ErbB*, e que interagem fortemente entre si, conforme demonstrado neste estudo pelas análises *in silico* (BONTOUX *et al.*, 2023; SOMPALLAE *et al.*, 2023).

O gene *MET* coordena o processo de transição epitélio-mesênquima, fenômeno associado ao desenvolvimento de doença metastática. As vias do *IGF-1* e do *ErbB* coordenam genes mutantes que conferem capacidade de proliferação e crescimento, e que estão frequentemente co-amplificados no câncer de pulmão. Seu significado clínico está associado a desfechos de pior prognóstico que não se beneficiam, por exemplo, do uso de imunoterapia anti-*PD1*. Já a via do *PDGF* apresenta importante papel na vascularização e neoangiogênese tumoral. Observamos ainda que alguns genes mutados diferencialmente expressos na nossa amostra são expressos em vários tecidos nas fases fetal e adulta, sugerindo sua importância como genes de desenvolvimento. Estes genes são superexpressos nos tumores e conferem capacidade de proliferação, transição epitélio-mesenquimal e fenótipo celular metastático (LI *et al.*, 2023; THOMPSON *et al.*, 2020).

A via do *IFN- γ* é conhecida por ser mediadora da resposta celular orquestrada pelos linfócitos T CD8+, que frequentemente encontra-se exaurida no câncer de

pulmão. Estudos pré-clínicos vêm tentando encontrar assinaturas genômicas que possam sugerir uma predição de melhores respostas com os inibidores de *immune checkpoints* e de -sobrevida, relacionando assinaturas inflamatórias contemplando a via de estimulação crônica pelo *IFN- γ* (genes *STAT1*, *IFI44*, *IFIT1*, *IFIT3*, *OAS1*, *OAS2*, *MX1*, *IRF7* e *IGS15*) com assinaturas que envolvam a transição epitélio-mesênquima (genes *AGER*, *FN1*, *MMP2*, *SNAI2*, *VIM*, *ZEB2*, *CDH1*, *CDH3*, *CLDN4*, *EPCAM*, *MAL2* e *ST14*). Especialmente quando há maiores *scores* de fenótipo mesenquimal do que epitelial, esperam-se piores respostas à imunoterapia, pois essa transformação mesenquimal leva à imunossupressão por elevar os níveis da citocina Fator transformador de crescimento beta (*TGF- β*) e por reduzir a expressão gênica de células T no *NSCLC*. A reativação dessa via tem sido explorada como uma possível estratégia terapêutica para potencializar o efeito anti-neoplásico em combinação com outras drogas, como a oxaliplatina. Esta via também interage com a via de mutação do *EGFR* no câncer de pulmão, aumentando a sua expressão (CAI *et al.*, 2023; GONG *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÃO

Esse foi um estudo longitudinal retrospectivo observacional com dados regionais de pacientes provenientes das 2 cidades mais populosas do Estado do Paraná, cujas ferramentas clínico-moleculares, estatísticas e de bioinformática possibilitaram a caracterização do perfil mutacional genômico de 133 indivíduos com o diagnóstico de *NSCLC* não-escamoso e, assim, a sua comparação com o perfil mundial catalogado no *TCGA*.

Dessa forma, foi constatado que a população estudada foi composta, em sua maioria, por pacientes adultos entre a 6ª e 8ª década de vida (62%), pertencentes ao sexo feminino (57%), eutróficos (51%) e tabagistas leves (53%). O adenocarcinoma foi o subtipo histológico predominante (98%) e o estadiamento mais comum foi o de doença metastática ao diagnóstico (74%). Importante citar novamente a limitação e, portanto, o claro viés de amostragem ou de seleção do nosso estudo, pois tratam-se aqui de pacientes majoritariamente oriundos do ambiente médico privado, e nesse contexto há maior disponibilidade de recursos para os testes de biologia molecular. Consequentemente, espera-se um enriquecimento da amostra com uma população não-tabagista de forma mais expressiva, aumentando-se os diagnósticos de casos de *NSCLC* com mutações condutoras.

Nas análises funcionais de bioinformática, pôde-se determinar os genes envolvidos nos processos celulares, as vias de sinalização e suas interações moleculares. Revelamos que boa parte desses genes estão relacionados a fatores de transcrição de agentes mitogênicos e a transdução de sinal e também estão relacionados à comunicação celular, cujas mutações estão associadas principalmente a ganhos de função e a amplificação de vias aberrantes, como o *IFN- γ* , *c-MET*, *PDGF*, *IGF-1* e *ErbB*. Houve também forte interação entre esses elementos no Interactoma gênico, evidenciando o *TP53* como ponto central.

Reportamos as variantes genômicas que foram sequenciadas na amostra do PR, demonstrando diferenças e similaridades com o perfil previamente encontrado no *TCGA* e também com a literatura nacional e internacional. Identificamos uma assinatura genômica regional, composta por pacientes com mutações em *EGFR* e co-mutações em *TP53* (33% e 59%, respectivamente), porém com menor número de alterações em *KRAS-NRAS* (15%), *STK11-KEAP1* (4,5%) e em *MTAP-CDKN2A/B* (14% e 12%, respectivamente). Demonstramos que, apesar da alta probabilidade de se encontrarem mutações germinativas em *TP53* nessa região do Brasil, a correspondência somática da mutação fundadora *R337H*

foi limitada a apenas 1 caso, permanecendo ainda a dúvida quanto à etiologia do enriquecimento gênico encontrado nessa amostra.

O perfil epidemiológico de expressão dos demais genes de interesse clínico (como *ALK*, *ROS1*, *HER2*, *MET*, *RET*, *PIK3CA* e *BRAF V600E*), da ausência do fenômeno de instabilidade microssatélite e da expressão quantitativa do *TMB* foram semelhantes ao apresentado em outros estudos.

Constatamos uma população com grandes diferenças de expressão gênica do *PDL-1* em comparação aos dados do *TCGA*. Todavia, confirmamos o diagnóstico de uma maior imunexpressão tecidual do *PDL-1*, comprovada pelo menor número de indivíduos com *TPS* negativo e maior número de hipo-expressores. Investigamos que esse perfil de imunexpressão foi distinto do esperado na literatura, principalmente internacional, apesar das semelhanças previamente reportadas na nossa maior série nacional.

Como impressões e considerações finais, concluímos que esse segue sendo um tema de alta relevância científica e de cunho prático ao médico oncologista. Tendo em vista a progressiva adoção de novos imunomarcadores e a maior difusão de painéis amplos de biologia molecular na Oncologia, crescem cada vez mais as evidências sobre a importância em se personalizar as informações clínicas na Oncologia Torácica.

Levando-se em consideração as semelhanças e as diferenças identificadas na amostra do nosso estudo, é possível dizer que o refinamento molecular dos dados clínicos é o pilar que possibilitará a individualização diagnóstica e terapêutica do câncer. Assim, o intuito central que motivou a realização desse estudo nos confirma que a regionalidade se torna agora uma ferramenta médica de valor essencial no desenho de novos ensaios clínicos e populacionais, principalmente para formatação de algumas políticas de saúde. Esses instrumentos passam a fazer parte de um arsenal indispensável para a adoção de condutas que proporcionarão melhores resultados nos diversos desfechos oncológicos, impactando diretamente na qualidade de vida dos pacientes com câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHATZ, M. I.; HAINAUT, P.; ASHTON-PROLLA, P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol.** 2009 Sep;10(9):920-5.

ACHATZ, M. I.; OLIVIER, M.; LE CALVEZ, F. *et al.* The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett.** 2007 Jan 8;245(1-2):96-102.

AHN, J.; NAGASAKA, M. Spotlight on Cemiplimab-rwlc in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Focus on Patient Selection and Considerations. **Cancer Manag Res.** 2023 Jul 11;15:627-634.

ALAM, N.; SHEPHERD, F. A.; WINTON, T. *et al.* Compliance with post-operative adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. An analysis of National Cancer Institute of Canada and intergroup trial JBR.10 and a review of the literature. **Lung Cancer.** 2005 Mar;47(3):385-94.

ANDREIS, T. F.; CORREA, B. S.; VIANNA, F. S. *et al.* Analysis of Predictive Biomarkers in Patients With Lung Adenocarcinoma From Southern Brazil Reveals a Distinct Profile From Other Regions of the Country. **J Glob Oncol.** 2019 Sep;5:1-9.

ANICHINI, A.; PEROTTI, V. E.; SGAMBELLURI, F. *et al.* Immune Escape Mechanisms in Non Small Cell Lung Cancer. **Cancers.** 2020 Dec 2;12(12):3605.

AWAYA, H.; TAKESHIMA, Y.; AMATYA, V. J. *et al.* Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung. **Pathol Int.** 2004 Jul;54(7):486-9.

BARBOSA, M. V. R.; DE LIMA, V. C.; FORMIGA, M. N. *et al.* High prevalence of *EGFR* mutations in lung adenocarcinomas from Brazilian patients harboring the *TP53 p.R337H* variant. **Clin. Lung Cancer.** 2020. 21, e37–e44.

BHASKARAN, K.; DOUGLAS, I.; FORBES, H. *et al.* Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. **Lancet.** 2014 Aug 30;384(9945):755-65.

BODOR, J. N.; BOUMBER, Y.; BORGHAEI, H. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Cancer.** 2020 Jan 15;126(2):260-270.

BONANNO, L.; DE PAOLI, A.; ZULATO, E. *et al.* LKB1 Expression Correlates with Increased Survival in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Chemotherapy and Bevacizumab. **Clinical Cancer Research.** 2017; 23(13):3316–24.

BONTOUX, C.; GUYARD, A.; LUPO, A *et al.* Detection of Nine Oncogenes Amplification in Lung and Colorectal Cancer Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Samples using Combined Next-Generation Sequencing-Based Script and Digital Droplet Polymerase Chain Reaction. **Cancer Control**. 2023 Jan-Dec;30:10732748231167257.

BORGHAEI, H.; PAZ-ARES, L.; HORN, L. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**. 2015;373:1627-39.

BRACCI, L.; SCHIAVONI, G.; SISTIGU, A. *et al.* Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. **Cell Death Differ**. 2014; 21: 15-25.

BRAHMER, J.; RECKAMP, K. L.; BAAS, P. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**. 2015;373:123-35.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. INCA, 2022. ISBN 978-65-88517-09-3.

BÜTTNER, R.; GOSNEY, J. R.; SKOV, B. G. *et al.* Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non–Small-Cell Lung Cancer. **J Clin Oncol**. 2017. 35(34):3867-3876.

CAI, R.; ZHU, H.; LIU, Y. *et al.* To be, or not to be: the dilemma of immunotherapy for non-small cell lung cancer harboring various driver mutations. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2023 Jun 1. doi: 10.1007/s00432-023-04919-4.

CAMIDGE, R.; KIM, H. R.; AHN, M. -J. *et al.* Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor–Naive Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial. **J Thor Oncol**. 2021;16 (nº 12): 2091–2108.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**. 2014 Jul 31;511(7511):543-50.

CARRERAS-TORRES, R.; HAYCOCK, P. C.; RELTON, C. L. *et al.* The causal relevance of body mass index in different histological types of lung cancer: A Mendelian randomization study. **Sci Rep**. 2016 Aug 4;6:31121.

CHEN, P.; LIU, Y.; WEN, Y. *et al.* Non-small cell lung cancer in China. **Cancer Commun**. 2022 Oct. 42(10):937-970.

COLLISSON, E. A.; CAMPBELL, J. D.; BROOKS, A. N. *et al.* Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**. 2014 Jul 31;511(7511):543-50.

CRONEMBERGER, E.; BALDOTTO, C.; MARINHO, F. *et al.* Real-World Molecular Testing and Treatment Patterns in Brazilian Patients with Newly Diagnosed Locally Advanced or Metastatic NSCLC. **Clinics** (Sao Paulo). 2020 Oct 19;75:e1777.

DEARDEN, S.; STEVENS, J.; WU, Y. L. *et al.* Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). **Ann Oncol.** 2013 Sep;24(9):2371-6.

DEDIU, M.; ALEXANDRU, A.; MEDIAN, D. *et al.* Compliance with adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. The experience of a single institution evaluating a cohort of 356 patients. **J Buon.** 2006 Oct-Dec;11(4):425-32.

DÉSAGE, A-L.; TISSOT, C.; BAYLE-BLEUEZ, S. *et al.* Adjuvant chemotherapy for completely resected IIA-IIIa non-small cell lung cancer: compliance to guidelines, safety and efficacy in real-life practice. **Transl Lung Cancer Res.** 2022 Dec;11(12):2418-2437.

DEWI, N. U.; BOSHUIZEN, H. C.; JOHANSSON, M. *et al.* Anthropometry and the Risk of Lung Cancer in EPIC. **Am J Epidemiol.** 2016 Jul 15;184(2):129-39.

DIETEL, M.; SAVELOV, N.; SALANOVA, R. *et al.* Real-world prevalence of programmed death ligand 1 expression in locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: The global, multicenter EXPRESS study. **Lung Cancer.** 2019 Aug;134:174-179.

DONG, H.; STROME, S. E.; SALOMAO, D. R. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med.** 2002;8:793-800.

DRILON, A.; OXNARD, G. R.; TAN, D. S. W. *et al.* Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2020;383:813-24.

FREEMAN, G. J.; LONG, A. J.; IWAI, Y. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med.** 2000;192:1027-34.

FREITAS, H. C.; TORREZAN, G. T.; DA CUNHA, I. W. *et al.* Mutational Portrait of Lung Adenocarcinoma in Brazilian Patients: Past, Present, and Future of Molecular Profiling in the Clinic. **Front Oncol.** 2020 Jul 2;10:1068.

GANDHI, L.; RODRIGUEZ-ABREU, D.; GADGEEL, S. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-189). **N Engl J Med.** 2018; 378:2078-92.

GARON, E., B.; RIZVI, N., A.; HUI, R. *et al.* Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. **N Engl J Med** 2015;372:2018-28.

GELATTI, A. C. Z.; CORDEIRO DE LIMA, V. C.; FREITAS, H. *et al.* Real-World Prevalence of PD-L1 Expression Among Tumor Samples From Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. **Clin Lung Cancer.** 2020 Nov;21(6):e511-e515.

GERBER, D. E.; SCHILLER, J. H. Maintenance chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: new life for an old idea. **J Clin Oncol**. 2013;31:1009-20.

GONG, K.; GUO, G.; PANCHANI, N. *et al*. EGFR inhibition triggers an adaptive response by co-opting antiviral signaling pathways in lung cancer. **Nat Cancer**. 2020 Apr;1(4):394-409.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011;144:646-74.

HELLMANN, M. D.; CIULEANU, T.-E.; PLUZANSKI, A. *et al*. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. **N Engl J Med**. 2018;378:2093-104.

HELLMANN, M. D.; PAZ-ARES, L.; CARO, R. B. *et al*. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**. 2019 Nov 21;381(21):2020-2031.

HERBST, R. S.; BAAS, P.; KIM, D. W. *et al*. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. **Lancet**. 2016; 387: 1540–50.

JARAMILLO, M. C.; ZHANG, D. D. The emerging role of the NRF2-KEAP1 signaling pathway in cancer. **Genes Dev** 2013 Oct. 15;27(20):2179-91.

JIANG, W.; WEI, Q.; XIE, H. *et al*. Effect of PTGES3 on the Prognosis and Immune Regulation in Lung Adenocarcinoma. **Anal Cell Pathol (Amst)**. 2023 Jun 28;2023:4522045.

JORDAN, E. J.; KIM, H. R.; ARCILA, M. E. *et al*. Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. **Cancer Discov**. 2017 Jun;7(6):596-609.

KEIR, M. E.; BUTTE, M. J.; FREEMAN, G. J. *et al*. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**. 2008;26:677-704.

KIM, C. G.; KIM, G.; KIM, K. H. *et al*. Distinct exhaustion features of T lymphocytes shape the tumor-immune microenvironment with therapeutic implication in patients with non-small-cell lung cancer. **J Immunother Cancer**. 2021 Dec;9(12):e002780.

KOTTAKIS, F.; NICOLAY, B. N.; ROUMANE, A. *et al*. LKB1 loss links serine metabolism to DNA methylation and tumorigenesis. **Nature**. 2016; 539(7629):390–5.

KOYAMA, S.; AKBAY, E. A.; LI, Y. Y. *et al*. STK11/LKB1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment and Proinflammatory Cytokine Production to Suppress T-cell Activity in the Lung Tumor Microenvironment. **Cancer Research**. 2016; 76(5):999–1008.

KUMAR, P. A.; GRAZIANO, S. L.; DANZIGER, N. *et al*. Genomic landscape of non-small-cell lung cancer with methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) deficiency. **Cancer Med**. 2023 Jan;12(2):1157-1166.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020.

LANGER, C. J.; GADGEEL, S. M.; BORGHAEI, H. *et al.* Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. **Lancet Oncol.** 2016 Nov;17(11):1497-1508.

LEIGHL, N. B. Treatment paradigms for patients with metastatic non-small-cell lung cancer: first, second- and third line. **Curr Oncol.** 2012;19:Suppl 1:S52-S58.

LI, B. T.; SMIT, E. F.; GOTO, Y. *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2022.;386:241-51.

LI, D.; DING, L.; RAN, W. *et al.* Status of 10 targeted genes of non-small cell lung cancer in eastern China: A study of 884 patients based on NGS in a single institution. **Thorac Cancer.** 2020;11(9):2580–9.

LI, P.; JIA, C.; FAN, Z. *et al.* Discovery of novel exceptionally potent and orally active c-MET PROTACs for the treatment of tumors with MET alterations. **Acta Pharm Sin B.** 2023 Jun;13(6):2715-2735.

LOPES, G. L.; CASTRO JUNIOR, G.; VATTIMO, E. F. Q. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. **J Bras Pneumol.** 2015; 41(4): 365-375.

MARABELLE, A.; FAKIH, M.; LOPEZ, J. *et al.* Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. **Lancet Oncol.** 2020 Oct;21(10):1353-1365.

MARABELLE, A.; LE, D. T.; ASCIERTO, P. A. *et al.* Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. **J Clin Oncol.** 2020 Jan 1;38(1):1-10.

MARCUZZO, Simone. **Sistema Respiratório.** Disponível em: https://professor.ufrgs.br/simonemarcuzzo/files/sistema_respiratorio_0.pdf. Acesso em: 18 set. 2023.

MASCARENHAS, E.; GELATTI, A. C.; ARAÚJO, L. H. *et al.* Comprehensive genomic profiling of Brazilian non-small cell lung cancer patients (GBOT 0118/LACOG0418). **Thorac Cancer.** 2021 Mar;12(5):580-587.

MCGRANAHAN, N.; ROSENTHAL, R.; HILEY, C. T. *et al.* Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. **Cell.** 2017 Nov. 30;171(6):1259-1271.e11.

MEZQUITA, L.; JOVE, M.; NADAL, E. *et al.* High prevalence of somatic oncogenic driver alterations in patients With NSCLC and Li-Fraumeni Syndrome. **J Thorac Oncol.** 2020. 15, 1232–1239.

MOGI, A.; KUWANO, H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. **J Biomed Biotechnol.** 2011;2011:583929.

MOK, T. S. K.; WU, Y. L.; KUDABA, I. *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.** 2019 May 4;393(10183):1819-1830.

MOK, T. S.; WU, Y. -L.; AHN, M. -J. *et al.* Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2017;376:629-40.

MOK, T. S.; WU, Y. -L.; THONGPRASERT, S. *et al.* Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. **N Engl J Med** 2009;361:947-57.

NICHOLSON, A. G.; TSAO, M. S.; BEASLEY, M. B. *et al.* The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. **J Thorac Oncol.** 2022 Mar;17(3):362-387.

ODOR, J. N.; BOUMBER, Y.; BORGHAEI, H. *et al.* Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **Cancer.** 2020 Jan 15;126(2):260-270.

OSOEGAWA, A.; ABE, M.; TAKUMI, Y. *et al.* Significance of programmed death-ligand 1 expression in resected lung cancer and its relationship with EGFR mutation. **Thorac Cancer.** 2023 Jul. 1-6.

PAIK, P. K.; FELIP, E.; VEILLON, R. *et al.* Tepotinib in Non–Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. **N Engl J Med.** 2020;383:931-43.

PALMERO, E. I.; SCHÜLER-FACCINI, L.; CALEFFI, M. *et al.* Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett.** 2008 Mar 8;261(1):21-5.

PARRA, E. R.; JIANG, M.; MACHADO-RUGOLO, J. *et al.* Variants in Epithelial-Mesenchymal Transition and Immune Checkpoint Genes Are Associated With Immune Cell Profiles and Predict Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. **Arch Pathol Lab Med.** 2020 Oct 1;144(10):1234-1244.

PARVAR, S. Y.; REZVANI, A.; GHADERPANAHI, R. *et al.* The relation between epidermal growth factor receptor mutations profiles and smoking patterns in patients with lung adenocarcinoma: A cross-sectional study. **Health Sci Rep.** 2023 Jul 5;6(7):e1369.

PAZ-ARES, L.; CIULEANU, T-E.; COBO, M. *et al.* First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer

(CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. **Lancet Oncol.** 2021 Feb;22(2):198-211.

PAZ-ARES, L.; LUFT, A.; VICENTE, D. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-407). **N Engl J Med.** 2018 Nov 22;379(21):2040-2051.

PETERS, S.; CAMIDGE, R.; SHAW, A. T. *et al.* Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2017;377:829-38.

PINTO, I. A.; CAVAGNA, R. O.; SILVA, A. L. V. *et al.* EGFR Mutations and PD-L1 Expression in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer: A Real-World Data From a Single Center in Brazil. **The Oncologist.** 2022, 27, e899–e907.

PLANCHARD, D.; SMIT, E. F.; GROEN, H. J. M. *et al.* Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated *BRAFV600E*-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2017; 18: 1307–16.

RECK, M.; RODRIGUEZ-ABREU, D.; ROBINSON, A. G. *et al.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-024). **N Engl J Med.** 2016;375:1823-33.

RENEHAN, A. G.; ZWAHLEN, M.; EGGER, M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. **Nat Rev Cancer.** 2015 Aug;15(8):484-98.

RICORDEL, C.; LABALETTE-TIERCIN, M.; LESPAGNOL, A. *et al.* EGFR-mutant lung adenocarcinoma and Li-Fraumeni syndrome: report of two cases and review of the literature. **Lung Cancer.** 2015 Jan;87(1):80-4.

RITTMeyer, A.; BARLESI, F.; WATERKAMP, D. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. **Lancet.** 2017; 389: 255-65.

RIZVI, H.; BANDLAMUDI, C.; SCHOENFIELD, A. J. *et al.* Molecular correlates of PD-L1 expression in patients with non-small cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2019; 37:9018.

RIZVI, H.; SANCHEZ-VEGA, F.; LA, K. *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.** 2018 Mar 1;36(7):633-641.

ROSELL, R.; CARCERENY, E.; GERVAIS, R. *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2012; 13: 239–46.

ROSELLI, M.; CEREDA, V.; DI BARI, M. G. *et al.* Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells. **Oncoimmunology**. 2013; 2(10): e27025.

SCHILLER, J. H.; HARRINGTON, D.; BELANI, C. P. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med**. 2002; 346: 92–98.

SCHOENFELD, A. J.; RIZVI, H.; BANDLAMUDI, C. *et al.* Clinical and molecular correlates of PD-L1 expression in patients with lung adenocarcinomas. **Ann Oncol**. 2020 May;31(5):599-608.

SEZER, A.; KILICKAP, S.; GÜMÜS, M. *et al.* Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. **Lancet** 2021; 397: 592–604.

SHACKELFORD, D. B.; SHAW, R. J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**. 2009; 9(8):563–75.

SHAW, A. T.; OU, S -H. I.; BANG, Y -J. *et al.* Crizotinib in *ROS1*-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med** 2014; 371:1963-71.

SHAW, A.; BAUER, T. M.; MARINIS, F. *et al.* First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. **N Engl J Med**. 2020;383:2018-29.

SHOK, K. P.; KARIMI, M.; BASNET, A. *et al.* Association of Molecular Profiles and Mutational Status With Distinct Histological Lung Adenocarcinoma Subtypes. An Analysis of the LACE-Bio Data. **Clin Lung Cancer**. 2023 Jun 17:S1525-7304(23)00123-7.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin**. 2015; 65:5-29.

SILVA, A. V. A.; NETO, F. M.; OLIVEIRA, A. C. S. M. *et al.* The frequency of high PD-L1 expression is low in lung adenocarcinoma patients from northeast Brazil. **Surg Exp Pathol**. 2019. 2:4.

SINGAL, G.; MILLER, P. G.; AGARWALA, V. *et al.* Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical Outcomes Among Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Using a Clinicogenomic Database. **JAMA**. 2019 Apr 9;321(14):1391-1399. Erratum in: JAMA. 2020 Feb 4;323(5):480.

SKOULIDIS, F.; GOLDBERG, M. E.; GREENAWALT, D. M. *et al.* *STK11/LKB1* Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in *KRAS*-Mutant Lung Adenocarcinoma. **Cancer Discov**. 2018 Jul;8(7):822-835.

SKOULIDIS, F.; LI, B. T.; DY, G. K. *et al.* Sotorasib for Lung Cancers with *KRAS* p.G12C Mutation. **N Engl J Med**. 2021;384:2371-81.

SKOULIDIS, F.; HEYMACH, J. V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. **Nat Rev Cancer**. 2019 Sep;19(9):495-509.

SOCINSKI, M. A.; JOTTE, R.M.; CAPPUZZO, F. *et al.* Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC (IMpower150). **N Engl J Med**. 2018; 378:2288-301.

SOMPALLAE, R. R.; DUNDAR, B.; GUSEVA, N. V. *et al.* EGFR and ERBB2 exon 20 insertion/duplication in advanced non-small cell lung cancer: genomic profiling and clinicopathologic features. **Front Oncol**. 2023 May 22;13:1163485.

SORIA, J. -C.; OHE, Y.; VANSTEENKISTE, J. *et al.* Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**. 2018;378:113-25.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**. 2021;71:209–249.

TAM, K. W.; ZHANG, W.; SOH, J. *et al.* CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small-cell lung cancer. **J Thorac Oncol**. 2013 Nov;8(11):1378-88.

TANG, H.; WANG, Y.; CHLEWICKI, L. K. *et al.* Facilitating T Cell Infiltration in Tumor Microenvironment Overcomes Resistance to PD-L1 Blockade. **Cancer Cell**. 2016; 30(3):500.

THOMPSON, J. C.; HWANG, W.-T.; DAVIS, C. *et al.* Gene signatures of tumor inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) predict responses to immune checkpoint blockade in lung cancer with high accuracy. **Lung Cancer**. 2020 Jan;139:1-8.

TSAI, L. H.; WU, J. Y.; CHENG, Y. W. *et al.* The MZF1/c-MYC axis mediates lung adenocarcinoma progression caused by wild-type LKB1 loss. **Oncogene**. 2015; 34(13):1641–9.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D. *et al.* Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol**. 2011;29:235-71.

VIEIRA, I. A.; ANDREIS, T. F.; FERNANDES, B. V. *et al.* Prevalence of the Brazilian TP53 Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients? **Front Genet**. 2021 Feb 2;12:606537.

WANG, C.; SHAO, J.; SONG, L. *et al.* Persistent increase and improved survival of stage I lung cancer based on a large-scale real-world sample of 26,226 cases. **Chin Med J (Engl)**. 2023 Jun 30.

WANG, R.; ZHANG, Y.; PAN, Y. *et al.* Comprehensive investigation of oncogenic driver mutations in Chinese non-small cell lung cancer patients. **Oncotarget**. 2015;6(33):34300–8.

WANG, Z.; TILL, B.; GAO, Q. *et al.* Chemotherapeutic agent-mediated elimination of myeloid-derived suppressor cells. **Oncoimmunology**. 2017; 6(7): e1331807.

WEINSTEIN, J.; COLLISSON, E.; MILLS, G. B. *et al.* The Cancer Genome Atlas Research Network., The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. **Nat Genet** **45**. 1113–1120 (2013).

WEST, H. J.; MCCLELAND, M.; CAPPUZZO, F. *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**. 2022 Feb;10(2):e003027.

WOLF, J.; SETO, T.; HAN, J. -Y. *et al.* Capmatinib in MET Exon 14–Mutated or MET-Amplified Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**. 2020;383:944-57.

XIA, H.; ZHANG, J.; CHEN, T. *et al.* Molecular characterization of MET fusions from a large real-world Chinese population: A multicenter study. **Cancer Med**. 2023 Jul. 12(13):14015-14024.

YANG, Y.; DONG, J.; SUN, K. *et al.* Obesity and incidence of lung cancer: a meta-analysis. **Int J Cancer**. 2013 Mar 1;132(5):1162-9.

YU, D.; ZHENG, W.; JOHANSSON, M. *et al.* Overall and Central Obesity and Risk of Lung Cancer: A Pooled Analysis. **J Natl Cancer Inst**. 2018 Aug 1;110(8):831-842.

ZHANG, S.; ZHAO, L.; GUO, M. *et al.* Anticancer effects of ikarugamycin and astemizole identified in a screen for stimulators of cellular immune responses. **J Immunother Cancer**. 2023 Jul;11(7):e006785. doi: 10.1136/jitc-2023-006785.

ZHAO, J.; SUN, Y.; HUANG, Y. *et al.* Functional analysis reveals that RBM10 mutations contribute to lung adenocarcinoma pathogenesis by deregulating splicing. **Sci Rep**. 2017 Jan 16;7:40488.

ZHOU, W.; LIU, G.; HUNG, R. J. *et al.* Causal relationships between body mass index, smoking and lung cancer: Univariable and multivariable Mendelian randomization. **Int J Cancer**. 2021 Mar 1;148(5):1077-1086.

ZHU, K.; ZOU, Y.; ZHAO, L. *et al.* Relationship between PD-L1 expression and molecular aberrances in lung adenocarcinoma with solid components. **J Thorac Dis**. 2023 Jun 30;15(6):2936-2947.

ZHUANG, X.; ZHAO, C.; LI, J. *et al.* Clinical features and therapeutic options in non-small cell lung cancer patients with concomitant mutations of EGFR, ALK, ROS1, KRAS or BRAF. **Cancer Med**. 2019;8(6):2858–66.

APÊNDICES

APÊNDICE A**DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA DE INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE**

Londrina, 26 de maio de 2020

Ilma. Sra. Prof^ª. Dra. Adriana Lourenço Soares Russo
Coordenadora do CEP/UEL

Senhora Coordenadora,

Declaramos que nós da clínica ProOnco – Grupo OncoClínicas, estamos de acordo com a condução do projeto de pesquisa “PERFIL MUTACIONAL GENÔMICO E ESTUDO DE CORRELAÇÃO DE MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ” sob a responsabilidade do pesquisador Gabriel Lima Lopes, nas nossas dependências, tão logo o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, até o seu final no ano de 2023.

Estamos cientes que as unidades de análise da pesquisa serão amostras de sangue para avaliação proteômica de pacientes diagnosticados com Câncer de pulmão metastático não-pequenas células sem mutações ativadoras, assim como informações clínicas oriundas de seus prontuários, e de que o presente trabalho deve seguir a Resolução 466/2012 do CNS e complementares.

Atenciosamente,

Dr Mário Liberatti
Oncologista titular, Diretor Clínico e Responsável técnico
Clínica ProOnco – Grupo OncoClínicas

APÊNDICE B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar da pesquisa **“PERFIL MUTACIONAL GENÔMICO E ESTUDO DE CORRELAÇÃO DE MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ”** a ser realizada na Universidade Estadual de Londrina. O objetivo deste estudo é avaliar biomarcadores genéticos associados ao Câncer de Pulmão e ao seu tratamento. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar ou desistir a qualquer momento sem que isso lhe acarrete qualquer ônus ou prejuízo.

Caso o (a) senhor (a) aceite participar da pesquisa, serão coletadas as suas informações médicas através do acesso ao seu prontuário, porém esclarecemos que suas informações serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade durante toda a pesquisa - todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo.

Esclarecemos ainda que você não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Caso o(a) senhor(a) aceite participar dessa pesquisa, estará contribuindo para o melhor entendimento sobre os mecanismos carcinogênicos e sobre a epidemiologia do Câncer de Pulmão no Estado do Paraná utilizando o tratamento de 1ª linha mais moderno atualmente, envolvendo uso de Inibidores de Tirosina-quinase, Quimioterapia e a combinação entre Quimioterapia baseada em platina e Imunoterapia anti-PD1 para pacientes portadores de Câncer de pulmão não-pequenas células avançado. Com isso, espera-se que esse estudo possa fornecer evidências que contribuam para o melhor entendimento da fisiopatologia dessa grave doença e para a utilização de novas ferramentas envolvidas no diagnóstico de progressão sistêmica dos Carcinomas pulmonares, possibilitando também a identificação de potenciais novos alvos terapêuticos.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contactar **(GABRIEL LIMA LOPES, Avenida Adhemar Pereira de Barros 679, telefone (43) 98814-1131, e-mail: gabriel.onco@hotmail.com ou CAROLINA**

PANIS, Rodovia Vitório Traiano - KM 2, Francisco Beltrão/PR, telefone (43) 99916-5316, e-mail: carolpanis@hotmail.com) ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, (CEP/UEL) situado junto ao prédio do LABESC – Laboratório Escola de Pós-Graduação, na sala 14 do Campus Universitário (Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid, KM 380 - PR445. CEP 86057-970. Telefone (43) 3371-5455. e-mail: cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue a você, e a outra ficará com o pesquisador.

Pesquisadores responsáveis:

Gabriel Lima Lopes
RG: 7250252-3

Carolina Panis
RG: 32298583-3

Eu, _____,
após ter sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, declaro ter lido e compreendido este documento e concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Local: _____

Data: ____/____/20____

Assinatura do pesquisador

**Assinatura (ou impressão
dactiloscópica) do participante**

APÊNDICE C

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE E SIGILO

Eu, **Gabriel Lima Lopes**, brasileiro, casado, médico, inscrito no CPF sob o nº 064.354.499-29, abaixo firmado, assumo o compromisso de manter confidencialidade e sigilo sobre todas as informações técnicas e outras relacionadas ao projeto de pesquisa intitulado “**PERFIL MUTACIONAL GENÔMICO E ESTUDO DE CORRELAÇÃO DE MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ**”, a que tiver acesso nas dependências da Universidade Estadual de Londrina.

Por este termo de confidencialidade e sigilo comprometo-me a:

1. não utilizar as informações confidenciais a que tiver acesso, para gerar benefício próprio exclusivo e/ou unilateral, presente ou futuro, ou para o uso de terceiros;
2. não efetuar nenhuma gravação ou cópia da documentação confidencial a que tiver acesso;
3. não me apropriar de material confidencial e/ou sigiloso que venha a ser disponível;
4. não repassar o conhecimento das informações confidenciais, responsabilizando-me por todas as pessoas que vierem a ter acesso às informações, por meu intermédio, e obrigando-me, assim, a ressarcir a ocorrência de qualquer dano e/ou prejuízo oriundo de uma eventual quebra de sigilo das informações fornecidas.

Neste Termo, as seguintes expressões serão assim definidas:

1. Informação Confidencial significará toda informação revelada ou cedida pelo participante da pesquisa, a respeito da pesquisa, ou associada à Avaliação de seus dados, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios. Avaliação

significará todas e quaisquer discussões, conversações ou negociações entre, ou com as partes, de alguma forma relacionada ou associada com o desenvolvimento da pesquisa;

2. Informação Confidencial inclui, mas não se limita, à dados pessoais, informação relativa à operações, processos, planos ou intenções, informações sobre produção, instalações, equipamentos, segredos de negócio, segredo de fábrica, dados, habilidades especializadas, projetos, métodos e metodologia, fluxogramas, especializações, componentes, fórmulas, produtos, amostras, diagramas, desenhos de esquema industrial, patentes, oportunidades de mercado e questões relativas a negócios.

Pelo não cumprimento do presente Termo de Confidencialidade e Sigilo, fica o abaixo assinado ciente de que sanções judiciais poderão advir.

Londrina, _____ de _____ de 20_____.

Ass. _____

Dr Gabriel Lima Lopes
Médico Oncologista Clínico
Investigador principal do estudo

APÊNDICE D

Quadro dos genes mutados de maior interesse clínico do estudo, obtidos das avaliações genômicas

Gene mutado	Tradução para o Português	Nomenclatura em Inglês
<i>EGFR</i>	Gene do receptor do fator de crescimento epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<i>ALK</i>	Gene da quinase do linfoma anaplásico	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
<i>RET</i>	Gene da reorganização durante a transfecção	<i>Rearranged during Transfection</i>
<i>KEAP1</i>	Gene da proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch	<i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i>
<i>MYC</i>	Proto-oncogene da mielocitomatose	<i>Myelocytomatosis</i>
<i>MYCL1</i>	Proto-oncogene da mielocitomatose pulmonar 1	<i>Myelocytomatosis-Lung 1</i>
<i>BCL2L1</i>	Gene da proteína 1 semelhante ao linfoma de células B-2	<i>B-cell lymphoma 2-like protein 1</i>
<i>CDKN1B</i>	Gene do Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1B</i>
<i>CDKN2A</i>	Gene do inibidor de quinase dependente de ciclina 2ª	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2ª</i>
<i>RAD21</i>	Gene do papel da radiação 21	<i>Role of Radiation 21</i>
<i>TP53</i>	Gene da proteína tumoral 53	<i>Tumor Protein 53</i>
<i>ROS1</i>	Proto-oncogene do receptor de tirosina quinase 1	<i>Proto-oncogene receptor tyrosine kinase-1</i>
<i>CHEK2</i>	Gene da quinase de checkpoint 2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
<i>GNAS</i>	Gene do alfa-poli-peptídeo de	<i>Guanine Nucleotide binding protein</i>

	estimulação da atividade da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina	<i>Alpha Stimulating activity polypeptide</i>
<i>KRAS</i>	Homólogo oncogênico do vírus <i>Kirsten</i> do sarcoma de rato	<i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homologue</i>
<i>NRAS</i>	Homólogo oncogênico do vírus do Neuroblastoma do sarcoma de rato	<i>Neuroblastoma Rat Sarcoma viral oncogene homologue</i>
<i>EWSR1</i>	Gene da proteína-1 de ligação ao RNA do Sarcoma de Ewing	<i>Ewing Sarcoma RNA Binding Protein 1</i>
<i>STK11</i>	Gene da quinase serina/treonina 11	<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
<i>BCORL1</i>	Gene da proteína-1 semelhante ao co-repressor BCL-6	<i>BCL-6 Co-Repressor-Like Protein 1</i>
<i>CTNNB1</i>	Gene da proteína beta-1 associada à catenina-caderina	<i>Catenin - Cadherin-associated protein Beta 1</i>
<i>PTEN</i>	Gene da fosfatase e tensina	<i>Phosphatase and Tensin</i>
<i>MTAP</i>	Gene da metiltioadenosina fosforilase	<i>Methylthioadenosine phosphorylase</i>
<i>RB1</i>	Gene da proteína do retinoblastoma 1	<i>Retinoblastoma protein-1</i>
<i>BRAF</i>	Gene do fibrossarcoma rapidamente acelerado-B	<i>B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
<i>IRF2</i>	Gene do fator de regulação do Interferon-2	<i>Interferon Regulatory Factor 2</i>
<i>SMARCA4</i>	Gene do regulador de cromatina associado à matriz dependente de actina relacionado a SWI/SNF subfamília 4 membro 4	<i>SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A Member 4</i>
<i>DNMT3A</i>	Gene da DNA metiltransferase 3ª	<i>DNA Methyltransferase 3ª</i>
<i>TERT</i>	Gene da transcriptase reversa de telomerase	<i>Telomerase Teverse Transcriptase</i>

<i>NF1</i>	Gene da neurofibromatose 1	<i>Neurofibromatosis 1</i>
<i>ATM</i>	Gene da ataxia-telangiectasia mutada	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>
<i>CDH1</i>	Gene da e-caderina 1	<i>E-Cadherin 1</i>
<i>MET</i>	Gene do receptor do fator de crescimento de hepatócito	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
<i>CDK4</i>	Gene da quinase dependente de ciclina 4	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i>
<i>MDM2</i>	Gene do minuto duplo do camundongo 2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
<i>MDM4</i>	Gene do minuto duplo do camundongo 4	<i>Mouse Double Minute 4</i>
<i>AXIN1</i>	Gene da proteína de inibição da axis 1	<i>Axis Inhibition protein 1</i>
<i>BRCA1</i>	Gene do câncer de mama 1	<i>Breast Cancer gene 1</i>
<i>BRCA2</i>	Gene do câncer de mama 2	<i>Breast Cancer gene 2</i>
<i>ERBB2</i>	Gene do receptor do fator do crescimento epidérmico humano 2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
<i>ERBB4</i>	Gene do receptor do fator do crescimento epidérmico humano 4	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 4</i>
<i>NFKBIA</i>	Gene do fator nuclear do inibidor-alfa Kappa-B	<i>Nuclear Factor of Kappa-B Inhibitor Alpha</i>
<i>NKX2-1</i>	Gene da proteína homeobox NK-2 ou TTF1	<i>Homeobox Protein NK-2 gene; Thyroid Transcription Factor 1</i>
<i>QKI</i>	Gene homólogo quaking de ligação de RNA do domínio KH	<i>Quaking homolog, KH domain RNA binding</i>
<i>PIK3CA</i>	Gene da fosfatidilinositol 3-quinase, subunidade alfa-catalítica	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic subunit Alpha</i>
<i>ERRF1</i>	Gene do inibidor-1 do receptor de feedback do ERBB	<i>ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1</i>
<i>FLCN</i>	Gene da foliculina	<i>Folliculin</i>

<i>SMARCB1</i>	Gene do regulador de cromatina associado à matriz dependente de actina relacionado a SWI/SNF subfamília B membro 1	<i>SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily B Member 1</i>
<i>CCNE1</i>	Gene da ciclina E-1	<i>Cyclin E1</i>
<i>MAP2K2</i>	Gene da proteína quinase 2 de especificidade dupla ativada por mitógeno	<i>Dual specificity Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 2</i>
<i>MAP2K4</i>	Gene da proteína quinase 4 de especificidade dupla ativada por mitógeno	<i>Dual specificity Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 4</i>
<i>FGFR1</i>	Gene do receptor do fator de crescimento fibroblástico 1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
<i>AURKA</i>	Gene da aurora quinase A	<i>Aurora Kinase A</i>
<i>NSD3</i>	Gene da proteína 3 do domínio SET de ligação ao receptor nuclear	<i>Nuclear receptor binding SET Domain protein 3</i>
<i>TERC</i>	Gene do componente de RNA da telomerase	<i>Telomerase RNA Component</i>
<i>ZNF703</i>	Gene da proteína dedo de zinco 703	<i>Zinc Finger Protein 703</i>
<i>NF2</i>	Gene da neurofibromatose 2	<i>Neurofibromatosis 2</i>
<i>RBM10</i>	Gene da proteína de motivo de ligação de RNA 10	<i>RNA Binding Motif protein 10</i>
<i>ZNF217</i>	Gene da proteína dedo de zinco 217	<i>Zinc Finger Protein 217</i>
<i>CXCR4</i>	Gene do receptor-4 da quimiocina C-X-C	<i>C-X-C Chemokine Receptor type 4</i>
<i>MSH2</i>	Gene da proteína MutS Homóloga 2	<i>MutS Homolog 2</i>
<i>NFE2L2</i>	Gene do fator nuclear eritróide-2 relacionado ao fator 2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2</i>

<i>CRKL</i>	Gene do regulador CT10 do proto-oncogene semelhante à quinase	<i>CT10 Regulator of Kinase-Like proto-oncogene</i>
<i>CCND1</i>	Gene da Ciclina D1	<i>Cyclin D1</i>
<i>CCND2</i>	Gene da Ciclina D2	<i>Cyclin D2</i>
<i>FGF19</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 19	<i>Fibroblast Growth Factor 19</i>
<i>FGF10</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 10	<i>Fibroblast Growth Factor 10</i>
<i>FGF3</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 3	<i>Fibroblast Growth Factor 3</i>
<i>FGF4</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 4	<i>Fibroblast Growth Factor 4</i>
<i>FGF6</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 6	<i>Fibroblast Growth Factor 6</i>
<i>FGF23</i>	Gene do fator do crescimento de fibroblastos 23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
<i>U2AF1</i>	Gene do fator auxiliar-1 de RNA nuclear pequeno U2	<i>U2 small nuclear RNA Auxiliary Factor 1</i>
<i>PRKCI</i>	Gene da proteína quinase C iota	<i>Protein Kinase C Iota</i>
<i>IRS2</i>	Gene do substrato 2 do receptor de insulina	<i>Insulin Receptor Substrate 2</i>
<i>PAX5</i>	Gene da caixa emparelhada 5	<i>Paired box 5</i>
<i>MUTYH</i>	Gene da MutY DNA glicosilase	<i>MutY DNA glycosylase</i>
<i>RICTOR</i>	Gene do companheiro insensível à rapamicina do alvo mamífero da rapamicina	<i>Rapamycin-Insensitive Companion of mammalian Target Of Rapamycin</i>
<i>TET2</i>	Gene da Tet Metilcitosina deoxigenase 2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
<i>PARK2</i>	Gene da proteína parkinson 2	<i>Parkinson protein 2</i>
<i>FBXW7</i>	Gene da proteína 7 de domínio F-Box e WD-40	<i>F-Box and WD-40 domain-containing protein 7</i>

<i>ATRX</i>	Gene da talassemia alfa/síndrome de retardo mental ligada ao X	<i>Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked</i>
<i>FAM123B</i>	Gene da família com similaridade de sequência 123B	<i>Family with sequence similarity 123B</i>
<i>SETD2</i>	Gene do domínio SET2 de histona lisina metiltransferase	<i>SET Domain containing 2, histone lysine methyltransferase</i>
<i>IDH1</i>	Gene da isocitrato desidrogenase 1	<i>Isocitrate DeHydrogenase 1</i>
<i>MEN1</i>	Gene da neoplasia endócrina múltipla 1	<i>Multiple Endocrine Neoplasia 1</i>
<i>NOTCH1</i>	Gene da proteína homóloga do locus neurogênico 1	<i>Neurogenic locus homolog protein 1</i>
<i>CDC73</i>	Gene do ciclo de divisão celular 73	<i>Cell Division Cycle 73</i>
<i>PMS2</i>	Gene da proteína de segregação pós-meiótica aumentada 2	<i>PostMeiotic Segregation increased 2</i>
<i>APC</i>	Gene da polipose adenomatosa colônica	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<i>SMAD4</i>	Gene do pequenas mães contra o homólogo decapentaplégico 4	<i>Small Mothers Against Decapentaplegic homolog 4</i>
<i>PDGFRα</i>	Gene do receptor-alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha</i>
<i>JUN</i>	Proto-oncogene Jun, subunidade do fator de transcrição AP-1	<i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>

Fonte: o próprio autor

APÊNDICE E

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Título da pesquisa: “**PERFIL MUTACIONAL GENÔMICO E ESTUDO DE CORRELAÇÃO DE MARCADORES ANÁTOMO-CLÍNICOS DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO NO ESTADO DO PARANÁ**”

Investigador principal: Gabriel Lima Lopes

Informações clínicas:

1. Instituição co-participante: _____
2. Médico recrutador: Dr(a) _____
3. Nome completo do paciente: _____
4. Identificação (para tabulação): _____
5. Idade: _____ anos Sexo: _____
6. Peso: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____
7. Tabagismo: _____ Carga tabágica (em anos/maço): _____
8. Tipo de análise molecular realizada: _____
9. Achados moleculares: _____
10. Expressão de PDL-1 (TPS%): _____
11. Subtipo histológico: _____
12. Diagnóstico em fase de Doença loco-regional (LR) ou metastática (M1)? _____
13. Tratamento adjuvante (se sim, qual?) _____
14. Tratamento sistêmico de 1ª linha (se sim, qual?):

Data: _____ / _____ /20_____

APÊNDICE F

Quadro-resumo dos laudos de NGS utilizando a plataforma *Foundation One CDx* dos indivíduos que apresentaram mutações nos genes *EGFR* e *TP53* no estudo

Indivíduo	Mutação no <i>EGFR</i>	Mutação no <i>TP53</i>	Outras co-mutações presentes
2	-	L194F	<i>CTNNB1, KEAP1, MEN1, PIK3CA</i>
3	Deleção do Éxon 19	-	<i>MTAP, CDKN2A/B, NKX2-1</i>
4	Deleção do Éxon 19	N268fs*77	<i>MTAP, CDKN2A/B</i>
9	-	P151A	<i>KRAS (G12V), QKI</i>
17	-	I251F	<i>TERT, MET</i> (amplificação)
18	-	<i>Splice site 375G>T</i>	<i>TET2, HER2</i> (amplificação), <i>KEAP1</i>
21	Deleção do Éxon 19	-	-
25	Deleção do Éxon 19	C141F	-
26	-	P128fs42	<i>TERT, BCORL1</i>
28	-	N131del	<i>BRCA2, CDK4, MYC, SMARCA4</i>
30	-	R273H	<i>CDK4, KRAS (Q61H), CXCR4, MSH2, RBM10</i>
32	-	R196*	<i>CCNE1, PMS2</i>
35	L858R (Éxon 21)	-	<i>MTAP, CDKN2A/B, MAP2K2, SMARCB1, CCNE1</i>
36	-	<i>Splice site 920-2A>T</i>	<i>HER2 (D769H), FBXW7, CTNNB1, MTAP, CDKN2A/B, STK11, ATRX, BCOR, FAM123B, MDM4, SMARCA4</i>
43	S768I, G719A	P151fs*29	<i>PTEN, CTNNB1, MTAP, CDKN2A/B</i>
44	-	R337P	<i>STK11, MYC</i>
47	-	R175H	<i>BRAF (V600E), PIK3CA, SETD2</i>
49	L858R (Éxon 21)	-	<i>HER2 (S310F), BRCA1, CTNNB1, SMAD4</i>

52	-	E285K	<i>MYC, STK11, FLCN, RAD21</i>
57	I744M	<i>Splice site 560-1G>T</i>	-
59	-	S241F	<i>KEAP1, PARK2, RB1, SMARCA4</i>
62	Deleção do Éxon 19	R337H	<i>RICTOR, FGF10, RB1</i>
63	Deleção do Éxon 19	-	<i>CCND2, CHEK2, KRAS</i> (amplificação), <i>DNMT3A, FGF23, FGF6, GNAS, MUTYH</i>
64	-	Del Éxons 2-6	<i>HER2</i> (amplificação)
65	Inserção do Éxon 20	Y234C	<i>HER2</i> (amplificação), <i>NFKBIA, NKX2-1</i>
77	-	H214R e C176Y	<i>NF1, CDC73</i>
78	S768I e L858R	C242F	<i>PTEN, RB1</i>
80	-	Y220C	<i>MYC, IRS2, RB1</i>
81	-	G262V	<i>KRAS (G12D), RB1</i>
82	-	K132N	<i>CTNNB1, KEAP1</i>
84	-	S215R	<i>ALK, DNMT3A, NOTCH1</i>
87	-	P152L	<i>BRAF (V600E), DNMT3A</i>
93	-	R280K	<i>MET</i> (mutação <i>skipping</i> do Éxon 14), <i>PDGFRα, KRAS</i> (amplificação), <i>MTAP, CDKN2A/B, CRKL, JUN</i>
95	Deleção do Éxon 19	<i>Splice site 560-1G>A</i>	<i>RB1</i>
99	L858R (Éxon 21)	R337L	<i>PIK3CA, ERFFI1, MTAP, CDKN2A/B</i>
100	L858R (Éxon 21)	L194R	<i>CDK4, MDM2, U2AF1</i>
103	Deleção do Éxon 19	P100FS*2	-
105	Inserção do Éxon 20	R158FS*12	<i>ZNF217</i>
107	-	G245C	<i>KRAS (Q61H), RICTOR, RBM10, TET2</i>
109	E709_T710>D	E286G	<i>MTAP, CDKN2A/B, CTNNB1, PIK3CA</i>

111	L858R (Éxon 21)	R280S	<i>CDK4, MYC, RAD21</i>
112	Deleção do Éxon 19, C797S, T790M	-	<i>CDK4, MDM2, IDH1</i>
113	Deleção do Éxon 19	E294*	<i>PTEN</i>
115	Deleção do Éxon 19	R273C	<i>HER2 (amplificação), NFKBIA, NKX2-1</i>
119	Deleção do Éxon 19	D393fs*77	<i>APC</i>
120	-	<i>Splice site 994-2A>T</i>	<i>NF1, MTAP, CDKN2A/B, DNMT3A, PAX5</i>
121	L858R (Éxon 21)	R248Q, R213*, A189V	<i>PIK3CA, CTNNB1, CDKN2A/B, RBM10</i>
122	-	<i>Splice site 375G>C</i>	<i>FGFR3, NF1, FGFR1, MDM2, PTEN, AURKA, NSD3, PRKCI, TERC, ZNF703</i>
127	Deleção do Éxon 19	-	-
128	Deleção do Éxon 19	M237K	<i>MTAP, CDKN2A/B, CCND1, MYC, RICTOR, FGF19, FGF3, FGF4, NFKBIA, NKX2-1, RAD21, ROS1 (amplificação)</i>

Fonte: o próprio autor

APÊNDICE G

Quadro de associação entre a carga mutacional tumoral (*TMB*), a presença de mutações condutoras/acionáveis e *status* do tabagismo, obtidos dos laudos de *NGS* dos pacientes que realizaram a análise genômica através da plataforma *Foundation One CDx*

Indivíduo	<i>TMB</i>	Tabagismo	Mutação condutora	Mutação identificada
2	baixo	sim	não	-
3	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
4	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
5	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G13D)
8	baixo	sim	não	-
9	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G12V)
12	baixo	sim	não	-
17	baixo	sim	sim	<i>MET</i> (amplificação)
18	baixo	sim	sim	<i>HER2</i> (amplificação)
26	baixo	sim	não	-
27	baixo	não	não	-
28	alto	sim	não	-
29	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G12C)
30	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (Q61H)
31	baixo	não	sim	<i>ALK</i>
33	baixo	não	não	-
35	baixo	sim	sim	<i>EGFR</i> (L858R do Éxon 21)
36	alto	indeterminado	sim	<i>HER2</i> (D769H)
38	baixo	não	não	-
39	alto	não	sim	<i>HER2</i> (P780_Y781insGSP)
43	baixo	sim	sim	<i>EGFR</i> (S768I, G719A)
44	baixo	sim	não	-
47	baixo	sim	sim	<i>BRAF</i> (V600E)

48	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G12D)
49	baixo	sim	sim	<i>EGFR</i> (L858R do Éxon 21) e <i>HER2</i> (S310F)
52	baixo	sim	não	-
57	alto	sim	sim	<i>EGFR</i> (I744M)
58	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G12A)
59	alto	sim	não	-
62	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
63	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
65	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Inserção do Éxon 20) e <i>HER2</i> (amplificação)
71	baixo	não	sim	<i>ALK</i>
77	alto	sim	não	-
78	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (S768I e L858R)
80	alto	sim	não	-
81	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G12D)
84	baixo	não	sim	<i>ALK</i>
90	baixo	sim	não	-
91	baixo	não	sim	<i>MET</i> (mutação D1010H - <i>skipping</i> do Éxon 14)
93	baixo	não	sim	<i>MET</i> (mutação D1010H - <i>skipping</i> do Éxon 14)
95	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
97	baixo	não	não	-
99	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (L858R do Éxon 21)
101	baixo	não	sim	<i>KRAS</i> (G13R)
102	baixo	não	não	-
103	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
105	baixo	sim	sim	<i>EGFR</i> (Inserção do Éxon 20)
107	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (Q61H)
109	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (E709_T710>D)

111	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (L858R do Éxon 21)
112	baixo	indeterminado	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19, C797S, T790M)
113	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
115	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19) e <i>HER2</i> (amplificação)
120	baixo	sim	não	-
121	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (L858R do Éxon 21)
122	alto	sim	não	-
123	baixo	sim	não	-
124	baixo	sim	sim	<i>KRAS</i> (G12A)
126	baixo	sim	não	-
128	baixo	não	sim	<i>EGFR</i> (Deleção do Éxon 19)
133	baixo	não	sim	<i>ALK</i>

Fonte: o próprio autor

APÊNDICE H

Tabela com as frequências absolutas e frequências relativas distribuídas nos diferentes estadios iniciais ao diagnóstico da doença, em relação às variáveis ligadas ao câncer e ao número de genes mutados

Variável	Categorias	LR		M1		p-valor
		FA	FR%	FA	FR%	
<i>Status</i> Microssatélite	Instável	0	0,00	0	0,00	-
	Estável	12	100	45	100	
<i>PDL-1</i> (TPS em %)	Hiper-expressor ($\geq 50\%$)	2	8,00	15	18,52	0,239
	Hipo-expressor (1% a 49%)	11	44,00	23	28,40	
	Negativo (< 1%)	12	48,00	43	53,09	
Nº genes mutados	De 1 a 3	13	41,94	43	47,78	0,148
	De 4 a 6	7	22,58	26	28,89	
	Acima de 6	1	3,22	8	8,89	
	Nenhum	10	32,26	13	14,44	
Subtipo histológico	Adenocarcinoma	29	93,56	89	98,89	0,166
	Carcinoma Adenoescamoso	1	3,22	0	0,00	
	Carcinoma de Grandes Células	1	3,22	1	1,11	

Legenda: FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas; LR: Doença loco-regional; M1: Doença metastática; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Independência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

APÊNDICE I

Tabela com as frequências absolutas e frequências relativas em relação às variáveis clínico-moleculares ligadas ao câncer e ao número de genes mutados nos indivíduos que realizaram tratamento adjuvante

TRATAMENTO ADJUVANTE						
Variável	Categorias	NÃO		SIM		p-valor
		FA	FR%	FA	FR%	
<i>Status</i> Microssatélite	Instável	0	0,00	0	0,00	
	Estável	47	100,00	10	100,00	-
<i>PDL-1</i> (TPS em %)	Hiper-expressor ($\geq 50\%$)	15	17,65	2	9,52	
	Hipo-expressor (1% a 49%)	26	30,59	8	38,10	
	Negativo (< 1%)	44	51,76	11	52,38	0,610
Nº genes mutados	De 1 a 3	48	50,00	8	32,00	
	De 4 a 6	26	27,08	7	28,00	
	Acima de 6	8	8,33	1	4,00	
	Nenhum	14	14,58	9	36,00	0,083
Subtipo histológico	Adenocarcinoma	95	98,96	23	92,00	
	Carcinoma Adenoescamoso	0	0,00	1	4,00	
	Carcinoma de Grandes Células	1	1,04	1	4,00	0,083

Legenda: FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Independência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

APÊNDICE J

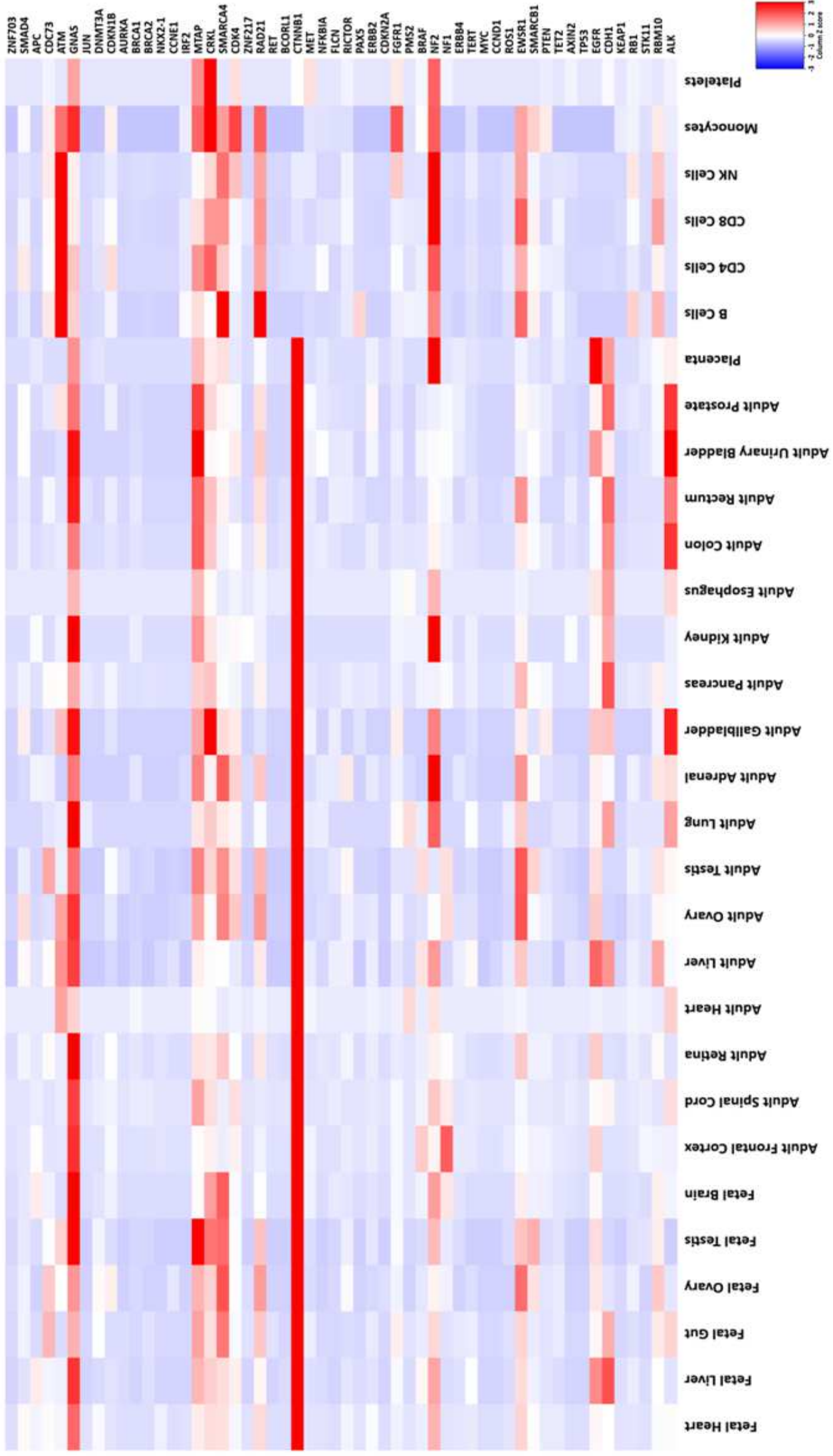
Tabela com as frequências absolutas e frequências relativas em relação às variáveis clínico-moleculares ligadas ao câncer e ao número de genes mutados nos indivíduos que realizaram tratamento sistêmico de 1ª linha

TRATAMENTO DE 1ª LINHA						
Variável	Categorias	NÃO		SIM		p-valor
		FA	FR%	FA	FR%	
<i>Status</i> Microssatélite	Instável	0	0,00	0	0,00	
	Estável	8	100	49	100	-
<i>PDL-1</i> (TPS em %)	Hiper-expressor ($\geq 50\%$)	3	15,79	14	16,28	
	Hipo-expressor (1% a 49%)	7	36,84	27	31,40	
	Negativo (< 1%)	9	47,37	45	52,33	0,896
Nº genes mutados	De 1 a 3	11	47,83	44	45,36	
	De 4 a 6	3	13,04	30	30,93	
	Acima de 6	1	4,35	8	8,25	
	Nenhum	8	34,78	15	15,46	0,103
Subtipo histológico	Adenocarcinoma	22	95,65	95	97,94	
	Carcinoma Adenoescamoso	0	0,00	1	1,03	
	Carcinoma de Grandes Células	1	4,35	1	1,03	0,478

Legenda: FA: frequências absolutas; FR%: frequências relativas; p-valor: teste de Qui-Quadrado de Independência (significativo se $p < 0,05$).

Fonte: o próprio autor

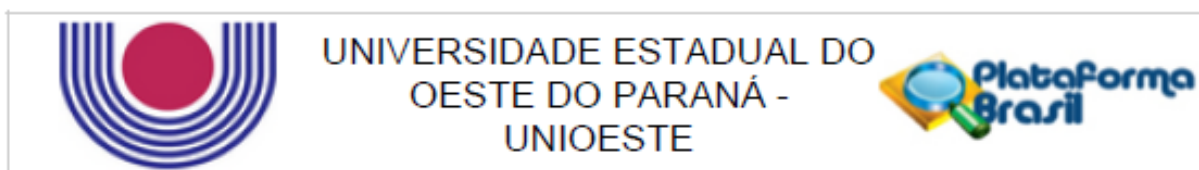
Apêndice K – Expressão tecidual dos genes sequenciados na amostra de pacientes.



Legenda: Heatmap contendo a distribuição tecidual dos genes presentes na amostra analisada, obtido do software *FurriCh*, sendo que os retângulos azuis representam expressão reduzida e os vermelhos superexpressão. Quanto maior a presença do gene no tecido, mais intensa a coloração vermelha do retângulo, e quanto menor sua expressão, mais azul a coloração; Eixo horizontal: nomes dos tecidos ou tipos celulares; Eixo vertical: genes.
 Fonte: o próprio autor.

ANEXOS

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de potenciais marcadores do prognóstico do câncer de pulmão: genômica, proteômica e vias de sinalização associadas.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 22943019.1.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.248.926

Apresentação do Projeto:

Solicitação de Emenda ao projeto:

Título da Pesquisa: Identificação de potenciais marcadores do prognóstico do câncer de pulmão: genômica, proteômica e vias de sinalização associadas.

Pesquisador Responsável: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 22943019.1.0000.0107

Submetido em: 17/08/2023

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Situação da Versão do Projeto: Em relatoria

Localização atual da Versão do Projeto: Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Objetivo da Pesquisa:

Emenda:

Justificativa da Emenda:

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 1619

Bairro: UNIVERSITARIO

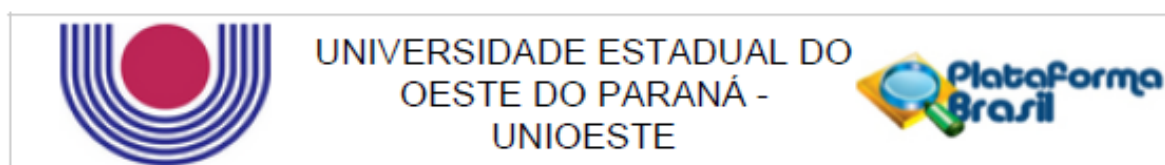
CEP: 85.819-110

UF: PR

Município: CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3082

E-mail: cep.prppg@unioeste.br



Continuação do Parecer: 6.248.926

Prezado comitê, solicitamos autorização para coleta de dados de prontuário (sem coleta de amostras biológicas) do parceiro Oncoclínicas Proonco (declaração do parceiro anexada).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide descrição anteriormente apresentada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide descrição anteriormente apresentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide descrição anteriormente apresentada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar o Relatório Final na Plataforma Brasil até 30 dias após o encerramento desta pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_219770_7_E1.pdf	17/08/2023 10:48:28		Aceito
Outros	Oncoclínicas.pdf	17/08/2023 10:46:45	CAROLINA PANIS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/11/2019 16:22:04	CAROLINA PANIS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_pesquisador.pdf	13/11/2019 16:21:50	CAROLINA PANIS	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	12/09/2019 15:14:28	CAROLINA PANIS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Responsavel_pelo_Campo_assinado.pdf	12/09/2019 10:25:48	CAROLINA PANIS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.pdf	12/09/2019 10:24:11	CAROLINA PANIS	Aceito

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 1619

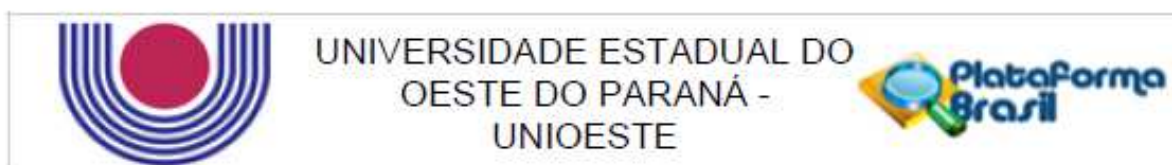
Bairro: UNIVERSITARIO

CEP: 85.819-110

UF: PR Município: CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3092

E-mail: cep.prppg@unioeste.br



Continuação do Parecer: 6.248.926

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CASCADEL, 19 de Agosto de 2023

Assinado por:
Dartel Ferrari de Lima
(Coordenador(a))

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 1619

Bairro: UNIVERSITARIO

CEP: 85.819-110

UF: PR **Município:** CASCADEL

Telefone: (45)3220-3092

E-mail: cep.prppg@unioeste.br