

**Maria Fernanda Santiago Gonçalves**

**Reprodutibilidade de um painel de expressão gênica para direcionamento de tratamento com quimioterapia adjuvante em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecáveis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Letícia Ferro Leal

Coorientador: Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2020

**Maria Fernanda Santiago Gonçalves**

**Reprodutibilidade de um painel de expressão gênica para direcionamento de tratamento  
com quimioterapia adjuvante em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas  
células cirurgicamente ressecáveis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Letícia Ferro Leal

Coorientador: Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2020

## **SUPORTE À PESQUISA**

Este trabalho recebeu o apoio do Ministério Público do Trabalho (Campinas - PRT 15ª Região). Recebeu apoio financeiro.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII– Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

*Dedicat3ria*

---

*À minha família, meus pais Carlos e Marta e minha irmã Ana Carolina.*

# *Agradecimientos*

---

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Letícia Ferro Leal pela orientação, por me contagiar com seu entusiasmo pela pesquisa. Você me proporcionou o crescimento acadêmico e, principalmente, o de vida. Agradeço os conselhos, tanto na vida profissional quanto no pessoal, por ter sido mais que uma orientadora, mas também uma grande amiga, e por ter acreditado em mim, e me permitido ser sua primeira aluna.

Ao Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis pela orientação desta dissertação e pelos ensinamentos compartilhados em todas as etapas da realização deste estudo. Obrigada por ter me dado a oportunidade de realizar este estudo e de ter confiado a minha pessoa esse projeto.

A Banca de Acompanhamento, Dr. Vinicius Duval e Dr Gilberto de Castro, por toda a assistência durante nossas reuniões. Os questionamentos levantados e orientações contribuíram para que esse trabalho fosse realizado com excelência.

Agradeço aos colaboradores do Hospital São João, Portugal, Dr. Helder Novais, Conceição Souto, Fatima e Marta.

Agradeço aos colaboradores e parceiros do MD Anderson Cancer Center e UT Southwestern Medical Center, em especial a Dr. Yang Xie e Shen Yin.

Ao Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos por incentivar a pesquisa, e pelo auxílio para continuidade deste estudo.

Ao NEB (Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística), em especial ao Marco, Marcos e Gisele, pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas deste estudo.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio-XII pela seriedade e eficiência na realização de seus trabalhos.

Ao Ministério Público do Trabalho, pelo apoio financeiro que tornou essa pesquisa de sonho a realidade.

Aos departamentos que me auxiliaram durante o desenvolvimento dessa pesquisa: Biblioteca, Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME), Registro hospitalar de câncer,



Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica (EPIT) e Departamento de Patologia (Dr. Vinicius Duval, Dra. Iara), Rafael pela ajuda com a plataforma REDCap.

Ao GTO, nossas reuniões foram essenciais para que eu tivesse uma visão ampla e translacional sobre o câncer de pulmão. Agradeço em especial aos oncologistas clínicos Dr. Pedro De Marchi e a Dra. Josiane Mourão pela ajuda na realização desse projeto.

Agradeço a todos os irmãozinhos do TOPÍssimos, Rodrigo, Aline by Lorena, Marcela, Icaro, Fabiana, por terem aturado meus dramas e por sempre tentarem me acalmar s2. As irmãs mais novas Sheila e Giovana, muito obrigada por toda ajuda.

Agradeço ao CPOM, todos os biólogos, secretaria, todos os colegas de laboratório. Agradeço a Ana e a Cris por sempre me receber com um sorriso no rosto.

À Dra. Luciane Sussuchi por sua ajuda com a parte de bioinformática deste trabalho.

Agradeço em especial aos meus amigos do Hospital de Amor: Paola, Lazaro, Flávia, Karina, Letícia B. Ângela, Wellington, Felipe, Guilherme, Eduardo e todos aqueles que deixaram a minha trajetória mais bonita e cheia de amor.

Aos grandes amigos da PED (grupo de tumores pediátricos), Aline, André, Juliana, Lais e Daniel. Vocês que me ensinaram a dar os primeiros passos na biologia molecular, foram o início de tudo. Agradeço a vocês, por todos os ensinamentos, conselhos e puxões de orelha. Muito obrigada família PED.

Ao meu namorado Fernando, por ser meu companheiro em todos os momentos, pela paciência e por compartilhar minhas conquistas como se fossem dele. Agradeço a minha sogra Joana pelo incentivo e por sempre colocar meu nome em suas orações durante essa longa árdua jornada.

Aos meus pais, Carlos e Marta, por serem meus modelos de caráter e determinação, por acreditarem em mim sempre e por terem me proporcionado tamanha realização, sem vocês eu não teria conseguido. Agradeço a toda minha família em especial, Carol, Pedro, vó Alice, vô Ranupho e vô Paulo, mais que especial aos amores da minha vida Vitor e Gabi.

# *Sumário*

---

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Epidemiologia do câncer</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Epidemiologia câncer de pulmão</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1.1</b>	<b><i>Mundo</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1.2</b>	<b><i>Brasil</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1.3</b>	<b><i>Hospital de Câncer de Barretos</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Etiologia do câncer de pulmão</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b><i>Diagnóstico e estadiamento</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4</b>	<b><i>Histologia</i> .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5</b>	<b>Tratamento e prognóstico.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>Aspectos Moleculares.....</b>	<b>10</b>
<b>1.7</b>	<b><i>Biomarcadores: assinaturas de expressão gênica</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>1.7.1</b>	<b><i>Biomarcadores baseados em assinaturas de expressão gênica: relevância no manejo clínico do CPNPC</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7.2</b>	<b><i>Biomarcadores em CPNPC ressecáveis: relevância no manejo clínico e potencial valor preditivo para tratamento com QTA</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>1.8</b>	<b><i>Nomograma como ferramenta complementar de predição de desfecho</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>

<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	24
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	24
<b>4. Metodologia</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1 Seleção dos pacientes</b> .....	26
<b>4.2 Extração RNA – amostras parafinadas (FFPE)</b> .....	27
<b>4.3 Análise Molecular</b> .....	27
<b>4.3.1 Expressão gênica</b> .....	27
<b>4.3.2 Análises bioinformáticas</b> .....	29
<b>4.4 Implementação em interface “user-friendly”</b> .....	30
<b>4.5 Análises estatísticas e construção da calculadora baseada em nomograma</b> .....	31
<b>5. Resultados</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1 Pacientes: Características clínicas</b> .....	34
<b>5.2 Painel molecular de 12 genes</b> .....	38
<b>5.3. Associação das características sociodemográficas e clínicas com o desfecho</b> .....	40
<b>5.3.1. Análise univariada</b> .....	40
<b>5.4 Performance prognóstica e preditiva do painel molecular</b> .....	46
<b>5.4.1 Performance prognóstica</b> .....	46
<b>5.4.2 Performance preditiva</b> .....	48
<b>5.4.2.1 Grupo de Baixo risco</b> .....	48
<b>5.4.2.2 Grupo de Alto risco</b> .....	50

<b>5.5. Score de risco e tratamento: análise univariada combinada .....</b>	<b>53</b>
<b>5.6 Implementação do script de análise no Galaxy.....</b>	<b>54</b>
<b>5.7. Análise multivariada.....</b>	<b>55</b>
<b>5.7.1 Construção e modelo de nomograma Sobrevida Global e Sobrevida livre de evento .</b>	<b>57</b>
<b>5.8 Construção da calculadora .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Discussão .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>69</b>
<b>Referências .....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo A .....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo B .....</b>	<b>91</b>

# *Lista de Figuras*

---

<b>Figura 1.</b> Índice mundial de incidência e mortes para os cinco principais tipos de câncer, segundo Globocan 2018, com destaque para o câncer de pulmão, que é o câncer mais incidente e o mais letal em todo o mundo <sup>1</sup> .	2
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 – 2022 por sexo (INCA, 2020). *Exceto caso de pele não melanoma <sup>2</sup> .	4
<b>Figura 3.</b> Infográfico do número de casos de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Câncer de Barretos no ano de 2018; número de casos de câncer pulmão por gênero. Dados gerados pelo setor de Registro Hospitalar da própria instituição <sup>3</sup> .	4
<b>Figura 4.</b> Infográfico do número de casos diagnosticados por estadiamento de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Câncer de Barretos no ano de 2018. Dados gerados pelo setor de Registro Hospitalar da própria instituição <sup>3</sup> .	5
<b>Figura 5.</b> Infográfico do número de casos diagnosticados por estadiamento de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Câncer de Barretos no ano de 2018. Dados gerados pelo setor de Registro Hospitalar da própria instituição <sup>3</sup> .EC. estadiamento clínico.	5
<b>Figura 6.</b> Classificação histológica do câncer de pulmão: tipos histológicos.	8
<b>Figura 7.</b> Conduta de tratamento para pacientes CPNPC cirurgicamente ressecáveis.	9
<b>Figura 8.</b> Representação de um modelo de nomograma.	19
<b>Figura 9.</b> Princípios da plataforma <i>NanoString</i> para identificação e quantificação de alvos moleculares. (adaptado de <i>Nanostring Technologies</i> - <a href="https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology">https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology</a> , Acesso em: 01/12/2020)	28
<b>Figura 10.</b> Fluxo de trabalho desde a obtenção dos dados de expressão gênica até a definição dos pacientes em alto ou baixo risco pelo <i>cutoff</i> .	30
<b>Figura 11.</b> Fluxo de seleção das amostras do presente projeto; BR, amostras do Brasil; PT, amostras de Portugal; n, número de amostra; FFPE, amostras embebidas em parafina e fixadas em formalina.	35

<b>Figura 12.</b> Representação da distribuição das amostras por cartucho. Cada cor representa um cartucho/ experimento. Eixo Y, contagens de transcritos; eixo X, amostras.....	38
<b>Figura 13.</b> <i>Heatmap</i> referente ao painel de 12 genes para todas as amostras analisadas no presente estudo, as amostras MF28 e MF32 estão apresentadas em triplicatas, e a amostra MF38 está em duplicata. Eixo Y, genes; eixo X, amostras. Vermelho, aumento de expressão; azul, diminuição de expressão; branco, expressão inalterada. As tarjas no painel superior da figura indicam o score de risco categorizado em alto ( <i>High risk</i> ) e baixo risco ( <i>low- risk</i> ) e a histologia, subtipos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas ( <i>squamous cell carcinoma</i> ).....	39
<b>Figura 14.</b> Sobrevida global em meses da idade ao diagnóstico (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses da idade ao diagnóstico (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.....	40
<b>Figura 15.</b> Sobrevida global em meses do sexo (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses da do sexo (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança. ....	41
<b>Figura 16.</b> Sobrevida global em meses status de tabagismo (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses status de tabagismo (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança. ....	42
<b>Figura 17.</b> Sobrevida global em meses do subtipo histológico (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses da do subtipo histológico (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.....	42
<b>Figura 18.</b> Sobrevida global em meses estadiamento clínico (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses estadiamento clínico (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à	



direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança. ....43

**Figura 19.** Sobrevida global em meses estadiamento agrupado (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses estadiamento agrupado (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.....44

**Figura 20.** Sobrevida global em meses tratamento com quimioterapia (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses tratamento com quimioterapia (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. QTA, quimioterapia adjuvante; N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança. ....45

**Figura 21.** Sobrevida global em meses score de risco (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses do score de risco (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança. ....46

**Figura 22** Sobrevida global para os pacientes com adenocarcinoma de acordo com o score de risco. ....47

**Figura 23.** Sobrevida global em meses baixo risco de acordo com o tratamento (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses baixo risco de acordo com o tratamento (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. QTA, quimioterapia adjuvante; N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança. ....48

**Figura 24.** Sobrevida global pacientes com adenocarcinoma do pertencentes ao grupo de baixo risco, de acordo com o tratamento com quimioterapia. ....49

**Figura 25.** Sobrevida global em meses do grupo de alto risco, de acordo com tratamento (gráfico à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses grupo de alto risco, de acordo com tratamento (gráfico à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da

análise univariada pela Regressão de Cox. Qta, quimioterapia adjuvante; N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança .....	50
<b>Figura 26</b> Sobrevida global, censurado em 24 meses do grupo de alto risco, de acordo com tratamento com QTA.....	51
<b>Figura 27.</b> Sobrevida global apenas dos pacientes com adenocarcinoma pertencentes ao grupo de alto risco, de acordo com o tratamento com quimioterapia .....	52
<b>Figura 28.</b> Sobrevida global apenas dos pacientes com carcinoma de células escamosas pertencentes ao grupo de alto risco, de acordo com o tratamento com quimioterapia. CEC, carcinoma de células escamosas.....	52
<b>Figura 29.</b> Gráfico de sobrevida global em meses score de risco agrupado quanto ao tratamento (gráfico à esquerda), e gráfico de sobrevida livre de evento em meses score de risco agrupado quanto ao tratamento (gráfico à direita). Análise univariada pelo modelo de Regressão de Cox da sobrevida global e sobrevida livre de evento com relação ao score de risco agrupado. Qta, quimioterapia adjuvante; N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança .....	53
<b>Figura 30.</b> Implementação do <i>script</i> na plataforma <i>Galaxy</i> da instituição Hospital de Amor de Barretos. ....	54
<b>Figura 31.</b> Geração dos dados a partir do <i>script</i> implementado na plataforma <i>Galaxy</i> da instituição Hospital de Amor de Barretos .....	55
<b>Figura 32.</b> Modelo de nomograma desenvolvido referente a sobrevida global para pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecados. ....	58
<b>Figura 33.</b> Modelo de nomograma desenvolvido referente a sobrevida livre de evento para pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecados.....	59
<b>Figura 34.</b> Calculadora para estimativa de sobrevida em 1, 3 e 5 anos para pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecados. ....	61

# *Lista de Tabelas*

---

<b>Tabela 1.</b> Assinaturas de expressão gênica com relevância clínica para pacientes com CPNPC. .....	14
<b>Tabela 2.</b> Principais funções dos 12 genes associados ao painel para predição do benefício com quimioterapia adjuvante. ....	18
<b>Tabela 3.</b> Genes que compõem o painel utilizado no presente estudo. ....	27
<b>Tabela 4.</b> Principais características clínicas dos pacientes do presente estudo (n=119). ....	37
<b>Tabela 5.</b> Análise multivariada pelo modelo de Regressão de Cox da sobrevida global e sobrevida livre de eventos das principais variáveis clínicas.....	56
<b>Tabela 6.</b> Análise multivariada pelo modelo de Regressão de Cox da sobrevida global e sobrevida livre de eventos das variáveis incluídas no modelo final do nomograma. ....	57
<b>Tabela 7.</b> Pontuação específica para cada variável clínica e molecular, sobrevida global e sobrevida livre de evento. ....	57
<b>Tabela 8.</b> Probabilidade de sobrevida global em 1, 3 e 5 anos.....	58
<b>Tabela 9.</b> Probabilidade de sobrevida livre de evento em 1, 3 e 5 anos. ....	59

# *Lista de Abreviaturas*

---

IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
EC	Estadiamento Clínico
CT	<i>Computed tomography</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PET CT	<i>Positron Emission Tomography–Computed Tomography</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer Lung</i>
CPPC	Câncer de Pulmão de Pequenas Células
CPNPC	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
QTA	Quimioterapia adjuvante
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncolog</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
BRAF	<i>V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B</i>
EML4	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SLFN11	<i>Schlafen family member 11</i>
ERCC1	<i>Excision repair protein ERCC-1</i>
ATP8A1	<i>Phospholipid-transporting ATPase IA</i>
AURKA	<i>Aurora kinase A</i>
C1orf116	<i>Chromosome 1 Open Reading Frame 116</i>
COL4A3	<i>Collagen typo IV alpha-3 chain</i>

<i>DOCK9</i>	<i>Dedicator of Cytokines 9</i>
<i>HOPX</i>	<i>Homeodomain-only protein</i>
<i>HSD17B6</i>	<i>17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 6</i>
<i>IFT57</i>	<i>Intraflagellar transport protein 57 homolog</i>
<i>MBIP</i>	<i>binding inhibitory protein 1</i>
<i>NKX2-1</i>	<i>NK2 homeobox 1</i>
<i>RRM2</i>	<i>Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2</i>
<i>TTC37</i>	<i>Tetratricopeptide repeat protein 37</i>
CPOM	Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular
QC	controle de qualidade
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
RMS	<i>Regression Modeling Strategies</i>
n	Número
μL	Microlitro
BR	Brasil
PT	Portugal
SG	Sobrevida global
SLE	Sobrevida livre de evento
RR	Risco Relativo
IC	Intervalo de confiança
ADC	Adenocarcinoma
CEC	Carcinoma de células escamosas
m	Média
ID	Identificação
Ref	Referencia
Prob	Probabilidade
GTOP	Grupo translacional de oncologia pulmonar

*Resumo*

---



Gonçalves MFS. Reprodutibilidade de um painel de expressão gênica para direcionamento de tratamento com quimioterapia adjuvante em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecáveis. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020.

**Justificativa:** O câncer de pulmão é o câncer responsável pelo maior número de óbitos no mundo todo, com taxas de sobrevivência muito baixas. Tratamentos curativos estão disponíveis para pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC) em estágio inicial (I-IIIa), incluindo cirurgia e quimioterapia adjuvante. No entanto, independentemente da quimioterapia adjuvante (QTA), a maioria dos pacientes com CPNPC tratados com abordagens curativas terá recidivas e progressão da doença. Atualmente, faltam critérios específicos para definir os pacientes que serão beneficiados pelo QTA. **Objetivo:** validar um painel de 12 genes para manejo dos pacientes com CPNPC e direcionamento do tratamento com QTA. **Métodos:** Pacientes com CPNPC ressecados cirurgicamente (n=119) foram selecionados retrospectivamente e as amostras de tecido tumoral (FFPE) foram submetidas à extração de RNA (RNeasy FFPE Mini Kit, Qiagen). Um painel de expressão customizado contendo 12 genes (nCounter ElementsXT) foi empregado utilizando 100ng de RNA. O score de risco foi calculado a partir de um *cutoff* (pacote R *mclust*), sendo os pacientes estratificados em 2 grupo: pacientes de alto risco (n = 59; benefício de QTA) e pacientes de baixo risco (n = 59; não benefício de QTA). O método de *Kaplan-Meier* e teste de *Log-rank*, bem como a regressão de Cox foram usados para as análises de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de evento. O modelo de regressão foi empregado para desenvolvimento do nomograma (Pacote *RMS*), e posteriormente a calculadora para predição de probabilidade de sobrevivência (*RedCap survey*). **Resultados:** O painel de 12 genes foi conclusivo para 99,2% das amostras (n=118; *failure rate*=0,8%) e estratificou os pacientes em dois grupos, alto e baixo risco, independentemente do tratamento, tanto para SG quanto para SLE. Os pacientes do grupo de baixo risco que não foram tratados com QTA (n=39) apresentaram maior sobrevida global em relação aos pacientes tratados com QTA. Os pacientes do grupo de alto risco que foram tratados com QTA (n=27) apresentaram, em média, 10 meses a mais de SG e SLE em relação aos pacientes não tratados (n=32). O modelo final para a construção do nomograma foi composto pelas variáveis score de risco (baixo risco e alto risco) e estadiamento clínico ao diagnóstico (IA/IB/IIA, IIB, IIIA). A calculadora foi configurada para

determinar a probabilidade de SG e SLE em 1, 3 e 5 anos. **Conclusão:** O painel de 12 genes apresentou alta taxa de resultados conclusivos e estratificou com sucesso os pacientes com CPNPC ressecados em grupos de alto e baixo risco. O nomograma baseado na calculadora combinando características clínicas e resultados moleculares pode ser uma ferramenta útil e para oncologistas para melhor orientar as estratégias de tratamento com intenção curativa para pacientes com CPNPC.

**Palavras-chave:** Câncer de pulmão de não pequenas células, quimioterapia adjuvante, assinatura molecular, medicina personalizada, NanoString.

# *Abstract*

---

Gonçalves MFS. Reproducibility of a 12-gene panel for predicting benefit with adjuvant chemotherapy in surgically resected non-small cell lung cancer patients. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2020.

**Background:** Lung cancer is the deadliest cancer worldwide with very low survival rates. Curative treatments are available for early-stage (I-IIIa) patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), including both surgery and adjuvant chemotherapy. However, regardless of adjuvant chemotherapy (ACT), most patients with NSCLC treated with curative approaches will experience recurrences and disease progression. There are no specific criteria to define patients who will be benefited by ACT. **Aim:** To validate a 12-gene panel for clinical management of NSCLC patient. **Methods:** Patients with NSCLC surgically resected (n=119) were retrospectively selected and tumor tissue samples (FFPE) were submitted to RNA isolation (RNeasy FFPE Mini Kit, Qiagen). A 12-gene custom panel (nCounter Elements XT) was employed using 100ng of RNA, and gene counts were normalized by housekeeping genes (NAPPA\_R package). The risk score was calculated and patients' stratification was based on a cutoff (R mclust package). Patients were then stratified into 2 groups: high-risk patients (n = 59; benefit ACT) and low-risk patients (n = 59; ACT non-benefit). The Kaplan-Meier method and Log-rank test, as well as Cox regression, were used for the analysis of overall survival (OS) and event-free survival (EFS). Regression model output was used for the nomogram-based calculator input (RMS Package) for predicting the survival probability (RedCap survey). **Results:** The 12-gene panel was conclusive for 99.2% of samples (n=118; *failure rate*=0.8%) and stratified patients into high and low risk for both OS and PFS. Patients in the low-risk group who were not treated with ACT (n=39) had higher overall survival compared to patients treated with ACT. ACT-treated high-risk patients (n = 27) presented 10 months increment of OS and PFS compared to untreated patients (n=32). The final nomogram included both risk score (low- and high-risk) and clinical stage at diagnosis (IA/IB/IIA, IIB, IIIA). The calculator was set up to determine the 1-, 3- and 5-years OS and PFS probability. **Conclusion:** The 12-gene panel was highly conclusive successfully stratified patients with resected NSCLC into high- and low-risk groups. The calculator-based nomogram including both clinical and parameters can be a useful tool for oncologists for better guiding treatment strategies with curative intent for NSCLC patients **Keywords:** Non-small cell lung cancer, adjuvant chemotherapy, molecular signature, personalized medicine, NanoString

# *Introdução*

---

## 1 Introdução

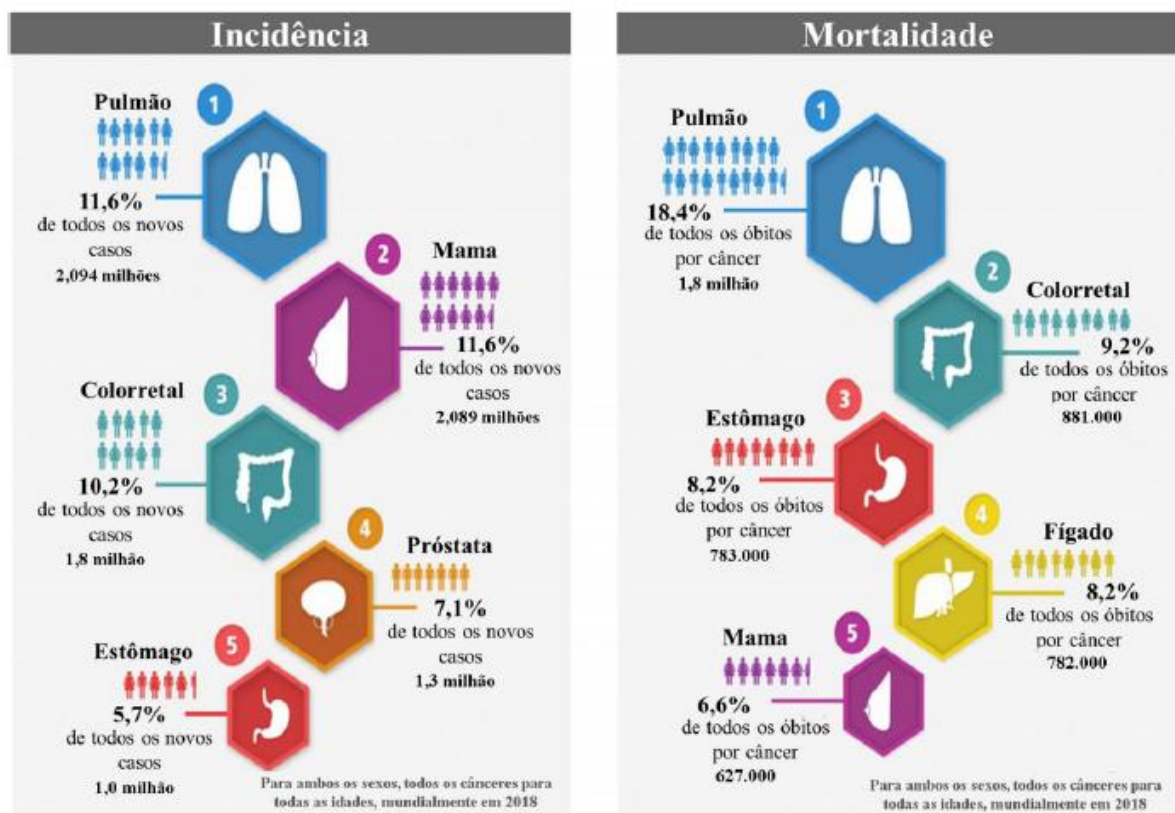
### 1.1 Epidemiologia do câncer

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency of Research on Cancer*), estimou-se para 2018 cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, sendo que, destes, 9,6 milhões irão a óbito em decorrência da doença<sup>1</sup>.

#### 1.1.1 Epidemiologia câncer de pulmão

##### 1.1.1.1 Mundo

O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais incidente e mais letal em todo o mundo. Para o ano de 2018, foram estimados 2,1 milhões de novos casos de câncer de pulmão e 1,8 milhão de mortes<sup>1</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Índice mundial de incidência e mortes para os cinco principais tipos de câncer, segundo Globocan 2018, com destaque para o câncer de pulmão, que é o câncer mais incidente e o mais letal em todo o mundo<sup>1</sup>.

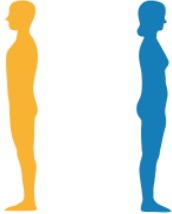
O continente asiático é o continente com o maior número de casos de câncer de pulmão de todo o globo. Para 2018, foram estimados cerca de 1,2 milhão de novos casos, ou seja, mais da metade de todos os indivíduos diagnosticados com câncer de pulmão no mundo. Conseqüentemente, a Ásia é a região com o maior índice de mortalidade entre todos os continentes, o que corresponde a cerca de 1 milhão de óbitos pela doença, conforme estimativa para o ano de 2018<sup>1</sup>.

O continente Europeu é a segunda região do mundo com o maior número de casos. Foram estimados para 2018 cerca de 407 mil novos casos, sendo aproximadamente 388 mil mortes causadas pela doença<sup>1</sup>. O terceiro continente mais afetado pelo câncer de pulmão é o Norte-americano, com uma estimativa de mais de 252 mil casos e mais de 173 mil mortes causadas pela doença<sup>1</sup>.

A incidência da doença para o continente Sul-americano foi estimada em 68,5 mil novos casos e, aproximadamente, 63 mil óbitos para 2018. Foi o terceiro tipo de câncer que mais afetou os homens, cerca de 39,2 mil novos casos para 2018, atrás apenas do câncer de próstata e colorretal. Entre as mulheres foi o quinto tipo de câncer mais comum com aproximadamente 39,3 mil novos casos para o ano de 2018<sup>1</sup>.

#### **1.1.1.2 Brasil**

No Brasil, foram estimados cerca de 30.200 mil novos casos de câncer de pulmão, para o triênio 2020 – 2022<sup>2</sup>. Dos casos estimados, 17.760 serão em homens, sendo o terceiro tipo mais incidente entre os indivíduos do sexo masculino, e 12.440 em mulheres, sendo o quarto tipo mais incidente em indivíduos do sexo feminino (**Figura 2**)<sup>2</sup>.

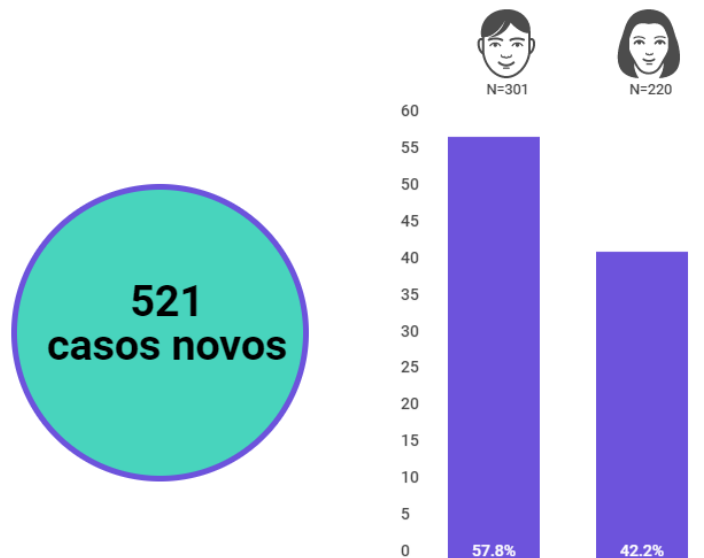
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 2.** Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 – 2022 por sexo (INCA, 2020). \*Exceto caso de pele não melanoma<sup>2</sup>.

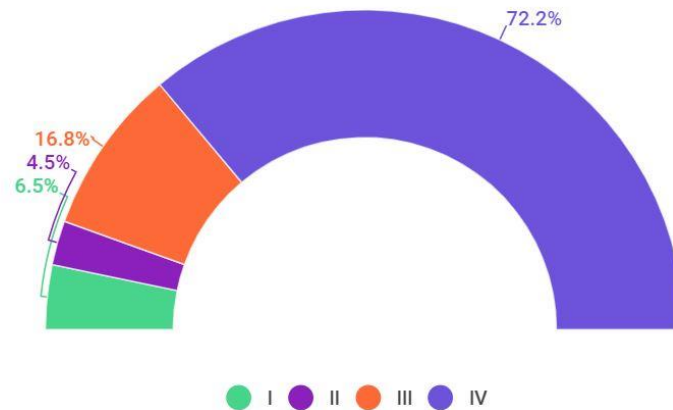
### 1.1.1.3 Hospital de Câncer de Barretos

O Registro Hospitalar do Hospital de Câncer de Barretos registrou, somente no ano de 2018, 521 novos casos de câncer de pulmão, dos quais 301 eram do sexo masculino e 220 eram do sexo feminino (**Figura 3**)<sup>3</sup>. Destes novos casos, 89% foram diagnosticados em estadiamento avançado III e IV (**Figura 4**)<sup>3</sup>.



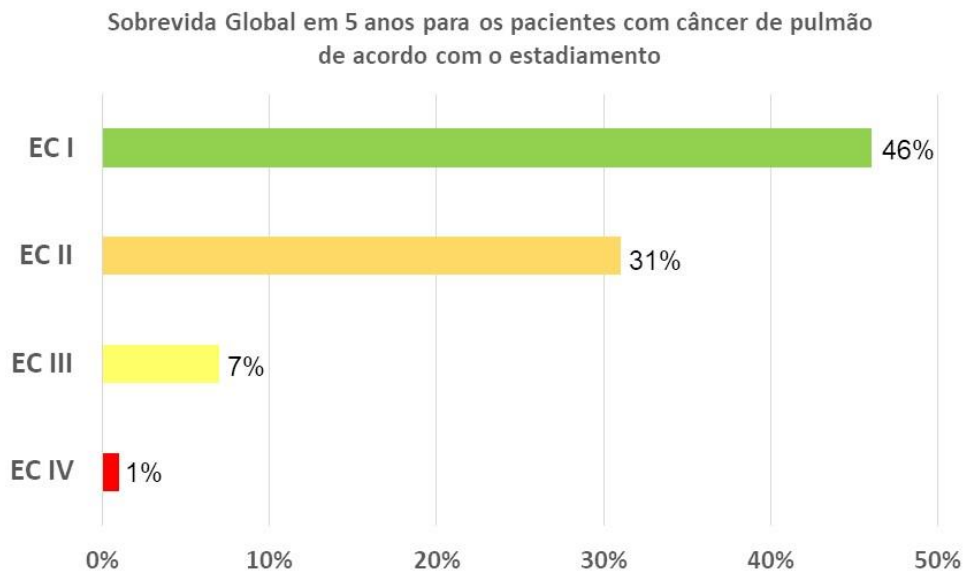
**Figura 3.** Infográfico do número de casos de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Câncer de Barretos no ano de 2018; número de casos de câncer pulmão por gênero. Dados gerados pelo setor de Registro Hospitalar da própria instituição<sup>3</sup>.





**Figura 4.** Infográfico do número de casos diagnosticados por estadiamento de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Câncer de Barretos no ano de 2018. Dados gerados pelo setor de Registro Hospitalar da própria instituição<sup>3</sup>.

A sobrevida global em 5 anos dos pacientes atendidos na instituição foi inferior a 50% para os pacientes diagnosticados em estadiamentos iniciais (estadiamentos I e II), quando as opções curativas ainda são consideradas para o tratamento. Para os pacientes diagnosticados em estadiamento avançado (estadiamentos III e IV), a sobrevida global em 5 anos foi inferior a 10% (**Figura 5**)<sup>5</sup>.



**Figura 5.** Infográfico do número de casos diagnosticados por estadiamento de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Câncer de Barretos no ano de 2018. Dados gerados pelo setor de Registro Hospitalar da própria instituição<sup>3</sup>. EC. estadiamento clínico.

## **1.2 Etiologia do câncer de pulmão**

O câncer de pulmão é considerado uma doença complexa que ocorre devido a uma integração de fatores ambientais e genéticos. A incidência elevada do câncer de pulmão está relacionada principalmente ao uso excessivo do tabaco, sendo este o principal fator etiológico em 80% dos casos<sup>4</sup>. O risco de desenvolver câncer de pulmão na população de indivíduos fumantes é maior quando comparados a ex-fumantes e a não fumante. É importante salientar que o risco de desenvolver câncer de pulmão diminui com o tempo após a cessação do tabagismo<sup>5</sup>. Apesar do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão diminuir em ex-fumantes, estes ainda têm um risco maior para desenvolver a doença comparado aos não fumantes<sup>6</sup>.

Além do tabaco, outros fatores de risco têm sido associados ao câncer de pulmão, especialmente em indivíduos que nunca fumaram<sup>7</sup>. Dentre estes fatores, exposição a radônio e asbestos, dieta inadequada, exposição à poluição do ar e processos endógenos (por exemplo, defeitos de recombinação homóloga e APOBEC)<sup>8</sup>.

## **1.3 Diagnóstico e estadiamento**

O alto índice de mortalidade pelo câncer de pulmão está diretamente relacionado ao diagnóstico tardio, uma vez que a maioria dos pacientes são diagnosticados em estadiamento avançado, quando não há opções curativas para a doença<sup>9,10</sup>. Entre os anos de 2000 a 2010, no estado de São Paulo, apenas 8,8% dos pacientes com câncer de pulmão foram diagnosticados em estágio I<sup>11,9,10</sup>.

A tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*), a broncoscopia e a biópsia transtorácica são os principais exames para detecção do câncer de pulmão. A CT apresenta vantagens no quesito de aquisição de imagem, projetando imagens mais detalhadas e permitindo o diagnóstico mais preciso<sup>12</sup>. O PET *scan*, ou PET CT, baseia-se na aquisição de imagens por emissão de prótons e permite avaliar o metabolismo tumoral por captação de glicose, sendo mais sensível em relação a CT possibilitando o diagnóstico do tumor e a identificação de possíveis metástases<sup>13</sup>. A broncoscopia é uma técnica que auxilia na

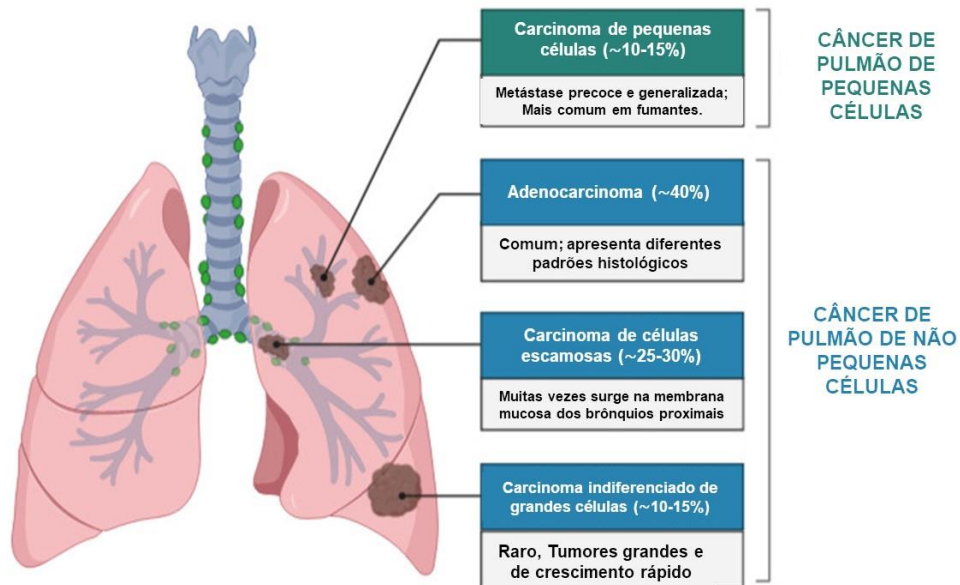
avaliação das células das vias aéreas, utilizando o broncoscópio a fim de identificar áreas com suspeita de lesão pulmonar<sup>14</sup>. Uma vez que o pulmão é um sítio comum de metástases oriundas de tumores em outros sítios, é necessária a confirmação do diagnóstico do câncer de pulmão pela análise histológica. A biópsia transtorácica é um aspirado de agulha que chega até o tecido tumoral para coleta de um pequeno fragmento para análises histológicas.

Após a confirmação do diagnóstico de câncer de pulmão, realizar o estadiamento de forma adequada é essencial para o direcionamento do tratamento e predição do prognóstico. O estadiamento do câncer de pulmão é baseado no sistema de estadiamento TNM. Essa classificação segue a *American Joint Committee of Cancer (AJCC)*, onde avalia-se: Tumor (T) - tamanho do tumor primário; Linfonodo (N) - presença de linfonodo comprometido; Metástase (M) presença de metástase<sup>15,16</sup>. A partir destas informações, os pacientes são classificados com estadiamento clínico de 0 a IV<sup>16</sup>.

#### **1.4 Histologia**

O câncer de pulmão é dividido em dois principais tipos histológicos: o câncer de pulmão de pequenas células (CPPC), que acomete 10-15% dos casos e o câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), que acomete 80-85% dos casos<sup>17</sup>.

O CPNPC é ainda subdividido, a depender da célula de origem, em três subtipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células (**Figura 6**)<sup>17</sup>. O adenocarcinoma é o mais frequente e apresenta-se na forma de massa periférica e os aspectos microscópicos englobam formação glandular, normalmente com produção de mucina. Este subtipo pode ainda apresentar 6 padrões histológicos, sendo eles papilar, micropapilar, mucinoso invasivo, acinar, lepidico e sólido. O carcinoma de células escamosas surge, em sua maioria, no hilo ou nas proximidades, provavelmente devido aos mecanismos de adaptação do tecido pulmonar frente a estresses, tal como o tabagismo, relatado por quase todos os casos diagnosticados com este subtipo<sup>18</sup>.



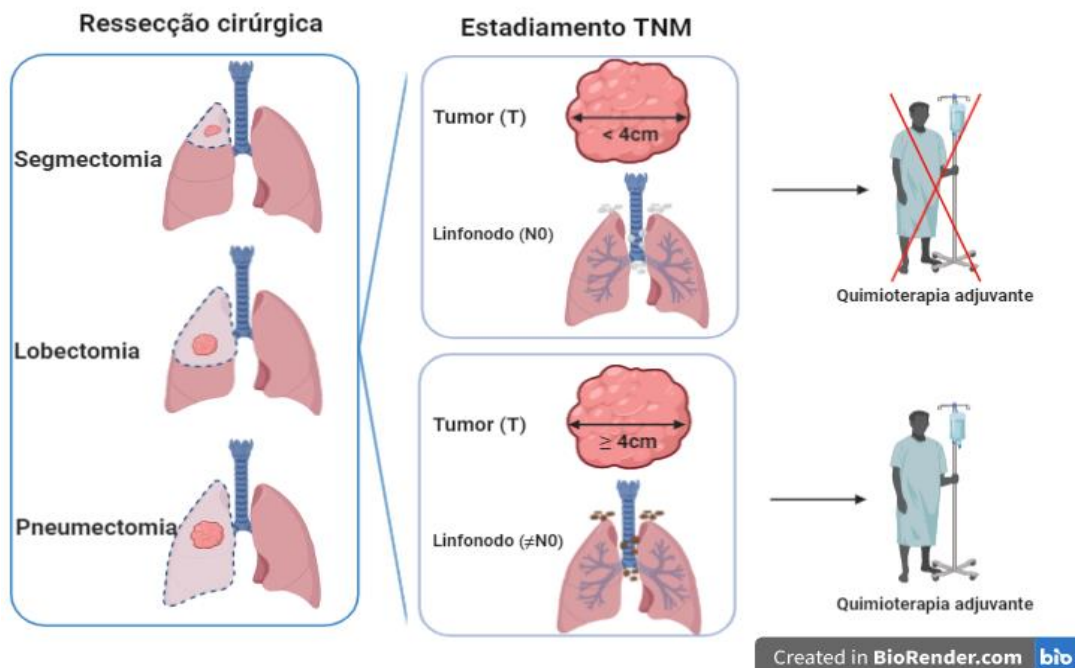
**Figura 6.** Classificação histológica do câncer de pulmão: tipos histológicos.

### 1.5 Tratamento e prognóstico

O tratamento para pacientes diagnosticados em estádios iniciais tem, quase sempre, intenção curativa. As principais modalidades de tratamento para estes pacientes são ressecção cirúrgica e tratamento adjuvante. A cirurgia com intenção curativa pode ser de 3 tipos: Segmentectomia – que remove apenas uma parte de um lobo pulmonar; Lobectomia – responsável pela retirada completa de um lobo pulmonar, sendo a mais comumente utilizada em CPNPC; Pneumonectomia – remove um dos pulmões por completo<sup>19</sup>. A escolha do tipo de cirurgia depende do tamanho da lesão e de sua localização, sempre com a intenção da retirada completa da lesão mais margem cirúrgica<sup>20</sup>. No entanto, a ressecção cirúrgica isolada nem sempre é suficiente e, por esta razão, muitos casos cirurgicamente ressecáveis recebem indicação para o tratamento com quimioterapia adjuvante (QTA).

Os critérios para indicação do tratamento adjuvante com quimioterapia são bastante escassos e, na prática clínica, nem sempre funcionam. Atualmente, o tamanho do tumor ( $\geq 4$ cm) e/ou o comprometimento linfonodal são os critérios adotados para indicação da QTA (**Figura 7**). Os principais regimes de QTA são as combinações de drogas baseadas em platina

(cisplatina e carboplatina) com paclitaxel (taxol) ou agentes alquilantes (vinorelbina)<sup>20</sup>. No entanto, a QTA é bastante agressiva e poucos pacientes são, de fato, beneficiados com este tipo de tratamento. A fim de preencher esta lacuna, Tang e colaboradores realizaram uma investigação em larga escala, e identificaram uma assinatura molecular capaz de identificar os pacientes que poderão se beneficiar do tratamento com QTA pós cirurgia com um aumento significativo da sobrevida global<sup>21</sup>.



**Figura 7.** Conduta de tratamento para pacientes CPNPC cirurgicamente ressecáveis.

Além da QTA, foi apresentado na ASCO em 2020, os primeiros resultados do estudo ADAURA, que avaliou o tratamento adjuvante com terapia alvo molecular com um anti-*EGFR* (*osimertinib*) para pacientes com CPNPC diagnosticados em estadiamento inicial (IB-IIIa) e portadores de mutação no gene *EGFR*<sup>22</sup>.

As terapias alvo moleculares revolucionaram o manejo dos pacientes com CPNPC. Este tipo de terapia é direcionado aos pacientes que carregam alterações somáticas específicas, como, por exemplo, mutações em domínios de tirosina quinase. A estas alterações, dá-se o nome de mutações “acionáveis”, sendo as principais alterações detalhadas no tópico seguinte. No entanto, as terapias alvo beneficiam somente uma parcela dos pacientes, uma vez que é obrigatória a presença de alterações acionáveis. Vale ainda salientar que, com exceção da

aprovação recente da ASCO (supracitada), todas as outras terapias alvo – crizotinib (anti-ALK), larotrectinib (anti-NTRK), selpercatinib (anti-RET), entre outros – ainda são indicadas somente no contexto de doença avançada<sup>23,24,25</sup>.

Ainda no contexto de doença avançada, a imunoterapia foi um grande avanço no tratamento de pacientes com CPNPC metastáticos com aumento substancial de sobrevida<sup>26</sup>. Para aumentar as chances de resposta a este tipo de tratamento, é recomendado que o paciente apresente um tumor com marcação em imunistoquímica para PD-L1 maior que 49%. As grandes limitações deste tratamento são os efeitos adversos e o número de pacientes não respondedores ou que, mesmo apresentando resposta parcial primeiramente, irão apresentar progressão da doença posteriormente<sup>27,28</sup>.

### **1.6 Aspectos Moleculares**

O câncer de pulmão apresenta perfis moleculares distintos, sendo o CPNPC o subtipo histológico mais explorado do ponto de vista molecular. Com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), as investigações dos perfis moleculares tornaram-se mais amplas, contribuindo substancialmente para a identificação de novos genes com relevância clínica.

Entre os genes frequentemente mutados em CPNPC, o gene *TP53* é o gene com maior número de alterações. O gene *TP53*, apesar de não ter valor clínico relevante, encontra-se mutado em cerca de 50% dos casos de adenocarcinoma e mais de 80% dos casos de carcinoma de células escamosas<sup>29,30</sup>.

O subtipo adenocarcinoma apresenta uma frequência de aproximadamente 12-50% de mutações no gene *EGFR* – concentradas nos exons 18 a 21 – variando entre as diferentes localizações geográficas<sup>23,31,32</sup>. A abordagem terapêutica com inibidores de tirosina quinase (TKIs) para pacientes com mutações no gene *EGFR* proporciona uma alta taxa de resposta ao tratamento levando ao aumento significativo da taxa de sobrevida<sup>33,34</sup>. Apesar do gene *EGFR* ser o gene “*druggable*” mais frequentemente mutado em CPNPC, o avanço dos estudos moleculares nas últimas décadas revelou a presença de alterações em outros genes que vieram a ser importantes alvos terapêuticos<sup>29</sup>. Além das mutações do gene *EGFR*, mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* são frequentemente observadas em CPNPC, principalmente em histologia não escamosa e pacientes fumantes, além de associadas a um prognóstico

desfavorável<sup>35-37</sup>. Recentemente, a mutação p.G12C do gene *KRAS* passou a ganhar uma relevância preditiva em CPNPC e este gene, até então, “*undrugable*”, passou a ser uma das principais promessas para os pacientes com esta doença. Um estudo com o composto AMG-510 mostrou diminuição do tumor e melhor resposta antitumoral para os pacientes portadores da mutação p.G12C do gene *KRAS* em comparação ao tratamento com quimioterapia<sup>30,38</sup>. Estes resultados indicam que, este subgrupo de pacientes, até então sem alternativas de tratamento com terapia alvo, podem ter agora uma alternativa efetiva.

Entre outras alterações que são alvo de terapias moleculares, estão também as mutações no códon V600 do gene *BRAF*, que parecem conferir um fenótipo mais agressivo da doença em pacientes com adenocarcinoma de pulmão. Para estes pacientes, entretanto, já existem terapias alvo moleculares anti-*BRAF* como as drogas alvo *dabrafenib*, *trametinib* e *vemurafenib*<sup>59</sup>. Porém, vale ainda salientar que, em CPNPC, as mutações do gene *BRAF* não-V600 são mais comuns que as mutações V600<sup>39</sup>.

Além das alterações nos genes *EGFR*, *KRAS* e *BRAF*, outras alterações menos frequentes são extremamente relevantes no contexto da medicina personalizada para melhor manejo dos pacientes, como os rearranjos e translocações do gene *ALK*. Estas alterações se devem à fusão de parte deste gene com fragmentos de outros genes, como, por exemplo, o gene *EML4*, entre outros parceiros<sup>40,41</sup>. Outros genes também podem sofrer rearranjos e translocações, como os genes *RET*, *ROS1* e *NTRK1/2*, que também são alvos terapêuticos e podem auxiliar no melhor manejo clínico dos pacientes com CPNPC. Porém, as fusões envolvendo esses genes são menos comuns em CPNPC (<2%)<sup>42</sup>. Geralmente, as translocações dos genes mencionados são mutuamente exclusivas com as mutações nos genes *EGFR* e *KRAS*.

Apesar das alterações moleculares nestes genes terem um papel importante no manejo clínico dos pacientes com câncer de pulmão, elas auxiliam no manejo clínico somente em uma parcela dos casos<sup>20</sup>. Outras alterações genômicas podem ser de extrema relevância do ponto de vista clínico para direcionamento do tratamento e predição de prognóstico no câncer de pulmão.

### **1.7 Biomarcadores: assinaturas de expressão gênica**

Os biomarcadores são divididos em 3 categorias, biomarcadores de diagnóstico (usados para diagnóstico diferencial), biomarcadores prognósticos (diferenciam tumores com desfecho desfavorável daqueles com desfecho favorável) e biomarcadores preditivos (auxiliam na predição de resposta a determinado tratamento para um paciente em particular)<sup>38</sup>. O ideal para um bom biomarcador é apresentar uma alta especificidade e sensibilidade, além de poder preditivo<sup>38</sup>. Os biomarcadores podem ser identificados em tecidos e fluidos corpóreos capazes de discriminar uma situação normal para uma situação de doença e podem auxiliar no diagnóstico, no direcionamento do tratamento e na predição de resposta à terapia. Atualmente, a maioria dos biomarcadores são baseados em mutações<sup>43</sup>. Porém, os biomarcadores baseados em expressão gênica surgem como uma ferramenta promissora para auxiliar o manejo clínico dos pacientes (**Tabela 1**).

Apesar da existência de estudos envolvendo a investigação de assinaturas gênicas prognósticas para o câncer de pulmão, estes estudos nem sempre são adequados para garantir a aplicabilidade e reprodutibilidade dos painéis desenvolvidos. Isto porque a maioria destes estudos apresentam problemas como análise e desenho de estudo inadequado, vieses dos dados apresentados e quantidade insuficiente de amostras para as fases de validação<sup>44</sup>. Para esse tipo de estudo, a fase de validação, a reprodutibilidade dos painéis e o método de predição de classe são essenciais para o sucesso do método na aplicação clínica<sup>44</sup>. Além destes fatores, é importante salientar que a maioria dos estudos citados utilizam amostras de tecido congelado. Porém, as amostras coletadas para os exames de rotina – histopatológicos e moleculares – são amostras parafinadas (FFPE, do inglês, *formalin-fixed paraffin-embedded*). Por esta razão, a realização de testes moleculares que necessitem disponibilidade de tecido congelado nem sempre é possível. No entanto, para a realização de testes em larga escala, especialmente painéis baseados em RNA, tais como os painéis de expressão gênica, é necessário que o RNA seja de excelente qualidade para que os resultados sejam confiáveis, o que dificilmente é alcançado com amostras de parafina, tornando-as incompatíveis com este tipo de abordagem. Para suprir esta lacuna, novas tecnologias em larga escala têm sido desenvolvidas nos últimos anos com o intuito de avaliar amostras de FFPE, e outras amostras com alto grau de degradação. Atualmente, a tecnologia *nCounter*<sup>®</sup> (*NanoString Technologies*)



é focada em painéis baseados em RNA e é a tecnologia em larga escala mais recomendada para abordagens que utilizem amostras parafinadas<sup>45</sup>. É importante salientar que, independentemente da qualidade das amostras, seja esta de qualidade baixa (ex.: FFPE) ou elevada (ex.: tecido fresco/congelado), os resultados obtidos com a tecnologia *nCounter*<sup>®</sup> apresentam concordância alta em tecidos congelados e parafinados, além de resultados altamente reprodutíveis<sup>46</sup>. Portanto, esta tecnologia pode ser considerada a ferramenta mais adequada para utilização na rotina diagnóstica empregando amostras coletadas rotineiramente (ex.: FFPE)<sup>46</sup>. É importante ainda ressaltar que o sistema que compõe a tecnologia *nCounter*<sup>®</sup> tem um custo semelhante a um sistema de sequenciamento de nova geração, tanto do ponto de vista patrimonial quanto do ponto de vista de consumo.

#### ***1.7.1 Biomarcadores baseados em assinaturas de expressão gênica: relevância no manejo clínico do CPNPC***

Estudos envolvendo assinaturas baseadas em expressão gênica já tem sido desenvolvido na tentativa de auxiliar o manejo clínico de pacientes com CPNPC. Assinaturas para predição de prognóstico e resposta a tratamento, predição de metástase linfonodal e diferenciação de tipos histológicos já foram descritas (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Assinaturas de expressão gênica com relevância clínica para pacientes com CPNPC.

<b>Autoria</b>	<b>Revista de publicação</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Quantidade de genes no painel*</b>	<b>Objetivo</b>
Choi N et al. <sup>47</sup>	Journal of Thoracic Oncology	n= 112	<i>Microarray</i> e RT-PCR	31 genes	Predição de metástase linfonodal
Girard L et al. <sup>48</sup>	Clinical Cancer Research	n= 1337	<i>Microarray</i>	62 genes	Distinguir histologia (Adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas)
Shahid M et al. <sup>49</sup>	Oncotarget	n= 181	<i>Microarray</i>	8 genes	Estratificação de risco de mortalidade
Huang P et al. <sup>50</sup>	Oncotarget	n= 96	TaqMan Low-Density Array (TLDA)	6 genes	Predição de prognóstico
Chen H et al. <sup>51</sup>	New England Journal of Medicine	n= 125 – Fase de descoberta n= 60 – Fase de Validação	<u>Fase de descoberta:</u> <i>Microarray</i> e RT-PCR <u>Fase de Validação:</u> RT-PCR	5 genes	Estratificação de desfecho clínico
Tang H et al. <sup>21</sup>	Clinical Cancer Research	n= 442	<i>Microarray</i>	12 genes	Predição de benefício de QTA
Xie Y et al. <sup>52</sup>	Journal of Thoracic Oncology	n= 207	NanoString	12 genes	Validação assinatura para predição de benefício de QTA

\*quantidade incluídos para o painel final com potencial aplicação.

Um painel avaliando 72 genes relacionados à resposta imune permitiu a estratificação dos pacientes em risco alto e baixo para recorrência da doença em pacientes com CPNPC em estadios iniciais<sup>53</sup>. Mesmo quando diagnosticados em estadios iniciais, o desfecho da doença nestes pacientes é desfavorável e a taxa de sobrevida global baixa. Chen e colaboradores desenvolveram uma assinatura molecular de 5 genes por meio de *microarray* e RT-PCR, a fim de prever o prognóstico em pacientes com CPNPC submetidos à ressecção cirúrgica<sup>51</sup>.

Considerando que a metástase linfonodal é um fator prognóstico importante e, a identificação de comprometimento linfonodal é realizada com mais acurácia somente em pacientes cirurgicamente ressecados, Choi e colaboradores selecionaram uma assinatura gênica capaz de prever a metástase linfonodal<sup>54</sup>. Uma assinatura molecular baseada no perfil de expressão gênica, descrita por Girard e colaboradores, foi capaz de estratificar os dois principais subtipos histológicos (adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas)<sup>48</sup>.

Mais recentemente, com o avanço da imunoterapia, um painel de expressão gênica foi desenvolvido com sucesso na tentativa de se identificar pacientes com CPNPC, câncer de cabeça e pescoço e melanoma respondedores e não respondedores aos inibidores de *checkpoints* imunológicos empregando amostras coletadas rotineiramente (FFPE) utilizando a tecnologia *nCounter*<sup>®</sup> <sup>55</sup>.

O estudo de Xie e colaboradores teve como principal objetivo validar um biomarcador para diagnóstico de câncer de pulmão de maneira não invasiva utilizando amostras de biópsia líquida. RNAs longos não codificadores circulantes foram avaliados no soro dos pacientes, comparando amostras de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de pulmão em uma coorte de 250 amostras. Ao final, foram identificados dois RNAs longos não codificadores, como potenciais biomarcadores diagnósticos para câncer de pulmão<sup>56</sup>.

Estudos envolvendo biomarcadores baseados em expressão gênica com valor preditivo vem, cada vez mais, ganhando destaque na literatura. Shee e colaboradores identificaram um biomarcador preditivo de melhor resposta ao tratamento com vários tipos de quimioterápicos como: cisplatina, carboplatina, docetaxel e outros. Neste estudo, o gene *SLFN11* foi associado à quimiossensibilidade em alguns subtipos de tumores sólidos (mama, pulmão, ovário)<sup>57</sup>.

Tal como previamente referido, a maioria dos estudos envolvendo assinaturas moleculares, utilizam amostras de tecido congelado para obtenção de ácido nucleico de

excelente qualidade. Porém, amostras de tecido congelado não são coletadas rotineiramente, uma vez que o diagnóstico histopatológico é realizado em amostras fixadas (FFPE). A obtenção de material biológico criopreservado para testes moleculares adicionais nem sempre é possível e a adesão a testes envolvendo este tipo de amostra podem nunca acontecer na prática clínica. Apesar dos inúmeros estudos envolvendo assinaturas baseados em expressão gênica, nenhuma das assinaturas está atualmente na prática clínica de pacientes com câncer de pulmão.

### ***1.7.2 Biomarcadores em CPNPC ressecáveis: relevância no manejo clínico e potencial valor preditivo para tratamento com QTA***

Apesar do avanço no tratamento dos pacientes com CPNPC, uma lacuna ainda aberta é a predição do benefício à QTA em pacientes cirurgicamente ressecáveis. Dentre os pacientes submetidos ao tratamento pós cirúrgico com QTA, somente uma pequena parcela responde a este tratamento<sup>58</sup>. Por se tratar de um tratamento altamente agressivo, identificar os pacientes beneficiados pela QTA pode auxiliar no manejo clínico. Estudos indicaram que a proteína ERCC1 estaria ligada a uma melhor resposta a QTA baseada em platina, podendo aumentar consideravelmente a sobrevida de pacientes CPNPC ressecados cirurgicamente. No entanto, há controvérsias em relação ao papel preditivo desta proteína em CPNPC, uma vez que estudos indicaram que a proteína ERCC1-negativo se beneficiaria de QTA. Por outro lado, o ERCC1- positivo estaria relacionado há uma maior sobrevida<sup>59,60</sup>.

Tang e colaboradores identificaram um conjunto de genes capaz de identificar pacientes que se beneficiariam de QTA. Este estudo utilizou 442 amostras de tecido congelado provenientes de ressecção cirúrgica de pacientes com CPNPC. Foram realizadas análises de expressão gênica em larga escala (*microarray*) e, a partir de 797 genes avaliados, 18 genes foram associados ao prognóstico de pacientes com CPNPC. Estes genes estão associados, principalmente, com aberrações genéticas ou letalidade sintética. Destes 18 genes, foram selecionados aqueles com maior conexões entre si, a partir de análise de *hub*, resultando em 12 genes potencialmente associados à resposta à quimioterapia, devido à associação com a letalidade sintética (*ATP8A1, AURKA, C1orf116, COL4A3, DOCK9, HOPX, HSD17B6, IFT57, MBIP, NKX2-1, RRM2, TTC37*; **Tabela 2**). Os resultados deste estudo foram bastante

promissores do ponto de vista preditivo, e identificou um grupo de pacientes com melhor sobrevida quando tratados com QTA e um grupo de pacientes que não apresentaram melhora na sobrevida quanto tratados com QTA<sup>21</sup>. Posteriormente, este conjunto de genes foi compilado em um painel, que foi validado utilizando outra abordagem metodológica mais robusta e inovadora (**Tabela 1 e Tabela 2**)<sup>52</sup>. Nesta nova abordagem metodológica, foram empregadas amostras de FFPE de 207 casos de CPNPC cirurgicamente ressecáveis para predição de benefício à QTA. O painel foi capaz de estratificar os pacientes em dois grupos principais, sendo um grupo de alto risco (pacientes com provável benefício de QTA) e um grupo de baixo risco. (pacientes com provável não benefício de QTA). O grupo de pacientes classificados como alto risco apresentou melhor sobrevida quando tratados com QTA em relação aos pacientes classificados como alto risco não tratados com QTA. Por outro lado, o grupo dos pacientes classificados como baixo risco apresentaram pior sobrevida quando tratados com QTA em relação aos pacientes classificados como baixo risco e que não seguiram com nenhum tratamento após a ressecção cirúrgica, indicando grande potencial para aplicação na rotina clínica<sup>52</sup>.

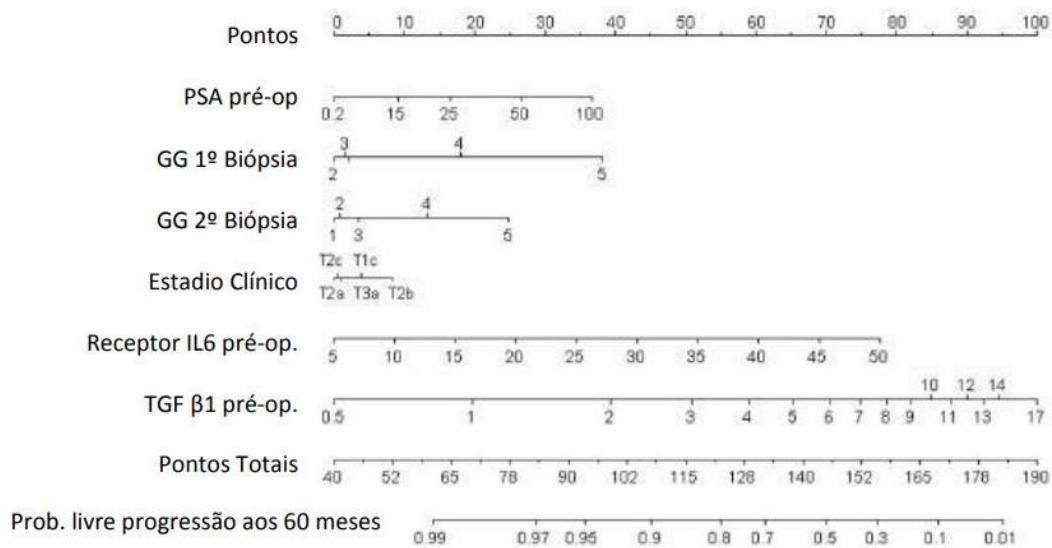
**Tabela 2.** Principais funções dos 12 genes associados ao painel para predição do benefício com quimioterapia adjuvante.

Genes	Nome	Função
<i>ATP8A1</i>	Phospholipid-transporting ATPase IA	Atua como enzima transportadora aminofosfolipídica na membrana plasmática das células neuronais.
<i>AURKA</i>	Aurora kinase A	Contribui para a regulação da progressão do ciclo celular. Associa-se aos centrossomos e aos microtúbulos do fuso durante a mitose e tem um papel essencial em vários eventos mitóticos.
<i>C1orf116</i>	Chromosome 1 Open Reading Frame 116)	Receptor específico de andrógeno. A expressão é regulada positivamente pelo andrógeno, mas não pelos glicocorticóides. Pertence à família (SARG).
<i>COL4A3</i>	Collagen type IV alpha-3 chain	O colágeno tipo IV é o principal componente estrutural das membranas basais glomerulares.
<i>DOCK9</i>	Dedicator of Cytokinesis 9	Funciona como ativador de pequenas proteínas G. A superexpressão induz a formação de filópodes. Pertence à família (DOCK).
<i>HOPX</i>	Homeodomain-only protein	Modula o crescimento e o desenvolvimento cardíaco, sua superexpressão causa hipertrofia cardíaca, podendo atuar supressor tumoral.
<i>HSD17B6</i>	17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 6	Oxidoreductase-dependente de NAD com ampla especificidade de substrato que mostra atividade oxidativa e redutora.
<i>IFT57</i>	Intraflagellar transport protein 57 homolog	Possui função pró-apoptótica por meio de sua interação com HIP1, levando a recrutar caspase-8 (CASP8) e desencadear apoptose.
<i>MBIP</i>	MAP3K12 binding inhibitory protein 1	Inibe a atividade do <i>MAP3K12</i> para induzir a ativação da via JNK / SAPK.
<i>NKX2-1</i>	NK2 homeobox 1	Fator de transcrição que se liga e ativa o promotor de genes específicos envolvidos na função tireoidiana e tem envolvimento na homeostase do líquido surfactante.
<i>RRM2</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	Fornece os precursores necessários para a síntese de DNA. Catalisa a biossíntese de desoxirribonucleotídeos dos ribonucleotídeos correspondentes.
<i>TTC37</i>	Tetratricopeptide repeat protein 37	Componente do complexo (SKI) possivelmente envolvido no enfraquecimento do RNA mediado por exossomos e se associa a genes de transcrição de maneira dependente do complexo PAF1 (PAF1C)

*DOCK*, Dedicator of cytokinesis; *SARG*, Specifically Androgen Regulated Gene; *PAF1*, polymerase II-associated factor 1 homolog; *SKI*, SKI proto-oncogene; *NAD*, NAD--protein ADP-ribosyltransferase; *HIP1*, huntingtin interacting protein 1; *SAPK*, Stress-activated protein kinases; *JNK*, Jun amino-terminal kinases

### 1.8 Nomograma como ferramenta complementar de predição de desfecho

O nomograma é um tipo de representação gráfica de análises multivariadas capaz de fornecer a probabilidade de sobrevivência. Do ponto de vista médico, os nomogramas são uma ferramenta capaz de integrar variáveis, sejam elas clínicas e/ou moleculares. Esta ferramenta visa prever a probabilidade de sobrevivência e/ou a probabilidade de um evento. Vários nomogramas já foram desenvolvidos e tem sido empregado na prática clínica oncológica com sucesso especialmente em câncer de próstata (**Figura 8**)<sup>61-66</sup>.



**Figura 8.** Representação de um modelo de nomograma.

A representação dos nomogramas assemelha-se a uma régua (**Figura 8**), e podem ser facilmente utilizados. Basicamente, os parâmetros de cada variável pontuam diferentemente de acordo com a influência do mesmo sobre o evento de interesse. A somatória de pontos de cada variável irá resultar na probabilidade de acontecer o evento de interesse. Para facilitar o uso na rotina clínica, em paralelo ao avanço tecnológico, os nomogramas têm sido adaptados para o uso digital<sup>67,68</sup>.

Em câncer de pulmão, alguns modelos de nomograma foram propostos, inclusive empregando tanto variáveis clínicas, como idade, linfonodos metastáticos, performance status, quanto moleculares, como resultados de painéis de expressão<sup>68-71</sup>. Alguns destes modelos foram, inclusive, já desenvolvidos no formato digital em interface web gratuita<sup>68</sup>. Esta interface *web* pública e gratuita disponibilizou cinco modelos de nomograma. Além disso,

foi disponibilizado um modelo combinado uma espécie de calculadora considerando os 5 modelos de nomograma, permitindo uma predição de probabilidade de sobrevivência ainda mais precisa<sup>68</sup>.

Apesar de todos os avanços dos nomogramas e calculadoras baseadas em nomogramas, a adesão a este tipo de ferramenta na prática clínica da oncologia pulmonar é praticamente nula. Por esta razão, desenvolver este tipo de ferramenta é de suma importância.



*Justificativa*

---

## **2. Justificativa**

O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais letal em todo o mundo. Para os pacientes diagnosticados em estágios mais iniciais da doença (I-IIIa), os tratamentos disponíveis cirurgia e adjuvância tem intenção curativa e resultam em melhores taxas de sobrevida. No entanto, somente uma parcela pequena destes pacientes (menos de 10%) beneficiam-se dos tratamentos sistêmicos curativos no contexto de adjuvância, e identificar aqueles pacientes que se beneficiam do tratamento com quimioterapia adjuvante ainda é um desafio na prática clínica.

Painéis moleculares baseados em assinaturas gênicas têm sido empregados para determinação de tratamento e predição de prognóstico de diversos tipos de tumores, inclusive no câncer de pulmão. Portanto, uma assinatura de expressão gênica capaz de auxiliar na predição de resposta à quimioterapia adjuvante pode contribuir de forma bastante decisiva no manejo clínico dos pacientes com CPNPC cirurgicamente ressecáveis.

Assim sendo, o presente estudo visa validar um painel de expressão gênica, utilizando amostras parafinadas, para predição do prognóstico e do benefício da quimioterapia adjuvante em pacientes cirurgicamente ressecáveis e que, ainda não está disponível na rotina clinicopatológicos do câncer de pulmão. Além disso, visamos também implementar uma ferramenta digital baseada em nomograma, incorporando os resultados moleculares deste painel de expressão e variáveis clínicas com o intuito de auxiliar a tomada de decisão na prática clínica em prol dos pacientes com CPNPC.

# *Objetivos*

---

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Validar um painel de expressão de 12 genes para auxiliar no manejo clínico para predição de benefício da quimioterapia adjuvante em pacientes com CPNPC cirurgicamente ressecados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Associar os achados moleculares com o desfecho clínico de pacientes com CPNPC cirurgicamente ressecados;
- Implementar o pipeline para análise do painel molecular em interface gráfica para aplicação na rotina diagnóstica;
- Desenvolver uma calculadora baseada em nomograma integrando o painel molecular como variável.

# *Metodologia*

---

#### **4. Metodologia**

O presente estudo foi realizado no Centro de pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos (Barretos, SP) em colaboração com o grupo da Profa. Yang Xie da *UT Southwestern* e do Prof. Ignacio Witsuba do *MD Anderson*. Este é um estudo observacional retrospectivo que utilizou amostragem por conveniência.

##### **5.1 Seleção dos pacientes**

A inclusão dos casos foi realizada com critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos pacientes das seguintes instituições: Hospital de Câncer de Barretos (centro coordenador) e Hospital São João (Porto, Portugal). O levantamento dos pacientes foi realizado junto ao Registro Hospitalar das instituições envolvidas.

Foram considerados elegíveis para este estudo os pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) diagnosticados entre 01/01/2011 e 31/12/2017 em estádios de I a IIIa - em acordo com a classificação AJCC 7<sup>a</sup> - com informação sobre o tratamento e a evolução clínica, e que tinham disponibilidade de tecido tumoral parafinado.

##### Critérios de inclusão:

- Pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de não pequenas células;
- Pacientes submetidos à ressecção cirúrgica;
- Pacientes com disponibilidade de bloco cirúrgico em parafina.

##### Critérios de exclusão:

- Pacientes diagnosticados em estadiamento IV;
- Pacientes submetidos a tratamento prévio (por exemplo: quimioterapia neoadjuvante);
- Ausência de informações sobre o desfecho da doença;
- Paciente que apresentou segundo primário concomitante ou tumores sincrônicos.

## 4.2 Extração RNA – amostras parafinadas (FFPE)

O RNA foi extraído das amostras em tecido parafinado com kit comercial (*RNeasy FFPE Mini Kit, Qiagen*) seguindo protocolo do fabricante. Primeiramente, a partir de uma lâmina corada com hematoxilina e eosina (H & E), um patologista experiente realizou a demarcação da área tumoral e, após a desparafinização das amostras, a área demarcada foi utilizada para a extração de RNA. Após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas por *Qubit (Thermo Fisher Scientific)* e diluídas a uma concentração de 100ng RNA total.

## 4.3 Análise Molecular

### 4.3.1 Expressão gênica

A tecnologia *nCounter<sup>®</sup> (NanoString Technologies)* permite a quantificação de alvos/genes específicos. Os 12 genes de interesse foram incluídos em ensaio customizado, utilizando o painel *nCounter<sup>®</sup> Elements XT (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA)* (**Tabela 3**)<sup>21,52</sup>.

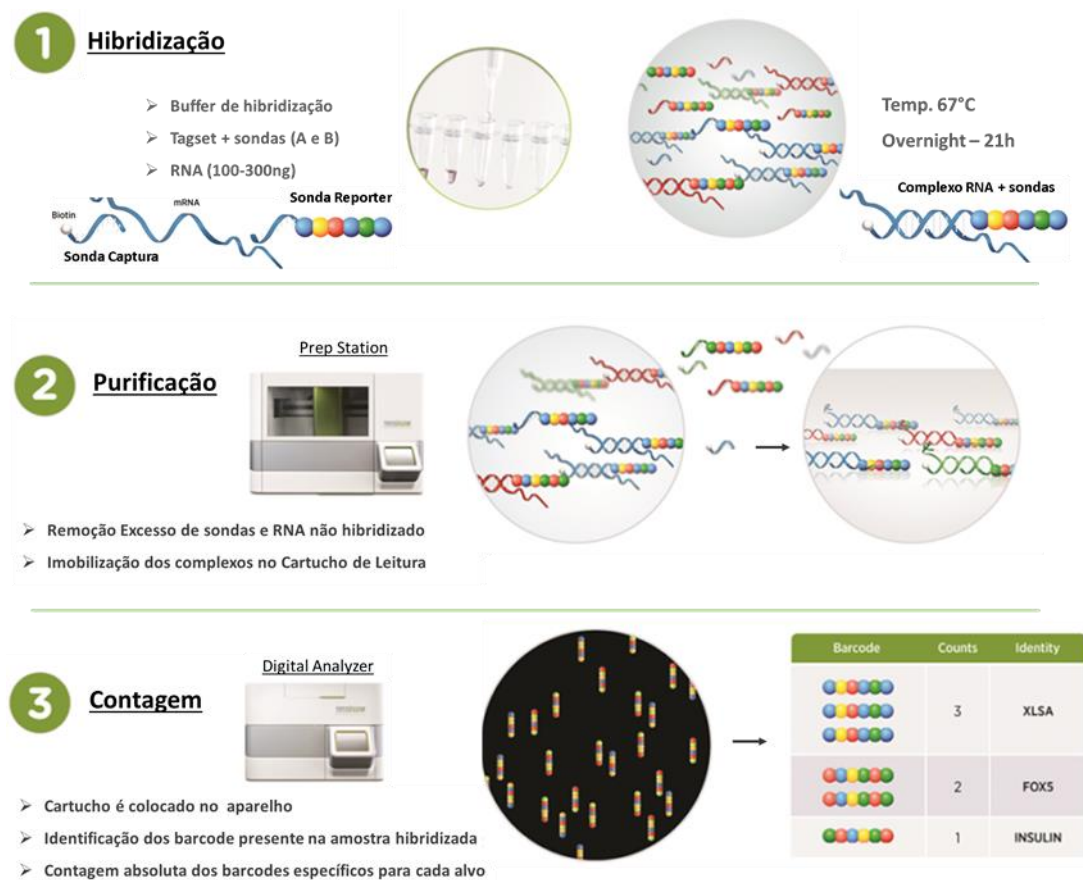
**Tabela 3.** Genes que compõem o painel utilizado no presente estudo.

Genes	
<i>ATP8A1</i>	<i>COL4A3</i>
<i>HSD17B6</i>	<i>NKX2-1</i>
<i>AURKA</i>	<i>DOCK9</i>
<i>IFT57</i>	<i>RRM2</i>
<i>C1orf116</i>	<i>HOPX</i>
<i>MBIP</i>	<i>TTC37</i>

O princípio da técnica se baseia em uma dupla hibridização de sondas específicas (A e B) para cada gene (as sondas específicas foram sintetizadas pela IDT). Cada sonda tem uma função específica em todos o processo, uma contém em sua extremidade *barcode* (sonda *reporter*) composto por uma sequência distinta de 4 cores (*color-code*), a outra sonda contém em sua extremidade uma molécula de biotina (sonda *captura*) (**Figura 9**).

A tecnologia apresenta três principais etapas: Hibridização, purificação/ imobilização e leitura. Os experimentos foram conduzidos conforme protocolo do fabricante, na etapa de

hibridização, a partir de 100ng de RNA, as amostras são hibridizadas com sondas específicas para cada gene por cerca de 24 horas a 67°C e, a seguir, na etapa de purificação/ imobilização, as sondas não hibridizadas são retiradas a partir de sucessivas lavagens no equipamento *PrepStation (NanoString Technologies)*, seguido por uma etapa de fixação no cartucho de maneira totalmente automatizada. Para a última etapa é realizada a leitura dos *barcodes* no *Digital Analyzer (NanoString Technologies)* (**Figura 9**). As leituras foram convertidas em dados numéricos e exportadas em formato RCC para o *nSolver Analysis<sup>®</sup> Software v4.0 (NanoString Technologies)*<sup>72,73</sup>.



**Figura 9.** Princípios da plataforma *NanoString* para identificação e quantificação de alvos moleculares. (adaptado de *Nanostring Technologies* - <https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology>, Acesso em: 01/12/2020)

O experimento apresenta um controle de qualidade (QC) interno, que garantiu com segurança a utilização dos dados gerados. O controle de qualidade inclui os seguintes itens:



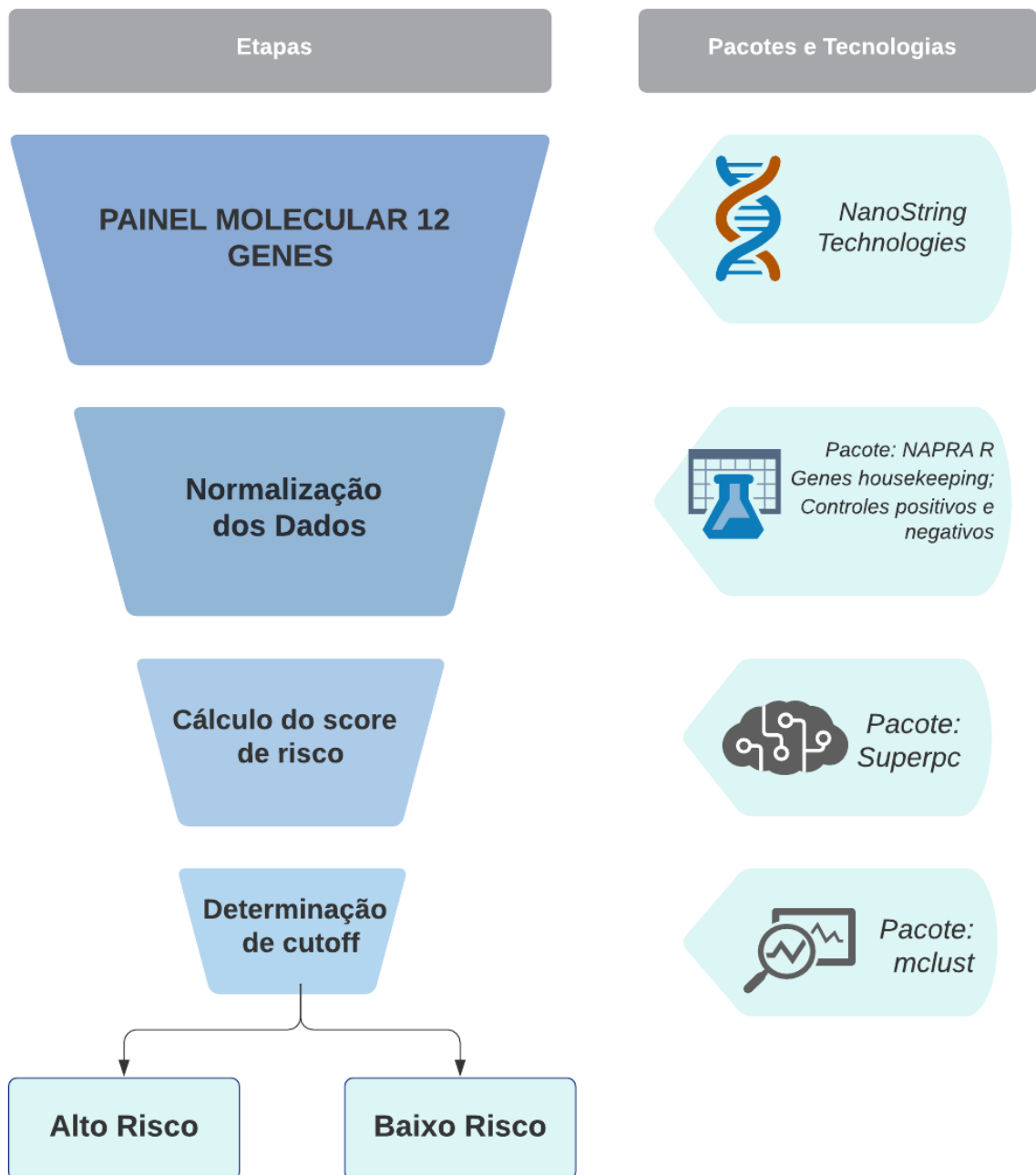
- *Imaging QC* : Verifica se todos os campos foram contados adequadamente;
- *Binding density QC* : Detecta a imobilização dos complexos no cartucho de leitura;
- *Positive control linearity QC*: Os controles positivos presente no ensaio são usados para medir a eficácia no processo de hibridização;
- *Limit of detection QC*: Avalia o limite de detecção do ensaio comparando as sondas do controle positivo (Pos\_E) com as sondas do controle negativo.

Em caso de detecção de alguma *flag* em quaisquer amostras, as amostras foram excluídas a fim de evitar quaisquer resultados enviesados do ponto de vista técnico.

#### **4.3.2 Análises bioinformáticas**

Para o controle de qualidade e avaliação de efeito batch foi utilizado o *nSolver™ Analysis Software (version 4.0)* e o pacote *quantro* do ambiente estatístico R<sup>74</sup>. A normalização dos dados foi conduzida no pacote NAPPA, de acordo como artigo publicado por Xie e colaboradores<sup>52</sup>. Para a normalização das contagens absolutas foi utilizado o controle interno negativo para correção de *background* com correção truncada de Poisson, assim como o controle interno positivo e a média dos genes *housekeepings* para correção.

As análises para o cálculo do escore de risco foram realizadas em parceria com *MD Anderson* e a *UT Southwestern*, idealizadores do painel gênico. Para estabelecimento do escore de risco, um *cutoff* é definido (pacote R *mclust*) para a estratificação dos pacientes com base na expressão gênica de cada amostra, em alto risco e baixo risco, sendo classificados como alto risco os pacientes com provável benefício de QTA e baixo risco os pacientes sem benefício de QTA (**Figura 10**). O *script* de análise vem sendo reproduzido e adequado a uma casuística brasileira, o qual pode ser conferido no Anexo I e implementado na plataforma *Galaxy*<sup>75</sup>. Todas as análises foram realizadas em ambiente R (R *software* versão 3.6.3).



**Figura 10.** Fluxo de trabalho desde a obtenção dos dados de expressão gênica até a definição dos pacientes em alto ou baixo risco pelo *cutoff*.

#### 4.4 Implementação em interface “user-friendly”

A implementação do pipeline de análise em interface gráfica *user-friendly* tem como principal finalidade a aplicação na rotina clínica, podendo ser utilizada por profissionais não bioinformatas. O *script* para definição do escore de risco foi desenvolvido em ambiente R de acordo com Tang et al<sup>22</sup> e passou pelo processo de *wrapping*. A seguir, foi realizado o *upload*

do script no servidor *Galaxy* privado, localizado no Hospital de Amor de Barretos. Após o upload, a ferramenta foi verificada para verificar a funcionalidade e, eventuais ajustes no script foram realizados. Esta etapa foi desenvolvida pela bioinformata, integrante da equipe de pesquisa.

*Galaxy* é uma plataforma *web-based* de análises muito utilizada para dados genômicos, proteômicos, metabolômicos e imagem. É uma plataforma gratuita e *open-source*, com uma comunidade ativa que possui atualmente mais de 90 servidores públicos e mais de 5500 ferramentas de análises disponíveis via *Galaxy ToolShed*. A implementação de um servidor local do *Galaxy* que atende as necessidades do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular vem sendo desenvolvido desde 2018 e é, inclusive, utilizado na rotina diagnóstica do Centro de Diagnostico Molecular do Hospital de Amor.

A plataforma é bastante flexível para o usuário final devido a interface gráfica e também para programadores com interesse em desenvolver uma interface gráfica para suas ferramentas de análise. A implementação de novas ferramentas, construídas e disponíveis através de *scripts* via linha de comando ou conhecimento em alguma linguagem de programação (C++, R, Pearl...), pode ser feita através de um processo conhecido como *wrapping* ou empacotamento. A construção de *wrappers* pode ser assistida por um conjunto de ferramentas (baseadas em linhas de comando *linux* e ambiente *pyhon*) chamado *Planemo* (<https://github.com/galaxyproject/planemo>), planejado especialmente para auxiliar a publicação de novas ferramentas em plataformas *Galaxy* públicas ou privadas.

#### **4.5 Análises estatísticas e construção da calculadora baseada em nomograma**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* IBM SPSS v.21.0 adotando um nível de significância de 5%. Os testes Exato de Fisher e qui-quadrado para as análises das variáveis categóricas, e para as análises das variáveis contínuas foram utilizadas pelos testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A análise de sobrevida univariada foi realizada pelo método de *Kaplan-Meier*, teste de *log-rank* e regressão de Cox univariada e a análise de sobrevida multivariada foi realizada pela regressão de Cox. Para todas as análises envolvendo sobrevida livre de evento foram considerados como eventos de interesse recidiva, progressão ou óbito,

e para as análises envolvendo sobrevida global foi considerado o óbito como evento de interesse.

A partir da análise univariada, as variáveis com p valor inferior 0,2 foram elegíveis para a análise multivariada. Para o modelo final da análise multivariada, foram consideradas significativas as variáveis com p valor ajustado inferior a 0,05.

A construção do modelo de nomograma foi realizada a partir dos resultados da análise multivariada (Regressão de Cox) em ambiente R (*software* R v.3.6.0). A partir da razão de risco mediana foi atribuído um risco estimado para cada variável incluída no modelo pela função *nomogram* do pacote RMS (*Regression Modeling Strategies*). De acordo com o risco estimado, foi atribuída uma pontuação de risco para cada característica e respectivos parâmetros. A partir da soma de todos os pontos de cada variável – seja ela clínica ou molecular – foi possível estimar a probabilidade de sobrevivência em 1, 3 e 5 anos para sobrevida global e sobrevida livre de evento.

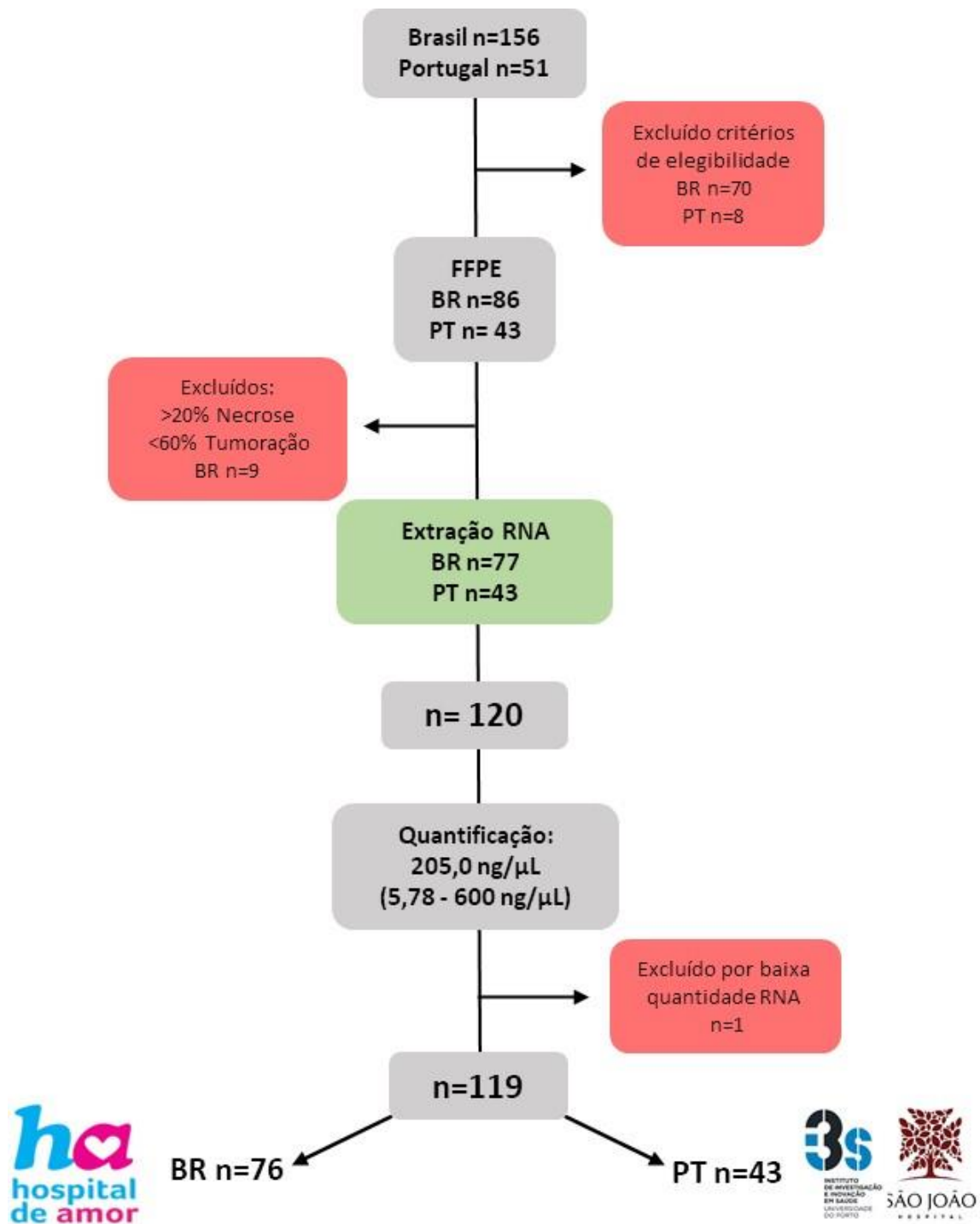
# *Resultados*

---

## 5. Resultados

### 5.1 Pacientes: Características clínicas

Os casos do Hospital do Câncer de Barretos (n=156), após os critérios de inclusão e exclusão, totalizaram 86 amostras (**Figura 11**). As amostras provenientes de Portugal do Hospital São João (n=51), após os critérios de inclusão e exclusão, totalizaram 43 amostras (**Figura 11**). Após a seleção das amostras, os cortes histológicos foram avaliados e, após a exclusão das amostras que não atendiam aos parâmetros de qualidade (porcentagem de necrose e tumoração), restaram, então, 120 amostras dos dois centros para realizarmos a extração de RNA. A média de quantificação das amostras de RNA foi de 205,0 ng/ $\mu$ L, variando de 5,78 ng/ $\mu$ L a 600ng/ $\mu$ L, sendo que, uma amostra foi excluída por quantidade insuficiente de RNA para realização do painel molecular.



**Figura 11.** Fluxo de seleção das amostras do presente projeto; BR, amostras do Brasil; PT, amostras de Portugal; n, número de amostra; FFPE, amostras embebidas em parafina e fixadas em formalina.

Sendo assim, para análise de assinatura génica foram incluídas 119 amostras de pacientes com CPNPC, 76 pacientes diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos (Brasil) e 43 pacientes diagnosticados no Hospital São João (Portugal). A mediana de idade da população foi 65 anos (31-86 anos), sendo que 65 pacientes (54,6%) eram do sexo masculino e 54 (45,4%) do sexo feminino e a maioria dos pacientes se autodeclararam brancos (Brasil: 62 pacientes, 53,4%; Portugal: 42 pacientes, 34,7%). Com relação ao status de tabagismo, 28 pacientes (23,7%) nunca haviam fumado, 39 (33,1%) eram fumantes e 44 (37,3%) eram ex-fumantes. A maioria dos pacientes apresentaram estadiamento clínico ao diagnóstico I (55,1%) e o subtipo histológico mais frequente foi o adenocarcinoma (77,1%). O tipo de ressecção cirurgia realizado para maioria dos pacientes foi lobectomia (76,3%), assim como a maioria dos pacientes não receberam tratamento adjuvante com quimioterapia (60,2%) (**Tabela 4**).



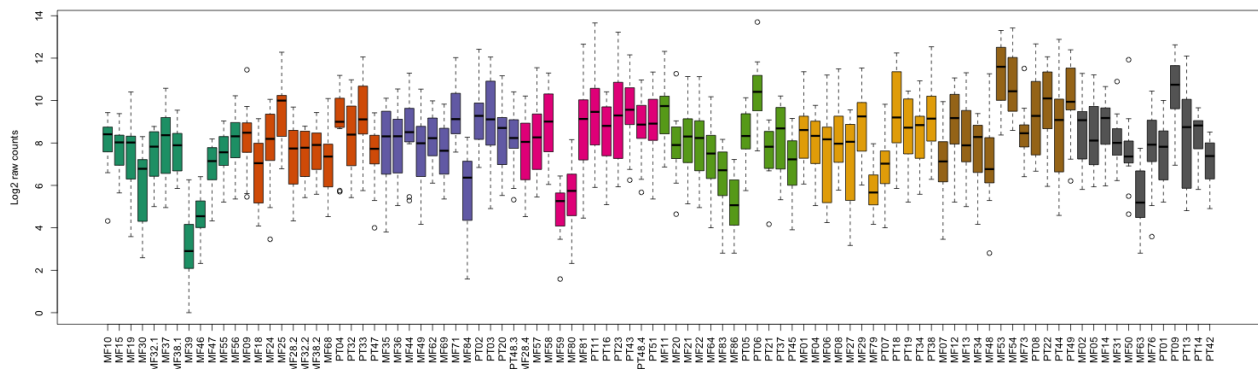
**Tabela 4.** Principais características clínicas dos pacientes do presente estudo (n=119).

Variáveis	Parâmetros	n	%
Idade, anos	64,5 (31 - 86)	119	100%
Sexo	Feminino	54	45,4%
	Masculino	65	54,6%
Raça autodeclarada	Branco/ Brasil	62	53,4%
	Negro	2	1,7%
	Pardo	8	6,9%
	Branco/Europeu	39	33,6%
	Não disponível	4	3,4%
País de origem	Brasil	76	63,9%
	Portugal	43	36,1%
Tabagismo	Nunca Fumante	28	23,9%
	Fumante	39	33,3%
	Ex-Fumante	44	37,6%
	Não disponível	6	5,1%
Histologia	Adenocarcinoma	92	77,3%
	Carcinoma de células escamosas	27	22,7%
Estadiamento ao diagnóstico	IA	33	28,4%
	IB	31	26,7%
	IIA	15	12,9%
	IIB	12	10,3%
	IIIA	24	20,7%
Ressecção cirúrgica	Segmentectomia	3	2,9%
	Lobectomia	90	88,2%
	Pneumomectomia	2	2,0%
	Ressecção atípica	5	4,9%
	Não disponível	2	2,0%
Quimioterapia adjuvante	Sim	47	39,5%
	Não	72	60,5%

*n*, Número de pacientes; *Idade ao diagnóstico* (mediana; mínimo-máximo); *Subtipo histológico CPNPC*; *Ressecção cirúrgica*, tipo de cirurgia.

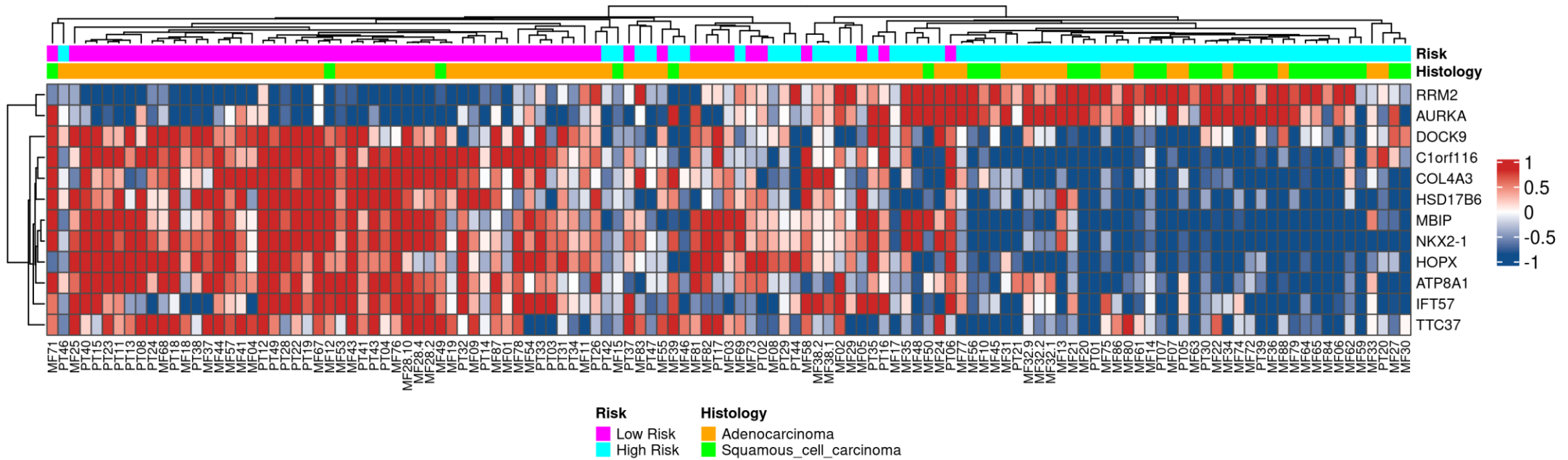
## 5.2 Painel molecular de 12 genes

O painel molecular de 12 genes foi realizado para 119 amostras. Não foi observado efeito *batch* entre os cartuchos, garantindo a confiabilidade (**Figura 12**). A análise de controle de qualidade do ensaio indicou que uma amostra não atendia os quesitos mínimos de qualidade e foi excluída das análises posteriores (*Failure rate*= 0.84%). Portanto, as análises a seguir foram realizadas com um total de 118 amostras. Não houve diferença técnica entre as amostras do Brasil e de Portugal, mesmo diante de eventuais diferenças nos processos pré-analíticos. Esta “homogeneidade” técnica das amostras permitiu a análise conjunta dos dados independentemente da origem.



**Figura 12.** Representação da distribuição das amostras por cartucho. Cada cor representa um cartucho/ experimento. Eixo Y, contagens de transcritos; eixo X, amostras.

A análise de *clustering* não supervisionado indica a estratificação dos pacientes em dois grupos. As tarjas com indicam duas variáveis, histologia e score de risco. Pode-se observar que os dois principais grupos são majoritariamente definidos pelo score de risco (baixo e alto) (**Figura 13**). Foram incluídas em diferentes cartuchos réplicas de três diferentes amostras para assegurar a reprodutibilidade dos dados. Todas as réplicas agruparam-se lado a lado e apresentaram o mesmo padrão de expressão dos 12 genes avaliados (**Figura 13**).

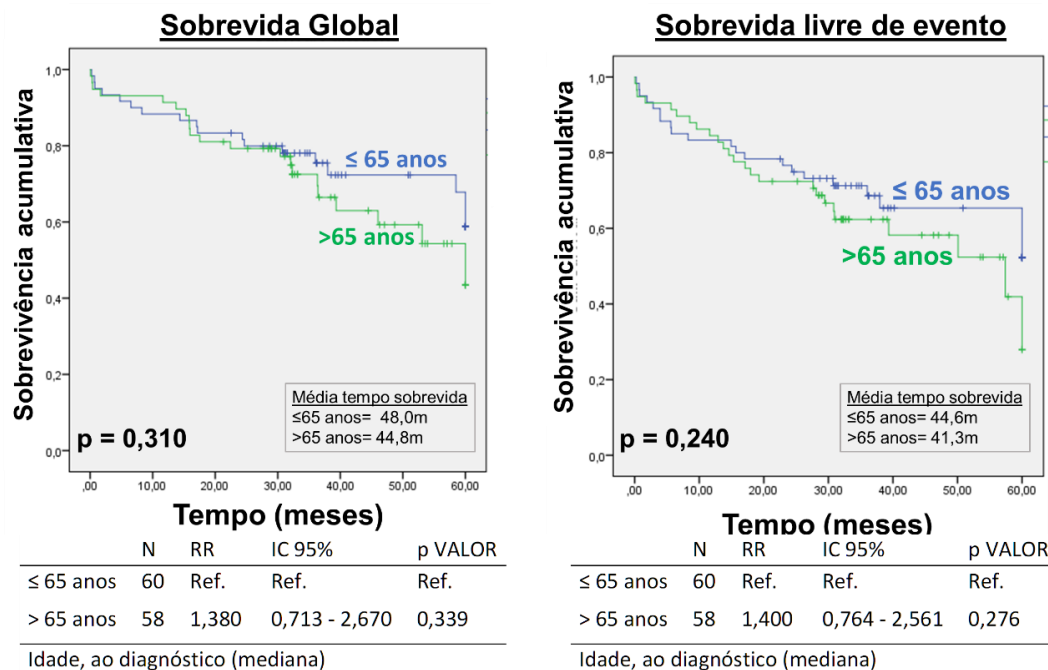


**Figura 13.** Heatmap referente ao painel de 12 genes para todas as amostras analisadas no presente estudo, as amostras MF28 e MF32 estão apresentadas em triplicatas, e a amostra MF38 está em duplicata. Eixo Y, genes; eixo X, amostras. Vermelho, aumento de expressão; azul, diminuição de expressão; branco, expressão inalterada. As tarjas no painel superior da figura indicam o score de risco categorizado em alto (*High risk*) e baixo risco (*low-risk*) e a histologia, subtipos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (*squamous cell carcinoma*).

### 5.3. Associação das características sociodemográficas e clínicas com o desfecho

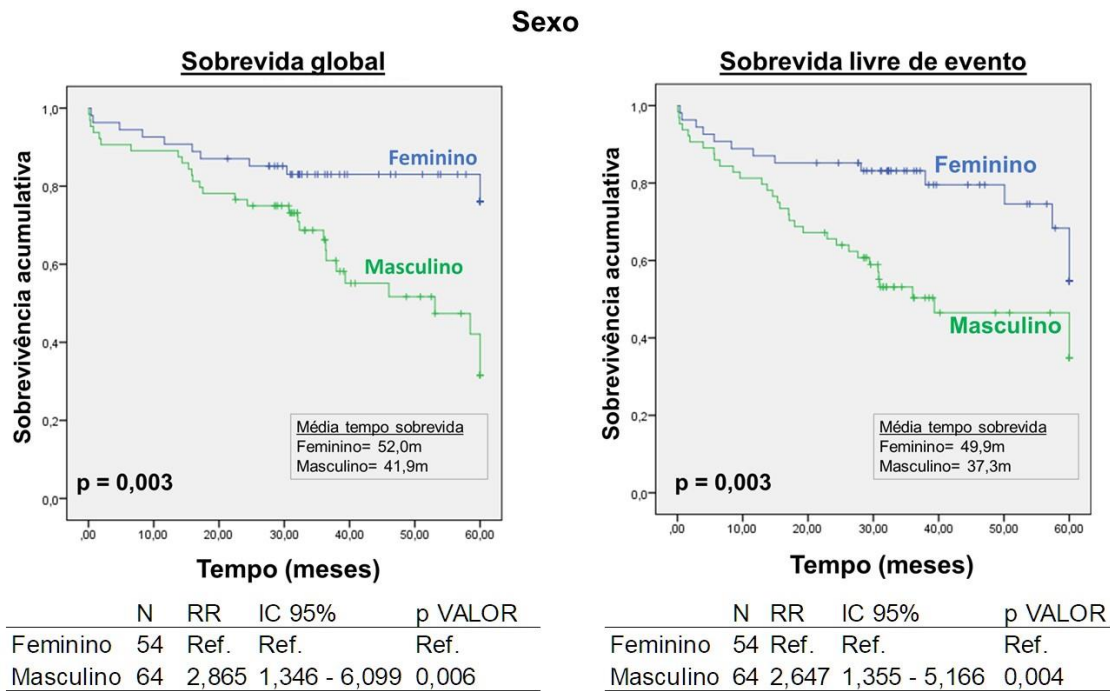
#### 5.3.1. Análise univariada

Foi realizada uma análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de evento (SLE) para as principais variáveis clínicas, e análise de risco relativo (RR). Com relação à idade ao diagnóstico ( $\leq 65$  anos e  $>65$  anos), não houve associação desta variável com SG e SLE (regressão de Cox,  $p=0,339$ ;  $p=0,276$ , respectivamente) (**Figura 14**).



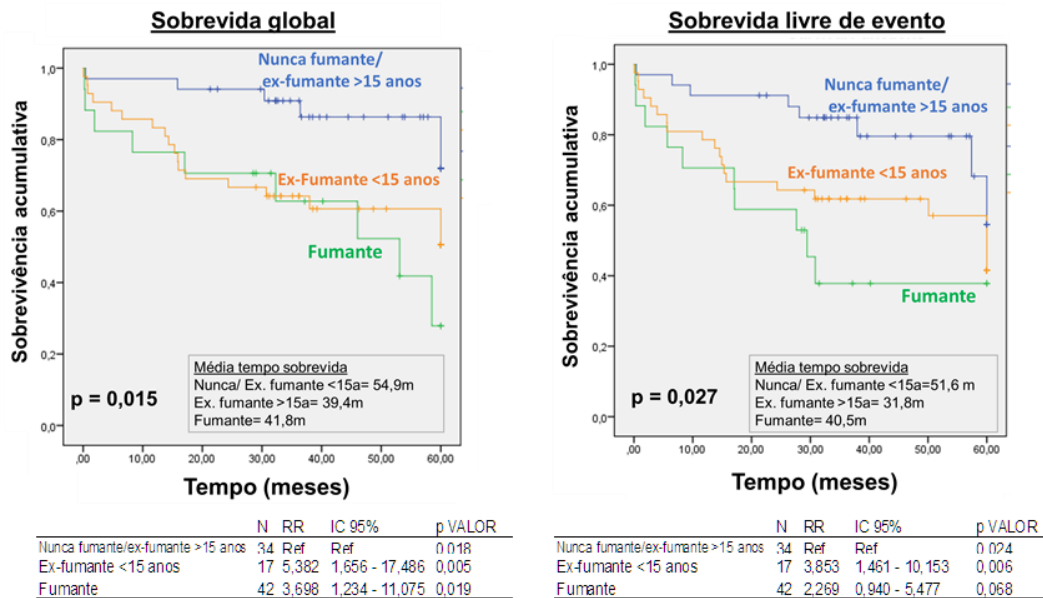
**Figura 14.** Sobrevida global em meses da idade ao diagnóstico (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses da idade ao diagnóstico (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

Com relação ao sexo (Feminino e Masculino), houve associação desta variável com SG e SLE (regressão de Cox,  $p=0,006$ ;  $p=0,004$ , respectivamente), sendo que os pacientes do sexo masculino apresentaram um maior risco para desfecho tanto na SG, como na SLE (RR=2,865; RR=2,647, respectivamente; **Figura 15**).



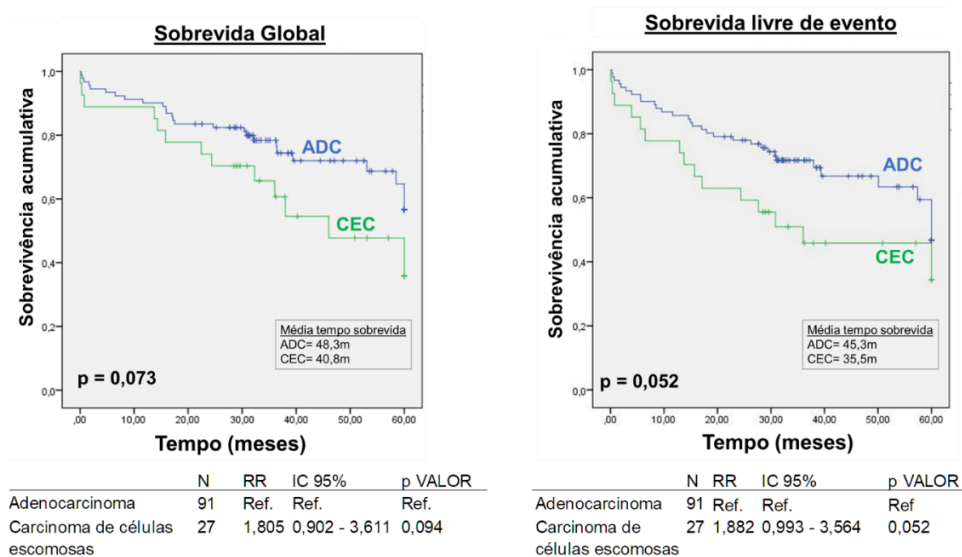
**Figura 15.** Sobrevida global em meses do sexo (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses do sexo (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

Com relação ao status de tabagismo, os pacientes fumantes e ex-fumantes há menos de 15 anos apresentaram menor tempo médio SG (Log-rank  $p=0,015$ ) e menor tempo médio SLE (Log-rank= $0,027$ ) comparado aos pacientes nunca fumantes e ex-fumantes há mais de 15 anos. Os pacientes fumantes ou ex-fumantes há menos de 15 anos apresentaram um maior risco para desfecho, tanto na SG como na SLE (**Figura 16**).



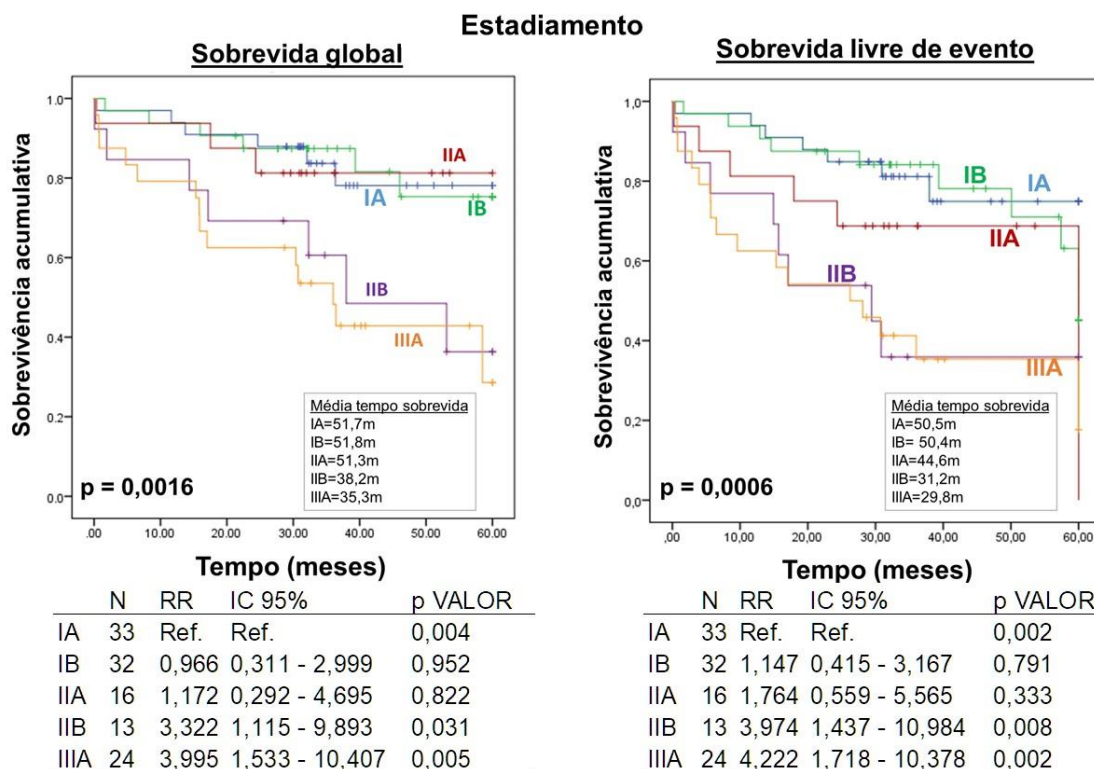
**Figura 16.** Sobrevida global em meses status de tabagismo (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses status de tabagismo (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

Com relação ao subtipo histológico (ADC e CEC), não houve associação desta variável com SG e SLE (regressão de Cox,  $p=0,094$ ;  $p=0,052$ , respectivamente, **Figura 17**).



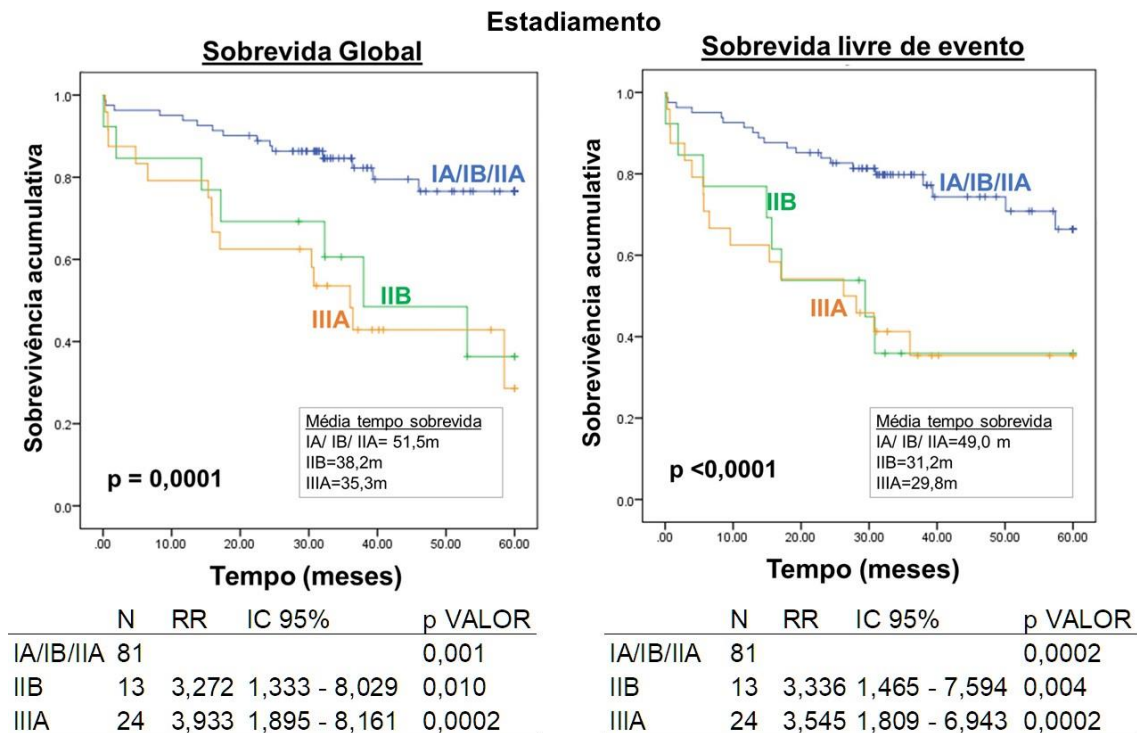
**Figura 17.** Sobrevida global em meses do subtipo histológico (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses do subtipo histológico (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

Houve associação de SG e SLE com o estadiamento ao diagnóstico, sendo menor sobrevida para os estadiamentos IIB e IIIA e maior sobrevida para os estadiamentos IA, IB e IIA (SG, log-rank  $p=0,0016$ ; SLE, log-rank  $p=0,0006$ , **Figura 18**). Foi observado um risco elevado para desfecho tanto na SG como na SLE para o estadiamento clínico IIB comparado ao estadiamento IA ( $RR=3,322$ ;  $RR=3,974$ , respectivamente, **Figura 18**). Comparado ao estadiamento IA, o estadiamento IIIA apresentou maior risco para desfecho tanto na SG como na SLE ( $RR=3,995$ ;  $RR=4,222$ , respectivamente, **Figura 18**).



**Figura 18.** Sobrevida global em meses estadiamento clínico (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses estadiamento clínico (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

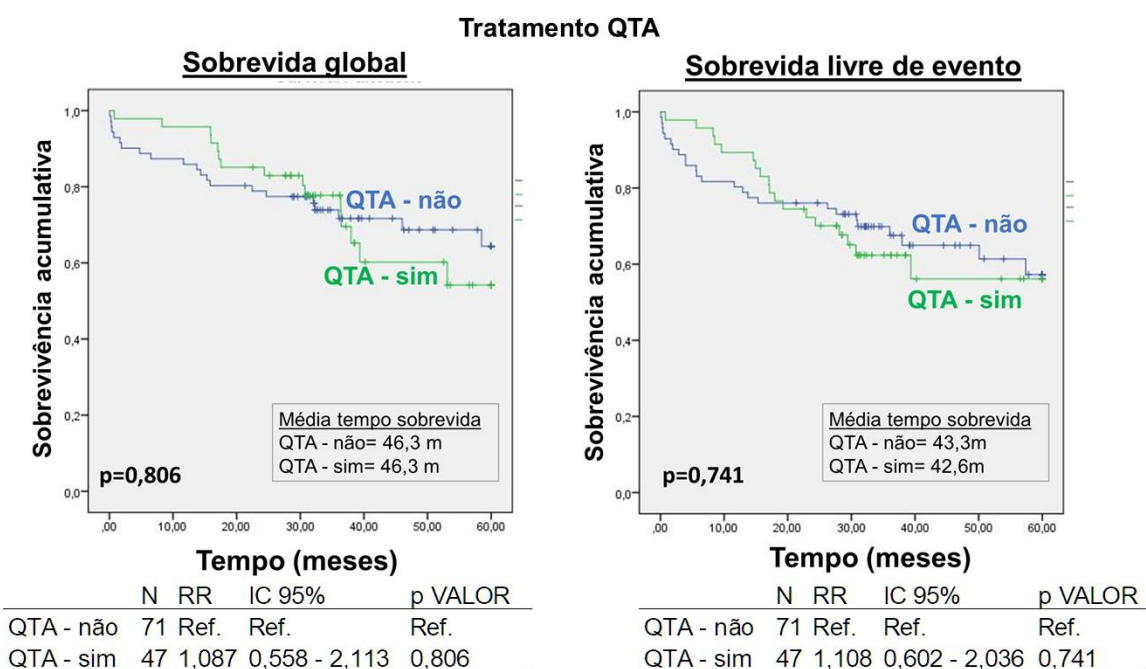
Devido a ausência de diferença entre as curvas dos estadiamentos IA, IB e IIA, estes pacientes foram agrupados (IA/IB/IIA) (**Figura 18**). Houve associação com o desfecho tanto na SG como na SLE, sendo o estadiamento IIIA com menor sobrevida (log-rank,  $p=0,0001$ ;  $p<0,001$ , respectivamente, **Figura 19**).



**Figura 19.** Sobrevida global em meses estadiamento agrupado (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses estadiamento agrupado (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.



Realizamos uma comparação com relação ao tratamento com QTA, pacientes que receberam a quimioterapia pós ressecção cirúrgica e pacientes que não receberam o tratamento, independente do painel molecular. Não houve associação em relação a ter recebido ou não o tratamento com QTA tanto na SG como na SLE (Log-rank,  $p=0,806$ ;  $p=0,741$ , respectivamente, **Figura 20**), indicando que o tratamento não está aumentando a sobrevida, ressaltando a importância de outras ferramentas capazes de identificar de fato os pacientes beneficiados do tratamento pós ressecção cirúrgica.

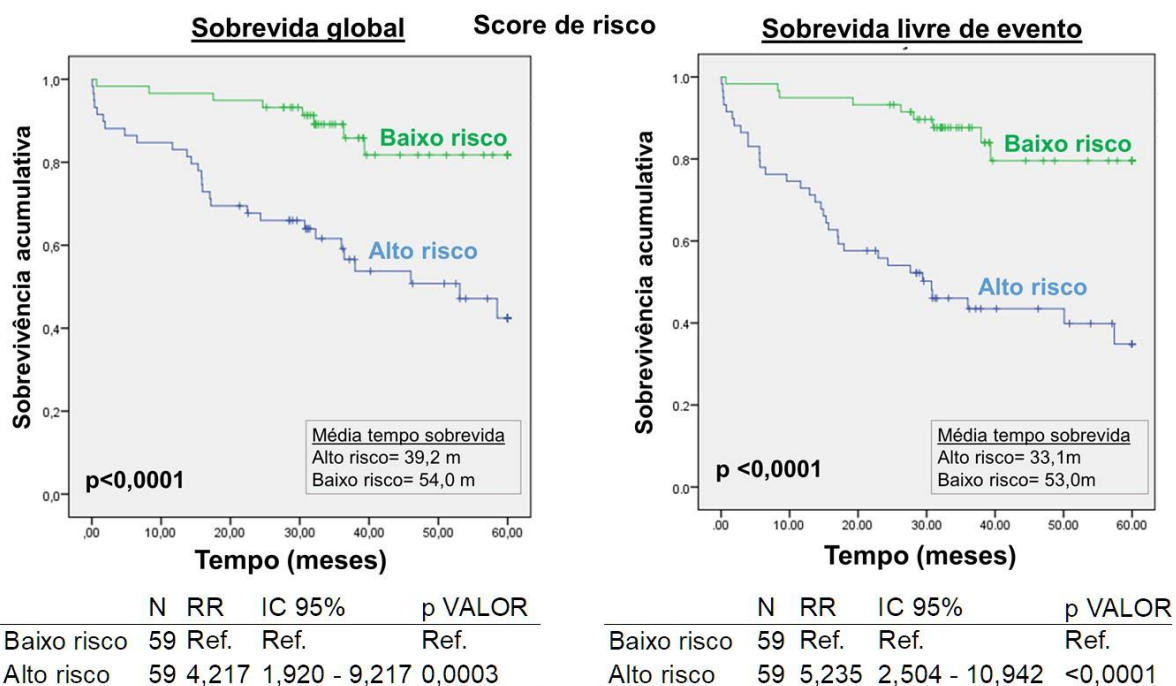


**Figura 20.** Sobrevida global em meses tratamento com quimioterapia (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses tratamento com quimioterapia (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. QTA, quimioterapia adjuvante; N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

## 5.4 Performance prognóstica e preditiva do painel molecular

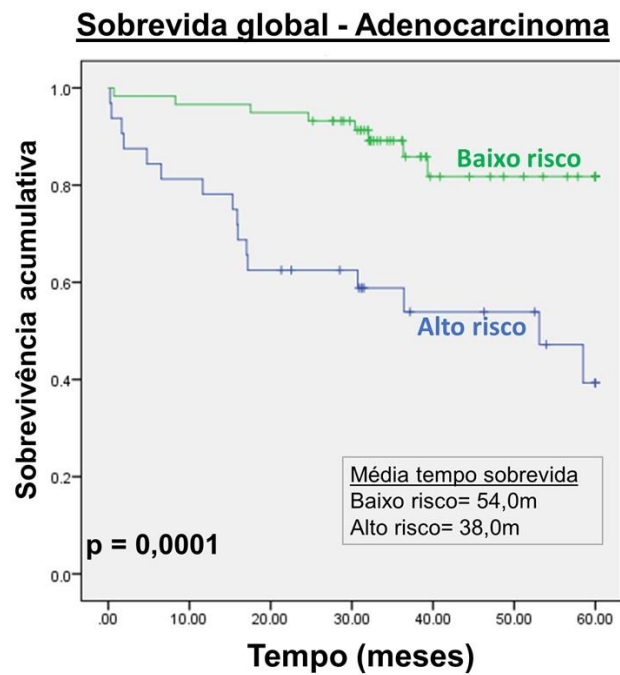
### 5.4.1 Performance prognóstica

Encontramos associação do score de risco gênico com a SG e SLE. É possível observar uma menor SG e SLE para os pacientes considerados como alto risco e maior sobrevida comparado aos pacientes considerados baixo risco (SG,  $p < 0,0001$ ; SLE,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 21**), com uma diferença de aproximadamente 20 meses no tempo médio de SG e SLE. A regressão de cox mostrou que os pacientes pertencentes ao grupo de alto risco apresentaram maior risco na SG e SLE comparado aos pacientes de baixo risco (SG,  $RR=4,217$ ; SLE,  $RR=5,235$ ; **Figura 21**).



**Figura 21.** Sobrevida global em meses score de risco (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses do score de risco (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

Foi realizado uma análise de SG separando os subtipos histológicos ADC e CEC. Houve associação da SG nos pacientes com ADC de pulmão, sendo que os pacientes pertencentes ao grupo de alto risco apresentaram pior sobrevida quando comparado aos pacientes de baixo risco ( $p=0,0001$ ; **Figura 22**). Não foi possível fazer essa comparação com os pacientes com histologia CEC, pois todos os pacientes foram do grupo de alto risco.



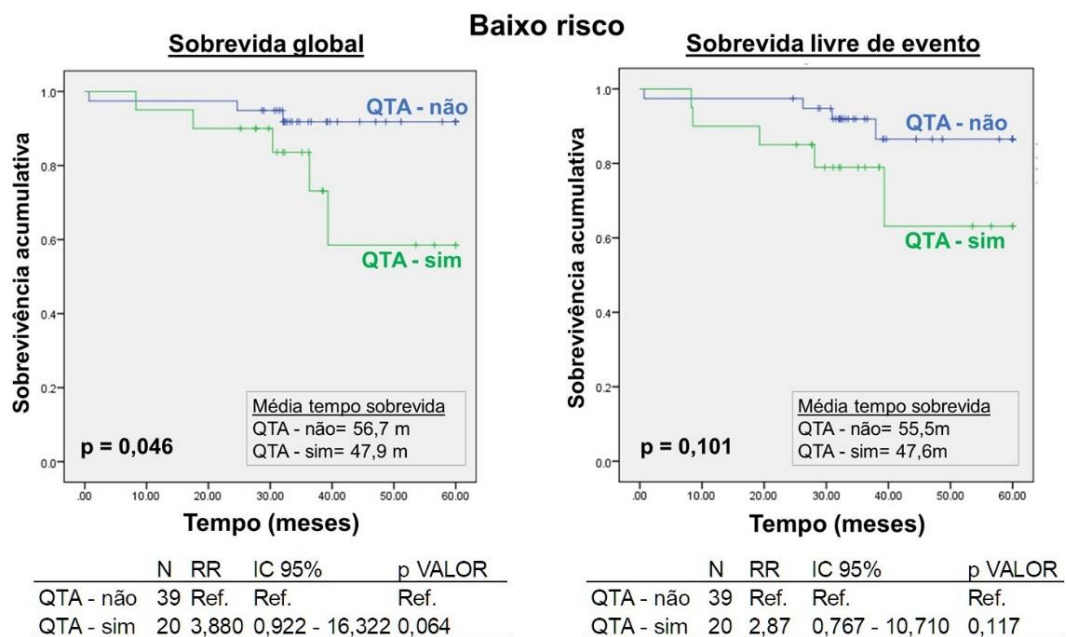
**Figura 22** Sobrevida global para os pacientes com adenocarcinoma de acordo com o score de risco.

### 5.4.2 Performance preditiva

Foi realizada a análise de SG e SLE para avaliar a performance preditiva do painel molecular, para isso os pacientes foram separados em 2 grupos de acordo com o painel molecular (grupo baixo risco e grupo alto risco).

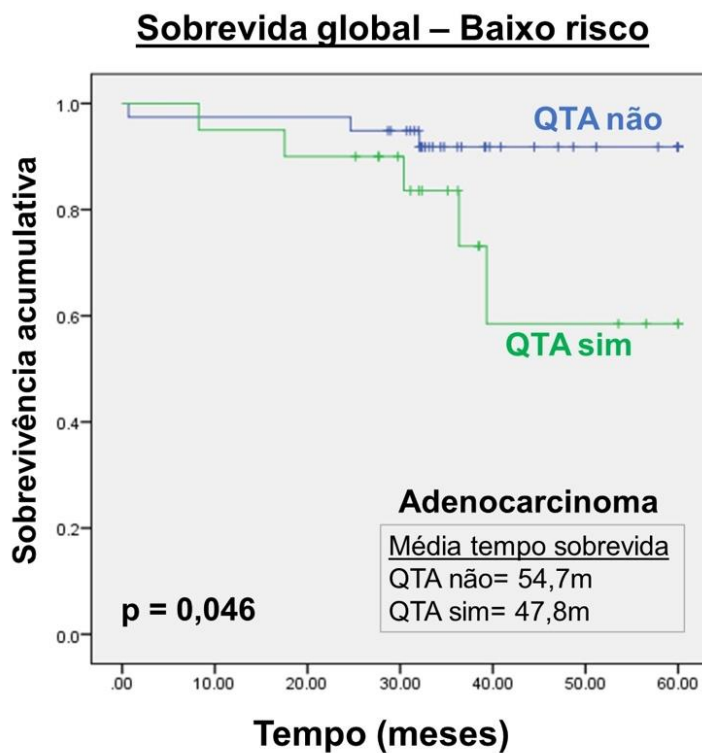
#### 5.4.2.1 Grupo de Baixo risco

Com relação aos pacientes pertencentes ao grupo de baixo risco, não houve associação da SLE dos pacientes com relação a ter recebido ou não o tratamento com QTA (log-rank  $p=0,101$ ). Houve associação com a SG, sendo os pacientes que não receberam o tratamento com QTA, tiveram maior sobrevida comparado aos pacientes que receberam o tratamento ( $p=0,046$ , **Figura 23**).



**Figura 23.** Sobrevida global em meses baixo risco de acordo com o tratamento (à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses baixo risco de acordo com o tratamento (à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. QTA, quimioterapia adjuvante; N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança.

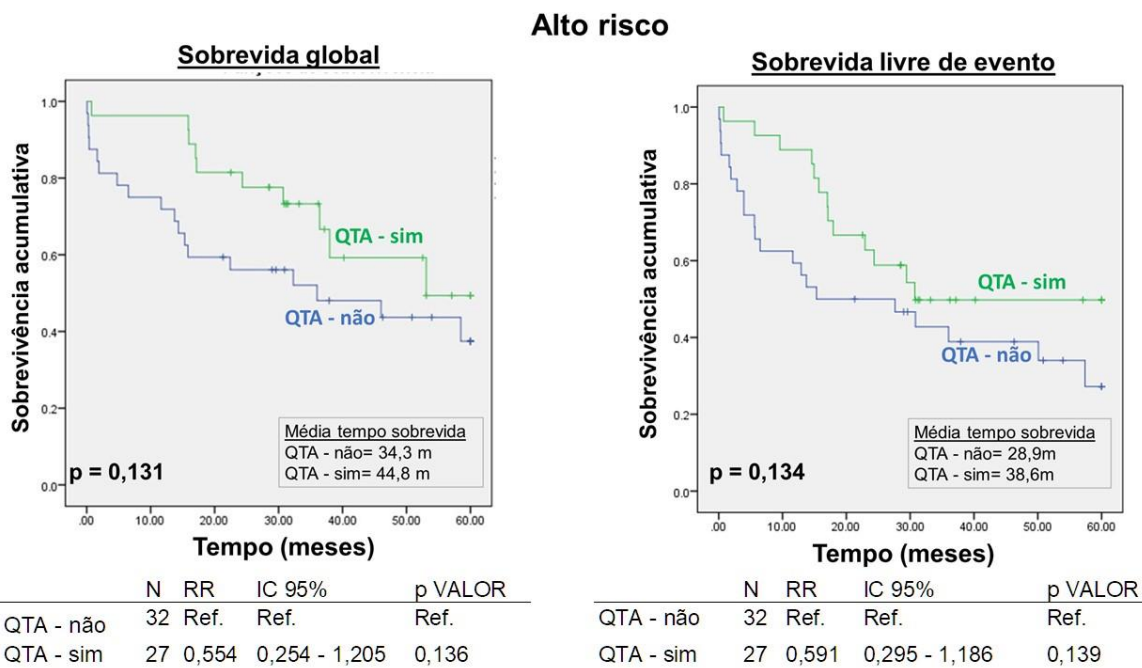
Com relação aos pacientes com ADC pertencentes ao grupo de baixo risco, houve associação da SG, sendo que os pacientes que fizeram QTA tiveram pior sobrevida, comparado aos pacientes que não fizeram o tratamento com QTA ( $p=0,046$ , **Figura 24**).



**Figura 24.** Sobrevida global pacientes com adenocarcinoma do pertencentes ao grupo de baixo risco, de acordo com o tratamento com quimioterapia.

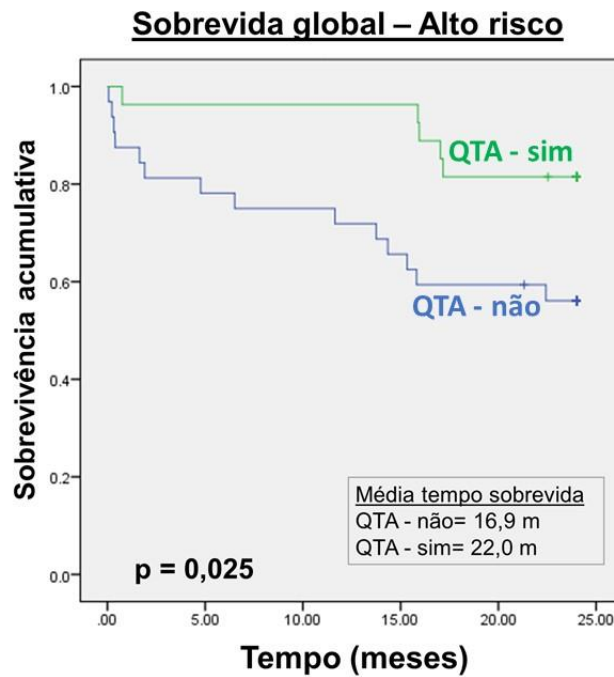
#### 5.4.2.2 Grupo de Alto risco

Com relação aos pacientes pertencentes ao grupo de alto risco, não houve associação na SG e SLE, com relação a ter recebido ou não o tratamento com QTA (SG, log-rank  $p=0,131$ ; SLE, log-rank  $p=0,134$ , **Figura 25**), os pacientes que fizeram o tratamento com QTA apresentarem um maior tempo médio de sobrevida na SG e SLE, com uma diferença de 10 meses em relação aos pacientes não tratados.



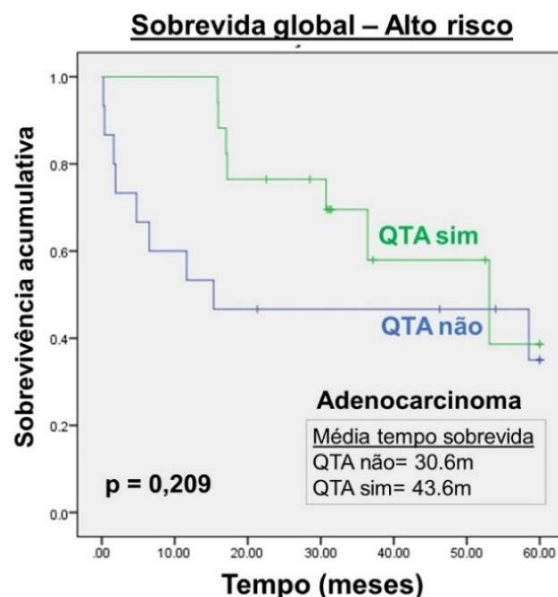
**Figura 25.** Sobrevida global em meses do grupo de alto risco, de acordo com tratamento (gráfico à esquerda), e sobrevida livre de evento em meses grupo de alto risco, de acordo com tratamento (gráfico à direita). Parte inferior da figura (à esquerda e à direita), resultado da análise univariada pela Regressão de Cox. Qta, quimioterapia adjuvante; N, numero de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança

Foi realizado uma análise dos pacientes censurados em 2 anos, e uma associação da SG com o óbito foi observada, onde os pacientes que fizeram tratamento com QTA apresentaram maior sobrevida comparado aos pacientes que não receberam o tratamento ( $p=0,025$ ; **Figura 26**). O benefício da QTA do grupo de alto risco foi evidente em 2 anos.



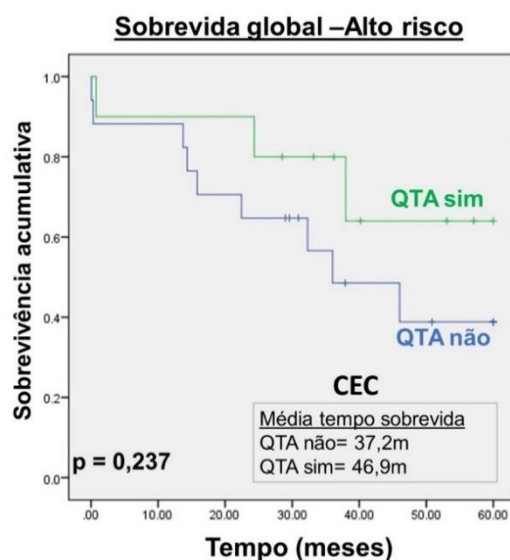
**Figura 26** Sobrevida global, censurado em 24 meses do grupo de alto risco, de acordo com tratamento com QTA.

Com relação aos pacientes com ADC pertencentes do grupo de alto risco, não houve associação da SG entre os pacientes que fizeram tratamento com QTA e os pacientes que não fizeram tratamento com QTA ( $p=0,209$ , **Figura 27**).



**Figura 27.** Sobrevida global apenas dos pacientes com adenocarcinoma pertencentes ao grupo de alto risco, de acordo com o tratamento com quimioterapia

Com relação aos pacientes com CEC pertencentes ao grupo de alto risco, não houve associação da SG entre os pacientes que fizeram tratamento com QTA e os pacientes que não fizeram tratamento com QTA ( $p=0,237$ , **Figura 28**).

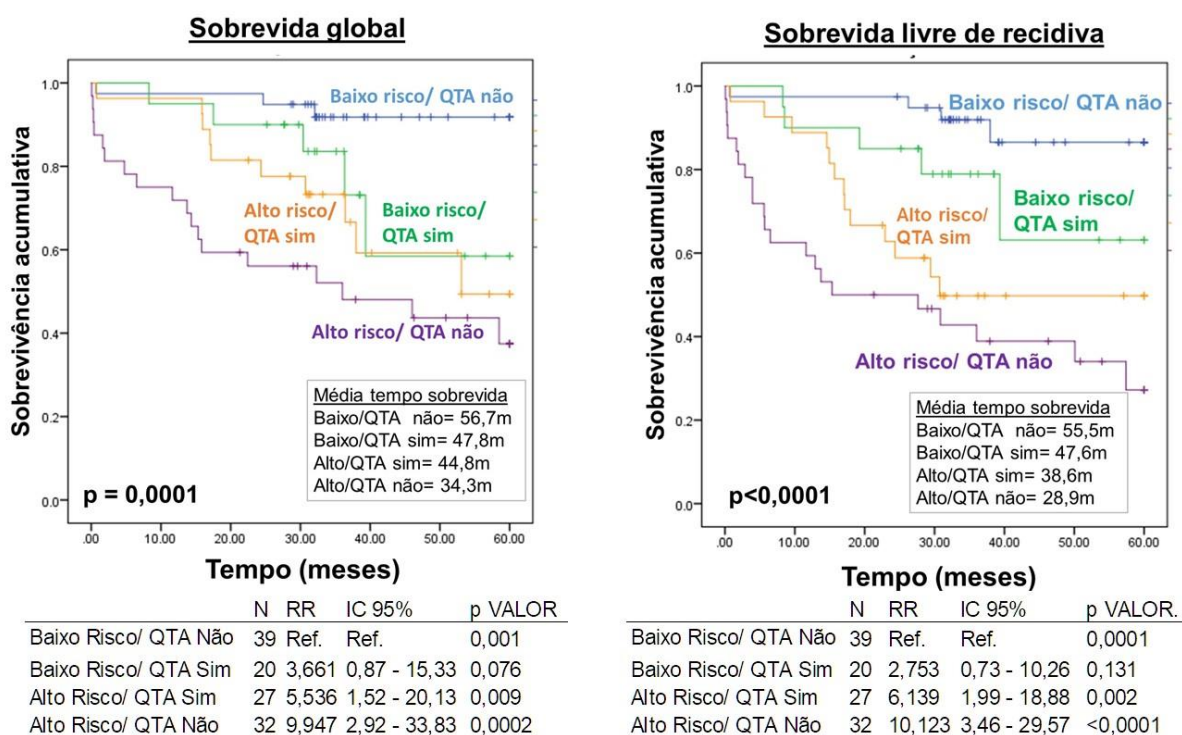


**Figura 28.** Sobrevida global apenas dos pacientes com carcinoma de células escamosas pertencentes ao grupo de alto risco, de acordo com o tratamento com quimioterapia. CEC, carcinoma de células escamosas.



### 5.5. Score de risco e tratamento: análise univariada combinada

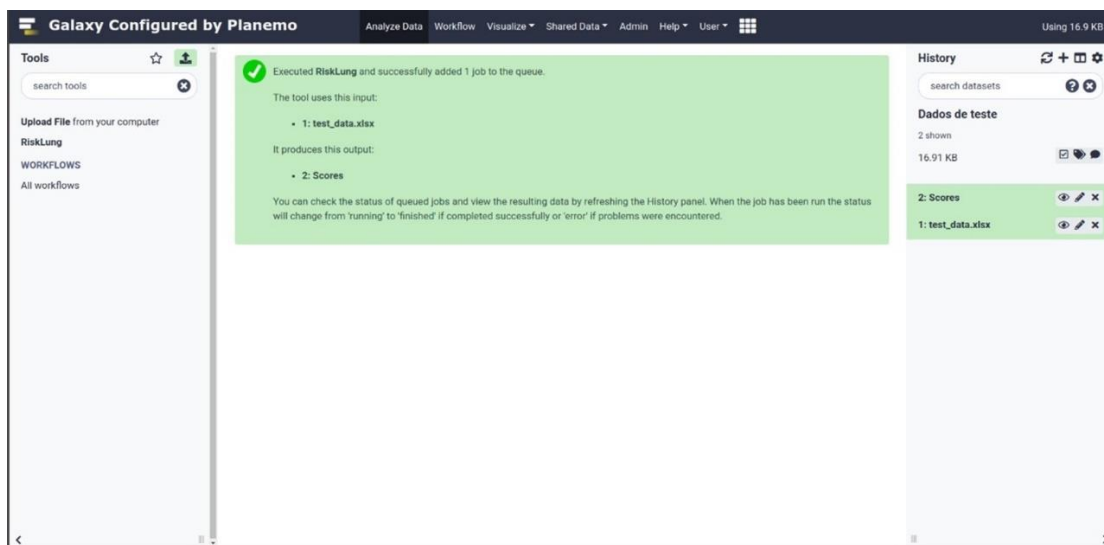
Foi realizado um agrupamento (baixo risco e alto risco), levando em consideração o tratamento realizado de cada grupo. Houve associação entre os grupos na SG e SLE (log-rank  $p=0,00013$ ; log-rank  $p=0,000002$ , respectivamente, **Figura 29**). É possível observar na SG como as curvas de baixo risco/QTA sim vs alto risco/ QTA sim se cruzam, mostrando como os pacientes de baixo risco submetidos ao tratamento tem agravamento da doença. A regressão de cox mostra que o alto risco/QT apresenta um risco elevado na SG e SLE comparado ao baixo risco/QT não (SG,RR=9,947; SLE RR=10,123, **Figura 29**).



**Figura 29.** Gráfico de sobrevivida global em meses score de risco agrupado quanto ao tratamento (gráfico à esquerda), e gráfico de sobrevivida livre de evento em meses score de risco agrupado quanto ao tratamento (gráfico à direita). Análise univariada pelo modelo de Regressão de Cox da sobrevivida global e sobrevivida livre de evento com relação ao score de risco agrupado. Qta, quimioterapia adjuvante; N, número de casos; RR, razão de risco; IC, intervalo de confiança

### 5.6 Implementação do script de análise no Galaxy

O *script* de análise do *score* de risco (baixo risco e alto risco) foi implementado no servidor interno (*Galaxy*) da instituição Hospital de Amor de Barretos, para profissionais não bioinformatas conseguirem realizar a análise. Os arquivos RCC gerados pelo sistema *nCounter* foram compilados em arquivo único, incluído na interface gráfica (Figura 30).



**Figura 30.** Implementação do *script* na plataforma *Galaxy* da instituição Hospital de Amor de Barretos.

Alguns segundos após o *upload* do arquivo os dados são gerados (**Figura 31**). Os dados gerados são: ID da amostra, valor do *score* de risco e grupo de estratificação baseado em cutoff pré estabelecido.

samples_test	discrete	continuous
"PT04"	"Low Risk"	-1.8037060664812
"PT32"	"Low Risk"	-2.16306412532555
"PT33"	"Low Risk"	-1.45601843131366
"PT47"	"Low Risk"	-0.0427830083612233
"PT02"	"Low Risk"	-0.714213041122388
"PT03"	"Low Risk"	-0.866438133510442
"PT20"	"High Risk"	0.143125003554596
"PT11"	"Low Risk"	-2.02815038982314
"PT16"	"Low Risk"	-0.839869197793844
"PT23"	"Low Risk"	-1.98958073576312
"PT43"	"Low Risk"	-2.18184943722113
"PT05"	"High Risk"	0.547331364495161
"PT06"	"Low Risk"	-1.43377184708048
"PT21"	"High Risk"	0.851913890317431
"PT37"	"Low Risk"	-0.686404488023536
"PT07"	"High Risk"	1.48979516000804
"PT18"	"Low Risk"	-2.17968615553651
"PT19"	"Low Risk"	-1.62827949962462
"PT34"	"Low Risk"	-0.608328646312916
"PT38"	"Low Risk"	-1.51785212149118
"PT08"	"Low Risk"	-1.65494831656083
"PT22"	"Low Risk"	-2.24740498391047
"PT44"	"High Risk"	0.469461133682421
"PT49"	"Low Risk"	-2.28744751150902
"PT01"	"High Risk"	1.65822137045311
"PT13"	"Low Risk"	-1.44678157957928
"PT14"	"Low Risk"	-0.620976799189259
		0.193755394207207

**Figura 31.** Geração dos dados a partir do script implementado na plataforma Galaxy da instituição Hospital de Amor de Barretos

### 5.7. Análise multivariada

Foi realizada uma análise multivariada para a construção do modelo de nomograma. As variáveis que entraram no modelo multivariado foram, sexo, tabagismo, histologia, estadiamento agrupado, tratamento com quimioterapia e score de risco, tanto na SG e SLE. Na SG as variáveis que foram significativas foram score de risco, sendo o alto risco apresentando um risco elevado para desfecho comprado ao baixo risco (RR=3,93; p=0,018, **Tabela 5**), e o estadiamento agrupado, sendo o estadiamento IIIA com risco elevado para desfecho comparado aos IA/IB/IIA (RR=7,25; p=0,00007, **Tabela 5**). A SLE as variáveis significativas no modelo inicial foram, score de risco, sendo o alto risco apresentando um risco elevado para desfecho comprado ao baixo risco (RR=5,91; p=0,0006, **Tabela 5**), e o estadiamento agrupado, sendo o estadiamento IIIA com risco elevado para desfecho comprado ao IA/IB/IIA (RR=6,71; p=0,00002, **Tabela 5**) e

tratamento com QTA, sendo os pacientes sem tratamento apresentaram risco elevado para desfecho comparado aos pacientes sem tratamento (RR=2,32; p=0,021, **Tabela 5**)

**Tabela 5.** Análise multivariada pelo modelo de Regressão de Cox da sobrevida global e sobrevida livre de eventos das principais variáveis clínicas.

Variáveis	N	Sobrevida global			Sobrevida livre de evento			
		RR	IC 95%	p VALOR	RR	IC 95%	p VALOR	
Sexo	Feminino	47	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
	Masculino	46	1,35	0,57 - 3,17	0,490	1,16	0,53 - 2,50	0,709
Score de risco	Baixo risco	41	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
	Alto risco	52	3,93	1,25 - 12,28	<b>0,018</b>	5,91	2,15 - 16,21	<b>0,0006</b>
Tratamento	QTA - sim	37	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
	QTA - não	56	1,89	0,87 - 4,06	0,105	2,32	1,13 - 4,73	<b>0,021</b>
Estadiamento	IA/IB/IIA	59	Ref.	Ref.	<b>0,0004</b>	Ref.	Ref.	<b>0,0001</b>
	IIB	13	2,95	0,98 - 8,86	0,053	2,93	1,05 - 8,10	<b>0,038</b>
	IIIA	21	7,25	2,72 - 19,33	<b>&lt;0,0001</b>	6,71	2,79 - 16,09	<b>&lt;0,0001</b>
Histologia	Adenocarcinoma	70	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
	Carcinoma de células escamosas	23	1,07	0,44 - 2,56	0,880	0,74	0,32 - 1,70	0,479
Tabagismo	Nunca fumante/ Ex-fumante >15 anos	34	Ref.	Ref.	0,169	Ref.	Ref.	0,748
	Ex-fumante <15 anos	17	1,14	0,32 - 4,04	0,836	0,88	0,28 - 2,73	0,822
	Fumante	42	2,28	0,76 - 6,79	0,139	1,21	0,482 - 3,06	0,681

QTA, quimioterapia adjuvante.

Após a análise multivariada, as variáveis que apresentaram um *p valor* maior foram retiradas, até que todas as variáveis restantes fossem significativas para o modelo final do nomograma. Assim as variáveis que entraram no modelo foram score de risco e estadiamento (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Análise multivariada pelo modelo de Regressão de Cox da sobrevida global e sobrevida livre de eventos das variáveis incluídas no modelo final do nomograma.

Variáveis	N	Sobrevida global			Sobrevida livre de evento			
		RR	IC 95%	p VALOR	RR	IC 95%	p VALOR	
Score de risco	Baixo risco	59	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	
	Alto risco	59	3,694	1,64 - 8,28	<b>0,002</b>	4,810	2,27 - 10,22	<b>&lt;0,0001</b>
Estadiamento	IA/IB/IIA	81	Ref.	Ref.	<b>0,003</b>	Ref.	Ref.	<b>0,0018</b>
	IIB	13	2,050	0,81 - 5,14	0,126	2,037	0,88 - 4,70	0,0954
	IIIA	24	3,574	1,71 - 7,45	<b>0,001</b>	3,386	1,71 - 6,67	<b>0,0004</b>

### 5.7.1 Construção e modelo de nomograma Sobrevida Global e Sobrevida livre de evento

O nomograma foi construído a partir da análise multivariada, e foi atribuído uma pontuação de risco para cada variável, do qual foram calculadas a probabilidade de sobrevivência global e livre de evento em 1, 3 e 5 anos (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Pontuação específica para cada variável clínica e molecular, sobrevida global e sobrevida livre de evento.

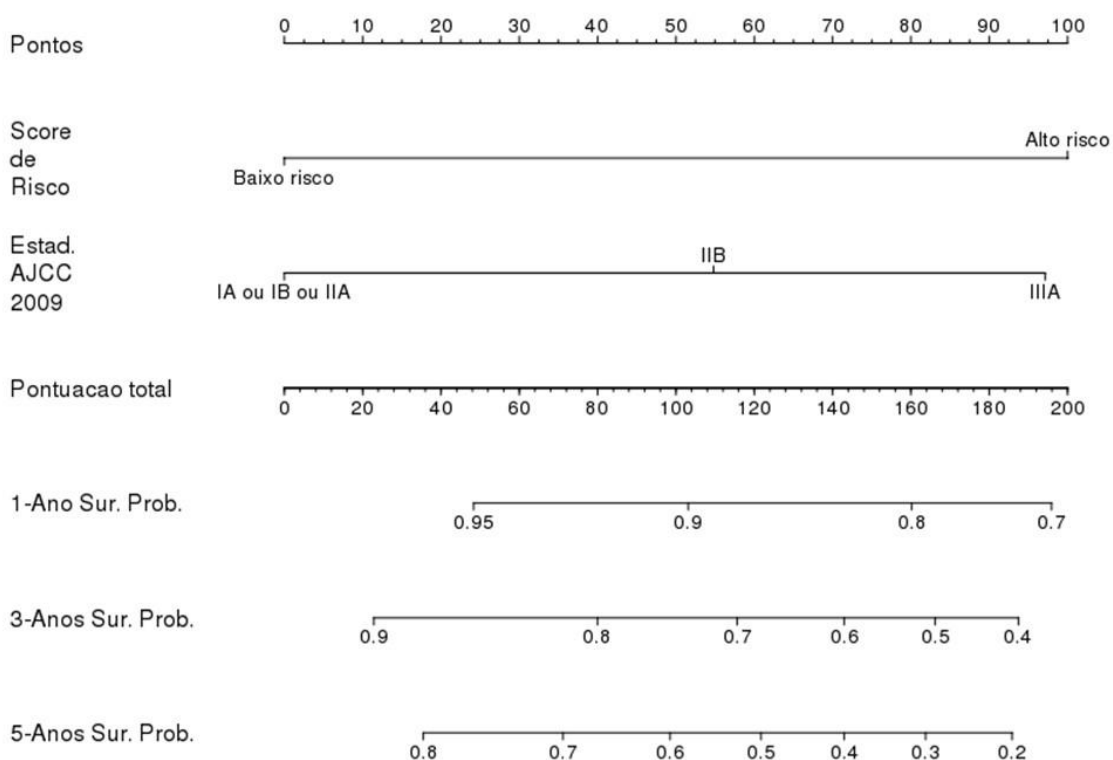
Variável	Parâmetros	Pontuação Sobrevida	
		Global	Livre de evento
Estadiamento	IA/IB/IIA	0	0
	IIB	55	47
	IIIA	97	73
Score de Risco	Baixo	0	0
	Alto	100	100

A tabela 9 e 10 mostra a probabilidade de sobrevivência em 1, 3 e 5 anos. Nota-se que quanto maior é a pontuação atribuída menor é a probabilidade de sobrevida global e sobrevida livre de evento (**Tabela 8**; **Tabela 9**, respectivamente). As figuras 32 e 33

mostram o modelo do nomograma construído para sobrevida global e sobrevida livre de evento.

**Tabela 8.** Probabilidade de sobrevida global em 1, 3 e 5 anos.

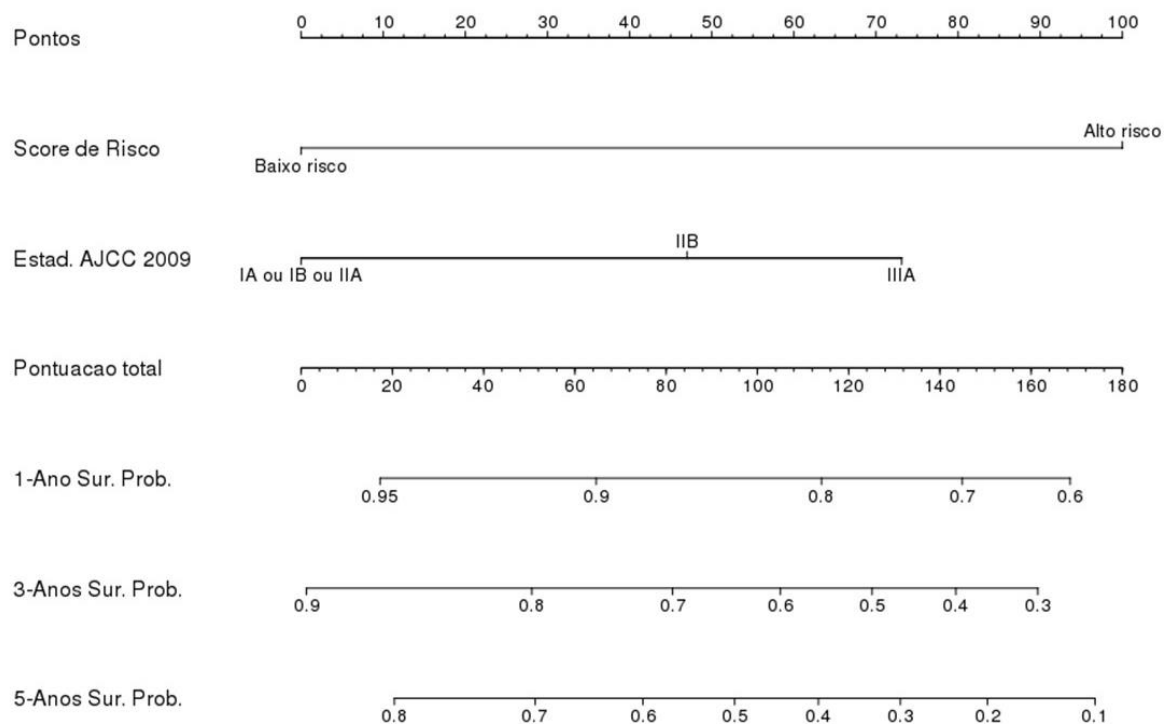
Probabilidade de sobrevida					
1 ano		3 anos		5 anos	
Pontos Total	Prob.	Pontos Total	Prob.	Pontos Total	Prob.
239	0,60	223	0,30	228	0,10
212	0,70	203	0,40	202	0,20
178	0,80	182	0,50	181	0,30
123	0,90	160	0,60	161	0,40
70	0,95	134	0,70	140	0,50
		99	0,80	118	0,60
		44	0,90	91	0,70
		0	0,95	57	0,80
				1	0,90



**Figura 32.** Modelo de nomograma desenvolvido referente a sobrevida global para pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecados.

**Tabela 9.** Probabilidade de sobrevida livre de evento em 1, 3 e 5 anos.

Probabilidade de sobrevida					
1 ano		3 anos		5 anos	
Pontos Total	Prob.	Pontos Total	Prob.	Pontos Total	Prob.
169	0.60	161	0,30	174	0,10
145	0.70	144	0,40	150	0,20
114	0.80	125	0,50	131	0,30
65	0.90	105	0,60	113	0,40
17	0.95	81	0,70	95	0,50
		51	0,80	75	0,60
		1	0,90	51	0,70
				20	0,80

**Figura 33.** Modelo de nomograma desenvolvido referente a sobrevida livre de evento para pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecados.

### **5.8 Construção da calculadora**

A calculadora foi construída através do modelo de nomograma criado, sendo inserido no RedCap, assim automaticamente no momento do preenchimento dos dados será gerada a probabilidade de sobrevivência e livre de doença, em 1, 3 e 5 anos (**Figura 34**; link: <https://hcbredcap.com.br/surveys/?s=XNXC3FTA3N>).



**GRUPO TRANSLACIONAL DE  
ONCOLOGIA PULMONAR  
(GTOP)**

**ha** HOSPITAL DE  
CÂNCER DE  
BARRETOS  
INSTITUTO DE ENSINO & PESQUISA

Nomograma clínico-molecular para manejo de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas submetidos à ressecção cirúrgica

Estadiamento AJCC 2009  IA / IB / IIA  
 IIB  
 IIIA

Score de Risco  Baixo Risco  
 Alto Risco

## SOBREVIDA GLOBAL

PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL  
EM **1 ANO** (%)

PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL  
EM **3 ANOS** (%)

PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL  
EM **5 ANOS** (%)

## SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA  
EM **1 ANO** (%)

PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA  
EM **3 ANOS** (%)

PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA  
EM **5 ANOS** (%)

**Figura 34.** Calculadora para estimativa de sobrevida em 1, 3 e 5 anos para pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células cirurgicamente ressecados.

# *Discussão*

---

## 6. Discussão

A intenção de tratamento para pacientes com cancer de pulmão de não pequenas células diagnosticados em estadiamento iniciais (I-IIIa) é quase sempre curativa. O tratamento basea-se majoritariamente em ressecção cirúrgica, podendo ou não ter indicação de tratamento adjuvante com quimioterapia e/ou radioterapia<sup>10</sup>. Os critérios para indicação do tratamento adjuvante com quimioterapia baseada em platina são baseados no tamanho do tumor e no acometimento linfonodal<sup>10</sup>. No entanto, mesmo preenchendo estes critérios mínimos estabelecidos, não são todos os pacientes que se beneficiam do tratamento com a quimioterapia adjuvante<sup>76</sup>. A grande lacuna existente atualmente na prática clínica é não saber quais os pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células que, de fato, serão beneficiados pela quimioterapia adjuvante. Assim, há a necessidade de identificar de maneira efetiva quais pacientes, de fato, poderão ser beneficiados.

No presente estudo, utilizamos um ensaio *mutiplex* baseado na expressão de 12 genes, que fornece uma assinatura gênica que estratifica o risco em relação ao prognóstico e também indica os pacientes que poderão ser beneficiados com a quimioterapia adjuvante. Este painel foi inicialmente desenvolvido por Tang e colaboradores, mostrando ser bastante promissor para identificar os pacientes dos Estados Unidos da América, com benefício do tratamento adjuvante<sup>21</sup>. Posteriormente, o painel foi validado em amostras parafinadas também de pacientes dos Estados Unidos da América por Xie e colaboradores, empregando uma tecnologia mais robusta para análise a tecnologia *nCounter*<sup>52</sup>. Inicialmente, foram analisadas amostras pareadas de tecido congelado e parafinado, indicando concordância elevada entre os dois tipos de amostras. Em amostras parafinadas, o painel também estratificou com sucesso os pacientes em grupos de alto risco – provável benefício da quimioterapia e baixo risco provável não benefício da quimioterapia<sup>52</sup>. Os genes que constituem este painel empregado no presente estudo estão associados a processos biológicos importantes do câncer de pulmão. Entre estas associações estão a presença de aberrações genéticas na

região destes genes e também à letalidade sintética, principal razão para o potencial preditivo deste painel à resposta a drogas quimioterápicas<sup>52,77</sup>.

Alguns dos genes incluídos no painel molecular aqui em questão já foram descritos como biomarcadores para câncer de pulmão. Um exemplo é o gene *ATP8A1*, associado à metástase em linfonodos, responsável por promover a capacidade de invasão e migração<sup>78</sup>. Outro gene que também já foi descrito em câncer de pulmão é o *COL4A3*, identificado como biomarcador preditivo para terapia com cisplatina e gemcitabina, em tumores avançados – estadiamento IIIb e IV<sup>79</sup>. A expressão aumentada do gene *AURKA* foi associada a um pior prognóstico em pacientes com carcinoma de células escamosas comparada a pacientes com adenocarcinoma<sup>80</sup>. Por outro lado, a expressão aumentada do gene *NKX2-1* foi associada a um melhor prognóstico em pacientes com câncer de pulmão<sup>80</sup>. Porém, o gene *NKX2-1* pode ter um papel dual e deve ser considerado com cautela, especialmente em tumores com heterogeneidade elevada, como é o caso dos tumores de pulmão de não pequenas células<sup>81</sup>.

Em 1995, o benefício do tratamento adjuvante com quimioterapia foi determinado pelo aumento na sobrevida global em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células<sup>82</sup>. No entanto, pouco se sabe sobre os pacientes expostos à quimioterapia adjuvante e que, possivelmente, não apresentam benefício ao tratamento. No presente estudo, observamos que inúmeros casos com indicação clínica para receber a quimioterapia após a ressecção cirúrgica, não foram beneficiados deste tipo de tratamento, pelo contrário, apresentaram sobrevida bastante inferior àqueles pacientes tratados.

A indicação para o tratamento com quimioterapia adjuvante, atualmente, é baseada no sistema de estadiamento TNM, considerando elegíveis para este tipo de tratamento pacientes tumores maiores que 4 cm e acometimento linfonodal. No presente estudo, a análise univariada mostrou que não há diferença de sobrevida global e sobrevida livre de evento entre os pacientes que receberam e os pacientes que não receberam a quimioterapia adjuvante. É importante salientar que, nesta análise univariada não é levado em consideração o resultado do painel molecular, reforçando que a indicação do tratamento baseada somente em critérios clínicos não está sendo

específica. Este resultado evidencia ainda mais a necessidade de outras ferramentas capazes de identificar, com maior precisão, os pacientes que realmente serão beneficiados pelo tratamento com quimioterapia adjuvante.

Os resultados do presente estudo corroboram os resultados previamente publicados pelo grupo colaborador dos Estados Unidos da América, que desenvolveu o painel<sup>52</sup>. A performance prognóstica do painel foi claramente ratificada no presente estudo, onde os pacientes pertencentes ao grupo de alto risco apresentaram menor sobrevida quando comparado aos pacientes classificados como baixo risco, independentemente do subtipo histológico. Este resultado também foi espelhado considerando somente o subtipo histológico o adenocarcinoma. Porém, não foi possível realizar as análises de sobrevida considerando somente o subgrupo classificado como carcinoma de células escamosas, uma vez que todos os pacientes com esta histologia foram classificados dentro do grupo de alto risco. Por esta razão, estudos adicionais são necessários para comprovar o real valor deste painel na prática clínica para os pacientes com o subtipo histológico de carcinoma de células escamosas.

Em relação à performance preditiva do painel para o grupo de alto risco, tanto para a sobrevida global quanto para a sobrevida livre de evento, não houve diferença do ponto de vista estatístico entre o grupo de pacientes que receberam o tratamento e o grupo de pacientes que não receberam o tratamento com quimioterapia adjuvante, independentemente do subtipo histológico. Porém, apesar da ausência de significância estatística, os pacientes que fizeram quimioterapia adjuvante apresentaram, em média, 10 meses a mais de sobrevida que o grupo que não receberam quimioterapia adjuvante. Por outro lado, quando censuramos as análises em dois anos de seguimento, o benefício do tratamento com quimioterapia adjuvante é evidente, inclusive do ponto de vista estatístico. Este fato indica que este painel pode ter um valor preditivo para os pacientes de alto risco, porém, somente dentro dos dois primeiros anos de seguimento. Após dois anos de seguimento, ter a classificação de alto risco, pode indicar que estes pacientes, tendo ou não realizado o tratamento adjuvante com quimioterapia, sofrerão algum evento após os primeiros dois anos de seguimento. Por esta razão, o valor prognóstico do painel é superior ao seu valor preditivo.

Em relação à performance preditiva do painel para o grupo de baixo risco, a sobrevida global foi claramente maior para os pacientes que não foram submetidos ao tratamento com quimioterapia adjuvante comparados aos pacientes que foram submetidos à quimioterapia adjuvante, independentemente do subtipo histológico. Vale ainda ressaltar que a menor sobrevida global para os pacientes classificados como baixo risco e que receberam o tratamento adjuvante nos permite inferir que, neste grupo específico de pacientes, receber quimioterapia favorece um pior desfecho. Sendo assim, a estratificação de risco pelo painel reproduzido e validado no presente estudo, se empregado no manejo dos pacientes classificados como baixo risco, poderia evitar o tratamento desnecessário destes pacientes, diminuindo os custos assistenciais e, mais importante, melhorando a qualidade de vida e sobrevida destes pacientes.

Tendo em vista o êxito obtido com os resultados do painel, deparamo-nos com o desafio das análises bioinformáticas para a definição do *score* de risco e estratificação em dois grupos. As análises do presente estudo foram realizadas com o auxílio dos bioinformatas envolvidos no desenvolvimento deste painel (*MD Anderson Cancer Center* e *UT Southwestern University*). No entanto, sabemos que este desafio pode inviabilizar a utilização deste painel na rotina diagnóstica, uma vez que, nem sempre dispomos de profissionais capacitados para tais análises. Por esta razão, com o suporte da *core facility* de bioinformática do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, o *script* de análise do painel gênico foi implementado em interface gráfica, tornando-o “*user-friendly*” em servidor *Galaxy*<sup>75</sup>. Esta implementação resultou na execução facilitada da análise do painel gênico e poderá ser utilizada por qualquer profissional não bioinformata, desde que treinado adequadamente.

Além de tornar o painel uma realidade na rotina diagnóstica, seria fundamental garantir a adesão deste painel por parte do corpo clínico. Porém, a simples definição paciente em alto ou baixo risco pode não ser suficiente para auxiliar o médico na tomada de decisão, especialmente no direcionamento do tratamento. Por esta razão, viu-se necessária a criação de uma ferramenta para prever a probabilidade de sobrevivência considerando, não somente o resultado do painel molecular, mas também variáveis clinicamente relevantes para a predição de desfecho. Desta forma, desenvolvemos,

então, uma calculadora baseada em nomograma que considera o score de risco e o estadiamento clínico ao diagnóstico. A calculadora poderá ser uma ferramenta complementar ao painel molecular para auxiliar os médicos oncologistas na tomada de decisão, especialmente no direcionamento do tratamento. Porém, vale salientar que, quaisquer nomogramas precisam ser validados em outras séries, de preferência com contextos diferentes, tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista socioeconômico. Nesta série, incluímos um grupo de pacientes europeus, porém, as análises para a definição do modelo do nomograma foram conduzidas conjuntamente e, por esta razão, não pode ser considerada uma validação externa do modelo de nomograma. Esta validação externa será conduzida pelo Grupo Translacional de Oncologia Pulmonar (GTOP) e acontecerá prospectivamente envolvendo outras séries brasileiras e latino-americanas.

Por ser um estudo de natureza retrospectiva, em caso de progressão da doença, os pacientes podem não ter sido tratados uniformemente, podendo influenciar nos resultados associados ao desfecho. Além disso, terapias alvo moleculares para os pacientes com alguma mutação acionável, tais como mutações no gene *EGFR* podem ter sido utilizadas à medida em que a doença progrediu. No entanto, salientamos que as terapias alvo podem ter sido empregadas somente para uma parcela dos casos, não influenciando significativamente nos resultados que envolvem às análises de desfecho. As análises multivariadas considerando possíveis variáveis confundidoras também foram empregadas para as análises de associação com desfecho, diminuindo, desta forma, possíveis vieses de análise. Salientamos ainda que, para a aplicação na prática clínica da calculadora baseada em nomograma, a mesma deverá ser antes validada em outras populações.

## *Conclusão*

---



## 7. Conclusão

Reproduzimos e validamos com sucesso um painel molecular de 12 genes para o manejo de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células. Este painel apresentou *failure rate* inferior a 1% e alta taxa de resultados conclusivos com excelente valor prognóstico e possível valor preditivo.

A implementação do *script* de análise do painel de 12 genes em servidor de interface gráfica tornou a análise de bioinformática viável por profissionais não-bioinformatas, sendo executada em poucos segundos.

A calculadora baseada em nomograma com as variáveis *score* de risco e estadiamento clínico permitiu calcular a probabilidade de sobrevivência em 1, 3 e 5 anos em poucos segundos, o que pode aumentar a adesão desta ferramenta por parte do corpo clínico.

Concluindo, as ferramentas envolvidas no presente estudo – painel molecular e calculadora baseada em nomograma - poderão ser úteis tanto na rotina diagnóstica quanto na prática clínica dos pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células auxiliando na tomada de decisão. Acreditamos que o emprego destas ferramentas na tomada de decisão poderá, a médio prazo, impactar positivamente na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão cirurgicamente ressecáveis.

## *Referências*

---

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2018;00(00):1–31.
2. INCA IN de CJAG da S. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2020.
3. Registro hospitalar de câncer. Infográficos, Hospital de Câncer de Barretos [Internet]. Barretos; 2018. Available from: [https://infogram.com/rhc\\_hcb](https://infogram.com/rhc_hcb)
4. Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostron B, Thun M, Anderson RN, et al. 21st-Century Hazards of Smoking and Benefits of Cessation in the United States. **N Engl J Med**. 2013;368(4):341–50.
5. Fry JS, Lee PN, Forey BA, Coombs KJ. How rapidly does the excess risk of lung cancer decline following quitting smoking? A quantitative review using the negative exponential model. **Regul Toxicol Pharmacol [Internet]**. Elsevier Inc.; 2013;67(1):13–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.06.001>
6. Thun MJ, Henley SJ, Calle EE. Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. **Oncogene**. 2002;21(48):7307–25.
7. Jonathan M. Samet, Erika Avila-Tang, Paolo Boffetta, Lindsay M. Hannan, Susan OlivoMarston, Michael J. Thun CMR. LUNG CANCER IN NEVER SMOKERS: CLINICAL EPIDEMIOLOGY AND ENVIRONMENTAL RISK FACTORS. **Clin Cancer Res**. 2009;
8. Boeckx B, Shahi RB, Smeets D, De Brakeleer S, Decoster L, Van Brussel T, et al. The genomic landscape of nonsmall cell lung carcinoma in never smokers. **Int J Cancer**. 2020;146(11):3207–18.
9. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **Lancet [Internet]**. Allemani et al. Open Access article distributed under the terms of CC BY; 2015;385(9972):977–1010. Available from:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9)

10. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clin Proc [Internet]**. Mayo Foundation for Medical Education and Research; 2019;94(8):1623–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>
11. Secretaria do Estado de São Paulo. Fundação Oncocentro de São Paulo. São Paulo;
12. Zhang Y, Li X, Segars WP, Samei E. Comparison of patient specific dose metrics between chest radiography, tomosynthesis, and CT for adult patients of wide ranging body habitus. **Med Phys**. 2014;41(2):023901.
13. Gallamini A, Zwarthoed C, Borra A. Positron Emission Tomography (PET) in Oncology. 2014;1821–89.
14. Inage T, Nakajima T, Yoshino I, Yasufuku K. Early Lung Cancer Detection. **Clin Chest Med**. Elsevier Inc; 2018;39(1):45–55.
15. National Comprehensive Cancer Network. Lung Cancer - Non-small cell lung cancer. **Natl Compr Cancer Netw**. 2016;2000.
16. American Joint Committee on Cancer. Lung Cancer Staging (TNM). **Am Cancer Soc**. 2009;7th EDITIO:1–2.
17. Lukeman JM. Lung Cancer. **Am Cancer Soc**. 2015;30–40.
18. William D. Travis, MD, Elisabeth Brambilla, MD, Masayuki Noguchi, MD, Andrew G. Nicholson, MD, Kim R. Geisinger, MD, Yasushi Yatabe, MD, David G. Beer, PhD, Charles A. Powell, MD, Gregory J. Riely, MD, Paul E. Van Schil, MD, Kavita Garg, MD, John H. M. Au M. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. **J Thorac Oncol**. 2011;6(2):244–85.

19. Society AC. Treating Non-Small Cell Lung Cancer. :1–43.
20. Letícia Ferro Leal, Flávia Escremim de Paula, Pedro De Marchi, Luciano de Souza Viana, Gustavo Dix Junqueira Pinto, Carolina Dias Carlos, Gustavo Noriz Berardinelli, José Elias Miziara, Carlos Maciel da Silva, Eduardo Caetano Albino Silva, Rui Pereira, Ma CS-N& RMR. Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations. **Sci Rep.** 2019;
21. Tang H, Xiao G, Behrens C, Schiller J, Allen J, Chow C, et al. A 12-Gene Set Predicts Survival Benefits from Adjuvant Chemotherapy in Non – Small Cell Lung Cancer Patients. 2013;1577–87.
22. Wu YL, Herbst RS, Mann H, Rukazenzov Y, Marotti M, Tsuboi M. ADAURA: Phase III, Double-blind, Randomized Study of Osimertinib Versus Placebo in EGFR Mutation-positive Early-stage NSCLC After Complete Surgical Resection. **Clin Lung Cancer [Internet]**. Elsevier Inc.; 2018;19(4):e533–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.04.004>
23. Genova C, Rossi G, Tagliamento M, Rijavec E, Biello F, Cerbone L, et al. Targeted therapy of oncogenic-driven advanced non-small cell lung cancer: recent advances and new perspectives. **Expert Rev Respir Med.** 2020;14(4):367–83.
24. Schiller JH. A New Standard of Care for Advanced Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2018;378(22):2135–7.
25. Oncoguia E. Governo decide incorporar no SUS dois Medicamentos para o Tratamento do Câncer de Pulmão [Internet]. **Oncoguia.** 2015. Available from: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/governo-decide-incorporar-no-sus-dois-medicamentos-para-o-tratamento-do-cancer-de-pulmao/4509/999/>
26. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2018;378(22):2078–92.

27. Brassart-Pasco S, Dalstein V, Brassart B, Dewolf M, Clavel C, Oudart J-B. Immunotherapy in non-small-cell lung cancer: from targeted molecules to resistance patterns. **Pharmacogenomics [Internet]**. 2020;21(10):705–20. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs-2020-0021>
28. Remon J, Mezquita L, Corral J, Vilariño N, Reguart N. Immune-related adverse events with immune checkpoint inhibitors in thoracic malignancies: focusing on non-small cell lung cancer patients. **J Thorac Dis**. 2018;10(S13):S1516–33.
29. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. **Nature**. Nature Publishing Group; 2014;511(7511):543–50.
30. Hammerman PS et. a. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. **Nature**. 2012;29(7417):162–4.
31. Xu Y, Tong X, Yan J, Wu X, Shao YW, Fan Y. Translational Oncology Short-Term Responders of Non – Small Cell Lung Cancer Patients to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Display High Prevalence of TP53 Mutations and Primary Resistance. **Transl Oncol**. Elsevier Inc.; 2018;11(6):1364–9.
32. Midha A, Dearden S, McCormack R. Original Article EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology : a systematic review and global map by ethnicity ( mutMapII ). 2015;5(9):2892–911.
33. Wu S, Shih J. Management of acquired resistance to EGFR TKI – targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. **Molecular Cancer**; 2018;1–14.
34. Toxicol A, Suda K, Mitsudomi T. Role of EGFR mutations in lung cancers : prognosis and tumor chemosensitivity. **Arch Toxicol**. Springer Berlin Heidelberg; 2015;
35. Varghese AM, Sima CS, Chaft JE, Johnson ML, Riely GJ, Ladanyi M, et al. Lungs don't forget: Comparison of the KRAS and EGFR mutation profile and survival of collegiate smokers and never smokers with advanced lung cancers. **J Thorac**

- Oncol.** 2013;8(1):123–5.
36. Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer : clinical perspectives on the treatment of an old target. *Molecular Cancer*; 2018;1–14.
  37. Bacchi CE, Queiroga EM, Benine LC, Silva LH, Ojopi EB. Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in Brazilian lung cancer patients. 2012;67(5):419–24.
  38. Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Fernandez-mercado M, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers : Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. 2016;
  39. TCGA. TCGA-LUAD. 2014;
  40. Awad MM, Shaw AT. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: Crizotinib and beyond. **Clin Adv Hematol Oncol.** 2014;12(7):429–39.
  41. Fan L, Feng Y, Wan H, Shi G, Niu W. Clinicopathological and Demographical Characteristics of Non-Small Cell Lung Cancer Patients with ALK Rearrangements : A Systematic Review and Meta-Analysis. 2014;9(6):1–10.
  42. Novaes LAC, da Silva LS DMP, de Oliveira Cavagna R, de Paula FE, Zanon MF E, AF, Albino da Silva EC, da Silva VD, Leal LF RR. Simultaneous analysis of ALK, RET, and ROS1 gene fusions by NanoString in Brazilian lung adenocarcinoma patients. **Transl Lung Cancer Res.** 2020;
  43. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers. **Hematol Oncol Clin North Am.** 2017;31(1):13–29.
  44. Subramanian J, Simon R. Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: Ready for clinical use? **J Natl Cancer Inst.** 2010;102(7):464–74.
  45. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct

- multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nat Biotechnol.** 2008;26(3):317–25.
46. Veldman-jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. 2015;2587–94.
  47. Choi N, Son D, Lee J, Song I. The Signature from Messenger RNA Expression Profiling Can Predict Lymph Node Metastasis with High Accuracy for Non-small Cell Lung Cancer. *International Association for the Study of Lung Cancer*; 2006;1(7):622–8.
  48. Girard L, Rodriguez-canales J, Behrens C, Thompson DM, Botros W, Tang H, et al. An Expression Signature as an Aid to the Histologic Classification of Non-Small Cell Lung Cancer *Luc.* 2017;22(19):4880–9.
  49. Shahid M, Choi TG, Nguyen MN, Matondo A, Akter S, Kang I, et al. An 8-gene signature for prediction of prognosis and chemoresponse in non-small cell lung cancer. 2016;7(52):86561–72.
  50. Huang P, Cheng C-L, Chang Y-H, Liu C-H, Hsu Y-C, Chen J-S, et al. Molecular gene signature and prognosis of non-small cell lung cancer. **Oncotarget [Internet].** 2016;7(32):51898–907. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10622>
  51. Hsuan-Yu Chen, M.Sc., Sung-Liang Yu, Ph.D., Chun-Houh Chen, Ph.D., Gee-Chen Chang, M.D., Ph.D., Chih-Yi Chen, M.D., Ang Yuan, M.D., Ph.D., Chiou-Ling Cheng, M.Sc., Chien-Hsun Wang, M.Sc., Harn-Jing Terng, Ph.D., Shu-Fang Kao, M.Sc., Wing-Kai Chan, M.D., H PD. A Five-Gene Signature and Clinical Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med.** 2007;11–20.
  52. Xie Y, Lu W, Wang S, Tang X, Tang H, Zhou Y, et al. Validation of the 12-gene predictive signature for Adjuvant Chemotherapy Response in Lung Cancer. **Clin**



**Cancer Res.** 2018;

53. Roepman P, Jassem J, Smit EF, Muley T, Niklinski J, Van T, et al. An Immune Response Enriched 72-Gene Prognostic Profile for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 2009;15(1):284–91.
54. Choi N, Son D, Lee J, Song I, Kim K-A, Park S-H, et al. The Signature from Messenger RNA Expression Profiling Can Predict Lymph Node Metastasis with High Accuracy for Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* International Association for the Study of Lung Cancer; 2006;1(7):622–8.
55. Ayers M, Ribas A, Mcclanahan TK, Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, et al. IFN- $\gamma$  – related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade Find the latest version : IFN- $\gamma$  – related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. 2017;127(8):2930–40.
56. Xie Y, Zhang Y, Du L, Jiang X, Yan S, Duan W, et al. Circulating long noncoding RNA act as potential novel biomarkers for diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. *Mol Oncol [Internet]*. 2018;12(5):648–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1878-0261.12188>
57. Shee K, Wells JD, Jiang A, Miller TW. Integrated pan-cancer gene expression and drug sensitivity analysis reveals SLFN11 mRNA as a solid tumor biomarker predictive of sensitivity to DNA-damaging chemotherapy. *PLoS One [Internet]*. 2019;14(11):e0224267. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31682620>
58. Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, Johnson DH, Le Chevalier T, Le Pechoux C, Parmar MK, Pignon JP, Souhami RL, Stephens RJ, Stewart LA, Tierney JF, Tribodet H van MJ. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet.* Elsevier Ltd; 2010;375(9722):1267–77.
59. Harris A, Sc M, Johnson DW, Ph D, Kesselhut J, Li JJ, et al. DNA Repair by ERCC1 in

- Non–Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. **N Engl J Med**. 2010;609–19.
60. Luc Friboulet, Ken André Olausson, Jean-Pierre Pignon, Frances A. Shepherd, Ming-Sound Tsao, Stephen Graziano, Robert Kratzke, Jean-Yves Douillard, Lesley Seymour RP. ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non–Small-Cell Lung Cancer. 2013;71(2):233–6.
61. Kattan MW, Scardino PT. Prediction of Progression: Nomograms of Clinical Utility. **Clin Prostate Cancer [Internet]**. 2002;1(2):90–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1540035211701299>
62. Bastian Júnior AJ. Validação externa de nomograma brasileiro para predição de câncer de próstata órgão-confinado em instituição terciária de ensino. Nomogramas da USP. **Univ São Paulo**. 2011;
63. TORRES SAA. DECISÃO TERAPÊUTICA NO CARCINOMA DA PRÓSTATA LOCALIZADO - JULGAMENTO CLÍNICO VERSUS MODELOS PREDITIVOS. **Fac Med DA Univ COIMBRA**. 2012;
64. HARRELL FE, LEE KL, MARK DB. MULTIVARIABLE PROGNOSTIC MODELS: ISSUES IN DEVELOPING MODELS, EVALUATING ASSUMPTIONS AND ADEQUACY, AND MEASURING AND REDUCING ERRORS. **Stat Med [Internet]**. 1996;15(4):361–87. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19960229\)15:4%3C361::AID-SIM168%3E3.0.CO;2-4](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4%3C361::AID-SIM168%3E3.0.CO;2-4)
65. Begg CB, Riedel ER, Bach PB, Kattan MW, Schrag D, Warren JL, et al. Variations in Morbidity after Radical Prostatectomy. **N Engl J Med [Internet]**. 2002;346(15):1138–44. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMsa011788>
66. Silva TB. Desenvolvimento e validação de nomogramas para estimativa de risco para câncer de próstata em população brasileira. **Univ São Paulo**. 2013;
67. Mançano BM. APLICABILIDADE DE UM NOMOGRAMA INCLUINDO VARIÁVEIS

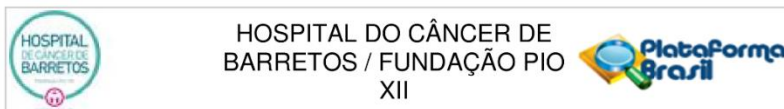
CLÍNICAS E MOLECULARES PARA ESTRATIFICAÇÃO DE GRUPOS DE RISCO EM MEDULOBLASTOMAS PEDIÁTRICOS. **Hosp Cancer Barretos**. 2020;

68. Wang S, Yang L, Ci B, Maclean M, Gerber DE, Xiao G, et al. Development and Validation of a Nomogram Prognostic Model for SCLC Patients. **J Thorac Oncol [Internet]**. 2018;13(9):1338–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086418306877>
69. Pan H, Shi X, Xiao D, He J, Zhang Y, Liang W, et al. Nomogram prediction for the survival of the patients with small cell lung cancer. **J Thorac Dis [Internet]**. 2017;9(3):507–18. Available from: <http://jtd.amegroups.com/article/view/12666/10597>
70. Xiao H-F, Zhang B-H, Liao X-Z, Yan S-P, Zhu S-L, Zhou F, et al. Development and validation of two prognostic nomograms for predicting survival in patients with non-small cell and small cell lung cancer. **Oncotarget [Internet]**. 2017;8(38):64303–16. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.19791>
71. Xie D, Marks R, Zhang M, Jiang G, Jatoi A, Garces YI, et al. Nomograms Predict Overall Survival for Patients with Small-Cell Lung Cancer Incorporating Pretreatment Peripheral Blood Markers. **J Thorac Oncol [Internet]**. 2015;10(8):1213–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415335504>
72. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. NanoStringNorm: An extensible R package for the pre-processing of nanostring mRNA and miRNA data. **Bioinformatics**. 2012;28(11):1546–8.
73. Software A, Manual U. nSolver™ 4.0. 2018;(January).
74. Hicks SC, Irizarry RA. quantro: a data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method. **Genome Biol [Internet]**. 2015;16(1):117. Available from:

- <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-015-0679-0>
75. Afgan E, Baker D, Batut B, Van Den Beek M, Bouvier D, Ech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic Acids Res.** 2018;46(W1):W537–44.
  76. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non–Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med [Internet].** 2004;350(4):351–60. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa031644>
  77. Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, Ferguson D, Girard L, Peyton M, et al. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. **Nature [Internet].** 2007;446(7137):815–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature05697>
  78. Daowei Li, Tao Xu, Xingguang Wang, Xiaobin Ma, Tingting Liu, Yonggang Wang SJ. The role of ATP8A1 in non-small cell lung cancer. **Int J Clin Exp Pathol.** 2017;
  79. Jiang C-P, Wu B-H, Chen S-P, Fu M-Y, Yang M, Liu F, et al. High COL4A3 expression correlates with poor prognosis after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Tumor Biol [Internet].** 2013;34(1):415–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-012-0565-2>
  80. Al-Khafaji ASK, Marcus MW, Davies MPA, Risk JM, Shaw RJ, Field JK, et al. AURKA mRNA expression is an independent predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. **Oncol Lett [Internet].** 2017;13(6):4463–8.
  81. Winslow MM, Dayton TL, Verhaak RGW, Kim-Kiselak C, Snyder EL, Feldser DM, et al. Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. **Nature [Internet].** 2011;473(7345):101–4.
  82. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. **BMJ.** 1995;

# *Anexos*

---



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Análise do Perfil Molecular do Câncer de Pulmão

**Pesquisador:** Leticia Ferro Leal

**Área Temática:**

**Versão:** 12

**CAAE:** 55631316.2.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.121.693

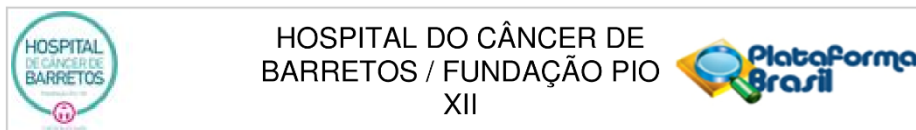
**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1277865\_E6.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 16/01/2019).

**RESUMO:**

O carcinoma do pulmão está entre as principais causas de morte em homens e mulheres por câncer em todo o mundo. A Agência Internacional de Pesquisa de Câncer estima que cerca de 1,8 milhões de novos casos de câncer de pulmão e quase 1,6 milhões de mortes tenham ocorrido em 2012, com projeções ascendentes em algumas partes do mundo. Apenas 15% dos casos de pulmão são diagnosticados em estágios iniciais da doença, quando o tratamento é mais eficiente, e os pacientes apresentam taxa de sobrevivência inferior a 20%. A maioria dos casos de câncer de pulmão (85%) é do tipo carcinoma não pequenas células (NSCLC), que pode ser subdividido em três principais: carcinoma de células escamosas, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma. Há também o carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC), de menor frequência, encontrado em grande parte nos brônquios primários e secundários, com alto potencial metastático. O desenvolvimento do câncer de pulmão está associado com extensa inflamação pulmonar e fortemente associado ao tabagismo. Este tipo de neoplasia apresenta perfis mutacionais variados e

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



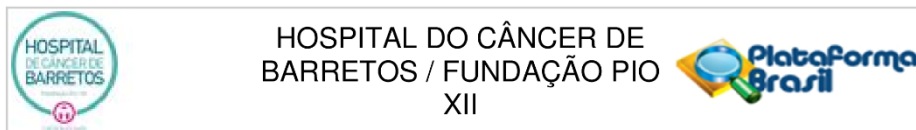
Continuação do Parecer: 3.121.693

complexos, o que torna seu entendimento um desafio de grandes proporções. O presente estudo tem como principal objetivo avaliar uma série retrospectiva de pacientes do Hospital de Câncer de Barretos com diferentes estágios do câncer de pulmão e investigar, nestes pacientes, o perfil molecular das amostras tumorais e identificar alterações associadas a este tipo de tumor tanto em estágios iniciais como em estágios mais avançados e correlacionar estes perfis com as características clínicas dos pacientes. Além disso, pretendemos validar o perfil mutacional observado nos tumores em amostras de biópsia líquida dos pacientes. Os resultados do presente projeto poderão contribuir de forma significativa para elucidação de mecanismos envolvidos na tumorigênese pulmonar, bem como na identificação de marcadores tumorais que permitam o diagnóstico precoce da doença e também marcadores com possível valor prognóstico.

#### INTRODUÇÃO:

1. INTRODUÇÃO carcinoma do pulmão está entre as principais causas de morte em homens e mulheres por câncer em todo o mundo (1). A Agência Internacional de Pesquisa de Câncer estima que cerca de 1,8 milhões de novos casos de câncer de pulmão e quase 1,6 milhões de mortes tenham ocorrido em 2012, com projeções ascendentes em algumas partes do mundo. (2). Apenas 15% dos casos de pulmão são diagnosticados em estadiamento iniciais da doença, quando o tratamento é mais eficiente. Contudo, a taxa de sobrevivência oscila de 14 a 17% (3, 4). Histologicamente, o câncer de pulmão é dividido em dois principais tipos: o de células pequenas (SCLC, do inglês Small Cell Lung Cancer) e o não pequenas células (NSCLC, do inglês Non Small Cell Lung Cancer) (5). Aproximadamente 80 a 85% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados como sendo do tipo histológico NSCLC, apresentando-se localmente avançados ou com metástase em aproximadamente 70% (1, 5, 6). Podem ainda ser subdivididos em: carcinoma de células escamosas, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma. Com base nesta subdivisão, o adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum e frequentemente se manifesta na forma de massa periférica com aspectos microscópicos característicos que incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina. O carcinoma de células escamosas tem maior correlação com o tabagismo, geralmente surge no hilo ou próximo a ele e os aspectos microscópicos variam desde o fenótipo de neoplasia queratinizante, bem diferenciada, até tumor anaplásico. O carcinoma de grandes células representa, provavelmente, um carcinoma de células escamosas ou adenocarcinoma pouco diferenciado que, em certas ocasiões, pode apresentar elementos histológicos peculiares, como células gigantes e células claras (7). 1.1. Carcinomas não pequenas células do pulmão: Muitos portadores de NSCLC com estádios I e II beneficiam-se de

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 3.121.693

ressecção cirúrgica, enquanto pacientes com doença avançada são candidatos aos tratamentos não cirúrgicos (8). A introdução de agentes antiangiogênicos e dos inibidores dos receptores tirosina-quinase, como o do fator de crescimento endotelial (EGFR), melhorou a resposta terapêutica de um grupo selecionado de pacientes com NSCLC. A seleção de pacientes candidatos a estas novas terapias é baseada no reconhecimento de diferentes subtipos histológicos e mutações genéticas que influenciam a biologia tumoral e prediz a eficácia da droga (9). A patogênese do câncer de pulmão é complexa e acredita-se que ocorra devido a uma integração de fatores ambientais e genéticos (10). Embora o tabagismo seja o fator de risco fortemente ligado a esta doença, o câncer de pulmão entre não fumantes é, atualmente, a sétima principal causa de morte por câncer (11). Entretanto, outros fatores relacionados por exemplo, às atividades laborais, como exposição a asbesto, radônio e certos metais (cromo, arsênio, cádmio, sílica e níquel), fumaça de carvão e poluição ambiental, além de hormônios, doença pulmonar prévia e fatores dietéticos, estão associados com a doença e têm recebido maior atenção, principalmente entre os não fumantes (11-13). Sabe-se, entretanto, que i) menos de 20% dos fumantes desenvolvem câncer de pulmão, ii) aproximadamente 25% de não fumantes desenvolvem a neoplasia pulmonar e, iii) o câncer de pulmão é uma importante causa de mortes também entre os não fumantes (12, 13). Isto significa que fatores além daqueles já bem conhecidos, devem existir mais agentes causadores da doença, que poderiam atuar isoladamente ou sinergicamente (12, 14).

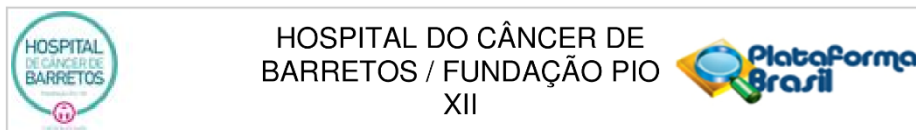
1.2. Carcinomas pequenas células do pulmão: O carcinoma pequenas células de pulmão (SCLC) afeta mais de 200.000 pessoas em todo mundo anualmente, correspondendo de 15 a 20% de todos os casos da doença diagnosticados, apresenta taxa de mortalidade muito elevada e, clinicamente, é frequentemente diagnosticado quando há metástase, e pela presença de sinais e sintomas como tosse, falta de ar, dor no peito, fraqueza e perda de peso (15). Portanto, trata-se de um subtipo de câncer de pulmão muito agressivo (16), morfológicamente caracterizado por pequenas células de bordas mal-definidas, citoplasma escasso (17), cromatina nuclear granular e nucléolos ausentes ou discretos (16). Ainda, a necrose é geralmente extensa e há alta atividade mitótica das células neoplásicas (18). Embora exista a classificação histopatológica em NSCLC e SCLC, nem sempre é possível fazer essa distinção porque há características mistas devido ao grande número de células que expressam níveis variáveis de marcadores neuroendócrinos, alveolares e bronquiolares.

1.3. Aspectos moleculares do câncer de pulmão

1.3.1. EGFR receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR, do inglês epidermal growth factor receptor) é uma glicoproteína transmembrana com um domínio intracelular com atividade de tirosina quinase (19). Mutações no gene EGFR levam à ativação do receptor codificado por este gene desencadeando a ativação das vias de sinalização

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

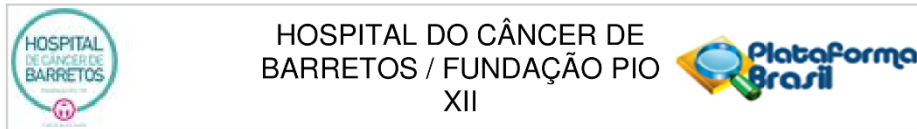




Continuação do Parecer: 3.121.693

subsequentes envolvidas na proliferação, diferenciação e ciclo celular atuando na transformação e progressão neoplásica. Estas mutações ocorrem mais comumente nos exons 19 e 21 e são frequentemente encontradas em alguns subtipos de câncer de pulmão, como os adenocarcinomas e NSCLC. Dentro do subtipo NSCLC, as mutações do gene EGFR estão presentes em aproximadamente 10 a 15% dos tumores, sendo essas mutações mais comuns em pacientes do sexo feminino, pacientes não fumantes e pacientes de etnia asiática, sendo que esta frequência sobe para, aproximadamente, 50% em pacientes de asiáticos (20, 21). A presença de mutações no gene EGFR está associada ao prognóstico dos pacientes, à sensibilidade e melhor resposta do tumor a pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinases (Figura 1), tal como Erlotinib e Gefitinib (22-26). 1.3.2. KRASO gene KRAS (do inglês Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) codifica uma proteína de mesmo nome, membro da superfamília das pequenas GTPases e que atua como mensagem secundário envolvido na proliferação celular (28, 29). Esta proteína desempenha funções oncogênicas e tem sido associada a malignidades diversas, incluindo carcinoma de pâncreas, colorretal e de pulmão (29-31). As mutações do gene KRAS são mais comuns no subtipo NSCLC e cerca de um terço dos pacientes com este subtipo tumoral são carreadores de mutações somáticas presentes nos códons 12 e 13 deste gene (32). Ao contrário das mutações do gene EGFR, as mutações no gene KRAS são associadas a pacientes fumantes e prognóstico desfavorável. (33, 34). Até o momento, não há terapia alvo eficaz para os pacientes carreadores de mutações no gene KRAS, no entanto, estes pacientes parecem não se beneficiam das terapias com inibidores de tirosina quinase (35). Além disso, pacientes com mutações nos genes EGFR e KRAS concomitantemente não apresentaram benefícios com o tratamento dos inibidores do EGFR (36). 1.3.3. EML-ALKA quinase de linfoma anaplásico (ALK, do inglês Anaplastic lymphoma kinase) é um receptor tirosina quinase com funções biológicas ainda não esclarecidas. O gene ALK, codificador desta quinase, é normalmente expresso no intestino delgado, testículos e sistema nervoso central de humanos adultos (37). A translocação do gene, resultado da fusão de pequenas inversões do cromossomo 2p, tem atividades oncogênicas em NSCLC (38). A frequência desta alteração nos pacientes com este subtipo do câncer de pulmão é inferior a 15% (38-40). O gene codificador da proteína equinoderma associada a microtubulos do tipo 4 (EML4, do inglês echinoderm microtubule associated protein like 4) localiza-se no braço curto do cromossomo 2 próximo da localização do gene ALK (38). Uma inversão no braço curto do cromossomo 2 nos loci 21 e 23 resulta em um gene composto pela fusão do gene ALK com o gene EML4. A proteína quinase codificada por este "novo" gene é altamente oncogênica e é responsável pela origem dos NSCLC em um subgrupo de pacientes (38). A presença da translocação ALK-EML4 e a presença de

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



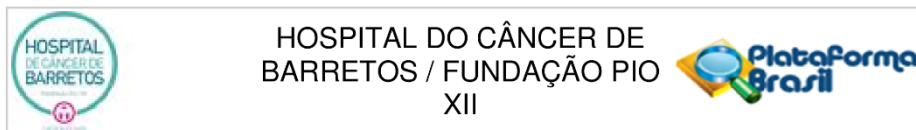
Continuação do Parecer: 3.121.693

mutações nos genes EGFR e KRAS são, geralmente, mutualmente exclusivas (39, 40). Por esta razão e também pela frequência da translocação ALK-EML4 ser inferior à presença de mutações dos genes EGFR e KRAS, recomenda-se realizar a investigação da translocação ALK-EML4 em casos que mutações nos genes EGFR e KRAS forem ausentes (41). O crizotinib, um inibidor oral do domínio de tirosina quinase de ALK, mostrou-se eficaz em diminuir a atividade tumoral em linhagens celulares e em prolongar a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão da doença em pacientes com NSCLC carreando translocações do gene ALK (42, 43). Portanto, a detecção das translocações de ALK faz-se importante para prever uma resposta clínica favorável ao crizotinib quando alterações dos genes EGFR e KRAS estão ausentes (44). Até o momento, o único teste diagnóstico para detecção dos rearranjos de ALK em NSCLC aprovado pelo FDA para uso clínico é o FISH (41). No entanto, novas tecnologias já tem sido utilizadas com o mesmo fim, inclusive com a possibilidade de se avaliar rearranjos em outros genes concomitantemente, como as fusões envolvendo os genes RET e ROS1 (45).

1.4. Biomarcadores do câncer de pulmão

Marcadores tumorais biológicos são produtos moleculares secretados pelo tecido neoplásico e caracterizado em células e fluidos corporais capazes de distinguir o que está em condição normal ou cancerosa (29, 46). Estes biomarcadores encontrados nos fluidos biológicos podem ser proteínas, RNAs, miRNAs, DNAs metilados e células tumorais circulantes. A identificação dos marcadores biológicos podem auxiliar na determinação do estadiamento tumoral, podem prever recorrência e podem auxiliar no monitoramento da resposta ao tratamento (47). Dentre os fluidos corporais, o sangue é o mais comumente utilizado em estudos para investigação de biomarcadores por ser de fácil acesso e por ser coletado dos pacientes para análises bioquímicas rotineiramente (47). Nos últimos anos, muito estudos surgiram avaliando biomarcadores em câncer de pulmão. Estes biomarcadores têm sido identificados, principalmente, com fins de prognóstico, diagnóstico, predição e detecção precoce da doença. Dentre os principais biomarcadores de câncer de pulmão destacam-se os fragmentos de citoqueratina 19 (CYFRA, do inglês Cytokeratin 19 Fragments), o antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês CarcinoEmbryonic Antigen), antígeno SCC, enolase neurônio-específica (NSE, do inglês Neuron-Specific Enolase), peptídeo liberador de progastrina (ProGRP, do inglês Progastrin-Releasing Peptide), EGFR, sendo este último o marcador mais importante do ponto de vista prático, devido à sua importância na terapêutica da doença, como supracitado (47). As células tumorais circulantes (CTC) estão presentes na corrente sanguínea de pacientes com tumores sólidos e desempenham um papel importante na metástase (48). O desenvolvimento de novas tecnologias, tais como os sequenciamentos de nova geração e a PCR digital, tem permitido a utilização das CTCs como biópsia líquida, em especial em tecidos tumorais

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.121.693

em que a remoção e/ou a biópsia são um desafio, como é o caso do tecido pulmonar (49, 50). Como supracitado, detecção de mutações no gene EGFR são fundamentais para o tratamento e para a predição do prognóstico dos pacientes carreadores destas mutações (26). Estas mutações foram detectadas em 84% das amostras de biópsia líquida de pacientes com NSCLC por sequenciamento de nova geração, resultado este compatível com os resultados encontrados no tecido tumoral (51). Desta forma, a identificação de mutações com papel importante na tumorigênese pulmonar, como as mutações do gene EGFR, em amostras de fácil obtenção aumenta as chances de diagnóstico mais precoce e permite o monitoramento da doença de forma menos invasiva.

#### HIPÓTESE:

A hipótese do presente estudo é que a identificação de biomarcadores por meio da análise do perfil molecular do câncer de pulmão poderão auxiliar na detecção precoce da doença e no monitoramento da resposta ao tratamento bem como na determinação do estadiamento tumoral e na predição de recorrência. Além disso, a identificação destes biomarcadores abrem perspectivas para novos alvos terapêuticos que poderão, no futuro, ser aplicados à prática clínica.

#### Objetivo da Pesquisa:

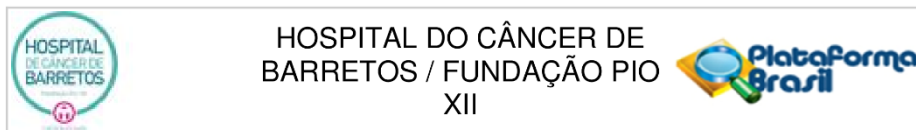
##### OBJETIVO PRIMÁRIO:

Elaborar o perfil molecular envolvendo mutações somáticas, rearranjos e alterações cromossômicas, expressão de miRNAs e dos principais genes envolvidos com a carcinogênese humana e correlacionar com as informações epidemiológicas e clínico-laboratoriais dos carcinomas de pulmão do Hospital de Câncer de Barretos.

##### OBJETIVO SECUNDÁRIO:

i. Realizar o perfil mutacional somático das amostras com câncer de pulmão em estágios iniciais (n=200) por exoma;ii. Realizar o estudo de rearranjos (ALK, RET e ROS1) e alterações cromossômicas (CNV) por NanoString em 100 casos de câncer de pulmão;iii. Realizar o perfil de expressão gênica do painel PanCancer (770 genes) e de miRNAs (800 alvos) por NanoString em 100 casos de câncer de pulmão e 20 controles normais;iv. Levantamento sociodemográfico e clinicopatológico dos 100 casos a serem avaliados por meio da análise de prontuários;v. Correlacionar os achados moleculares com os achados sociodemográficos e clinicopatológicos; vi. Detectar as mutações e microRNAs mais frequentes identificadas pelo exoma em biópsia líquida

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.121.693

destes pacientes por NGS e PCR digital; vii, validação de um painel molecular para predição de resposta ao tratamento com quimioterapia adjuvante.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS:**

Não há risco de identificação de alterações hereditárias (mutações germinativas) e, portanto, não há possibilidade de encontrar, acidentalmente, nenhum tipo de câncer hereditário. O risco principal deste estudo é a quebra acidental de sigilo, que os pesquisadores cuidadosamente vão procurar minimizar, tomando todo o cuidado necessário e utilizando medidas de segurança quanto à confidencialidade, privacidade e armazenamento de dados. O estudo é considerado de baixo risco para o paciente por não envolver procedimentos invasivos e por se tratar de um estudo retrospectivo. A análise molecular será realizada retrospectivamente nos tecidos de amostras de carcinomas de pulmão congeladas e em tecidos de lesões incluídos em blocos de parafina bem como tecidos de pulmão normal incluídos em parafina provenientes de indivíduos que tiveram morte súbita ou acidental.

**BENEFÍCIOS:**

Não há benefício para o paciente participante do estudo. O potencial benefício do estudo para a sociedade é que por meio do perfil de mutações somáticas, possa ser caracterizado molecularmente o tipo de tumor, o que pode propiciar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos futuros. Além disso, este estudo pode possibilitar subsídios para uma avaliação dos fatores e profissões de risco de desenvolver o câncer de pulmão.

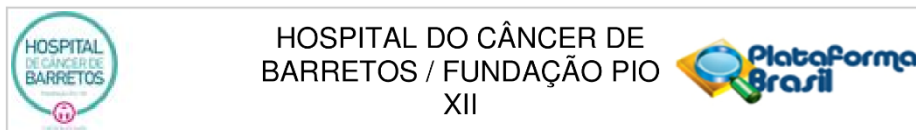
**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A presente submissão trata-se de E6 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- Formulário\_para\_Emenda.docx
- Formulário\_para\_Emenda\_.pdf.pdf
- Perfil\_Molecular\_do\_Cancer\_de\_Pulmao\_HCB\_EMENDA\_6.docx
- Folha\_rosto.pdf
- PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1277865\_E6.pdf

O que se propõe a EMENDA apresentada:

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.121.693

1. Inclusão de membro da equipe (pagina 1): Maria Fernanda Santiago Gonçalves, elaboração projeto de Mestrado do programa de pós graduação, Hospital de Amor/Fundação PIO XII- Barretos, Brasil.
2. Inclusão de objetivo específico: Validação de um painel molecular para predição de resposta ao tratamento com quioterapia adjuvante.
3. Aumento do número de casos: Inclusão de mais 600 casos de câncer de pulmão de não pequenas células, para validação do painel molecular. O total de casos do presente projeto serão de 800 casos.
4. Inclusão de metodologia, para validação de um painel molecular nCounter® Elements, para direcionamento do tratamento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

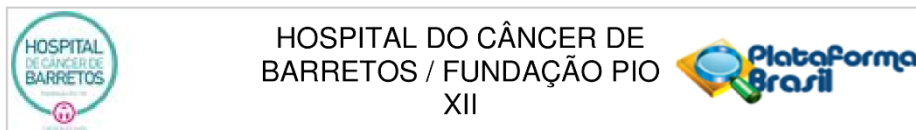
O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1139/2016, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 16/01/2019;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- O Estudo deve Continuar;
- O Estudo dever ser Interrompido;
- O Estudo está Finalizado;
- Solicita-se Esclarecimento;

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.121.693

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1277865_E6.pdf	16/01/2019 13:27:16		Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	16/01/2019 12:51:28	Maria Fernanda Santiago Gonçalves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Perfil_Molecular_do_Cancer_de_Pulmao_HCB_EMENDA_6.docx	16/01/2019 12:45:01	Maria Fernanda Santiago Gonçalves	Aceito
Outros	Formulario_para_Emenda_.pdf.pdf	16/01/2019 12:42:49	Maria Fernanda Santiago Gonçalves	Aceito
Outros	Formulario_para_Emenda.docx	16/01/2019 12:42:07	Maria Fernanda Santiago Gonçalves	Aceito
Outros	Cadastro_Projeto_n200.pdf	24/10/2017 11:08:02	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Levantamento_material_biologico.xlsx	13/06/2016 10:24:22	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Declaracao_ciencia_estudo_Chefia.pdf	29/04/2016 12:52:43	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Declaracao_Fonte_de_Financiamento_PioXII.pdf	25/04/2016 14:00:26	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Declaracao_Responsabilidade_Pesquisador.pdf	25/04/2016 10:36:11	Letícia Ferro Leal	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 25 de Janeiro de 2019

Assinado por:  
**Maicon Fernando Zanon da Silva**  
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

**Anexo B - Artigo Científico**

Declaro que o artigo está em fase de elaboração.