

Bruna Beatriz Duarte de Souza

Caracterização funcional *in vitro* do gene *HERC2* e avaliação de patogenicidade de suas variantes em uma série brasileira de câncer de pulmão de não pequenas células

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos como requisito para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Ferro Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira

Barretos, SP

2023

Bruna Beatriz Duarte de Souza

Caracterização funcional *in vitro* do gene *HERC2* e avaliação de patogenicidade de suas variantes em uma série brasileira de câncer de pulmão de não pequenas células

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos como requisito para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Ferro Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira

Barretos, SP

2023

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.

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

AGRADECIMENTOS

À minha família, que me proporcionou a base para que eu pudesse me dedicar aos estudos durante tantos anos, que me estimulou e me apoiou nas minhas escolhas, e que sempre me recebe de braços abertos. À Esther, pelo cuidado, pela atenção indisputada e por me motivar constantemente a ir em frente; Aos meus amigos que, mesmo de longe, eu sinto o apoio e a torcida;

À minha orientadora, Dra. Letícia Ferro, pelo suporte, pelas ideias, pelo entusiasmo contagiante com o projeto e pela disponibilidade em ensinar. Pelo apoio irrestrito e garra na defesa dos meus direitos; Ao meu co-orientador, Dr. Renato Oliveira, pela parceria e contribuições no planejamento do trabalho;

Ao Grupo Translacional em Oncologia Pulmonar (GTOP), pelas contribuições ao projeto e à minha formação em geral, através de discussões produtivas e enriquecedoras;

À Thayane, parte integral deste trabalho, que foi meus braços durante a reta final do projeto. Muito obrigada, pela disposição, esforço e cuidado com os nossos resultados. Este trabalho também é de sua autoria. Aos demais alunos do grupo, que compartilham as preocupações, incentivam e ajudam a colocar as coisas em perspectiva;

Aos colegas de pós-graduação, por me acolherem, me ajudarem e me incentivarem a finalizar o curso. Vocês foram rede de apoio essencial para quem estava longe da família e amigos, em um estado distante. Obrigada pelo bom humor e leveza no ambiente de trabalho e pela convivência fora dele também;

A todos os professores do curso de pós-graduação, que contribuíram para o meu crescimento profissional crítico e no desenvolvimento das habilidades necessárias para a obtenção do título de mestre;

Ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), nas pessoas de suas biologistas, Karina Pepinelli, Izabela Gomes, Carolina Laus e Letícia Braga, por todo o suporte durante os anos da minha residência e mestrado. Agradeço todos os puxões de orelha,

ensinamentos, acolhimento e empatia, vocês ajudaram na realização de todas as etapas experimentais deste trabalho;

À equipe de bioinformática: Adriane Feijó, Edilene Santos, Luciane Sussuchi e Wellington dos Santos;

Ao diagnóstico molecular do Hospital de Amor, pelo suporte na execução de experimentos e no entendimento de protocolos e reagentes;

À banca de acompanhamento, Dr. Rui Reis e Dr. Sonir Antonini, que me direcionou durante todo o mestrado, fazendo críticas e elogios a partir de uma visão externa ao projeto;

À banca avaliadora, Dr. Sonir Antonini e Dra. Michelly Pereira, pelo aceite e disposição em contribuir com o trabalho;

À Secretaria de Pós-graduação, pela administração do curso e suporte nas questões acadêmicas;

Ao Hospital de Amor, pelo financiamento, estrutura e suporte.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Epidemiologia.....	18
1.2 Fatores de Risco.....	18
1.3 Histologia.....	19
1.4 Diagnóstico, Estadiamento e Prognóstico	20
1.5 Tratamento.....	22
1.6 Aspectos Moleculares.....	24
1.7 Resultados prévios do Grupo Translacional de Oncologia Pulmonar	25
1.8 <i>HERC2</i>	27
1.9 <i>HERC2</i> e câncer.....	29
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
5 METODOLOGIA.....	32
5.1 Desenho de estudo e casuística.....	32
5.2 <i>Whole-Exome Sequencing</i> (WES)	32
5.3 Análise de ancestralidade genética	32
5.4 Predição de patogenicidade das variantes	33
5.5 Análise de bancos de dados	33
5.6 Análises de dados sociodemográficos e sobrevida.....	34
5.7 Análise funcional <i>in vitro</i>	35
5.7.1 Seleção das linhagens celulares.....	35
5.7.2 Silenciamento do gene <i>HERC2</i> por esiRNA	35
5.7.3 Avaliação da expressão proteica por <i>Western Blotting</i>	36

5.7.4 Avaliação de proliferação celular	36
5.7.5 Avaliação de migração e invasão	37
5.7.6 Avaliação de ciclo celular – citometria de fluxo	38
5.7.7 Avaliação de sensibilidade ao tratamento com cisplatina	38
5.7.8 Análises estatísticas	38
5.8 Aspectos éticos	38
5.9 Financiamento	39
6 RESULTADOS	40
6.1 Estudos genômicos e <i>in silico</i>	40
6.1.1 Frequência mutacional.....	40
6.1.2 Associação do status mutacional de <i>HERC2</i> a dados clínicopatológicos e sociodemográficos.....	46
6.1.3 Associação do status mutacional de <i>HERC2</i> com desfecho.....	50
6.2 Estudos funcionais <i>in vitro</i>	54
6.2.1 Expressão proteica basal das linhagens selecionadas.....	54
6.2.2 Silenciamento gênico por esiRNA	54
6.2.3 Avaliação de proliferação celular – xCELLigence.....	55
6.2.4 Avaliação de migração e invasão	55
6.2.5 Avaliação de ciclo celular – citometria de fluxo	56
6.2.6 Avaliação de sensibilidade ao tratamento com cisplatina	57
7 DISCUSSÃO	58
8 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO A	75
ANEXO B.....	76
Basal	76
48h	78

72h e 96h	80
-----------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número estimado de casos incidentes e mortes no mundo para ambos os sexos e todas as idades (exceto câncer de pele não-melanoma). Modificado de Globocan, 2020 ¹ .	18
Figura 2 - Tipo histológicos de câncer de pulmão.	20
Figura 3 - Estadiamento dos casos de câncer de pulmão e brônquios atendidos no Hospital de Amor no ano de 2021.	21
Figura 4 - Sobrevida global por estadiamento de acordo com o sugerido para a 8ª edição da classificação TNM da <i>American Joint Committee on Cancer</i> ²⁸ .	22
Figura 5 - Opções terapêuticas para câncer de pulmão não pequenas células de acordo com o estadiamento. Fonte: NCCN Guidelines ²⁴ .	24
Figura 6 - Genes que apresentam alterações <i>drivers</i> em Adenocarcinoma avançado. Adaptado de Skoulidis et.al. ⁵⁴ .	25
Figura 7 - <i>Heatmap</i> dos casos avaliados de Adenocarcinoma com os principais genes <i>drivers</i> para este subtipo histológico, com destaque para o gene <i>HERC2</i> . As diferentes cores representam categorias das mutações detectadas (legenda à esquerda).	26
Figura 8 - <i>Heatmap</i> dos casos avaliados de CEC com os principais genes <i>drivers</i> para este subtipo histológico, com destaque para o gene <i>HERC2</i> . As diferentes cores representam categorias das mutações detectadas (legenda à esquerda).	27
Figura 9 - Domínios presentes na proteína HERC2. Fonte: Pfam (Id: O95714) e adaptado de Sala-Gaston et. al., 2020 ⁶¹ .	28
Figura 10 - Fluxograma descrevendo a predição de impacto realizada pelo <i>Cancer Genome Interpreter</i> (CGI) das variantes encontradas no exoma completo realizado pelo grupo. WES: <i>Whole-Exome Sequencing</i> .	41
Figura 11 - <i>Integrative Genomic Viewer</i> (IGV) demonstrando a cobertura e frequência alélica (VAF) de algumas variantes patogênicas, o identificador abaixo de cada coluna (AD_X) especifica a amostra em que a variante foi observada. No painel superior, mostramos a região analisada na amostra germinativa do indivíduo; no painel inferior, temos imagens representativas da mesma região na amostra tumoral (somática). As cores azul, verde e laranja representam <i>reads</i> com as variações detectadas (VAF), enquanto os traços cinzas representam o total de <i>reads</i> (cobertura vertical).	43

Figura 12 - Variantes preditas como patogênicas em amostras de adenocarcinoma da presente casuística. Na imagem está representada a estrutura proteica da proteína HERC2, com seus domínios destacados por cores diversas. Variantes intrônicas não estão visíveis. Eixo Y, número de vezes em que a variante foi detectada; eixo X, número dos aminoácidos e a respectiva localização na proteína. Figura construída com Oncoprinter ⁶⁰ .	44
Figura 13 - Variantes preditas como patogênicas em amostras de CEC da presente casuística. Na imagem está representada a estrutura proteica da proteína HERC2, com seus domínios destacados por cores diversas. Eixo Y, número de vezes em que a variante foi detectada; eixo X, número dos aminoácidos e a respectiva localização na proteína.. Figura construída com Oncoprinter ⁶⁰ .	44
Figura 14 - Distribuição de variantes no gene <i>HERC2</i> em adenocarcinoma nos bancos de dados (A) cBioPortal e (B) IntOgen.	46
Figura 16 - Perfil da contribuição das diferentes ancestralidades genéticas para indivíduos selvagens para <i>HERC2</i> (<i>HERC2</i> ^{WT}) e portadores de variantes neste gene (<i>HERC2</i> ^{MUT}). As cores representam cada grupo étnico avaliado: Europeu (verde), Africano (vermelho), Ameríndio (amarelo) e Asiático (azul).	47
Figura 17 - Associação entre <i>HERC2</i> e TMB segundo dados do cBioPortal.	49
Figura 18 - Análise de correlação entre o nível de expressão gênica de <i>HERC2</i> e <i>TP53</i> segundo dados do TCGA disponíveis no cBioPortal. A - Gráfico de dispersão com linha de regressão em amostras de adenocarcinoma; B - Gráfico de dispersão com linha de regressão em amostras de CEC.	50
Figura 19 - Sobrevida global (em meses) comparando o grupo de pacientes com variantes patogênicas no gene <i>HERC2</i> (n=13) e o grupo de pacientes com status selvagem para este gene ou com variantes benignas (n=110). Valores correspondentes à mediana de sobrevida.	51
Figura 20 - Análise de sobrevida global para o total de indivíduos com CPNPC (A), para Adenocarcinoma (B) e para CEC (C) com <i>HERC2</i> ^{WT} e <i>HERC2</i> ^{MUT} utilizando dados do cBioPortal ⁶⁰ .	52
Figura 21 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para variantes no gene <i>HERC2</i> em Adenocarcinoma (n=508) (A) e CEC (n=488) (B) utilizando dados do <i>KM Plotter</i> ¹¹⁷ .	53

Figura 22 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para expressão gênica do gene <i>HERC2</i> em Adenocarcinoma (n=672) (A) e CEC (n=271) (B) utilizando dados do <i>KM Plotter</i> ¹¹⁷	53
Figura 23 - Expressão proteica basal de <i>HERC2</i> nas linhagens CORL105, H292 e SK-MES-1. Controle endógeno utilizado para normalização foi a α -tubulina.	54
Figura 24 - Quantificação proteica de <i>HERC2</i> por <i>western blot</i> evidenciando o silenciamento desta proteína na linhagem SK-MES-1 após 48h, 72h e 96h.	54
Figura 25 - Gráfico de proliferação em tempo real até o tempo 229h, correspondente a 100% de ocupação do controle negativo esiEGFP.	55
Figura 26 - Ensaio de migração e invasão das células silenciadas. A - Painel de imagens representativas de cada condição nos dois ensaios. B - Comparação da média das contagens de células que migraram nas três condições. C - Comparação da média das contagens de células que invadiram nas três condições.	56
Figura 27 – Avaliação de ciclo celular por citometria de fluxo. Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após 36h (A) e 96h (B) de silenciamento.	56
Figura 28 - Determinação de IC50 para cisplatina. A. Curva de dose-resposta. B. Comparação da média entre os IC50 determinados em dois experimentos independentes.....	57
Figura 29 - Esquema proposto do impacto do silenciamento de <i>HERC2</i> na resposta celular ao tratamento com platinas.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Predição de patogenicidade*, classificação de deleteriedade* e frequência alélica (VAF) das variantes encontradas no gene <i>HERC2</i> em nossa casuística.	42
Tabela 2 - Frequências mutacionais e total de variantes descritas para <i>HERC2</i> nos bancos de dados consultados e encontradas por WES realizado pelo grupo de pesquisa.	45
Tabela 3 - Análise estatística de características sociodemográficas e histológicas quanto ao status mutacional para <i>HERC2</i>	47
Tabela 4 - Associação do status mutacional de <i>HERC2</i> e ancestralidade genética.	48
Tabela 5 - Regressão de Cox multivariada para as variáveis tabagismo e status mutacional do gene <i>HERC2</i>	51
Tabela 6 - Descrição das replicatas de definição de IC50 para cisplatina dos três grupos experimentais.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AFR	Ancestralidade Africana
AIM	Ancestry Informative Markers
AME	Ancestralidade Ameríndia
ASN	Ancestralidade Asiática
cBioPortal	cBio Cancer Genomics Portal
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
CGI	Cancer Genome Interpreter
CNV	Copy Number Variation
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CPNPC	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
CPPC	Câncer de Pulmão de Pequenas Células
CT	Computed Tomography
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EGA	European Genome-Phenome Archive
esiRNA	RNA de interferência pequeno preparado enzimaticamente
EUR	Ancestralidade Europeia
GDC	Genomic Data Commons
GEO	Gene Expression Omnibus
GST	Gene Supressor Tumoral
GTOP	Grupo Translacional em Oncologia Pulmonar
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HERC2	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC50	Concentração Inibitória média
IGV	Integrative Genomic Viewer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INDEL	Inseção e deleção
IntOGen	Integrative OncoGenomics
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer

PET	Positron Emission Tomography
RR	Razão de Risco
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SUS	Sistema Único de Saúde
TCGA	The Cancer Genome Atlas
VAF	Variant Allelic Frequency
VATS	Video-assisted Thoracic Surgery
WES	Whole-Exome Sequencing
WGS	Whole-Genome Sequencing

RESUMO

Souza BBD. Caracterização funcional *in vitro* do gene *HERC2* e avaliação de patogenicidade de suas variantes em uma série brasileira de câncer de pulmão de não pequenas células. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2023.

Justificativa: O gene *HERC2* apresenta expressiva frequência mutacional em câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), e possui funções associadas ao desenvolvimento tumoral. Porém, pouco se conhece sobre sua relevância no CPNPC.

Objetivos: Descrever a frequência mutacional e a patogenicidade de variantes no gene *HERC2* em amostras de câncer de pulmão de não pequenas células – adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas – e caracterizar seu papel funcional *in vitro* na carcinogênese pulmonar.

Materiais e Métodos: A frequência mutacional do gene *HERC2* foi avaliada por WES realizado anteriormente (N=123), a predição de impacto de tais variantes foi realizada pelo *Cancer Genome Interpreter* (CGI) e associadas a características clínicas. Os bancos de dados cBioPortal, IntOGen, GDC-NCI e *KM Plotter* foram consultados quanto à frequência mutacional e expressão gênica de *HERC2* e associações com características clínicas e sobrevida em CPNPC. A avaliação *in vitro* foi realizada com a linhagem SK-MES-1(*HERC2*^{WT}), na qual transfectamos esiRNA contra o gene *HERC2* a fim de alcançar o silenciamento gênico. Em seguida, analisamos a proliferação celular em tempo real por 20 dias (xCELLigence), migração (*trans-well*), invasão (Matrigel), ciclo celular (citometria de fluxo), e sensibilidade ao tratamento com cisplatina. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis.

Resultados: A frequência mutacional de *HERC2* em nossa casuística total foi de 10,5% (N=13/123), estando os adenocarcinomas alterados em 8,8% (N=8/90) e os CEC em 15,1% (N=5/33). Do total de 23 variantes encontradas em *HERC2*, 15 foram preditas como *drivers* (Tier 1: 9 variantes; Tier 2: 6 variantes). Em nossa casuística, pacientes *HERC2*^{WT} apresentaram 13,8 meses a mais no tempo de sobrevida global quando comparado aos *HERC2*^{MUT} (p=0,271). Nos bancos de dados, a frequência mutacional do gene *HERC2* variou entre 8,2-15% em carcinoma de células escamosas e 1,69-13% em adenocarcinoma, sendo que, neste grupo, a alta expressão de *HERC2* foi associada à maior sobrevida (RR=0,73; p=0,021). A presença de variante em *HERC2* se correlacionou com um aumento na carga mutacional (p<0,001). Nós obtivemos um silenciamento gênico satisfatório nos tempos 48h, 72h e 96h. *In vitro*, células *HERC2-knockdown* proliferaram 57,4% menos que o controle negativo e apresentaram um aumento de 12 unidades no IC50, sugerindo certa resistência ao tratamento com cisplatina. Não observamos diferenças nos fenótipos de migração, invasão e no ciclo celular.

Conclusão: O gene *HERC2* apresenta maior frequência mutacional em CEC, associa-se à ampliação da sobrevida global em adenocarcinomas e está correlacionado à carga mutacional. O silenciamento desse gene diminui a proliferação celular e confere resistência ao tratamento com cisplatina.

Palavras-chave: gene *HERC2*; câncer de pulmão; estudos funcionais in vitro; reparo ao DNA; tratamento com cisplatina.

ABSTRACT

Souza BBD. *In vitro* functional characterization of *HERC2* gene and evaluation of its variants pathogenicity in a Brazilian series of non-small cell lung cancer. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2023.

Background: The *HERC2* gene is frequently mutated in non-small cell lung cancer (NSCLC) and has pathophysiological functions associated with cancer development. However, little is known about its relevance to lung cancer. **Aim:** To describe the mutational frequency and pathogenicity of *HERC2* variants in NSCLC samples—adenocarcinoma and squamous cell carcinoma—and to characterize *HERC2*'s functional role in pulmonary carcinogenesis *in vitro*. **Material and Methods:** We evaluated *HERC2* mutational frequency through Whole-Exome sequencing previously performed (N = 123), then predicted the impact of the unveiled variants using the Cancer Genome Interpreter (CGI) and associated to clinical features. The databases cBioPortal, IntOGen, GDC-NCI, and KM Plotter were utilized to assess *HERC2* mutational frequency and gene expression and to gather related clinical and survival information when available. *In vitro* evaluation consisted of the silencing of the *HERC2* gene in the SK-MES-1 (*HERC2*^{WT}) cell line through the transfection of esiRNA against *HERC2*. Afterward, we measured the cellular proliferation in real time for 20 days (xCELLigence), migration (*trans-well*), invasion (Matrigel), cell cycle (flow cytometry), and the sensibility to cisplatin (MTS). Statistical analysis was performed with the Kruskal-Wallis test.

Results: The mutational frequency of *HERC2* in our series was 10.5% (N=13/123), with adenocarcinomas altered in 8.8% (N=8/90) and SqCC in 15.1% (N= 5/33). Of the total 23 variants found in *HERC2*, 15 were predicted as drivers (Tier 1: 9 variants; Tier 2: 6 variants). In our series, *HERC2*^{WT} patients had 13.8 months longer overall survival when compared to *HERC2*^{MUT} (p=0.271). In databases, *HERC2* mutational frequency ranged from 8.2 to 15% in SqCC and 1.69-13% in adenocarcinoma, and in the last group, *HERC2* high expression was associated with greater survival (RR=0.73; p=0.021). The presence of a variant in *HERC2* correlated with an increase in mutational burden (p<0.001). We obtained satisfactory gene silencing at 48h, 72h and 96h. *In vitro*, *HERC2*-knockdown cells proliferated 57.4% less than the negative control and showed an increase of 12 units in IC50, suggesting some resistance to cisplatin treatment. We did not observe differences in migration, invasion and cell cycle phenotypes.

Conclusion: The *HERC2* gene presents higher mutational frequency in SqCC, it is associated to longer overall survival in adenocarcinomas, and it is correlated to mutational burden. *HERC2* gene silencing decreases cellular proliferation and grants resistance to cisplatin treatment.

Key-words: *HERC2* gene; lung cancer; *in vitro* functional studies; DNA repair; Cisplatin treatment.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

No mundo, em termos de números brutos, o câncer de pulmão ocupa a segunda colocação em incidência (2,2 milhões de novos casos, 11,4% do total), estando atrás apenas do câncer de mama (Figura 1). Ele é o principal responsável por mortes por câncer (1,8 milhão de mortes, 18% do total)¹. A previsão do GLOBOCAN para 2040 indica um aumento de 67% no número de mortes causadas por este tipo tumoral.

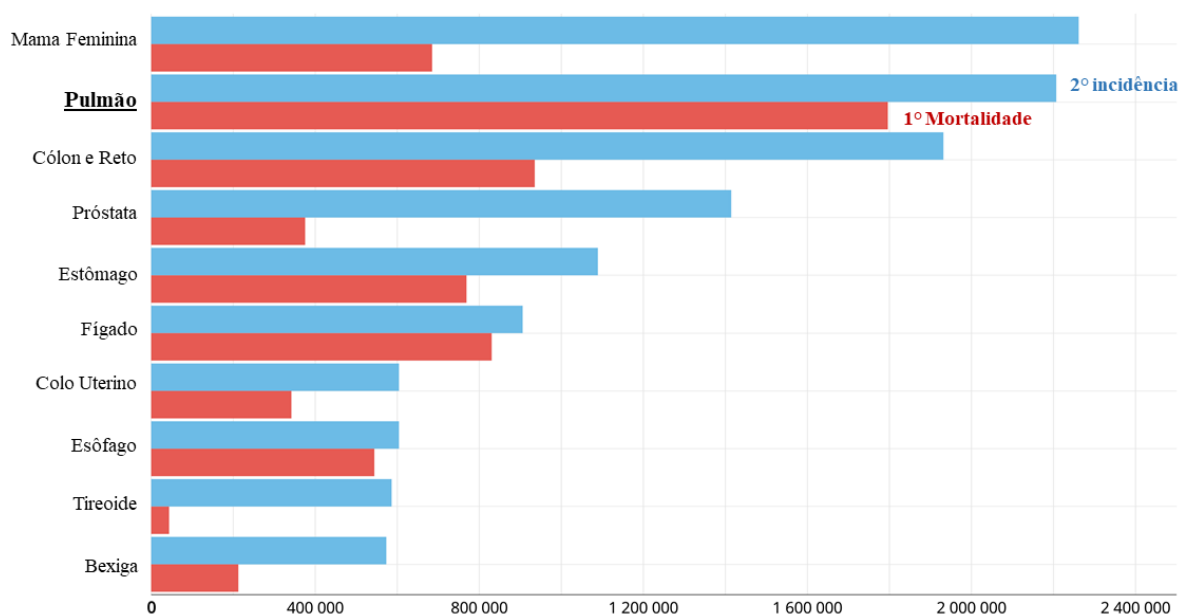


Figura 1 - Número estimado de casos incidentes e mortes no mundo para ambos os sexos e todas as idades (exceto câncer de pele não-melanoma). Modificado de Globocan, 2020¹.

O câncer de pulmão é o quarto tipo de câncer mais incidente no Brasil (excluindo o câncer de pele não-melanoma), somando 6,7% dos casos estimados para o triênio 2023-2025². A projeção do Instituto Nacional do Câncer – o INCA – descreve o câncer de pulmão como o terceiro mais incidente em homens e o quarto mais incidente em mulheres; e estima uma incidência de 12,73 novos casos a cada 100 mil homens e 9,26 a cada 100 mil mulheres². No Hospital de Amor de Barretos, são diagnosticados aproximadamente 500 novos casos de câncer de pulmão a cada ano e cerca de 70% destes casos são diagnosticados com doença metastática³.

1.2 Fatores de Risco

O principal fator de risco no desenvolvimento de câncer de pulmão é o tabaco. O fumo de cigarros é a causa de 80 a 90% dos casos deste tipo de câncer, com um risco relativo em

fumantes de longo prazo de 10 a 30 vezes maior que em nunca fumantes⁴. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) descreve pelo menos 49 possíveis carcinógenos na fumaça de cigarros⁵.

O câncer de pulmão em nunca fumantes corresponde a 15% dos casos de câncer de pulmão em homens e 53% dos casos em mulheres e, visto como uma doença isolada, ocuparia a 7ª posição como causa de morte no mundo^{4, 6}. Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem estar associados ao câncer de pulmão em indivíduos não tabagistas. Dentre eles destacam-se: susceptibilidade genética⁷⁻⁹; poluição do ar^{10, 11}; exposição ao radônio; uso contínuo de ópio¹²; exposição ocupacional, com destaque para o asbesto, arsênico e sílica¹³; e doença pulmonar prévia, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)¹⁴.

1.3 Histologia

De acordo com características histomorfológicas, o câncer de pulmão é dividido em 2 grandes grupos: Câncer de Pulmão de Pequenas Células (CPPC ou SCLC, do inglês – *Small Cell Lung Cancer*) e Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células (CPNPC ou NSCLC do inglês – *Non Small Cell Lung Cancer*), os quais apresentam implicações clínicas, prognósticas e terapêuticas¹⁵ (Figura 2). O CPPC corresponde a 15% dos casos de câncer de pulmão; é tipicamente muito agressivo, com altas taxas de proliferação e metástase, exibindo forte associação com o tabagismo¹⁶. O CPNPC tem frequência predominante (85% dos casos) e pode ser subclassificado em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células¹⁷. Os adenocarcinomas são os mais frequentes dentre os CPNPCs (49,7%)¹⁸ e também o subtipo histológico mais frequente entre os não tabagistas, com uma localização geralmente periférica, características glandulares, expressando os marcadores imuno-histoquímicos TTF-1 ou Napsin-A¹⁹. O segundo CPNPC mais comum é o carcinoma de células escamosas (22,7%)¹⁸, fortemente associado ao tabagismo, com aparecimento mais central e características escamosas (queratinização, expressão de p40, p63, CK5/6)¹⁹.

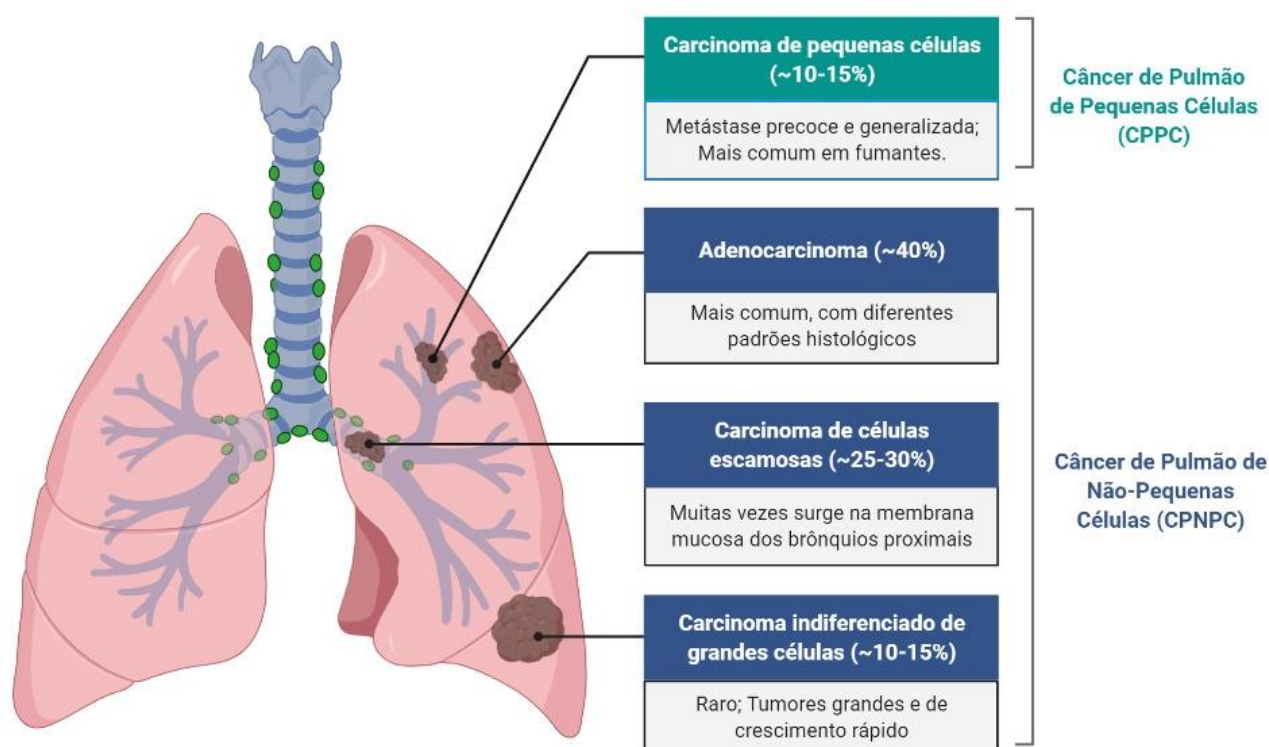


Figura 2 - Tipo histológicos de câncer de pulmão.

1.4 Diagnóstico, Estadiamento e Prognóstico

A taxa de sobrevida em 5 anos do câncer de pulmão de não pequenas células está na faixa de 10-20% na maioria dos países do mundo^{20, 21}. Esse cenário está relacionado com a detecção tardia, em parte, devido à ausência de sintomas patognomônicos e de início precoce, os quais aparecem de forma inespecífica com a progressão da doença. Na realidade do Hospital de Amor, 71,4% dos casos são diagnosticados em estágio avançado³ (Figura 3).

Estadiamento Clínico ao Diagnóstico

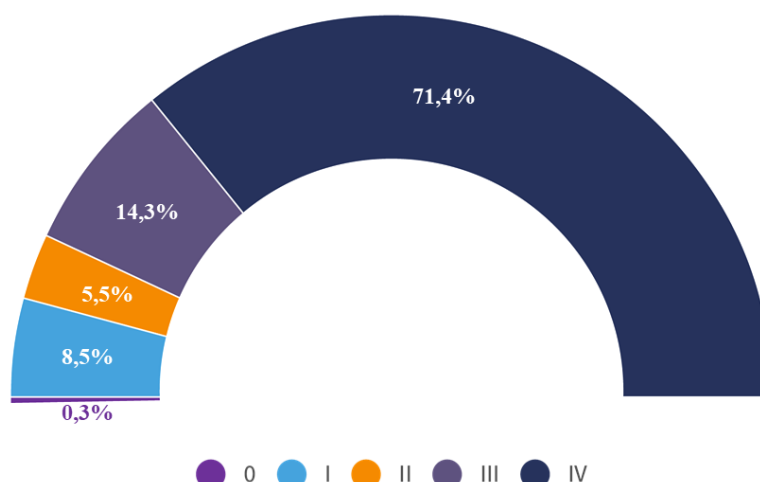


Figura 3 - Estadiamento dos casos de câncer de pulmão e brônquios atendidos no Hospital de Amor no ano de 2021.

O diagnóstico do câncer de pulmão se inicia com a queixa de sintomas como tosse persistente, hemoptise e dispneia ou pela descoberta incidental de lesões em exames de imagem²². Esses exames auxiliam na localização da lesão primária e na identificação de possíveis sítios metastáticos; os mais utilizados para diagnóstico de câncer de pulmão são a tomografia computadorizada (CT - *computed tomography*), a tomografia por emissão de pósitrons (PET Scan - *positron emission tomography*) e a ressonância magnética (MRI - *magnetic resonance imaging*)²³. Em seguida, tais lesões são biopsiadas a fim de confirmar o diagnóstico patológico.

Após confirmado o diagnóstico de câncer de pulmão, é realizado o estadiamento da doença para definição da conduta clínica. Para realizar o estadiamento não invasivo da doença, é utilizado PET Scan, o qual avalia a radiação emitida por um radiofármaco análogo da glicose (fluorodesoxiglicose) administrado na forma de contraste e capaz de indicar possíveis sítios tumorais por sua elevada captação de glicose, contribuindo para a escolha da lesão a ser biopsiada e descoberta de lesões suspeitas por todo o corpo²⁴. Devido à sua natureza metabólica, o PET Scan apresenta limitações anatômicas e geralmente é associada à CT, especialmente para avaliação de sistema nervoso central²⁵. O objetivo do estadiamento é descrever a extensão anatômica do câncer de forma padronizada, considerando o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M)²⁶. O agrupamento das determinações de cada componente avaliado (T, N, M) em um indivíduo dão origem a

categorias da doença com comportamento similar: os estágios I e II com linfonodos negativos são considerados iniciais, os estágios II e III com linfonodos comprometidos são localmente avançados e o estágio IV é avançado com presença de metástase à distância^{24, 27}. Cada um desses quatro estágios pode ainda ser dividido em subcategorias mais detalhadas de acordo com o TNM.

Para o CPNPC, o principal fator prognóstico é o estadiamento TNM, o qual associa-se a desfechos progressivamente piores conforme aumento do estágio (Figura 4)²⁸. Dentre os outros fatores clínicos que contribuem para o prognóstico estão idade, perda de peso, tabagismo e performance status – estado geral do indivíduo e sua habilidade de executar atividades rotineiras^{29, 30}.

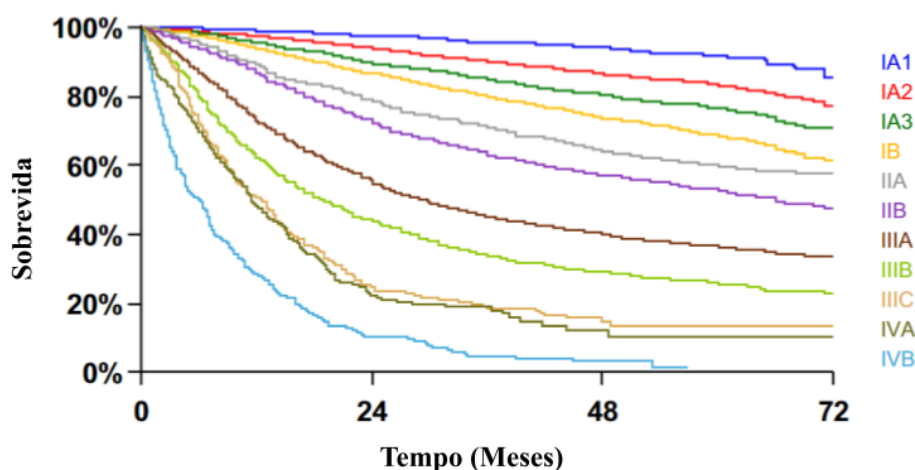


Figura 4 - Sobrevida global por estadiamento de acordo com o sugerido para a 8ª edição da classificação TNM da *American Joint Committee on Cancer*²⁸

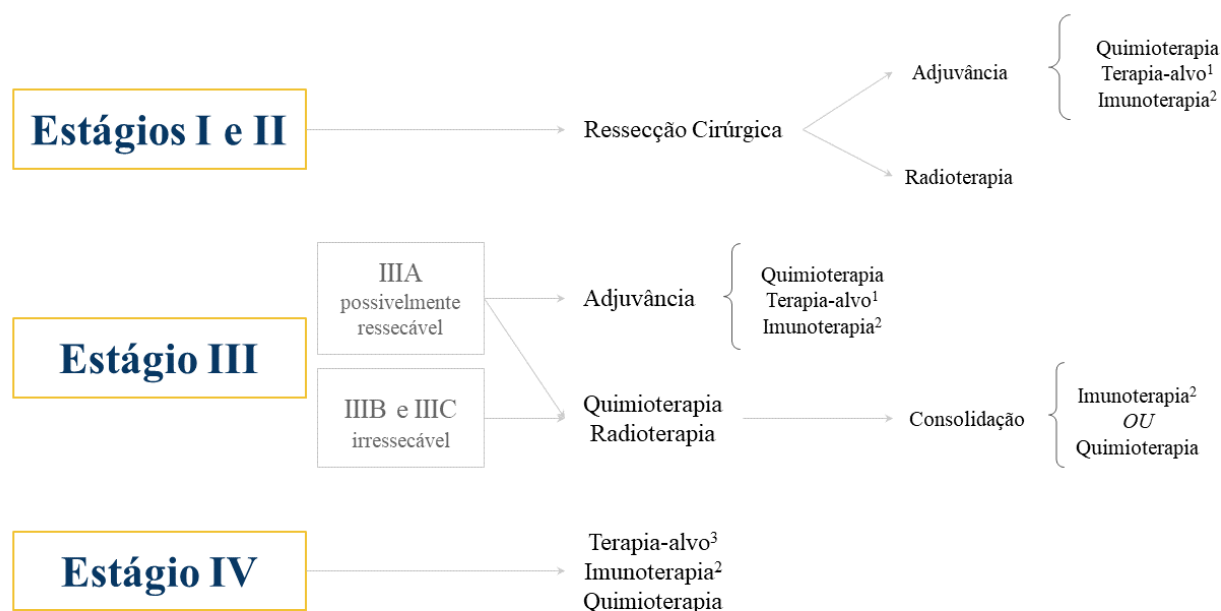
1.5 Tratamento

A abordagem terapêutica do câncer de pulmão é dividida em contextos de doença inicial e avançada (Figura 5). Na doença localizada, a ressecção cirúrgica é preferível³¹; mas alternativas como a radioterapia – na modalidade SBRT, do inglês *Stereotactic Body Radiation Therapy* – são utilizadas quando o paciente não é operável (devido à condição geral de saúde e/ou comorbidades) ou a cirurgia é considerada de alto risco³²⁻³⁴. Subsequente ao controle local, pode ser realizado o tratamento sistêmico em adjuvância, majoritariamente com quimioterapia, podendo ser empregada terapia alvo para pacientes com mutações no gene *EGFR*³⁵. A doença localmente avançada se beneficia da atuação conjunta da quimioterapia e da radioterapia, além da intervenção cirúrgica quando o tumor for ressecável (terapia trimodal). Após quimiorradioterapia definitiva, a consolidação pode ser realizada com imunoterapia ou quimioterapia^{24, 36}.

Na presença de metástases à distância (estágio IV), a terapia sistêmica é recomendada, com tratamento local por radioterapia paliativa tanto do tumor primário e quanto de oligometástases. Além da quimioterapia citotóxica convencional, os pacientes com CPNPC metastático têm como opções de tratamento sistêmico a terapia alvo e a imunoterapia. Para definir a melhor estratégia de tratamento é necessária a avaliação de biomarcadores preditivos (alterações acionáveis), os quais são capazes de antecipar a resposta à determinada droga³⁷. A terapia alvo é aquela direcionada a uma característica das células neoplásicas a fim de poupar as células normais. Para definir quais pacientes são elegíveis para este tipo de tratamento, alterações moleculares acionáveis devem ser investigadas em adenocarcinomas e outras histologias não escamosas²⁴. Já a imunoterapia se baseia na modulação do sistema imune para atacar o tumor; sua efetividade pode ser aferida através da expressão do biomarcador PD-L1, a qual deve ser quantificada para todo paciente metastático²⁴.

A quimioterapia citotóxica é recomendada para pacientes em estágio avançado quando da ausência de alterações nos biomarcadores acionáveis para terapia alvo, ou quando contraindicados os inibidores PD-1 e PD-L1 para imunoterapia²⁴. O esquema padrão utilizado é baseado em combinação com platina. Os fármacos mais utilizados são a carboplatina e cisplatina, associadas a quimioterápicos de diversas outras classes como pemetrexed, paclitaxel ou gemcitabina³⁸⁻⁴⁰. As diferentes associações com platina tendem a funcionar de maneira similar em termos de sobrevida e taxa de resposta, variando quanto a toxicidade, custo e outros fatores que definem a escolha do oncologista⁴¹⁻⁴³. Essa abordagem frequentemente é a única opção de tratamento para pacientes com carcinoma de células escamosas, sendo a única fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil.

As platinas tem como mecanismo de ação a capacidade de formar adutos e *crosslinks* de DNA ao se ligar com as bases nitrogenadas purinas⁴⁴. Essas ligações covalentes causam danos ao DNA, que quando não reparados, levam a célula à apoptose. Enquanto células normais conseguem lidar com esses danos, muitas células tumorais perderam a capacidade de reparar danos ao DNA e, conseqüentemente, sofrem com a ação da cisplatina e são eliminadas. A efetividade desta terapia pode variar de acordo com o status mutacional do gene *TP53*, uma vez que a produção de proteínas p53 não funcionais impede suas funções de “sensor” ao dano no DNA e de gatilho para a apoptose⁴⁵. Da mesma forma, falhas em outros mecanismos de reparo, como a recombinação homóloga e o reparo por excisão de nucleotídeo, podem ser determinantes para sensibilidade à platina^{46, 47}.



1 – Quando positivo para *EGFR*

2 – Quando PD-L1 > 1%

3 – Quando positivo para *EGFR*, *BRAF* V600E, *ALK*, *RET*, *ROS1*, *NTRK*, *MET* ex14 skipping

Figura 5 - Opções terapêuticas para câncer de pulmão não pequenas células de acordo com o estadiamento. Fonte: NCCN Guidelines²⁴.

1.6 Aspectos Moleculares

Estudos moleculares de larga escala evidenciaram alterações genéticas envolvidas na patogênese do câncer de pulmão, muitas das quais já foram incluídas na prática clínica como biomarcadores preditivos⁴⁸. Esse cenário é visualizado particularmente no CPNPC, com a descrição de diversas variantes *drivers*. Para os adenocarcinomas, os genes mais frequentemente mutados e/ou com opções terapêuticas alvo-dirigidas são: *TP53* (~50%), *KRAS* (~30%), *EGFR* (10-35%), *STK11* (17%), *ALK* (2-7%), *PIK3CA* (2-7%), *ERBB2* (4-5%), *BRAF* (2-4%), *ROS* (1-2%), *RET* (1-2%)^{15, 49, 50}. Na figura 6, podemos observar como a doença em estágio avançado – neste caso, adenocarcinoma – pode ser dividida em subtipos moleculares de acordo com as alterações *drivers*, as quais proporcionam um manejo personalizado para esses pacientes. No entanto, a maioria destes genes não estão mutados em carcinoma de células escamosas (CEC), que tem um perfil mutacional distinto. Em CEC, os genes mais frequentemente mutados são: *TP53* (~90%), *PIK3CA* (16%), *PTEN* (15%), *NF1* (11%), *NOTCH* (8%), *FGFR1* (7%), *DDR2* (4%) e *KRAS* (3%)^{51, 52}. Devido à baixa frequência de variantes em genes acionáveis, os CEC, bem como as demais histologias não-adenocarcinoma, não são rotineiramente encaminhados para caracterização molecular⁵³.

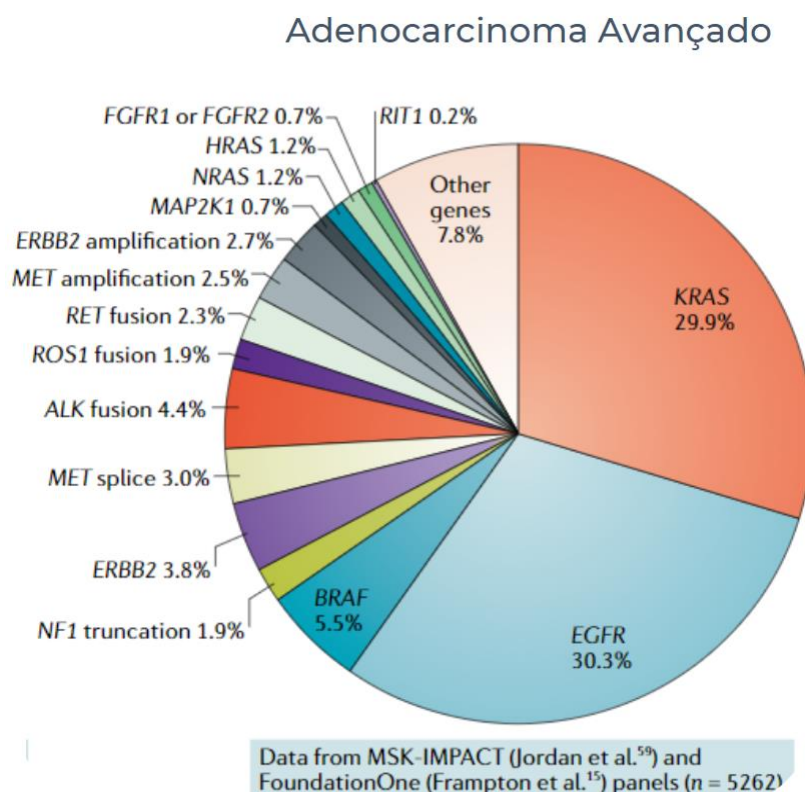


Figura 6 - Genes que apresentam alterações *drivers* em Adenocarcinoma avançado. Adaptado de Skoulidis et.al.⁵⁴.

Atualmente, os biomarcadores preditivos aplicados na prática clínica para CPNPC incluem: fusões de *ALK* e *ROS1*, mutações no gene *EGFR*, a mutação *BRAF* p.(Val600Glu), fusões de *NTRK*, rearranjos de *RET*, *skipping* do éxon 14 do gene *MET* e expressão de PD-L1²⁴. O subtipo CEC, contudo, dispõe apenas da imunoterapia como alternativa terapêutica à quimioterapia isolada e utiliza a expressão de PD-L1 como biomarcador preditivo de resposta, mas ele está longe de ser o ideal⁵⁵.

1.7 Resultados prévios do Grupo Translacional de Oncologia Pulmonar

Considerando a importância da definição do perfil mutacional na identificação de potenciais alvos ou genes *drivers*, apresenta-se a problemática de a grande maioria dos estudos de perfis genômicos do CPNPC – adenocarcinoma e/ou CEC – serem realizados em populações majoritariamente européias, asiáticas e norte-americanas⁵⁶. Essa característica se mostra como viés uma vez que já é bem estabelecida, por exemplo, uma associação entre alterações no gene *EGFR* e ancestralidade asiática^{57, 58}. Recentemente, um trabalho prévio do nosso grupo também indicou uma ligação entre variantes no gene *TP53* e ancestralidade africana⁵⁹. Desse modo,

investigar populações miscigenadas – as quais apresentam maior diversidade de ancestralidade genética – é fundamental na busca por novos genes candidatos.

Por esta razão, o Grupo Translacional de Oncologia Pulmonar (GTOP) do Hospital de Amor de Barretos iniciou um estudo de caracterização genômica de pacientes brasileiros com CPNPC pela realização de *Whole-Exome Sequencing* (WES), perfil de variações no número de cópias, translocações, expressão gênica e metilação. Os resultados evidenciaram uma recorrência de variantes no gene *HERC2*, tanto em adenocarcinoma quanto em CEC. Este mesmo padrão de elevada frequência também foi observado em outras séries de câncer de pulmão não brasileiras, mas estes resultados não foram explorados nos estudos e foram encontrados somente via bancos de dados genômicos de domínio público⁶⁰.

As variantes em *HERC2* reveladas por WES estão em concomitância com alguns genes sabidamente importantes para câncer de pulmão. Em adenocarcinoma, variantes em *HERC2* estavam presentes concomitantemente a alterações em *TP53* (Figura 7). Além disso, observamos uma exclusividade mútua de variantes em *HERC2* e em oncogenes como *EGFR*, *BRAF*, *ERBB2* e *PIK3CA*.

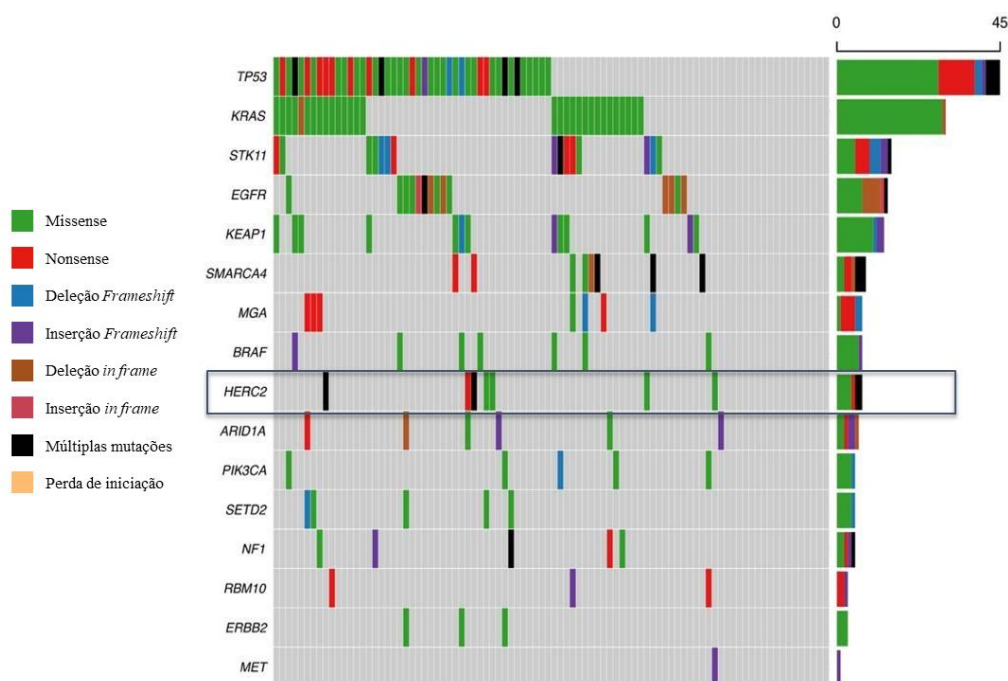


Figura 7 - *Heatmap* dos casos avaliados de Adenocarcinoma com os principais genes *drivers* para este subtipo histológico, com destaque para o gene *HERC2*. As diferentes cores representam categorias das mutações detectadas (legenda à esquerda).

Para CEC, observamos concomitância de variantes do gene *HERC2* com os genes *TP53* e *CDKN2A*, e exclusividade mútua com *PIK3CA*, *NOTCH1*, *RB1* e *PTEN* (Figura 8).

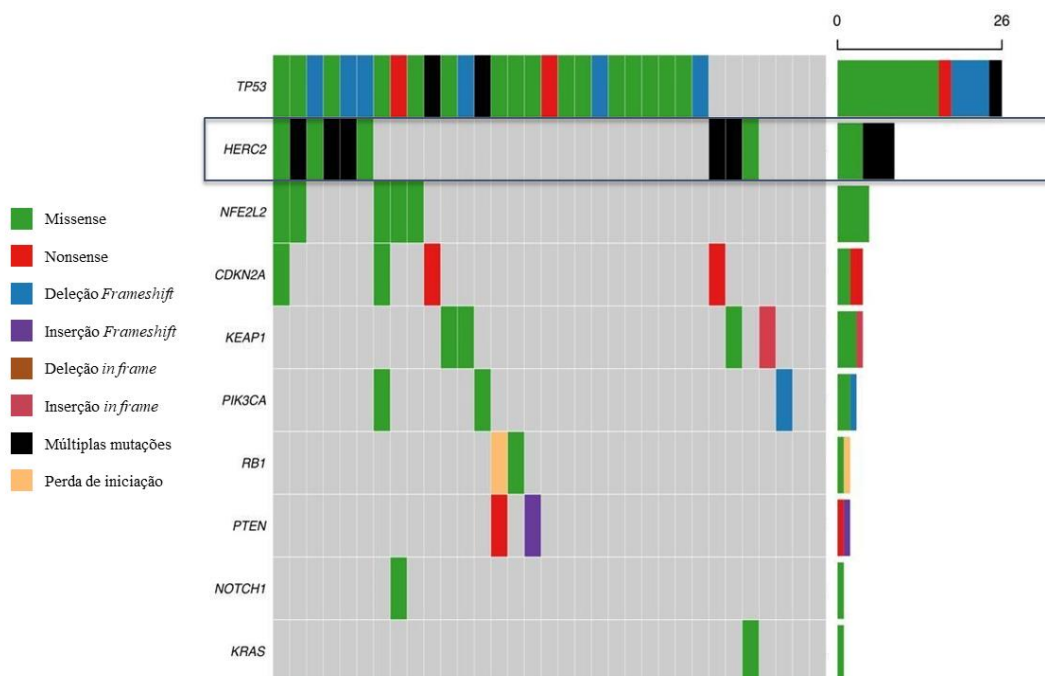


Figura 8 - Heatmap dos casos avaliados de CEC com os principais genes *drivers* para este subtipo histológico, com destaque para o gene *HERC2*. As diferentes cores representam categorias das mutações detectadas (legenda à esquerda).

1.8 *HERC2*

O gene *HERC2* é uma ligase E3 de ubiquitina pertencente à família HECT, a qual se caracteriza pela presença de um domínio catalítico de mesmo nome (Figura 9) responsável pela adição de ubiquitinas em resíduos de lisina de proteínas alvo⁶¹. É merecedor de destaque o domínio CPH, por meio do qual esta proteína interage com p53 regulando positivamente sua atividade e inibindo a progressão do ciclo celular⁶², assim como participa dinamicamente da via regulatória p53-MDM2⁶³, o que indica um potencial papel de *HERC2* na supressão tumoral. Ele também está relacionado com a modelação da cromatina em resposta ao dano de fita dupla do DNA ao interagir com RNF8, Histona H3 e resíduos SUMO1 por meio de seu domínio Zinc Finger - ZZ (Figura 9)^{64, 65}. Além disso, a interação de *HERC2* com as helicases BLM e WRN regula a localização nucleolar destas proteínas envolvidas na resolução do DNA G-quadruplex - uma estrutura secundária do DNA relacionada a instabilidade genômica⁶⁶⁻⁶⁸. Outros estudos ainda sugerem a interação de *HERC2* com vias de sinalização de reconhecimento de dano celular, controle do ciclo celular e replicação⁶⁹⁻⁷¹, além de atuar diretamente na ubiquitinização de proteínas como BRCA1 e XPA^{72, 73}.



Figura 9 - Domínios presentes na proteína HERC2. Fonte: Pfam (Id: O95714) e adaptado de Sala-Gaston et. al., 2020⁶¹.

Este gene é altamente conservado entre mamíferos e invertebrados; a sequência humana apresenta 70% de similaridade com a sequência de *Drosophila*⁷⁴. Isso indica uma função essencial no funcionamento da célula. No contexto genômico, este gene apresenta diversas cópias distribuídos nos cromossomos 15 (15q11, 15q13) e 16 (16q11.2), os quais podem estar distribuídos de diferentes formas: descontínua, *in tandem* ou no sentido inverso⁷⁵⁻⁷⁷. Um total de 15 sequências descritas como pseudogene de *HERC2* estão depositadas no NCBI, sendo 3 delas no cromossomo 16⁷⁸.

Na fisiologia humana, o gene *HERC2* é amplamente relacionado com pigmentação da pele⁷⁹, cabelos⁸⁰ e cor dos olhos^{81, 82}, especialmente a cor azul⁸³. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) localizados neste gene foram descritos em diferentes grupos populacionais, se associando à ancestralidade europeia^{84, 85}, africana^{86, 87} e asiática⁸⁸. A grande miscigenação da população brasileira – povos originários indígenas, colonização portuguesa, tráfico da população africana, migração de outras comunidades europeias e asiáticas ao longo da história – sugere a distribuição dessas características genéticas nos indivíduos. Em consonância, variantes germinativas do gene *HERC2* também já foram associadas à pigmentação em brasileiros⁸⁹.

Outra função deste gene é a regulação indireta do metabolismo do ferro ao interagir com proteínas como FBXL5, responsável pelo controle dos níveis de ferro intracelular, e NCOA4, responsável pelo controle dos estoques de ferritina^{90, 91}. Experimentos em animais *knockout* demonstraram a participação de *HERC2* no desenvolvimento embrionário; camundongos homozigotos para a deleção do gene não foram viáveis e a letalidade ocorreu a nível de embrião. Por outro lado, os camundongos heterozigotos foram viáveis, mas desenvolveram patologias diversas⁹². Esses resultados sugerem a contribuição de *HERC2* em processos essenciais para viabilidade das células e do organismo de forma independente de p53.

Várias evidências indicam a participação de *HERC2* em desordens do desenvolvimento neuronal - desde síndromes específicas, como a de Angelman, até o autismo⁹³⁻⁹⁶. Este gene foi descrito, inclusive, como uma das sobreposições de risco existentes entre autismo e câncer⁹⁷.

1.9 *HERC2* e câncer

Variantes no gene *HERC2* foram descritas em diferentes tipos tumorais, incluindo tumores hematológicos (Leucemia Pro-linfocítica de células T)⁹⁸. Em tumores sólidos, variantes *frameshift* do gene *HERC2* foram relatadas em câncer gástrico e colorretal com instabilidade de microssatélite⁹⁹ e em adenocarcinoma ductal de pâncreas em uma coorte latino-americana¹⁰⁰. Variantes pontuais foram descritas em lipossarcoma de-diferenciado numa frequência de 41,7% (5/12) na ausência de alterações em *TP53*¹⁰¹. Ademais, por meio de sequenciamento de genoma completo de amostras germinativas em um estudo exploratório, foi observado um enriquecimento de variantes deletérias no gene *HERC2* nos casos de glioma familiar (4 variantes descobertas nos casos e nenhuma nos controles).¹⁰²

Estudos de GWAS (do inglês *Genome Wide Association Studies*) associaram o *locus* deste gene com predisposição a melanoma cutâneo e uveal¹⁰³⁻¹⁰⁵, bem como variantes determinantes de cor dos olhos castanha se mostraram fatores protetores para desenvolvimento de melanoma uveal hereditário¹⁰⁶. Por outro lado, um estudo caso-controle em casuística brasileira demonstrou associação de um SNP (rs1129038) em *HERC2* com risco aumentado de desenvolvimento de melanoma¹⁰⁷. Além disso, uma maior expressão deste gene, aferida por imuno-histoquímica e western blot, se correlacionou com fatores de prognóstico desfavorável nesta doença, como pigmentação aumentada e invasão de corpo ciliar¹⁰⁸. Já no câncer renal, o aumento da expressão de *HERC2* foi associado com uma melhor sobrevida¹⁰⁹.

Em câncer de pulmão de não pequenas células, a expressão elevada de *HERC2*, quando associada à baixa expressão de *BRCA1*, correlaciona-se com pior sobrevida e pior resposta à quimioterapia; já a combinação da baixa expressão de ambos os genes se associou a um risco reduzido de progressão e morte¹¹⁰. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados à atuação do gene *HERC2* em células pulmonares – seja em sua forma selvagem ou alterada – e a associação de alterações neste gene no câncer de pulmão.

2 JUSTIFICATIVA

O gene *HERC2* tem por função primária a participação na cascata de ubiquitinação e está envolvido em processos como reparo de DNA e controle do ciclo celular ao atuar sobre proteínas como *BRCA1*, *XPA* e *USP20*. As evidências genéticas, associadas ao seu papel fisiológico já descrito, são indicadores de uma possível participação do *HERC2* na patogênese do câncer, inclusive do câncer de pulmão. Este gene se destacou dentre os mais frequentemente mutados em *whole-exome sequencing* (WES) realizado previamente por nosso grupo de pesquisa. Nessa avaliação genômica de câncer de pulmão de células não pequenas em pacientes brasileiros, o *HERC2* foi o terceiro gene mais mutado, próximo dos já esperados *TP53* e *KRAS*. Em outras casuísticas, disponíveis em bancos de dados públicos, é possível observar dados semelhantes, porém, estes dados não foram explorados por nenhum artigo da literatura disponível.

Tendo em vista o impacto do câncer de pulmão na saúde pública e a contribuição dos alvos moleculares no manejo e prognóstico dos pacientes, é indispensável a investigação de novos candidatos a contribuir para esta realidade. O subtipo histológico carcinoma de células escamosas (CEC) ainda não é beneficiado por esses avanços devido à escassez de alvos moleculares acionáveis, o que torna promissora a maior frequência mutacional observada no gene *HERC2* para esses casos. Nesse contexto, *HERC2* se configura como potencial gene *driver*, suscitando uma caracterização detalhada da sua participação no perfil molecular do câncer de pulmão.

Ainda não foram descritos estudos funcionais *in vitro* que abordem de forma central o papel de *HERC2* em células pulmonares. Essa abordagem permite o entendimento contextualizado do papel de genes em diversos processos celulares e a definição de especificidade tecidual. A carência de investigação deste gene em linhagens celulares pulmonares impossibilita o estabelecimento de sua relevância. Assim, torna-se necessário uma avaliação funcional *in silico* e *in vitro* do gene *HERC2*, assim como da sua interação com outros genes. Uma ampla investigação *in vitro* permitirá avaliar a função desempenhada na patogênese pulmonar e sua possível aplicação na medicina de precisão do câncer de pulmão de não pequenas células.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a patogenicidade de variantes do gene *HERC2* identificadas em uma série brasileira de câncer de pulmão de não pequenas células e caracterizar *in vitro* o papel funcional deste gene.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a frequência mutacional de *HERC2* e a patogenicidade das variantes encontradas em uma série brasileira de câncer de pulmão não pequenas células;
- ✓ Associar o status mutacional de *HERC2* a dados clínicopatológicos, sociodemográficos e sobrevida;
- ✓ Realizar análises *in silico* em diferentes *datasets* para comparar com a presente casuística de câncer de pulmão de não pequenas células;
- ✓ Avaliar *in vitro* os efeitos funcionais do silenciamento do gene *HERC2* em linhagem pulmonar de carcinoma de células escamosas.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho de estudo e casuística

Este é um estudo observacional retrospectivo que analisou um subconjunto de casos de câncer de pulmão de não pequenas células (n=13), parte de uma casuística maior com caracterização genômica completa (n=123). Os critérios utilizados para inclusão de casos neste estudo foi a disponibilidade de dados de *whole-exome sequencing* (WES).

5.2 Whole-Exome Sequencing (WES)

Foi extraído o DNA de amostras de tecido tumoral congelado e amostras de *buffy coat* pareadas pela plataforma QIASymphony pelo Biobanco do Hospital de Amor. O WES foi realizado nas plataformas HiSeq2500 (*Mendelics*; n=96) e NovaSeq (*Sophia Genetics*; n=27), ambas da Illumina. A análise das amostras pareadas foi realizada a fim de excluir as variantes germinativas e garantir a avaliação apenas de variantes somáticas. O *pipeline* de bioinformática seguiu as recomendações descritas no *Genome Analysis Toolkit* - GATK versão 4 do *Broad Institute*: o alinhamento com o genoma humano de referência versão 37 (GRCh37) foi realizado pelo *Burrows–Wheeler Aligner* (BWA), seguido da chamada de variantes pelo GATK Mutect2 e Pindel; e anotação de variantes com o Annovar. Realizamos a exclusão de variantes germinativas também por meio da consulta ao banco de dados gnomAD e AbraOm (amostras de indivíduos brasileiros saudáveis). Utilizamos também como filtros uma cobertura vertical mínima de 10x e frequência alélica (VAF – do inglês *variant allelic frequency*) mínima de 2%, com revisão manual das variantes filtradas utilizando o *Integrated Genomics Viewer* (IGV).

5.3 Análise de ancestralidade genética

Para essa casuística, também foi realizada previamente a análise de ancestralidade genética com a avaliação de 46 marcadores informativos de ancestralidade (AIM, do inglês *Ancestry Informative Markers*), os quais são polimorfismos de inserção e deleção (INDELs) em tandem, cujo número de vezes em que cada região se repete pode variar de um indivíduo para o outro. Esses 46 marcadores foram amplificados por uma reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Nesse sistema, pares de *primers* direcionados às regiões de interesse são marcados com fluoróforos diferentes e identificados em uma única amplificação. Após a amplificação foi realizada a análise de fragmento por eletroforese capilar (3500 *Genetic Analyzer* - ABI), a qual detecta o tamanho e fluorescência de cada fragmento amplificado. Esse dado é analisado a fim de determinar os alelos presentes em cada amostra através do *software*

GeneMapper v4.1 (*Applied Biosystems*) e, posteriormente, calcular a contribuição das ancestralidades europeia (EUR), africana (AFR), asiática (ASN) e ameríndia (AME) pelo *software Structure* v2.3.3¹¹¹⁻¹¹³.

O painel HGDP-CEPH (*Human Genome Diversity Project - Center d'Etude du Polymorphisme Humain*) foi utilizado como referência na análise supervisionada que estimou as proporções de ancestralidade nos indivíduos deste trabalho^{112, 113}. As proporções calculadas em porcentagem foram classificadas por tercís e avaliadas pelo teste exato de Fisher para determinar associação estatística¹¹³. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.4 Predição de patogenicidade das variantes

A partir do WES realizado pelo grupo, foi realizada a predição de patogenicidade das alterações encontradas no gene *HERC2* por meio da plataforma *Cancer Genome Interpreter* - CGI disponível online¹¹⁴. Esta ferramenta identifica variantes oncogênicas já validadas e prediz o impacto daquelas de significado incerto. Isso é realizado através do método OncodriveMUT, no qual dois tipos de predições são associados. Uma predição se baseia em dados de coortes de diversos tipos tumorais e de indivíduos saudáveis que quando comparados permitem a identificação de sinais de seleção positiva de genes, agrupamento de variantes somáticas, regiões de variantes germinativas e o mecanismo de ação de genes. A outra predição avalia cada alteração genômica individualmente, em nível molecular, levando em consideração o impacto funcional, o tipo de variante - *missense*, *nonsense*, sinônima -, os éxons e domínios proteicos envolvidos. A partir dessas informações, este preditor classifica as alterações como *driver* predito nível 1, *driver* predito nível 2 e *passenger* predito, bem como fornece o nível de deleteriedade de acordo com o score CADD (ex.: Muito alta, Alta, Média-Baixa, Baixa). Com base nestes resultados, as variantes foram divididas em potencialmente *drivers*/patogênicas e provavelmente *passengers*/benignas¹¹⁴.

5.5 Análise de bancos de dados

Bancos de dados públicos com informações sobre o perfil mutacional foram consultados para determinar a frequência e distribuição de variantes no gene *HERC2* em diferentes grupos populacionais a fim de comparar com o observado em nossa casuística. Também foram avaliados aspectos sociodemográficos, quando disponíveis. O *cBio Cancer Genomics Portal* (cBioPortal) integra dados brutos de diversas publicações e grandes projetos/*datasets*, como TCGA, tornando-os mais acessíveis e mais facilmente manuseáveis. Esta plataforma disponível

online fornece tanto dados de variantes quanto de alteração do número de cópias (CNV), expressão de mRNA, metilação, entre outras, associando-as a dados clínicos⁶⁰.

Outro recurso acessado foi o *Integrative OncoGenomics* (IntOGen), uma iniciativa que tem por objetivo construir um compêndio de genes *drivers* de câncer a partir de análises da variação do perfil mutacional dos tumores e seleção positiva¹¹⁵. Esta ferramenta também agrupa dados da literatura, TCGA, ICGC, PCAWG, assim como do próprio cBioPortal; e foi utilizada a título de comparação dos dados mutacionais, uma vez que não fornece caracterização adicional das amostras.

Também foram agrupados dados do *Genomic Data Commons* (GDC), um programa do *National Cancer Institute* (NCI)¹¹⁶. Os dados foram acessados no portal disponível online gratuitamente, sendo compostos por informações clínicas e moleculares oriundas de grandes projetos (TCGA, ICGC, TARGET) e submetidas pelos próprios usuários.

Para análises de sobrevida, além dos dados disponíveis nos bancos citados anteriormente, também acessamos o repositório *KM Plotter*¹¹⁷. Nesta plataforma - disponível online e curada manualmente - são agrupados dados de expressão gênica, de sobrevida global e sobrevida livre de recaída oriundos dos bancos de dados GEO (*Gene Expression Omnibus* - NCBI) e EGA (*European Genome-Phenome Archive*), assim como do TCGA. É possível inferir o valor prognóstico de genes específicos por meio da geração da curva de sobrevida de Kaplan Meier e cálculo do p-valor pelo teste de Log-rank.

5.6 Análises de dados sociodemográficos e sobrevida

Para análise de características clínicas e demográficas dos pacientes foram empregados os testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Os dados de ancestralidade foram categorizados em tercís para as análises de associação¹¹³. As análises de sobrevida foram realizadas pela curva de Kaplan Meier, teste de Log-rank e regressão de Cox, sendo considerado como evento de interesse o óbito; os pacientes vivos com ou sem doença bem como os pacientes que perderam seguimento foram considerados censurados (tempo máximo de censura de 60 meses). O limite de significância para todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$). Foram utilizados os *softwares* *GraphPad Prism* 4.0 (GraphPad, San Diego, CA) e *IBM SPSS Statistics* (Armonk, NY: IBM Corp).

5.7 Análise funcional *in vitro*

5.7.1 Seleção das linhagens celulares

Tendo como base as linhagens disponíveis no banco de células do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), foram selecionadas as células oriundas de câncer de pulmão humano com classificação histológica de Adenocarcinoma ou Carcinoma de Células Escamosas. Com o intuito de determinar o perfil mutacional das linhagens selecionadas, foi consultado o banco de dados COSMIC - *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*¹¹⁸. Este banco é subdividido em diversos projetos, um deles sendo direcionado para a catalogação de variantes em uma grande variedade de linhagens celulares de câncer. Após avaliação dos aspectos histológicos, mutacionais e de origem das linhagens candidatas, foram selecionadas as seguintes linhagens: COR-L105 (adenocarcinoma, *HERC2*^{WT}); SK-MES-1 (CEC, *HERC2*^{WT}); e H292 (carcinoma mucoepidermóide/CEC - *HERC2*^{MUT}, p.R4293W). A variante encontrada nesta última linhagem coincide com o códon alterado por uma das variantes detectadas no WES realizado pelo grupo (p.R4293L). Devido às limitações práticas, no presente estudo contemplamos apenas o silenciamento gênico da linhagem SK-MES-1. Ela foi selecionada por ser o modelo de estudo mais representativo da nossa população de interesse: indivíduos com câncer de pulmão não pequenas células do subtipo escamoso, selvagem para o gene *HERC2*.

5.7.2 Silenciamento do gene *HERC2* por esiRNA

A linhagem celular selecionada foi transfectada com RNA de interferência pequeno preparado enzimaticamente (esiRNA) direcionados contra o gene *HERC2* (no. catálogo: EHU040521) e contra o gene *EGFP* (no. catálogo: EHUEGFP) como controle negativo (*Non-targeting control*). Esse tipo de RNA consiste em um conjunto heterogêneo de centenas de siRNAs direcionados contra o mesmo RNA mensageiro (mRNA) e produzidos por digestão enzimática. Essa estratégia permite a cobertura de uma região de até 600 bp do alvo associada a uma menor taxa de efeitos indesejados (*off-target*), isso porque cada siRNA individual integra a solução em baixas concentrações. A transfecção foi realizada utilizando a Lipofectamina 2000 (*ThermoFisher Scientific*) com as células em uma confluência de aproximadamente 70%. Para esta etapa, seguimos as recomendações do fabricante do agente de transfecção, utilizando placas de 6 poços, 100pmol de esiRNA, 5uL de Lipofectamina em um volume de 2x 250uL de OptiMEM. A mistura foi incorporada às células ($0,35 \times 10^6$) e incubados a 37°C por 6 horas. Em seguida, o meio de transfecção foi substituído por meio completo com SFB. A confirmação

do silenciamento foi realizada por *western blotting*. Para todos os ensaios subsequentes foram comparados 3 grupos: células tratadas apenas com Lipofectamina 2000, células transfectadas com esiEGFP e células transfectadas com esiHERC2.

5.7.3 Avaliação da expressão proteica por *Western Blotting*

As análises de expressão proteica nas linhagens celulares foram realizadas pela técnica de *western blot* 48h, 72h e 96h após o plaquemanto das células silenciadas. As proteínas foram extraídas com utilização de um tampão de lise e dos inibidores de protease DTT, Leupeptina, Aprotinina, EDTA e PMSF, seguido de incubação em gelo por uma hora e centrifugação a 4°C, 14000 rpm por 15 minutos. O extrato proteico foi diluído com o tampão Laemmli e aquecido a 95°C por 5 minutos para desnaturação das proteínas, as quais foram então submetidas à eletroforese para separação por peso molecular (SDS-PAGE). Utilizamos o gel gradiente Mini-PROTEAN® TGX™ *Precast Protein Gels*, 4-20% da Bio-Rad e, juntamente às amostras, foi aplicado o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (nº cat. 161-0374) também da Bio-Rad.

Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com uma solução de leite a 5% (TBS-T) e, posteriormente, incubada com o anticorpo primário (específico para cada proteína, o anticorpo anti-HERC2 foi obtido da BD *Transduction Laboratories™* - no. catálogo: 612366) previamente diluído, em tampão (Tris 1M; NaCl 5M; Tween 20 + BSA 1%) por 16 horas (*overnight*) a 4°C sob agitação. Após esse período, a membrana foi lavada várias vezes com tampão TBS-T (Tris 1M; NaCl 5M; Tween 20). Após as lavagens, a membrana foi incubada sob agitação por 2 horas, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (Imunoglobulina IgG conjugada à peroxidase) diluído em tampão contendo 5% de leite em pó desnatado e 1% de albumina bovina. A detecção e quantificação das amostras foram feitas por quimiluminescência (Kit ECL *Western Blotting Detection Reagents*-cod RPN2109; GE HealthCare) no sistema ImageQuant™ LAS 4000 Mini (GE Healthcare).

5.7.4 Avaliação de proliferação celular

Para determinar a proliferação celular nos três grupos experimentais, foi utilizada a plataforma *xCELLigence Real-Time Cell Analysis* (RTCA) da Agilent. Essa tecnologia se baseia em placas contendo microeletrodos de ouro através dos quais passa uma corrente elétrica que será perturbada pela fixação das células no fundo dos poços. A medida de variação de

impedância decorrente é proporcional à quantidade de células no poço. A impedância é medida a cada uma hora por 20 dias, traduzindo a imagem da proliferação das células plaqueadas em tempo real.

Foram plaqueadas 6 mil células (6×10^3) de cada condição em quintuplicata com meio normal para a linhagem (DMEM, 10% SFB, 1% antibiótico). Após os 20 dias, o experimento foi interrompido, os dados brutos foram visualizados e analisados no *RTCA Software Pro* integrado à plataforma. Neste ensaio, a proliferação celular é avaliada em termos de *cell index*, um parâmetro correspondente à taxa de adesão das células à microplaca de eletrodos. Ele é calculado pelo *RTCA software pro* por meio da variação de impedância num determinado momento menos a impedância basal (sem células), dividido por uma constante. Assim, são adquiridos os valores de *cell index* a cada hora. Essa medição é realizada para cada replicata individualmente e é reportado como a média das cinco replicatas realizadas para cada repetição do experimento. As análises estatísticas e a confecção de gráficos foram realizadas no *software GraphPad Prism 9*.

5.7.5 Avaliação de migração e invasão

O potencial migratório das células foi avaliado pela metodologia *transwell*, na qual $0,2 \times 10^5$ células são plaqueadas em insertos que separam o poço em dois compartimentos. No compartimento inferior colocamos meio enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e no compartimento superior plaqueamos as células em meio sem SFB para que, dessa forma, as células tivessem um estímulo químico nutricional para migrar. Separando os dois ambientes, está uma membrana que reterá temporariamente as células que migrarem. O sistema é encubado a 37°C por 48h. Posteriormente, o experimento foi interrompido e foi realizada a montagem das lâminas a serem fotografadas para quantificação das células migratórias utilizando o *software ImageJ*.

Para investigação do potencial invasor das células, foi utilizado o reagente *Corning® BioCoat® Matrigel® Invasion Chambers*. Neste ensaio, os filtros *transwell* são revestidos por Matrigel, que é um material semelhante à matriz extracelular – contendo proteínas como colágeno e laminina e fatores de crescimento – o qual impede a migração das células através da membrana. Células invasivas são capazes de secretar proteases e atravessar a barreira oferecida pelo Matrigel. A avaliação da invasão celular também foi verificada no tempo de 48h após o plaqueamento das células. (incluir como é avaliado o resultado final, microscopia, fotos...)

5.7.6 Avaliação de ciclo celular – citometria de fluxo

Avaliamos o efeito do silenciamento sobre o ciclo celular por meio de citometria de fluxo nos tempos 36h e 96h após a transfecção das células, utilizando o kit Cycletest™ PLUS DNA Reagent kit (BD Transduction Laboratories™ - no. catálogo: 340242). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences), equipado com laser em comprimento de onda 488nm, Software e Cálculos para estimar quantas células são de cada fase do ciclo.

5.7.7 Avaliação de sensibilidade ao tratamento com cisplatina

Para determinar o IC50 para a cisplatina dos três grupos experimentais, as células foram tratadas em triplicata com uma curva de concentração ascendente de cisplatina. Os pontos utilizados foram: 0µM (tratamento apenas com o veículo da droga – NaCl 0,9%), 1µM, 2µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM e 50µM. Após um período de 72h de tratamento, as células foram expostas ao reagente *Cell Titer 96 Aqueous One Solution* (Promega, Madison, WI, USA) para definição de viabilidade. Células metabolicamente ativas reduzem o composto MTS tetrazolium, por meio da oxidação de NADH ou NADPH, dando origem a Formazan, um composto de cor marrom solúvel no meio de cultura. A metabolização do MTS é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis e foi calculada através de espectrofotometria no comprimento de onda de 490nm. A partir das medições das viabilidades em todos os pontos de tratamento, conseguimos estabelecer o IC50 de cada condição e o R^2 do ensaio, o qual reflete a linearidade da curva dose-resposta e consequentemente a confiança do resultado.

5.7.8 Análises estatísticas

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os ensaios funcionais nos três grupos experimentais. Os resultados foram expressos em termos de média e desvio padrão das medições dos experimentos independentes. Tais análises foram realizadas nos softwares *GraphPad Prism 9* (GraphPad, San Diego, CA) e *IBM SPSS Statistics* (Armonk, NY: IBM Corp), levando em consideração um nível de significância de 95%, p-valor $\leq 0,05$.

5.8 Aspectos éticos

Os estudos realizados com material e dados de origem humana foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Amor de Barretos (Projeto número 1139/2016; **Anexo A**). Os ensaios funcionais *in vitro* dispensam aprovação no Comitê de ética em Pesquisa.

5.9 Financiamento

Este projeto foi financiado com recursos do Ministério Público do Trabalho (MPT) e do Hospital de Amor (Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador – PAIP).

6 RESULTADOS

6.1 Estudos genômicos e *in silico*

6.1.1 Frequência mutacional

6.1.1.1 Predição de impacto das variantes no gene *HERC2*

Conforme supracitado, a descoberta das variantes detectadas no gene *HERC2* foi realizada por sequenciamento de exoma completo (WES) em 123 amostras tumorais de câncer de pulmão de não pequenas células, pareadas com amostras de sangue periférico a fim de excluir as variantes germinativas das análises subsequentes. A cobertura média atingida no WES foi de 450X para as amostras somáticas e 150X para as amostras germinativas do subgrupo de amostras (n=27) sequenciadas pela *Sophia Genetics* (ver seção 5.1) e de 70x para as amostras somáticas e germinativas sequenciadas pela *Mendelics* (n=96).

Das 23 variantes identificadas no gene *HERC2*, nove foram classificadas como *drivers* nível 1 (Figura 10) – sendo que variantes de nível 1 são definidas como variantes que tem maior indicativo de participação no desenvolvimento e/ou progressão tumoral, segundo o *Cancer Genome Interpreter* (CGI)¹¹⁴. Seis variantes foram preditas como *drivers* nível 2, e foram agrupadas às variantes *drivers* nível 1, formando a categoria denominada neste trabalho como provavelmente patogênicas. Este grupo apresentou frequência alélica (VAF, do inglês *variant allelic frequency*) variando de 4,2% a 66,7% (Tabela 1; Figura 11). Apenas uma variante foi classificada como polimorfismo e sete foram preditas como *passengers*, sendo estas duas categorias classificadas como não patogênicas. Para as análises posteriores, os pacientes portadores das variantes não patogênicas foram agrupados ao grupo de pacientes *HERC2*^{WT}.

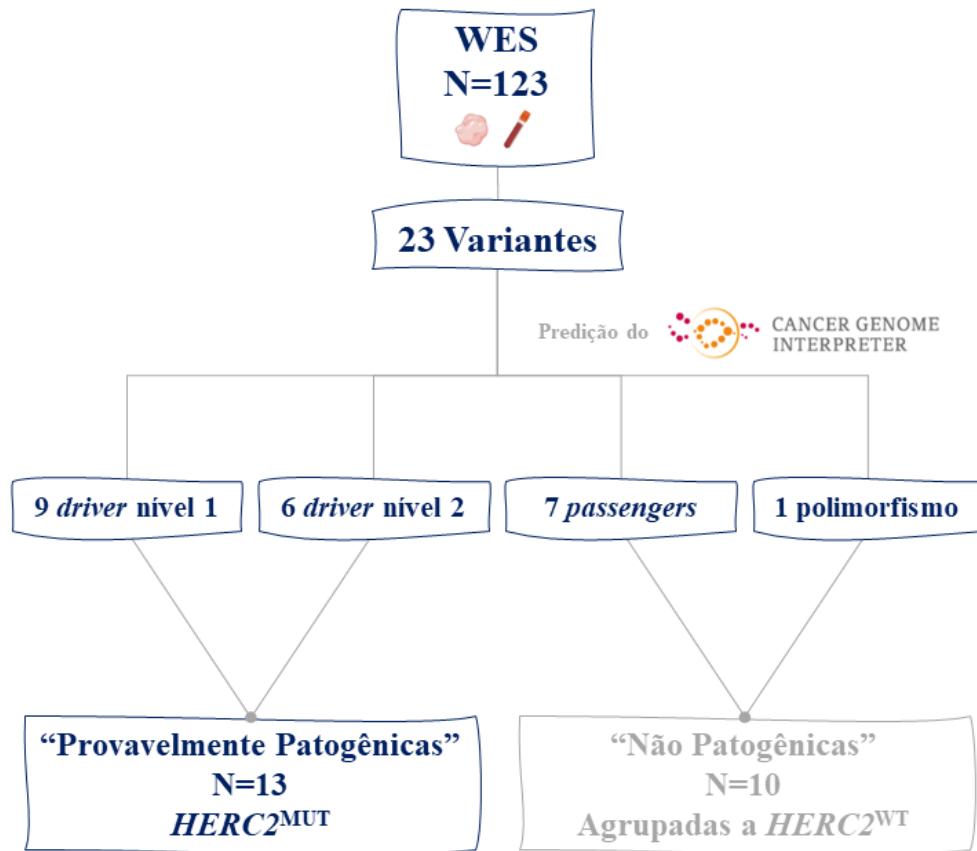


Figura 10 - Fluxograma descrevendo a predição de impacto realizada pelo *Cancer Genome Interpreter* (CGI) das variantes encontradas no exoma completo realizado pelo grupo. WES: *Whole-Exome Sequencing*.

Tabela 1 - Predição de patogenicidade*, classificação de deleteriedade* e frequência alélica (VAF) das variantes encontradas no gene *HERC2* em nossa casuística.

Variante		Predição	Deleteriedade	VAF (Patogênicas)
c.12877C>A	p.(Arg4293Leu)	<i>Driver</i> nível 1	Muito alta	0.260
c.5656C>A	p.(Gly1886Trp)	<i>Driver</i> nível 1	Muito alta	0.298
c.978T>A	p.(Asn326Tyr)	<i>Driver</i> nível 1	Muito alta	0.132
c.7910G>C	p.(Ser2637Cys)	<i>Driver</i> nível 1	Alta	0.183
c.11467G>C	p.(Ala3823Gly)	<i>Driver</i> nível 1	Alta	0.235
c.9836A>G	p.(Tyr3279His)	<i>Driver</i> nível 1	Alta	0.148
c.1876C>A	p.(Val626Leu)	<i>Driver</i> nível 1	Alta	0.307
c.11886C>A	p.(Arg3962Ser)	<i>Driver</i> nível 1	Alta	0.235
c.6386G>A	p.(Arg2129Cys)	<i>Driver</i> nível 1	Alta	0.042
c.8295_8296insT	p.(Gln2766ThrfsTer38)	<i>Driver</i> nível 2	Muito alta	0.121
c.3689_3693delCCTGT	p.(Thr1197SerfsTer4)	<i>Driver</i> nível 2	Muito alta	0.170
c.2899T>A	p.(Lys967Ter)	<i>Driver</i> nível 2	Muito alta	0.667
c.1557C>T	p.(Trp519Ter)	<i>Driver</i> nível 2	Muito alta	0.106
c.12016-1C>A	p.(Ter4006_splice)	<i>Driver</i> nível 2	Alta	0.153
c.3274T>A	p.(Tyr1092Phe)	<i>Driver</i> nível 2	Alta	0.291
c.10595T>A	p.(Gln3532Leu)	<i>Passenger</i>	Médio	-
c.1562C>A	p.(Cys521Phe)	<i>Passenger</i>	Médio	-
c.2624C>A	p.(Ser875Ile)	<i>Passenger</i>	Médio	-
c.2270C>A	p.(Gly757Val)	<i>Passenger</i>	Médio	-
c.7910G>T	p.(Ser2637Tyr)	<i>Passenger</i>	Médio	-
c.1257C>A	p.(Lys419Asn)	<i>Passenger</i>	Médio baixo	-
c.5859T>A	p.(Thr1953Ser)	<i>Passenger</i>	Muito baixo	-
c.4698G>A	p.(Thr1566Met)	Polimorfismo	Baixo	-

*conforme classificação do CGI. VAF, *variant allelic frequency*.

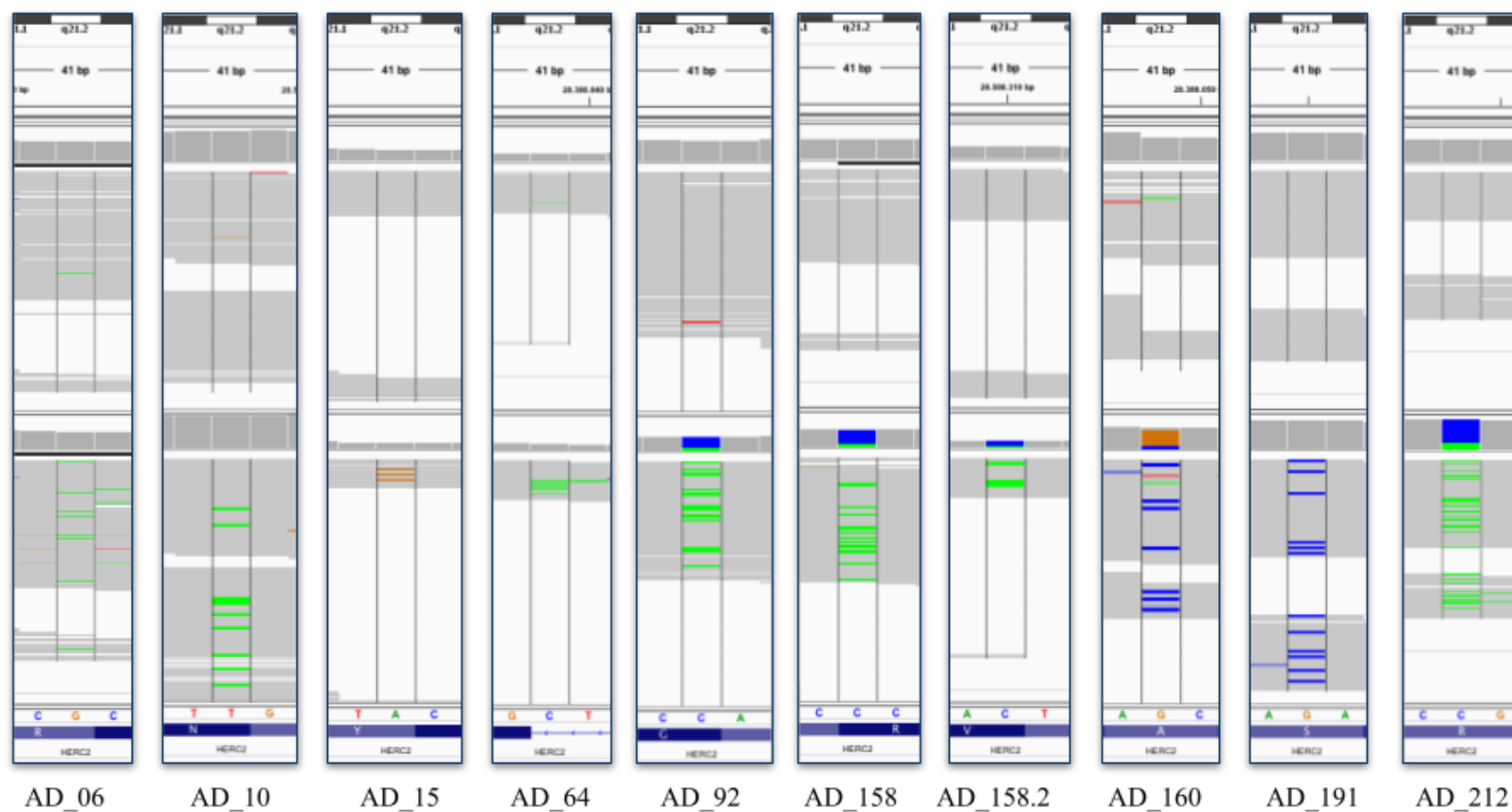


Figura 11 - *Integrative Genomic Viewer* (IGV) demonstrando a cobertura e frequência alélica (VAF) de algumas variantes patogênicas, o identificador abaixo de cada coluna (AD_X) especifica a amostra em que a variante foi observada. No painel superior, mostramos a região analisada na amostra germinativa do indivíduo; no painel inferior, temos imagens representativas da mesma região na amostra tumoral (somática). As cores azul, verde e laranja representam *reads* com as variações detectadas (VAF), enquanto os traços cinzas representam o total de *reads* (cobertura vertical).

6.1.1.2 Casuística Hospital de Amor

Considerando a casuística de CPNPC do WES realizado pelo grupo (n=123), a frequência de casos com variantes classificadas como provavelmente patogênicas ou patogênicas em *HERC2* foi de 10,5% (n= 13; 15 variantes). De acordo com o subtipo histológico, os casos de adenocarcinoma apresentaram uma frequência mutacional de *HERC2* de 8,8% (n= 8/90; 9 variantes) (Figura 12), e os casos de CEC apresentaram uma frequência mutacional de *HERC2* de 15,1% (n=5/33; 6 variantes) (Figura 13). Podemos observar um padrão de distribuição uniforme destas variantes ao longo do gene – sem região *hotspot* – e cada variante foi única dentre os casos analisados.

Adenocarcinoma

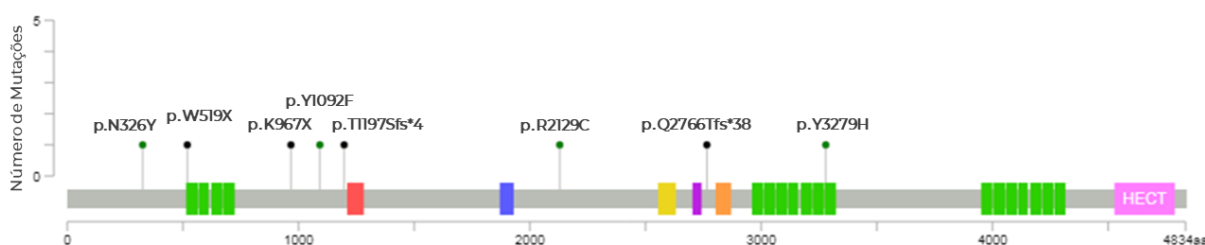


Figura 12 - Variantes preditas como patogênicas em amostras de adenocarcinoma da presente casuística. Na imagem está representada a estrutura proteica da proteína *HERC2*, com seus domínios destacados por cores diversas. Variantes intrônicas não estão visíveis. Eixo Y, número de vezes em que a variante foi detectada; eixo X, número dos aminoácidos e a respectiva localização na proteína. Figura construída com Oncoprinter⁶⁰.

Carcinoma de Células Escamosas

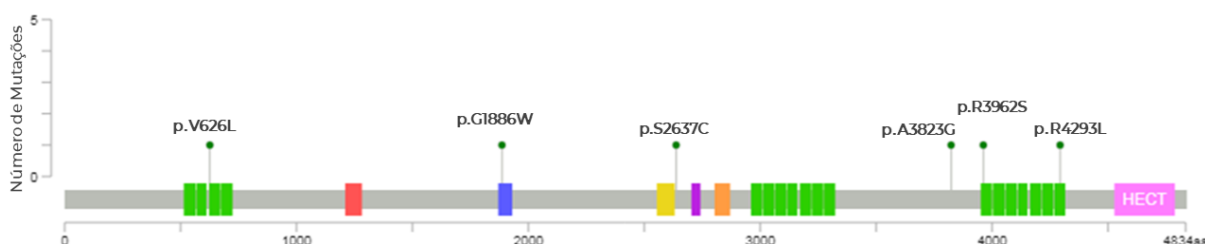


Figura 13 - Variantes preditas como patogênicas em amostras de CEC da presente casuística. Na imagem está representada a estrutura proteica da proteína *HERC2*, com seus domínios destacados por cores diversas. Eixo Y, número de vezes em que a variante foi detectada; eixo X, número dos aminoácidos e a respectiva localização na proteína.. Figura construída com Oncoprinter⁶⁰.

6.1.1.3 Bancos de dados

Analisando todos os casos de CPNPC disponíveis no cBioPortal (n=5485) – adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas – oriundos de 15 *datasets*, foram encontradas 294 variantes em 319 pacientes, em sua grande maioria classificadas como *missense*, totalizando uma frequência mutacional de 4,7%. Segundo o GDC (n=12034), 223 variantes em 289 casos corresponderam a uma frequência mutacional de 2,4%. As variantes se distribuem igualmente por toda extensão do gene, não sendo possível identificar nenhuma região *hotspot*, como mostrado na figura 14.

Considerando a classificação de acordo com o subtipo histológico, o gene *HERC2* apresentou-se mais frequentemente mutado em CEC, que variou de 8,2 a 15% nos *datasets* analisados, enquanto que em adenocarcinoma, esta frequência mutacional variou de 1,69 a 13% (Tabela 2). É possível observar consistentemente uma maior frequência mutacional em CEC quando comparada com adenocarcinoma em todos os *datasets* analisados.

Tabela 2 - Frequências mutacionais e total de variantes descritas para *HERC2* nos bancos de dados consultados e encontradas por WES realizado pelo grupo de pesquisa.

	Adenocarcinoma			CEC		
	Frequência (N alterado)	N total	Total de variantes	Frequência (N alterado)	N total	Total de variantes
cBioPortal	3,6% (204)	4159	143	8,5% (115)	1176	68
IntOGen	13,6% (103)	756	102	15,1% (88)	584	80
GDC (NCI)	1,69% (138)	8155	111	8,2% (142)	1726	104
WES (GTOP*)	8,8% (8)	90	9	15,1% (5)	33	6

N: número de casos. CEC: Carcinoma escamocelular. GDC, Genomic Data Commons. NCI: National Cancer Institute. WES: *Whole-exome sequencing*. *GTOP: Grupo Translacional de Oncologia Pulmonar.

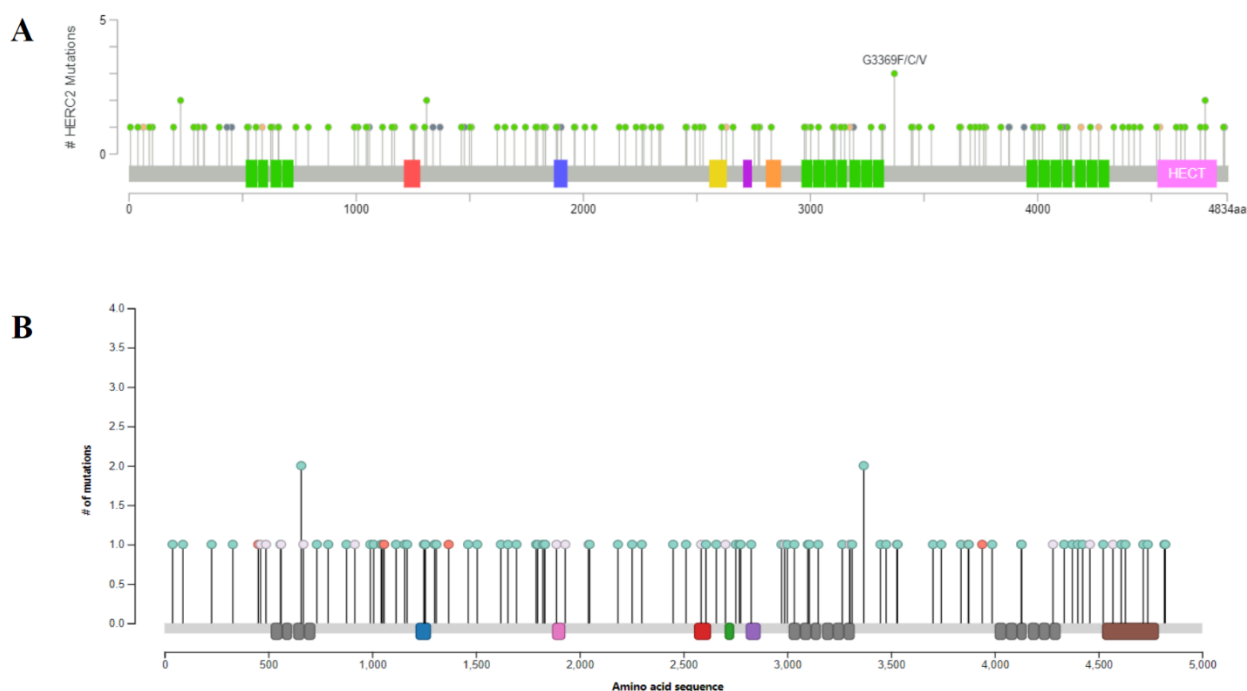


Figura 14 - Distribuição de variantes no gene *HERC2* em adenocarcinoma nos bancos de dados (A) cBioPortal e (B) IntOGen.

6.1.2 Associação do status mutacional de *HERC2* a dados clínicopatológicos e sociodemográficos

6.1.2.1 Casuística Hospital de Amor

Os 13 casos com mutações no gene *HERC2* são compostos, em sua maioria, por pacientes do sexo masculino (61,5 %), fumantes (84,6 %), com diagnóstico de câncer de pulmão de não pequenas células do subtipo adenocarcinoma (61,5%). Nossa população de estudo é proveniente majoritariamente de pacientes do estado de São Paulo (78 indivíduos, 63,4%). Consequentemente, a região sudeste é a mais representada – com 102 indivíduos, 82,9% dos casos – enquanto as regiões Nordeste e Sul são as menos representadas - ambas com 2 indivíduos, que representam 1,6% dos casos cada.

A presença de variantes no gene *HERC2* não se associou com sexo, idade, cor, histórico de tabagismo e histologia. No entanto, vale ressaltar que, apesar da ausência de significância estatística, 100% dos pacientes com variantes patogênicas para *HERC2* foram expostos ao tabaco ($p=0.122$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise estatística de características sociodemográficas e histológicas quanto ao status mutacional para *HERC2*.

Variável	Parâmetro	<i>HERC2</i> ^{WT1}	<i>HERC2</i> ^{-MUT}	p-valor ²
		Benignas (N=110)	Patogênicas (N=13)	
Sexo	Masculino	70	8	1.0
	Feminino	40	5	
Idade	≤62 Anos	54	9	0.242
	>62 anos	56	4	
Cor	Branca	86	11	1.0
	Parda	14	2	
Histórico de Tabagismo	Fumante atual	56	11	0.210
	Ex-fumante ≤15anos	22	2	
	Ex-fumante >15anos	7	0	
Exposição ao tabaco	Ativa/passada	89	13	0.122
	Ausente	21	0	
Histologia	Carcinoma de Células Escamosas	28	5	0.331
	Adenocarcinoma	82	8	

N, número de casos. 1 - WT = *wild-type*, selvagem. 2 - Teste Exato de Fisher

Na análise de ancestralidade genética, os indivíduos carreadores de variantes patogênicas no gene *HERC2* apresentaram, em média, uma predominância da ancestralidade europeia (74,7%), seguida por 14,4% da ancestralidade africana, 7% da ameríndia e 4% asiática. Os casos não carreadores de variantes patogênicas, apresentaram, em média, 68,9% da ancestralidade europeia, 16,3% da africana, 8,3% da asiática, 6,4% da ameríndia (Figura 16).

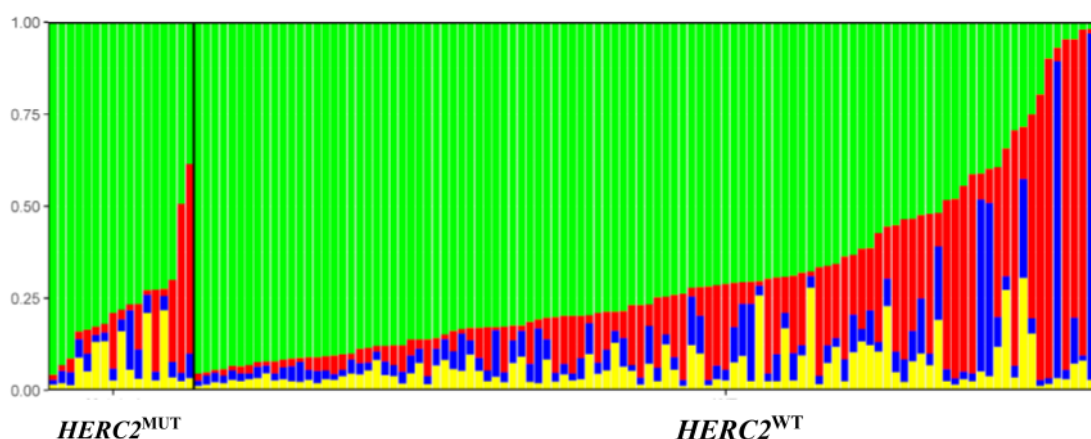


Figura 15 - Perfil da contribuição das diferentes ancestralidades genéticas para indivíduos selvagens para *HERC2* (*HERC2*^{WT}) e portadores de variantes neste gene (*HERC2*^{MUT}). As cores representam cada grupo étnico avaliado: Europeu (verde), Africano (vermelho), Ameríndio (amarelo) e Asiático (azul).

Não observamos associação do status mutacional de *HERC2* com ancestralidade genética (Tabela 4), concordante com a ausência de associação de variantes do gene *HERC2* com cor de pele (Tabela 3).

Tabela 4 - Associação do status mutacional de *HERC2* e ancestralidade genética.

Variável		<i>HERC2</i> -WT ¹ / Benignas (N=111)	<i>HERC2</i> -mut Patogênicas (N=13)	p-valor ²
EUR	Baixo	39	2	0.267
	Intermediário	37	7	
	Alto	35	4	
AFR	Baixo	35	6	0.506
	Intermediário	39	3	
	Alto	37	4	
ASN	Baixo	38	4	0.584
	Intermediário	35	6	
	Alto	38	3	
AME	Baixo	36	5	0.936
	Intermediário	38	4	
	Alto	37	4	

N, número de casos. EUR, europeu; AFR, africano; ASN, asiático; AME, ameríndio. 1 - WT = *wild-type*, selvagem. 2 - Teste Exato de Fisher.

6.1.2.2 Bancos de dados

De acordo com os dados disponibilizados pelo cBioPortal, as variáveis idade ao diagnóstico ($p=0,877$), etnia autodeclarada ($p=0,316$) e histologia ($p=0,137$) não se associaram com o status mutacional de *HERC2*. A exposição ao tabagismo foi uma variável que também não se relacionou à presença de variantes no gene *HERC2*, apesar do p-valor limítrofe ($p=0,062$).

Nós consultamos 7 estudos compreendendo as histologias adenocarcinoma e CEC com avaliação mutacional ampla (exoma ou genoma completos), totalizando um número amostral de 4.296, os quais evidenciaram uma associação positiva entre a alta carga mutacional, na forma de TMB (*Tumor Mutation Burden*), e a presença de variante no gene *HERC2* ($p\text{-valor} < 0,001$) (Figura 17).

***HERC2* e TMB**

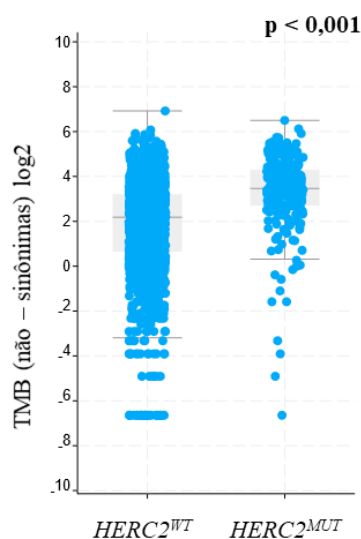


Figura 16 - Associação entre *HERC2* e TMB segundo dados do cBioPortal.

Não foi possível determinar uma correlação clara entre a presença de alteração no gene *HERC2* e a flutuação no seu próprio nível de expressão gênica.

Tendo em vista a aparente relação próxima entre *HERC2* e *TP53*, sugerida pelos estudos *in vitro* mencionados anteriormente, também buscamos avaliar possíveis correlações entre esses dois atores no contexto *in silico*. Nos casos do cBioPortal, *HERC2* estava mutado em 11% dos casos, enquanto *TP53* apresentou frequência mutacional de 55%. Segundo análise realizada pela própria plataforma, esses dois genes apresentam uma tendência de co-ocorrência ($p < 0,001$). Também inquerimos os estudos TCGA, CPTAC e OncoSG quanto aos níveis de expressão gênica dos dois genes. A figura 18 traz os resultados representativos do TCGA para adenocarcinoma e CEC. Apesar de os dois tipos histológicos apresentarem uma tendência de comportamento oposta, não foi observada correlação estatística em nenhum dos casos.

Correlação de Expressão gênica: *HERC2* e *TP53*

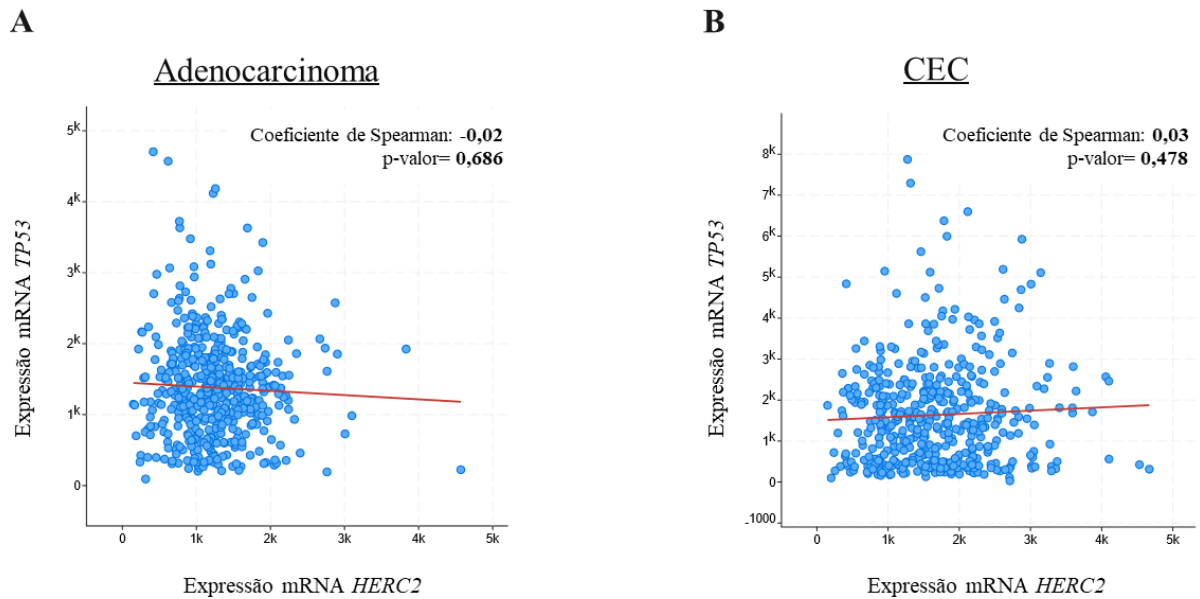


Figura 17 - Análise de correlação entre o nível de expressão gênica de *HERC2* e *TP53* segundo dados do TCGA disponíveis no cBioPortal. A - Gráfico de dispersão com linha de regressão em amostras de adenocarcinoma; B - Gráfico de dispersão com linha de regressão em amostras de CEC.

6.1.3 Associação do status mutacional de *HERC2* com desfecho

6.1.3.1 Casuística Hospital de Amor

Também realizamos a análise de sobrevida comparando *HERC2*^{MUT} e *HERC2*^{WT} por meio do teste de Log-rank (Figura 19). Os pacientes carreadores de variantes patogênicas no gene *HERC2* apresentaram sobrevida global mediana de 6,5 meses, enquanto os pacientes não carreadores apresentaram sobrevida global mediana de 20,3 meses ($p=0,271$).

Sobrevida Global

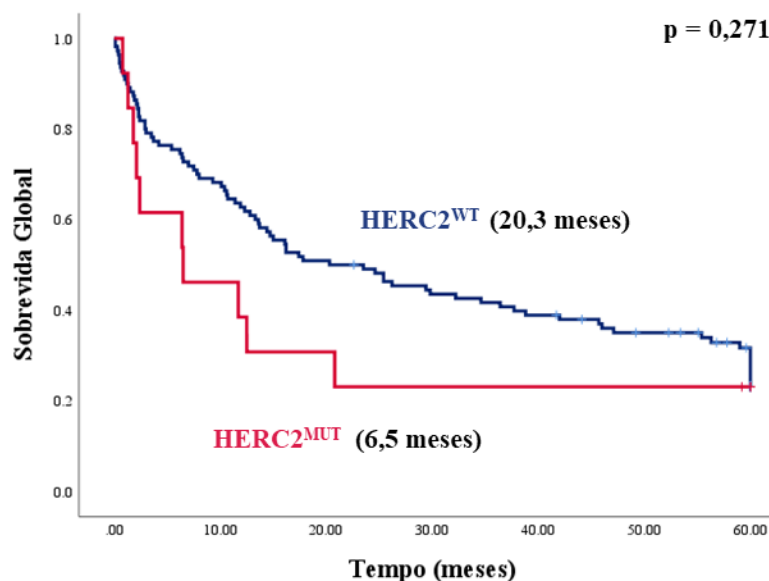


Figura 18 - Sobrevida global (em meses) comparando o grupo de pacientes com variantes patogênicas no gene *HERC2* ($n=13$) e o grupo de pacientes com status selvagem para este gene ou com variantes benignas ($n=110$). Valores correspondentes à mediana de sobrevida.

Esse resultado foi corroborado pela regressão de Cox univariada em que o grupo carreador de variantes patogênicas no gene *HERC2* apresentou razão de risco de óbito de 1,6 (IC 95%: 0,84 - 3,15; p -valor= 0,15). A análise multivariada com correção para o tabagismo evidenciou uma razão de risco de 1,2 (IC 95%: 0,619 – 2,33; p -valor= 0,588) (Tabela 5).

Tabela 5 - Regressão de Cox multivariada para as variáveis tabagismo e status mutacional do gene *HERC2*.

Variável		N	HR	95% CI	p-valor ¹
Tabagismo	Nunca Fumou	21	REF.	REF.	0.003
	Fumante	102	2,901	1,45-5,81	
Status <i>HERC2</i>	<i>HERC2</i> ^{WT}	110	REF.	REF.	0.588
	<i>HERC2</i> ^{MUT}	13	1,201	0,62-2,33	

N, número de casos. HR = *Harzard Ratio*. CI = Intervalo de Confiança. 1 – Regressão de Cox Multivariada. WT = *wild-type*, selvagem. MUT = Mutado.

6.1.3.2 Bancos de dados

No cBioPortal, para os casos mutados em *HERC2* com informações de desfecho da doença foi realizada análise de sobrevida global ($n=2498$), que indicou ausência de associação de variantes de *HERC2* e desfecho. Na avaliação das duas histologias de forma conjunta, os pacientes carreadores de variantes patogênicas no gene *HERC2* apresentaram sobrevida global

mediana de 47 meses, enquanto que os pacientes não carreadores apresentaram sobrevida global mediana de 55 meses ($p=0,546$; Figura 20).

Para adenocarcinoma, observamos uma menor sobrevida nos indivíduos $HERC2^{MUT}$, sendo a sobrevida global mediana para os $HERC2^{MUT}$ de 45 meses e de 58 meses para os $HERC2^{WT}$ ($p=0,084$; Figura 20). Para CEC, não houve associação entre a sobrevida global e o status de $HERC2$ ($p=0,371$; Figura 20).

Sobrevida Global

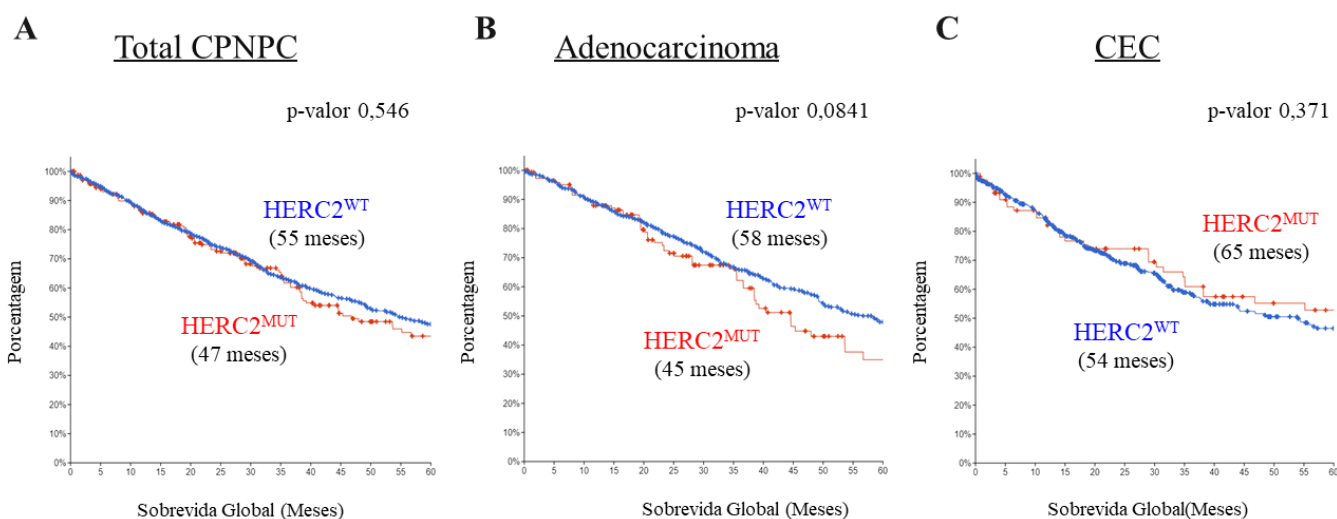


Figura 19 - Análise de sobrevida global para o total de indivíduos com CPNPC (A), para Adenocarcinoma (B) e para CEC (C) com $HERC2^{WT}$ e $HERC2^{MUT}$ utilizando dados do cBioPortal⁶⁰.

Segundo os dados do *KM Plotter*, também não houve associação entre sobrevida global e presença de variantes no gene $HERC2$ para adenocarcinoma ($RR=1,7$; IC 95% 0,68 - 1,68) e para CEC ($RR=0,91$; IC 95% 0,61 - 1,36) (Figura 21).

Sobrevida Global

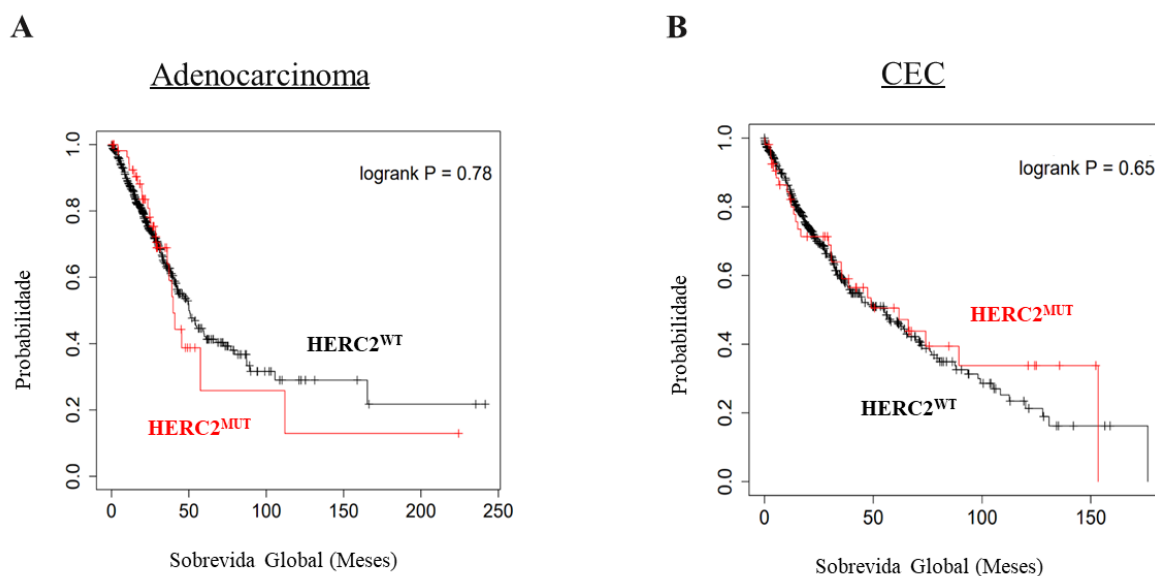


Figura 20 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para variantes no gene *HERC2* em Adenocarcinoma (n=508) (A) e CEC (n=488) (B) utilizando dados do *KM Plotter*¹¹⁷.

Já os dados de expressão gênica obtidos nesta mesma plataforma demonstram que a alta expressão do gene *HERC2* esteve associada à maior sobrevida em adenocarcinoma de pulmão (RR= 0,73; IC 95% 0,56 – 0,96; Figura 22). Porém, o mesmo não foi observado em CEC (RR= 0,9; IC 95% 0,64 – 1,27; Figura 22).

Sobrevida Global

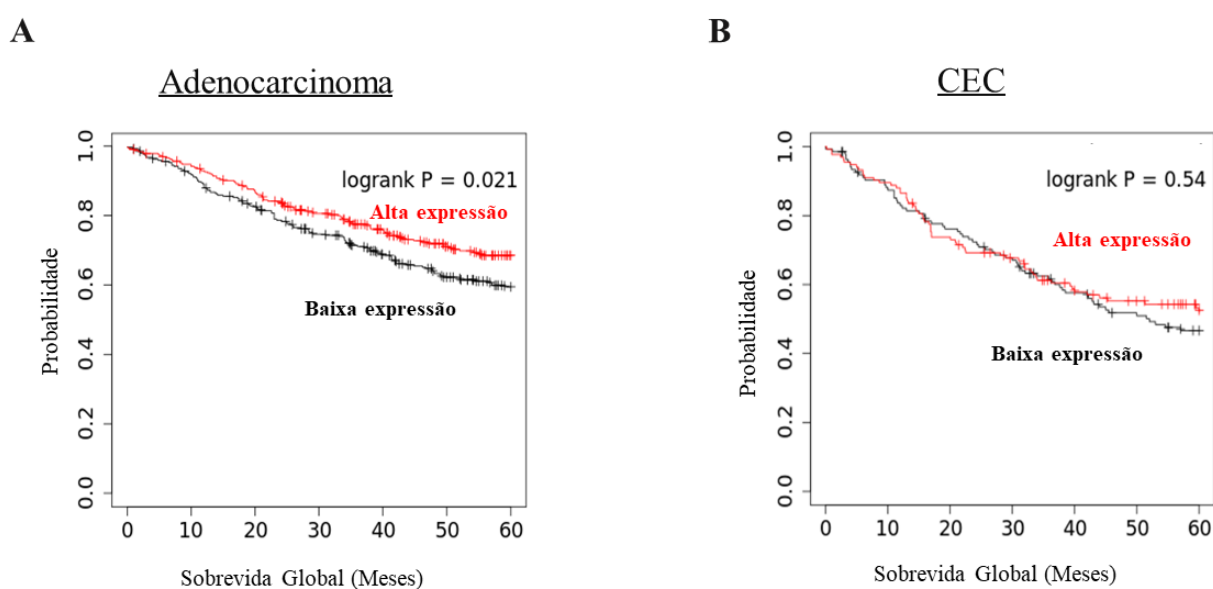


Figura 21 - Curvas de sobrevida de Kaplan Meier para expressão gênica do gene *HERC2* em Adenocarcinoma (n=672) (A) e CEC (n=271) (B) utilizando dados do *KM Plotter*¹¹⁷.

6.2 Estudos funcionais *in vitro*

6.2.1 Expressão proteica basal das linhagens selecionadas

Em nível proteico, todas as linhagens estudadas - CORL105, H292 e SK-MES-1 – apresentaram expressão basal para o gene *HERC2* (Figura 23). Foi padronizada a diluição 1:1000 do anticorpo primário anti-*HERC2*.

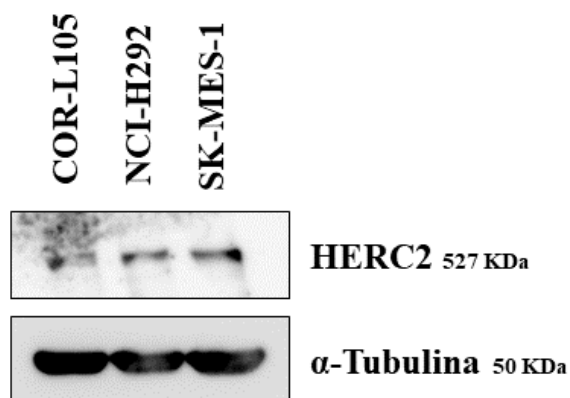


Figura 22 - Expressão proteica basal de *HERC2* nas linhagens CORL105, H292 e SK-MES-1. Controle endógeno utilizado para normalização foi a α -tubulina.

6.2.2 Silenciamento gênico por esiRNA

Na avaliação temporal ao longo de 48h, 72h e 96h, podemos constatar o sucesso do silenciamento de *HERC2* na linhagem SK-MES-1 em todos os pontos estudados (Figura 24).

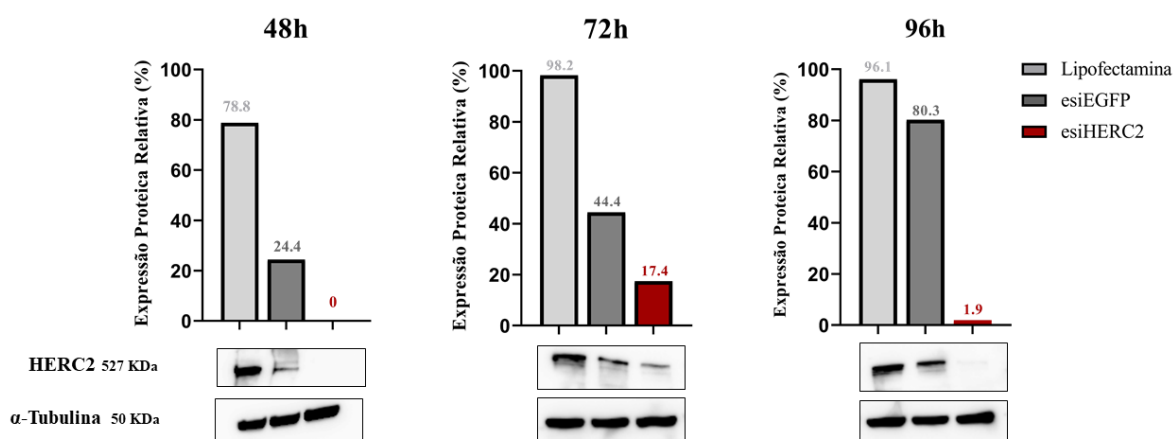


Figura 23 - Quantificação proteica de *HERC2* por *western blot* evidenciando o silenciamento desta proteína na linhagem SK-MES-1 após 48h, 72h e 96h.

Com este resultado, prosseguimos para os ensaios funcionais, considerando o silenciamento efetivo.

6.2.3 Avaliação de proliferação celular – xCELLigence

Os dados de proliferação gerados pelo xCELLigence dos três grupos analisados – Lipofectamina, esiEGFP e esiHERC2 – são expressos como *cell index*; essa métrica representa a quantidade de células que estão aderidas ao poço, e ela é calculada a partir da variação de impedância da corrente elétrica. A título comparativo, nós definimos o maior valor de *cell index* do controle negativo esiEGFP como 100% de ocupação do poço e utilizamos esse valor como referência para determinar qual a porcentagem de ocupação dos demais grupos. A partir da média de dois experimentos independentes, foi possível observar uma perda de 57,4% no potencial proliferativo das células silenciadas com esiHERC2 em 229h (esiEGFP = 100%; Lipofectamina = 90,8%; esiHERC2 = 42,6%) (Figura 25).

Proliferação em tempo real (xCELLigence)

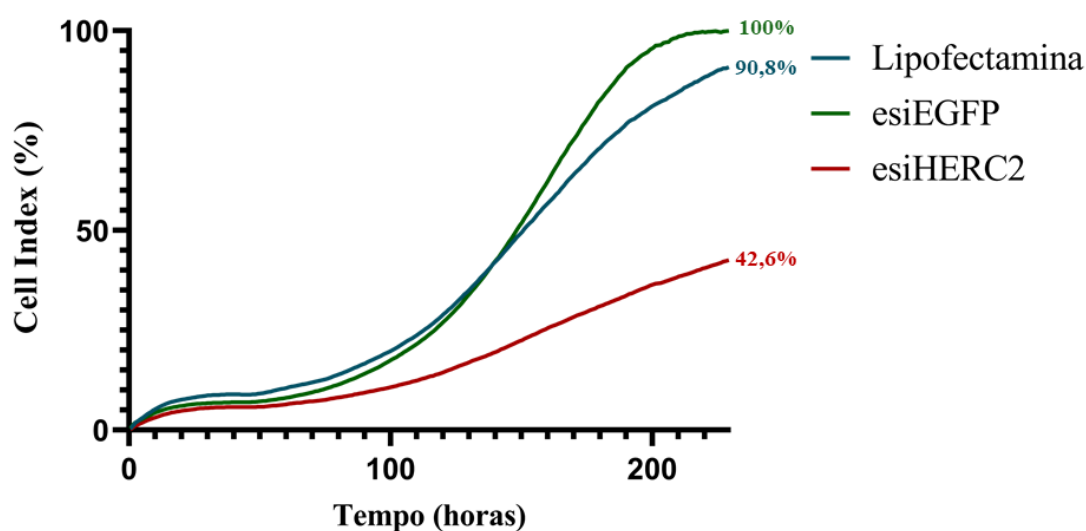


Figura 24 - Gráfico de proliferação em tempo real até o tempo 229h, correspondente a 100% de ocupação do controle negativo esiEGFP.

6.2.4 Avaliação de migração e invasão

Para caracterizar o perfil migratório e invasivo das células silenciadas, nós realizamos os ensaios de trans-well e Matrigel. Após 48h de plaqueamento, não foi possível observar diferença significativa na quantidade de células que migraram ($p=0,93$) ou invadiram ($p=0,4$) quando comparamos os três grupos de estudo. As figuras 26B e 26C representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes para cada ensaio.

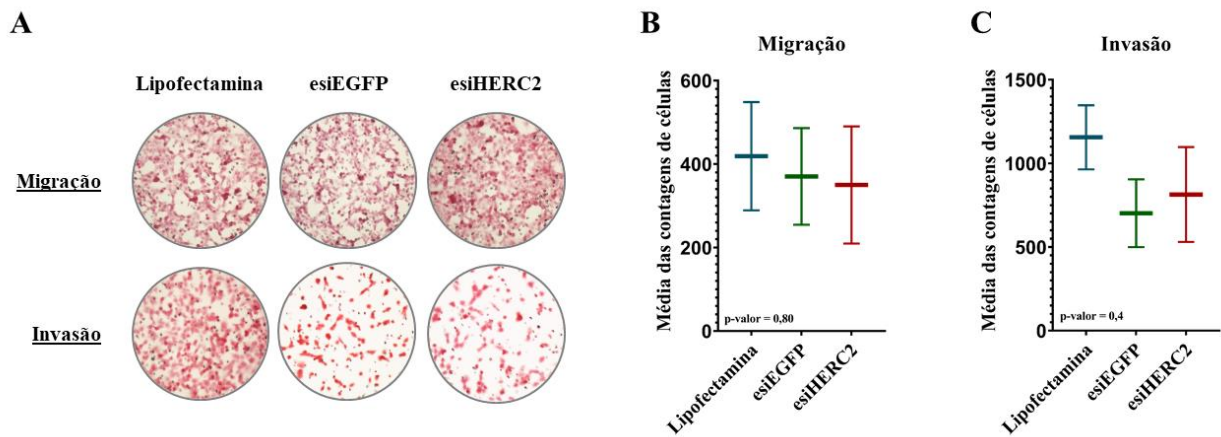


Figura 25 - Ensaio de migração e invasão das células silenciadas. A - Pannel de imagens representativas de cada condição nos dois ensaios. B - Comparação da média das contagens de células que migraram nas três condições. C - Comparação da média das contagens de células que invadiram nas três condições.

6.2.5 Avaliação de ciclo celular – citometria de fluxo

Nós avaliamos a proporção de células em cada fase do ciclo celular após 36h e 96h de silenciamento. Não houve variação significativa entre os três grupos experimentais em nenhum dos momentos analisados (36h: p-valor = 0,156; 96h: p-valor = 0,102), esse resultado reflete a média de dois experimentos independentes (Figura 27).

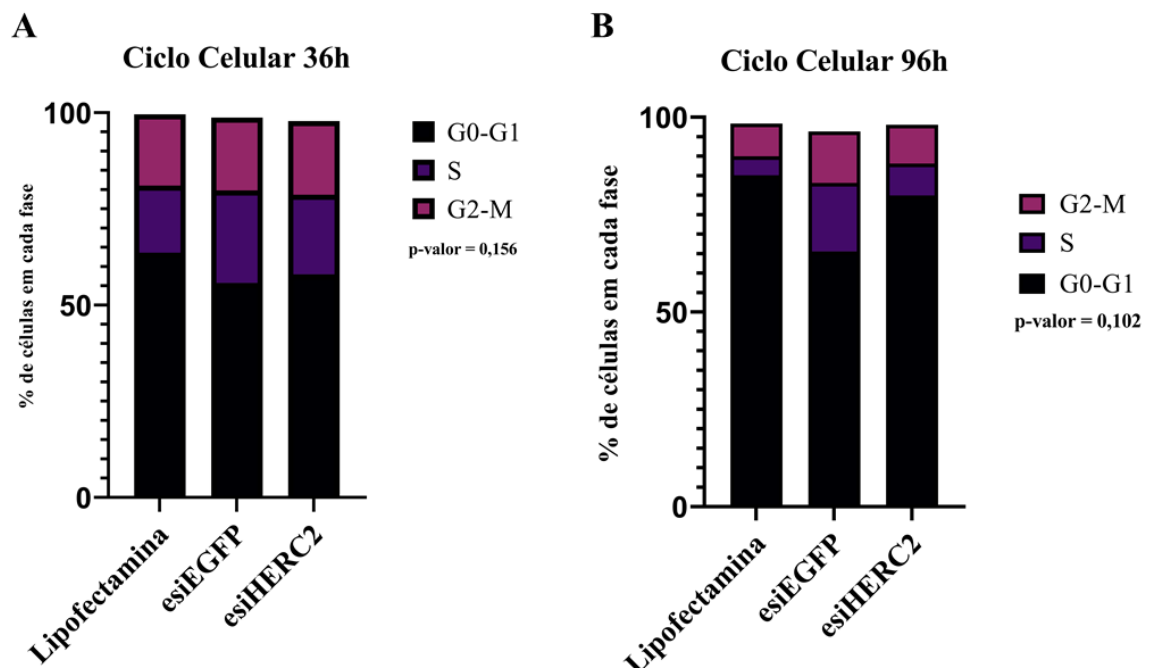


Figura 26 – Avaliação de ciclo celular por citometria de fluxo. Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após 36h (A) e 96h (B) de silenciamento.

6.2.6 Avaliação de sensibilidade ao tratamento com cisplatina

As células silenciadas para *HERC2* apresentaram um IC₅₀ médio de 34,67, enquanto os controles negativos (esiEGFP) e de transfecção (Lipofectamina) apresentaram 22,6 e 24,5, respectivamente (Figura 28). Esse resultado sugere uma possível resistência ao tratamento com cisplatina na ausência do gene *HERC2*.

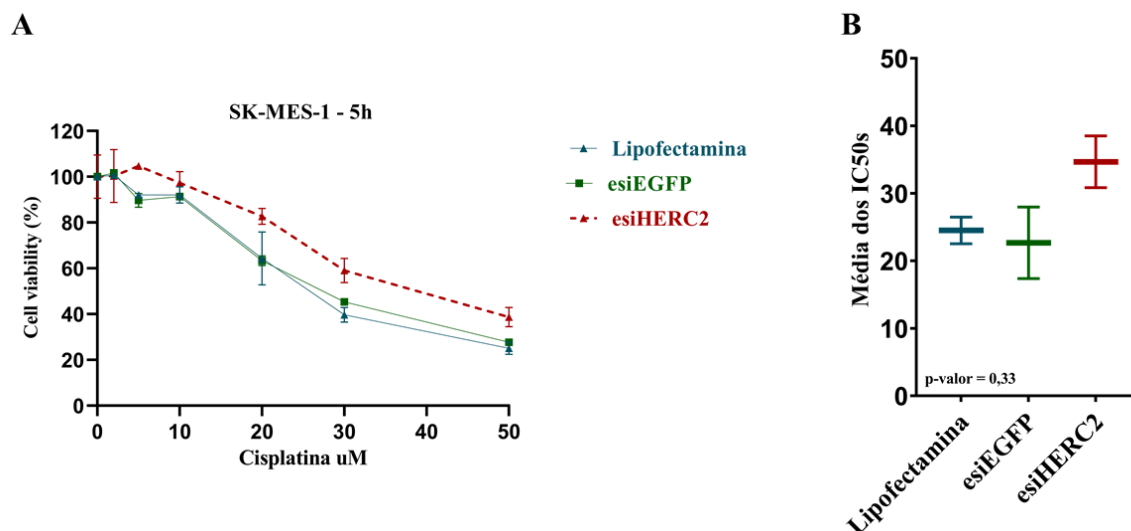


Figura 27 - Determinação de IC₅₀ para cisplatina. A. Curva de dose-resposta. B. Comparação da média entre os IC₅₀ determinados em dois experimentos independentes.

Na tabela 6 descrevemos os valores individuais de IC₅₀ e R² de cada replicata experimental.

Tabela 6 - Descrição das replicatas de definição de IC₅₀ para cisplatina dos três grupos experimentais.

	IC ₅₀	R ²	IC ₅₀	R ²	Média IC ₅₀	Desvio Padrão
Lipofectamina	26,48	0,9637	22,52	0,8897	24,5	2,80
esiEGFP	27,97	0,9801	17,38	0,8710	22,67	7,49
esiHERC2	38,51	0,9415	30,83	0,7982	34,67	5,43

7 DISCUSSÃO

Um conjunto de evidências existe acerca do envolvimento do gene *HERC2* em diversos processos patológicos, como desordens neuronais, contudo, essa investigação é limitada no contexto oncológico^{93, 94}. O envolvimento sugestivo deste gene no câncer é respaldado, principalmente, pelos estudos que relatam a implicação deste gene em processos como reparo ao dano no DNA e controle da replicação⁶⁹⁻⁷¹.

No presente trabalho, descrevemos as variantes encontradas no gene *HERC2* em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) tanto em casos atendidos pelo serviço de um hospital de referência em câncer no Brasil (Hospital de Amor), quanto em dados públicos, de origem diversa. Observamos uma frequência de variantes no gene *HERC2* de 10,5% nos casos do Hospital de Amor e 2,4 a 4,7% nos bancos de dados. Essa maior frequência na população estudada pode estar relacionada com a maior diversidade étnica da população brasileira devido à miscigenação, uma vez que polimorfismos neste gene estão associados à pigmentação da pele e cor dos olhos^{79, 81-83}, além de estar associado à ancestralidade africana^{86, 87}.

Curiosamente, as frequências mutacionais do gene *HERC2* variaram entre os portais consultados – mesmo havendo uma sobreposição de *datasets* utilizados. Este fato pode ser atribuído, possivelmente, ao número de casos disponíveis em cada repositório, a diferentes algoritmos de bioinformática utilizados pelas plataformas e à seletividade das variantes por diferentes filtros. Apesar disso, a frequência mutacional observada nos bancos de dados e na presente casuística foi consistentemente maior em CEC que em adenocarcinoma. Esse achado sugere uma maior relevância de *HERC2* em CEC, algo potencialmente relacionado ao status de tabagismo, uma vez que as variantes patogênicas do gene *HERC2* estiveram presentes apenas nos pacientes fumantes ou ex-fumantes tanto em nossa casuística brasileira quanto nos *datasets* avaliados¹¹⁹⁻¹²¹. A associação do tabagismo com a mutagênese já foi observada com outros genes e topografias, sendo o maior exemplo o gene *TP53* em câncer de cabeça e pescoço, o qual apresenta perda de função em grande parte dos tumores associados ao tabaco¹²², incluindo em casos brasileiros¹²³. Além do câncer de cabeça e pescoço, o gene *TP53* também se encontra frequentemente mutado em câncer de pulmão, apresentando mutações específicas relacionadas ao status de tabagismo^{124, 125}. A relação entre o gene *HERC2* e CEC pode então ter origem etiológica. Entretanto, a existência de correlação biológica entre tais fatos ainda precisa ser elucidada.

Considerando a hipótese de o *HERC2* ser um gene supressor tumoral, avaliamos também a concomitância de alterações neste gene com outras alterações moleculares, uma vez

que genes supressores tumorais e suas co-mutações tem ganhado relevância clínica nos últimos anos⁵⁴. Observamos que as variantes do gene *HERC2* ocorrem em concomitância com outros genes determinantes em câncer de pulmão, especialmente o gene *TP53* em ambos os tipos histológicos – adenocarcinoma e CEC – o que pode indicar a participação desses genes em vias complementares, ou o mesmo fator etiológico induzindo este tipo de mutação. Essa concomitância foi corroborada nos dados públicos presentes no cBioPortal. A co-ocorrência de mutações somáticas evidencia a heterogeneidade genética nesses tumores, revelando possíveis subtipos com perfil mutacional distinto com diferentes implicações no manejo clínico e desfecho da doença. Um exemplo importante da implicação das co-mutações no manejo clínico é a pior resposta à imunoterapia em pacientes com CPNPC carreadores de mutações no gene *KRAS* concomitantes a mutações no gene *STK11*, culminando em uma menor sobrevida global dos pacientes¹²⁶⁻¹²⁸.

A fim de avaliarmos uma possível implicação no desfecho da doença, também avaliamos a sobrevida global dos pacientes com e sem variantes do gene *HERC2*. Nos pacientes da presente casuística, observamos uma maior sobrevida global em pacientes não carreadores de variantes somáticas do gene *HERC2* comparados a pacientes carreadores. Apesar de não ser estatisticamente significativo, possivelmente por limitação do número amostral, esse dado implica um ganho importante de sobrevida naqueles indivíduos sem alterações neste gene (aproximadamente 13 meses). A mesma tendência foi observada nos casos de adenocarcinoma dos bancos de dados públicos. Além disso, também observamos que, em bancos de dados, a alta expressão do gene *HERC2* está relacionada a uma maior sobrevida. Essa observação vai ao encontro da nossa hipótese de provável papel supressor tumoral (GST) do gene *HERC2*, já que essa classe de genes regulatórios parece atuar inibindo a tumorigênese¹²⁹. Em estudos funcionais, a proteína *HERC2* apresentou uma interação física com p53, estabelecendo sua participação na oligomerização e forma ativa de p53, assim como no *feedback* regulatório entre *TP53* e *MDM2*⁶³. Também foi esclarecida a relação entre *HERC2*, ATR e RPA, na qual *HERC2* ubiquitina RPA fosforilada, uma proteína que participa da replicação e do reparo ao dano no DNA¹³⁰. Outras características identificadas no presente estudo também apontam para o papel de GST do *HERC2*, como a distribuição uniforme das mutações ao longo da proteína sem nenhuma região *hotspot* evidente e os elevados valores de frequência encontrados, os quais condizem com o fato de GSTs estarem mais frequentemente alterados que oncogenes^{129, 131}.

Nos bancos de dados também observamos uma associação entre presença de variantes em *HERC2* e a carga mutacional alta, ou alto TMB. Devemos considerar a relevância do tabagismo como fator confundidor nesta relação, uma vez que esse hábito está relacionado com alta taxa

mutacional, e existe a hipótese de que *HERC2* esteja associado com tabagismo. Dito isto, podemos atrelar a associação de *HERC2* e TMB à falha dos mecanismos de reparo e consequente acúmulo de variantes através das divisões celulares, resultando em uma maior instabilidade genômica^{69, 71, 72}. Essa observação possibilita duas inferências. Por um lado, *HERC2* pode estar sofrendo alterações de ganho de função e assim aumentando sua potência em inibir proteínas de reparo. Por outro, as atividades deste gene podem ser diversas e não homogêneas e, com sua perda, diferentes mecanismos de defesa contra o dano podem, na verdade, ficar comprometidos, bem como ele pode exercer influência indireta em outras atividades celulares relacionadas, como o controle do ciclo celular. Essa relação se mostra relevante uma vez que a TMB já se estabeleceu como um marcador preditivo para a imunoterapia com inibidores de checkpoint imunológico em outros tipos tumorais¹³²⁻¹³⁴. Para explicar este comportamento, estudos mais aprofundados serão necessários.

A partir dessas evidências genômicas, tanto da presente casuística quanto dos bancos de dados consultados, seguimos com o silenciamento gênico bem-sucedido do gene *HERC2* em linhagem celular de CEC de pulmão. Primariamente, ao silenciarmos o gene *HERC2*, observamos uma redução considerável no ritmo proliferativo dessas células. A literatura aponta para uma direção oposta, na qual a perda do gene *HERC2* estaria relacionada com um aumento na proliferação e crescimento celular *in vitro*⁶². Vale ressaltar que esses resultados foram obtidos por metodologias diferentes do presente trabalho, tanto de silenciamento (siRNA) quanto do ensaio de proliferação (MTS), além de terem sido realizados em linhagens tumorais não pulmonares, por isso talvez não sejam comparáveis.

Um membro da família das HERCs, a proteína HERC1, já foi estabelecida como uma reguladora da proliferação através da via das MAPK¹³⁵. Por outro lado, o relacionamento de HERC2 com esse processo não é tão bem esclarecido. Um estudo recente demonstrou que HERC2 interage com a via de sinalização das MAPK por meio da proteína C-RAF, a qual ela ubiquitina. Essa interação, porém, não parece impactar a via canônica de proliferação celular, e sim a cascata C-RAF/MKK3/p38, relacionada à resposta ao estresse celular¹³⁶. Análises proteômicas identificaram HERC2 como participante de um complexo de alto peso molecular com NEURL4, E6AP e MAPK6¹³⁷; a atividade desse complexo e os efeitos nos processos celulares ainda não foi elucidado. Essas evidências suscitam uma avaliação aprofundada da relação de HERC2 com as diversas vias das MAPKs e um melhor entendimento da sua participação na proliferação celular.

Com relação à resposta ao tratamento com cisplatina, nossos resultados apontam um aumento na concentração inibitória média (IC50) em células silenciadas para o gene *HERC2*, o

que indica que são necessárias maiores concentrações da droga para atingir o mesmo efeito citotóxico que nas células tumorais com expressão normal do gene *HERC2*. As platinas atuam pela interação direta com o DNA e consequente dano. O papel dos diversos mecanismos de reparo ao DNA disponíveis na célula tumoral já foi relacionado à eficácia dessa linha terapêutica⁴⁶. *HERC2* está intimamente relacionado aos processos de resposta ao dano no DNA, seja diretamente ao ubiquitinar proteínas que executam essas ações, como *BRCA1* e *XPA*^{72, 73}, ou indiretamente, através da coordenação de fatores de reparo em resposta à radiação ionizante⁶⁹. Além disso, *HERC2* também influencia em outra importante variável para os efeitos do tratamento com platina: a regulação do ciclo celular; tanto pela interação com a proteína Claspin e consequente inibição da progressão da fase S do ciclo⁷⁰, quanto pela regulação da atividade de p53^{62, 63}.

Este trabalho sugere que, ao bloquearmos a ação do gene, suas funções inibitórias sobre proteínas de reparo são suspensas e a célula é capaz de responder efetivamente aos danos induzidos pela cisplatina. Em consonância, a ação positiva de *HERC2* sobre a polimerização de p53 é igualmente interrompida, assim como sua ação de retenção na fase S, contribuindo com a progressão do ciclo celular (Figura 29).

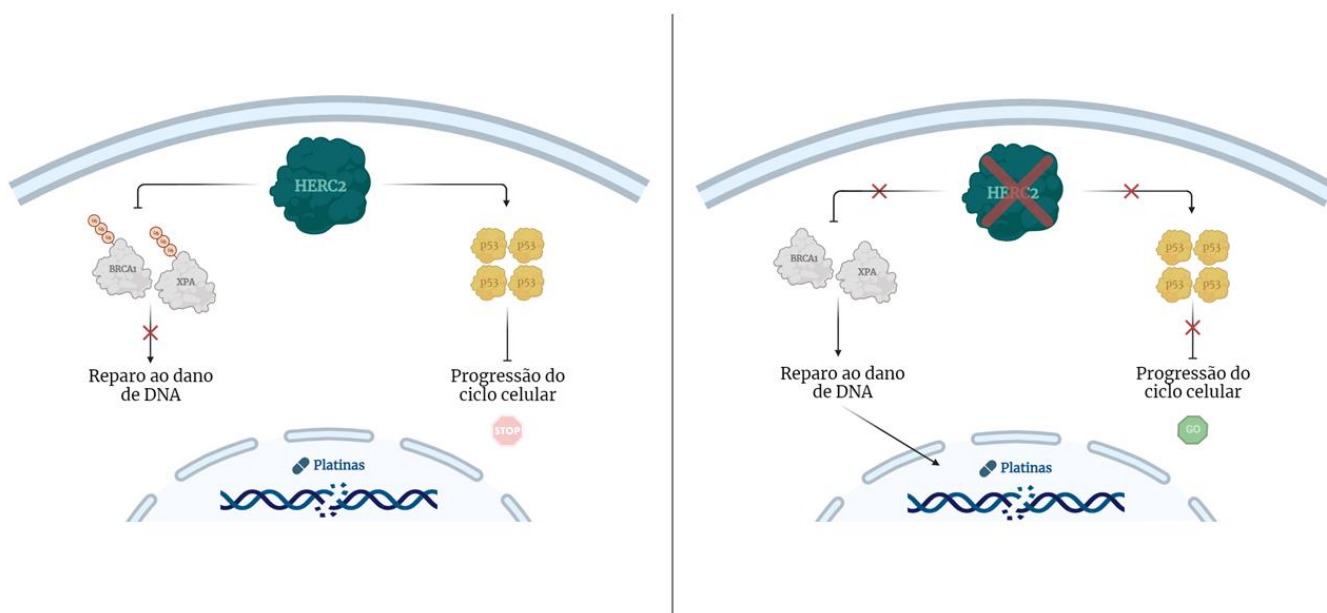


Figura 28 - Esquema proposto do impacto do silenciamento de *HERC2* na resposta celular ao tratamento com platinas.

É possível que um aumento do número de casos carreadores de variantes no gene *HERC2* evidencie uma associação de variantes no gene *HERC2* e algumas variáveis, como tabagismo e sobrevivência. Nossos achados permitiram revelar *HERC2* como um potencial participante da carcinogênese do câncer de pulmão, mas evidências ainda mais sólidas podem

ser atingidas pela ampliação da casuística. Uma estratégia plausível para tanto é a realização de um painel de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*) em novos casos, uma vez que o tamanho do gene exige a utilização de uma técnica em maior escala que o sequenciamento direto por capilar. Uma abordagem ainda mais abrangente, como o WES ou o WGS, permitirá a validação de observações feitas nos bancos de dados como a associação entre variantes em *HERC2* e TMB. Também é válido ressaltar que os depósitos nos bancos de dados consultados não são uniformes em relação à caracterização clínica, demográfica e étnica dos pacientes, um grande gargalo no uso de bancos públicos, aumentando o nível de dificuldade para comparar informações geradas por diferentes fontes.

Uma das limitações do nosso estudo é o modelo experimental, compreendido de apenas um tipo celular, que reflete o tipo histológico carcinoma de células escamosas. Contudo, uma caracterização mais ampla do comportamento de *HERC2*, tanto em outras linhagens de CEC como em adenocarcinoma, seria ideal para a definição de especificidade de acordo com histologia e tipo tumoral. Também seria importante realizar experimentos adicionais para avaliar os mesmos aspectos funcionais utilizando metodologias diferentes, como por exemplo ensaio colorimétrico para avaliar proliferação e/ou ensaio *wound healing* para avaliar migração. Desta forma, os resultados obtidos ganhariam ainda mais robustez. Ademais, transportar os nossos achados mais impactantes para o contexto *in vivo* contribuiria para a consolidação das evidências observadas.

No presente estudo, originado de uma casuística brasileira e com uma caracterização funcional relevante, o gene *HERC2* se mostra como um potencial gene *driver* com relevância para o câncer de pulmão. Apesar de algumas evidências ainda serem especulativas e circunstanciais, nós realizamos associações não antes discutidas e apontamos direções promissoras. Um relevante aspecto é o estudo de vias moleculares de proliferação, dano ao DNA e tratamento com cisplatina. Assim, um aprofundamento experimental é justificado pra esclarecer, em bases sólidas, a participação de *HERC2* na carcinogênese pulmonar.

8 CONCLUSÃO

O gene *HERC2* participa do controle fino de diversos processos biológicos no interior das células. No presente trabalho, nós descrevemos o perfil mutacional do gene *HERC2* em uma casuística brasileira de câncer de pulmão de não pequenas células, destacando a incidência marcante nos carcinoma de células escamosas (CEC) e estratificando tais variantes quanto à predição de patogenicidade. Com o auxílio de bancos de dados, traçamos potenciais relações de *HERC2* com características dessa doença, o tabagismo e a carga mutacional, e observamos um ganho de sobrevida naqueles indivíduos com alta expressão do gene. Ainda, foi possível estabelecer o impacto de *HERC2* na diminuição do potencial proliferativo das células tumorais silenciadas, assim como uma aparente resistência ao tratamento com cisplatina, principal estratégia terapêutica no manejo de indivíduos com CEC. O conjunto de evidências demonstradas por este trabalho ajuda a afirmar a participação deste gene na carcinogênese pulmonar, e abre caminhos promissores para a futura investigação dos mecanismos pelos quais *HERC2* exerce sua influência.

REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. **CA Cancer J Clin**. 2021;71(3):209-49.
2. Santos MdO, Lima FCdSd, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LMd, Cancela MdC. *Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025*. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2023;69(1).
3. *Registro hospitalar de câncer - Infográficos do Câncer 2021*. [Internet] Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021 [cited 06/06];Available from: <https://infogram.com/tumores-do-torax-2021-1h7g6k0g1n0502o>.
4. Bade BC, Dela Cruz CS. *Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention*. **Clin Chest Med**. 2020;41(1):1-24.
5. CJ S, TA P, MA R, A R, DJ D. "IARC Group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. **Food and Chemical Toxicology**. 2000;38:825-48.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global Cancer Statistics, 2002*. **CA A Cancer Journal for Clinicians**. 2005;55(2).
7. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. *Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk*. **Br J Cancer**. 2005;93(7):825-33.
8. Li Y, Sheu C-C, Ye Y, de Andrade M, Wang L, Chang S-C, et al. *Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study*. **The Lancet Oncology**. 2010;11(4):321-30.
9. Lan Q, Hsiung CA, Matsuo K, Hong YC, Seow A, Wang Z, et al. *Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia*. **Nat Genet**. 2012;44(12):1330-5.
10. Chen G, Wan X, Yang G, Zou X. *Traffic-related air pollution and lung cancer: A meta-analysis*. **Thorac Cancer**. 2015;6(3):307-18.
11. Raaschou-Nielsen O, Beelen R, Wang M, Hoek G, Andersen ZJ, Hoffmann B, et al. *Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer*. **Environ Int**. 2016;87:66-73.
12. IARC. *IARC Monographs Vol 126 group: Carcinogenicity of opium consumption*. **Lancet Oncol**. 2020;21(11):1407-8.
13. Akhtar N, Bansal JG. *Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker*. **Curr Probl Cancer**. 2017;41(5):328-39.

14. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeboller H, Rosenberger A, McCormack V, et al. *Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium*. **Am J Epidemiol**. 2012;176(7):573-85.
15. Fujimoto J, Wistuba, II. *Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma*. **Semin Diagn Pathol**. 2014;31(4):306-13.
16. Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. *Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward*. **Nat Rev Cancer**. 2017;17(12):725-37.
17. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. *The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015*. **J Thorac Oncol**. 2021;17(3):362-87.
18. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016 - based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site* [database on the Internet]. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2019.
19. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. **J Thorac Oncol**. 2015;10(9):1243-60.
20. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. *Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries*. **The Lancet**. 2018;391(10125):1023-75.
21. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TML, Myklebust TÅ, et al. *Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study*. **The Lancet Oncology**. 2019;20(11):1493-505.
22. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. *Non-small-cell lung cancer*. **Nat Rev Dis Primers**. 2015;1:15009.
23. Society. AC. *Tests for Lung Cancer*. [Internet] <https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html2021>.
24. (NCCN) NCCN. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Non-Small Cell Lung Cancer*. 2023.
25. Silvestri GA, Tanoue LT, Margolis ML, Barker J, F. D. *The Noninvasive Staging of Non-small Cell Lung Cancer*. **Chest**. 2003;123(1):147S-56S.
26. Lababede O, Meziane MA. *The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams*. **Oncologist**. 2018;23(7):844-8.
27. Cancer. AJCo. *AJCC Cancer Staging Manual. Lung.*: **Springer International Publishing**; 2017

28. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer.* **J Thorac Oncol.** 2016;11(1):39-51.
29. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. *Performance Status and Smoking Status Are Independent Favorable Prognostic Factors for Survival in Non-small Cell Lung Cancer: A Comprehensive Analysis of 26,957 Patients with NSCLC.* **J Thorac Oncol.** 2010;5(5):620–30.
30. Schild SE, Tan AD, Wampfler JA, Ross HJ, Yang P, Sloan JA. *A new scoring system for predicting survival in patients with non-small cell lung cancer.* **Cancer Med.** 2015;4(9):1334-43.
31. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. *Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines.* **Chest.** 2013;143(5 Suppl):e278S-e313S.
32. Crabtree TD, Denlinger CE, Meyers BF, El Naqa I, Zoole J, Krupnick AS, et al. *Stereotactic body radiation therapy versus surgical resection for stage I non-small cell lung cancer.* **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2010;140(2):377-86.
33. Donington J, Ferguson M, Mazzone P, Handy J, Jr., Schuchert M, Fernando H, et al. *American College of Chest Physicians and Society of Thoracic Surgeons consensus statement for evaluation and management for high-risk patients with stage I non-small cell lung cancer.* **Chest.** 2012;142(6):1620-35.
34. Baumann P, Nyman J, Hoyer M, Wennberg B, Gagliardi G, Lax I, et al. *Outcome in a prospective phase II trial of medically inoperable stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiotherapy.* **J Clin Oncol.** 2009;27(20):3290-6.
35. Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. *Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer.* **N Engl J Med.** 2020;383(18):1711-23.
36. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csöszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. *Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial.* **The Lancet.** 2021;398(10308):1344-57.
37. Ballman KV. *Biomarker: Predictive or Prognostic?* **J Clin Oncol.** 2015;33(33):3968-71.
38. Pennell NA. *Selection of chemotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer.* **Cleve Clin J Med.** 2012;79 Electronic Suppl 1:eS46-50.
39. Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, Keppler U, Macha HN, Pirker R, et al. *Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with*

advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial. Ann Oncol. 2002;13(10):1539-49.

40. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. *Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol.* 2008;26(21):3543-51.

41. SCHILLER JH, M.D., , HARRINGTON D, PH.D., BELANI CP, M.D., LANGER C, M.D., SANDLER A, M.D., KROOK J, M.D., et al. *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med.* 2002;346.

42. Gronberg BH, Bremnes RM, Flotten O, Amundsen T, Brunsvig PF, Hjelde HH, et al. *Phase III study by the Norwegian lung cancer study group: pemetrexed plus carboplatin compared with gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol.* 2009;27(19):3217-24.

43. Santana-Davila R, Szabo A, Arce-Lara C, Williams CD, Kelley MJ, Whittle J. *Cisplatin versus carboplatin-based regimens for the treatment of patients with metastatic lung cancer. An analysis of Veterans Health Administration data. J Thorac Oncol.* 2014;9(5):702-9.

44. Rottenberg S, Disler C, Perego P. *The rediscovery of platinum-based cancer therapy. Nat Rev Cancer.* 2021;21(1):37-50.

45. Bagrodia A, Lee BH, Lee W, Cha EK, Sfakianos JP, Iyer G, et al. *Genetic Determinants of Cisplatin Resistance in Patients With Advanced Germ Cell Tumors. J Clin Oncol.* 2016;34(33):4000-7.

46. Cavallo F, Graziani G, Antinozzi C, Feldman DR, Houldsworth J, Bosl GJ, et al. *Reduced proficiency in homologous recombination underlies the high sensitivity of embryonal carcinoma testicular germ cell tumors to Cisplatin and poly (adp-ribose) polymerase inhibition. PLoS One.* 2012;7(12):e51563.

47. Li Q, Damish AW, Frazier Z, Liu D, Reznichenko E, Kamburov A, et al. *ERCC2 Helicase Domain Mutations Confer Nucleotide Excision Repair Deficiency and Drive Cisplatin Sensitivity in Muscle-Invasive Bladder Cancer. Clin Cancer Res.* 2019;25(3):977-88.

48. Dacic S, Nikiforova MN. *Present and Future Molecular Testing of Lung Carcinoma. Adv Anat Pathol* 2014;21:94–9.

49. Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba, II. *Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. Cancer Treat Res.* 2016;170:25-46.

50. Cancer Genome Atlas Research N. *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. Nature.* 2014;511(7511):543-50.

51. Rooney M, Devarakonda S, Govindan R. *Genomics of squamous cell lung cancer. Oncologist.* 2013;18(6):707-16.

52. Cancer Genome Atlas Research N. *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. **Nature**. 2012;489(7417):519-25.
53. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. *Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology*. **Arch Pathol Lab Med**. 2018;142(3):321-46.
54. Skoulidis F, Heymach JV. *Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy*. **Nat Rev Cancer**. 2019;19(9):495-509.
55. Hanna NH, Peter M. Ellis, Ishmael Jaiyesimi, Andrew G. Robinson, Stabler JO, Schneider BJ, et al. *Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer Without Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update*. **Journal of Clinical Oncology**. 2020;38(14).
56. Aggarwal A, Lewison G, Idir S, Peters M, Aldige C, Boerckel W, et al. *The State of Lung Cancer Research: A Global Analysis*. **J Thorac Oncol**. 2016;11(7):1040-50.
57. Chen J, Yang H, Teo ASM, Amer LB, Sherbaf FG, Tan CQ, et al. *Genomic landscape of lung adenocarcinoma in East Asians*. **Nat Genet**. 2020;52(2):177-86.
58. Shi Y, Au JS-K, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai C-M, Khoa MT, et al. *A Prospective, Molecular Epidemiology Study of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology (PIONEER)*. **Journal of Thoracic Oncology**. 2014;9(2):154-62.
59. Cavagna RdO, Pinto IA, de Paula FE, Berardinelli GN, Sant’Anna D, Santana I, et al. *Disruptive and Truncating TP53 Mutations Are Associated with African-Ancestry and Worse Prognosis in Brazilian Patients with Lung Adenocarcinoma*. **Pathobiology**. 2023.
60. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. **Cancer Discov**. 2012;2(5):401-4.
61. Sala-Gaston J, Martinez-Martinez A, Pedrazza L, Lorenzo-Martin LF, Caloto R, Bustelo XR, et al. *HERC Ubiquitin Ligases in Cancer*. **Cancers (Basel)**. 2020;12(6).
62. Cubillos-Rojas M, Amair-Pinedo F, Peiro-Jordan R, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. *The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization*. **J Biol Chem**. 2014;289(21):14782-95.
63. Garcia-Cano J, Sanchez-Tena S, Sala-Gaston J, Figueras A, Vinals F, Bartrons R, et al. *Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2*. **Mol Oncol**. 2020;14(1):69-86.
64. Danielsen JR, Povlsen LK, Villumsen BH, Streicher W, Nilsson J, Wikstrom M, et al. *DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger*. **J Cell Biol**. 2012;197(2):179-87.

65. Liu J, Xue Z, Zhang Y, Vann KR, Shi X, Kutateladze TG. *Structural Insight into Binding of the ZZ Domain of HERC2 to Histone H3 and SUMO1*. **Structure**. 2020;28(11):1225-30 e3.
66. Zhu M, Wu W, Togashi Y, Liang W, Miyoshi Y, Ohta T. *HERC2 inactivation abrogates nucleolar localization of RecQ helicases BLM and WRN*. **Sci Rep**. 2021;11(1):360.
67. Wu W, Rokutanda N, Takeuchi J, Lai Y, Maruyama R, Togashi Y, et al. *HERC2 Facilitates BLM and WRN Helicase Complex Interaction with RPA to Suppress G-Quadruplex DNA*. **Cancer Res**. 2018;78(22):6371-85.
68. Kosiol N, Juranek S, Brossart P, Heine A, Paeschke K. *G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy*. **Mol Cancer**. 2021;20(1):40.
69. Bekker-Jensen S, Rendtlew Danielsen J, Fugger K, Gromova I, Nerstedt A, Lukas C, et al. *HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes*. **Nat Cell Biol**. 2010;12(1):80-6; sup pp 1-12.
70. Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, et al. *HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression*. **Cancer Res**. 2011;71(17):5621-5.
71. Yuan J, Luo K, Deng M, Li Y, Yin P, Gao B, et al. *HERC2-USP20 axis regulates DNA damage checkpoint through Claspin*. **Nucleic Acids Res**. 2014;42(21):13110-21.
72. Wu W, Sato K, Koike A, Nishikawa H, Koizumi H, Venkitaraman AR, et al. *HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation*. **Cancer Res**. 2010;70(15):6384-92.
73. Kang TH, Lindsey-Boltz LA, Reardon JT, Sancar A. *Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010;107(11):4890-5.
74. Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. *Structure of the Highly Conserved HERC2 Gene and of Multiple Partially Duplicated Paralogs in Human*. **Genome Res**. 2000 Mar;10(3):319–29.
75. Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. *Large Genomic Duplicons Map to Sites of Instability in the Prader-Willi/Angelman Syndrome Chromosome Region (15q11–q13)*. **Human Molecular Genetics**. 1999;8(6):1025–37.
76. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, et al. *Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints*. **Am J Hum Genet**. 1999;65(2):370-86.
77. Saitou M, Gokcumen O. *Resolving the Insertion Sites of Polymorphic Duplications Reveals a HERC2 Haplotype under Selection*. **Genome Biol Evol**. 2019;11(6):1679-90.

78. Information NCfB. *HERC2 Pseudogenes*. [Internet] 2022;Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?Term=related_functional_gene_8924%5Bgroup%5D.
79. Visser M, Kayser M, Palstra RJ. *HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter*. **Genome Res.** 2012;22(3):446-55.
80. Han J, Kraft P, Nan H, Guo Q, Chen C, Qureshi A, et al. *A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation*. **PLoS Genet.** 2008;4(5):e1000074.
81. Kayser M, Liu F, Janssens AC, Rivadeneira F, Lao O, van Duijn K, et al. *Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene*. **Am J Hum Genet.** 2008;82(2):411-23.
82. White D, Rabago-Smith M. *Genotype-phenotype associations and human eye color*. **J Hum Genet.** 2011;56(1):5-7.
83. Eiberg H, Troelsen J, Nielsen M, Mikkelsen A, Mengel-From J, Kjaer KW, et al. *Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression*. **Hum Genet.** 2008;123(2):177-87.
84. Edwards M, Cha D, Krithika S, Johnson M, Cook G, Parra EJ. *Iris pigmentation as a quantitative trait: variation in populations of European, East Asian and South Asian ancestry and association with candidate gene polymorphisms*. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2016;29(2):141-62.
85. Kastelic V, Drobic K. *A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model*. **Croat Med J.** 2012;53(5):401-8.
86. Crawford NG, Kelly DE, Hansen MEB, Beltrame MH, Fan S, Bowman SL, et al. *Loci associated with skin pigmentation identified in African populations*. **Science.** 2017;358(6365).
87. Beleza S, Johnson NA, Candille SI, Absher DM, Coram MA, Lopes J, et al. *Genetic architecture of skin and eye color in an African-European admixed population*. **PLoS Genet.** 2013;9(3):e1003372.
88. Jonnalagadda M, Faizan MA, Ozarkar S, Ashma R, Kulkarni S, Norton HL, et al. *A Genome-Wide Association Study of Skin and Iris Pigmentation among Individuals of South Asian Ancestry*. **Genome Biol Evol.** 2019;11(4):1066-76.
89. Andrade ES, Fracasso NCA, Strazza Junior PS, Simoes AL, Mendes-Junior CT. *Associations of OCA2-HERC2 SNPs and haplotypes with human pigmentation characteristics in the Brazilian population*. **Leg Med (Tokyo).** 2017;24:78-83.

90. Mancias JD, Pontano Vaite L, Nissim S, Biancur DE, Kim AJ, Wang X, et al. *Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis.* **Elife.** 2015;4.
91. Moroishi T, Yamauchi T, Nishiyama M, Nakayama KI. *HERC2 targets the iron regulator FBXL5 for degradation and modulates iron metabolism.* **J Biol Chem.** 2014;289(23):16430-41.
92. Cubillos-Rojas M. *The HERC2 ubiquitin ligase is essential for embryonic development and regulates motor coordination.* **Oncotarget.** 2016;7(35).
93. Elpidorou M, Best S, Poulter JA, Hartill V, Hobson E, Sheridan E, et al. *Novel loss-of-function mutation in HERC2 is associated with severe developmental delay and paediatric lethality.* **J Med Genet.** 2021;58(5):334-41.
94. Puffenberger EG, Jinks RN, Wang H, Xin B, Fiorentini C, Sherman EA, et al. *A homozygous missense mutation in HERC2 associated with global developmental delay and autism spectrum disorder.* **Hum Mutat.** 2012;33(12):1639-46.
95. Harlalka GV, Baple EL, Cross H, Kuhnle S, Cubillos-Rojas M, Matentzoglou K, et al. *Mutation of HERC2 causes developmental delay with Angelman-like features.* **J Med Genet.** 2013;50(2):65-73.
96. Sanchez-Tena S, Cubillos-Rojas M, Schneider T, Rosa JL. *Functional and pathological relevance of HERC family proteins: a decade later.* **Cell Mol Life Sci.** 2016;73(10):1955-68.
97. Crawley JN, Heyer WD, LaSalle JM. *Autism and Cancer Share Risk Genes, Pathways, and Drug Targets.* **Trends Genet.** 2016;32(3):139-46.
98. Johansson P, Klein-Hitpass L, Choidas A, Habenberger P, Mahboubi B, Kim B, et al. *SAMHD1 is recurrently mutated in T-cell prolymphocytic leukemia.* **Blood Cancer J.** 2018;8(1):11.
99. Yoo NJ, Park SW, Lee SH. *Frameshift mutations of ubiquitination-related genes HERC2, HERC3, TRIP12, UBE2Q1 and UBE4B in gastric and colorectal carcinomas with microsatellite instability.* **Pathology.** 2011;43(7):753-5.
100. Sanchez P, Espinosa M, Maldonado V, Barquera R, Belem-Gabino N, Torres J, et al. *Pancreatic ductal adenocarcinomas from Mexican patients present a distinct genomic mutational pattern.* **Mol Biol Rep.** 2020;47(7):5175-84.
101. Liu W, Tong H, Zhang C, Zhuang R, Guo H, Lv C, et al. *Integrated genomic and transcriptomic analysis revealed mutation patterns of de-differentiated liposarcoma and leiomyosarcoma.* **BMC Cancer.** 2020;20(1):1035.
102. Choi D, Armstrong G, Lozzi B, Vijayaraghavan P, Plon SE, Wong TC, et al. *The genomic landscape of familial glioma.* **Sciences Advances.** 2023;9(17).

103. Mobuchon L, Derrien AC, Houy A, Verrier T, Pierron G, Cassoux N, et al. *Different Pigmentation Risk Loci for High-Risk Monosomy 3 and Low-Risk Disomy 3 Uveal Melanomas*. **J Natl Cancer Inst**. 2022;114(2):302-9.
104. Amos CI, Wang LE, Lee JE, Gershenwald JE, Chen WV, Fang S, et al. *Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma*. **Hum Mol Genet**. 2011;20(24):5012-23.
105. Ferguson R, Vogelsang M, Ucisik-Akkaya E, Rai K, Pilarski R, Martinez CN, et al. *Genetic markers of pigmentation are novel risk loci for uveal melanoma*. **Sci Rep**. 2016;6:31191.
106. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Fatehchand K, Davidorf FH, Cebulla CM. *Hereditary predisposition to uveal melanoma*. *Genetics and Genomics of Eye Disease* 2020. p. 137-51.
107. Reis LB, Bakos RM, Vianna FSL, Macedo GS, Jacovas VC, Ribeiro-Dos-Santos AM, et al. *Skin pigmentation polymorphisms associated with increased risk of melanoma in a case-control sample from southern Brazil*. **BMC Cancer**. 2020;20(1):1069.
108. Kashyap S, Singh MK, Jha J, Singh L, Pushker N, Sen S, et al. *Prognostic impact of HERC2 protein and pink-eyed dilution protein in uveal melanoma*. **Hum Cell**. 2020;33(4):1264-72.
109. Schneider T, Martinez-Martinez A, Cubillos-Rojas M, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. *Large HERCs Function as Tumor Suppressors*. **Front Oncol**. 2019;9:524.
110. Bonanno L, Costa C, Majem M, Sanchez JJ, Rodriguez I, Gimenez-Capitan A, et al. *Combinatory effect of BRCA1 and HERC2 expression on outcome in advanced non-small-cell lung cancer*. **BMC Cancer**. 2016;16:312.
111. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmuller de Araujo A, Leite Goes Gitai D, Aparecida da Silva D, et al. *Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels*. **PLoS One**. 2013;8(9):e75145.
112. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, et al. *Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing*. **PLoS One**. 2012;7(1):e29684.
113. Leal LF, de Paula FE, De Marchi P, de Souza Viana L, Pinto GDJ, Carlos CD, et al. *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;9(1):3209.
114. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, et al. *Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations*. **Genome Med**. 2018;10(1):25.
115. Martinez-Jimenez F, Muinos F, Sentis I, Deu-Pons J, Reyes-Salazar I, Arnedo-Pac C, et al. *A compendium of mutational cancer driver genes*. **Nat Rev Cancer**. 2020;20(10):555-72.

116. Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, et al. *Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data*. **N Engl J Med**. 2016;375(12):1109–12.
117. Lanczky A, Gyorffy B. *Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation*. **J Med Internet Res**. 2021;23(7):e27633.
118. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. *COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*. **Nucleic Acids Res**. 2019;47(D1):D941-D7.
119. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. *Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer*. **Tobacco Control**. 2008;17(3):198-204.
120. Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. *Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men*. **Chest**. 1997;112(6):1474-9.
121. Khuder SA. *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*. **Lung Cancer** 2001(31):139-48.
122. Cancer Genome Atlas N. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas*. **Nature**. 2015;517(7536):576-82.
123. de Carvalho AC, Perdomo S, Dos Santos W, Fernandes GC, de Jesus LM, Carvalho RS, et al. *Impact of genetic variants in clinical outcome of a cohort of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma*. **Sci Rep**. 2020;10(1):9970.
124. Halvorsen AR, Silwal-Pandit L, Meza-Zepeda LA, Vodak D, Vu P, Sagerup C, et al. *TP53 Mutation Spectrum in Smokers and Never Smoking Lung Cancer Patients*. **Front Genet**. 2016;7:85.
125. Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF. *The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer*. **Hum Mutat**. 2003;21(3):229-39.
126. Scheffler M, Ihle MA, Hein R, Merkelbach-Bruse S, Scheel AH, Siemanowski J, et al. *K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occurring Mutations in Other Oncogenic Pathways*. **J Thorac Oncol**. 2019;14(4):606-16.
127. Arbour KC, Jordan E, Kim HR, Dienstag J, Yu HA, Sanchez-Vega F, et al. *Effects of Co-occurring Genomic Alterations on Outcomes in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer*. **Clin Cancer Res**. 2018;24(2):334-40.
128. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. *STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma*. **Cancer Discov**. 2018;8(7):822-35.
129. Bashyam MD, Animireddy S, Bala P, Naz A, George SA. *The Yin and Yang of cancer genes*. **Gene**. 2019;704:121-33.

130. Lai Y, Zhu M, Wu W, Rokutanda N, Togashi Y, Liang W, et al. *HERC2 regulates RPA2 by mediating ATR-induced Ser33 phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation*. **Sci Rep**. 2019;9(1):14257.
131. Zhu K, Liu Q, Zhou Y, Tao C, Zhao Z, J S, et al. *Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives*. **BMC Genomics**. 2015(16):16(S7):S8.
132. Palmeri M, Mehnert J, Silk AW, Jabbour SK, Ganesan S, Popli P, et al. *Real-world application of tumor mutational burden-high (TMB-high) and microsatellite instability (MSI) confirms their utility as immunotherapy biomarkers*. **ESMO Open**. 2022;7(1):100336.
133. Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec G. *Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer*. **Front Immunol**. 2020;11:369.
134. Liu L, Bai X, Wang J, Tang XR, Wu DH, Du SS, et al. *Combination of TMB and CNA Stratifies Prognostic and Predictive Responses to Immunotherapy Across Metastatic Cancer*. **Clin Cancer Res**. 2019;25(24):7413-23.
135. Schneider T, Martinez-Martinez A, Cubillos-Rojas M, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. *The E3 ubiquitin ligase HERC1 controls the ERK signaling pathway targeting C-RAF for degradation*. **Oncotarget**. 2018;9 (No. 59):31531-48.
136. Sala-Gaston J, Pedrazza L, Ramirez J, Martinez-Martinez A, Rawlins LE, Baple EL, et al. *HERC2 deficiency activates C-RAF/MKK3/p38 signalling pathway altering the cellular response to oxidative stress*. **Cell Mol Life Sci**. 2022;79(11):548.
137. Martínez-Noël G, Galligan JT, Sowa ME, Arndt V, Overton TM, Harper JW, et al. *Identification and Proteomic Analysis of Distinct UBE3A/E6AP Protein Complexes*. **Molecular and Cellular Biology**. 2023;32(15):3095-106.

ANEXO A

Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Amor de Barretos
(Projeto número 1139/2016).

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Letícia Ferro Leal

Área Temática:

Versão: 14

CAAE: 55631316.2.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.941.533

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_1813702_E8.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 23/08/2021).

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 sobrevida 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 complexos, o que torna seu entendimento um desafio de grandes proporções. O presente estudo

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: 4.941.533

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.

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.

Metodologia Proposta:

Extração de DNA e RNA: i. Extração de DNA/RNA de tecidos em Blocos de parafina; ii. Extração de DNA/RNA de tecido congelado; iii. Extração de DNA de biópsia líquida; Perfil Molecular Perfil mutacional – Exoma; Validação dos resultados por NGS (painel TruSight15); Perfil de translocações, CNV e expressão gênica e de miRNAs; Validação dos perfis de metilação gene-específicos; Sequenciamento gene-específico (Sanger); Detecção de mutações somáticas em biópsia líquida por NGS e PCR digital. Estudos funcionais das variantes do gene HERC2. Ver detalhamento da Metodologia Proposta no Projeto de Pesquisa Completo (anexo). Espaço da seção insuficiente.

Critério de Inclusão:

Tratando-se desta amostra de conveniência, serão incluídos os pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células e pequenas células com estadiamento inicial e avançado acompanhados no Hospital de Câncer de Barretos e que tenham disponibilidade de material parafinado e/ou tecido congelado do tumor bem como amostra do sangue do paciente.

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: 4.941.533

Critério de Exclusão:

Amostras com material parafinado/congelado insuficiente para pesquisa.

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 e validar os resultados;
- ii. Realizar o estudo de rearranjos (ALK, RET, ROS1 e NTRK1/2/3) e alterações cromossômicas (CNV) por NanoString em 200 casos de câncer de pulmão;
- iii. Realizar o perfil de expressão gênica do painel PanCancer (770 genes), do painel Vantage Metabolism (192 genes) e de miRNAs (800 alvos) por NanoString em 200 casos de câncer de pulmão e 20 controles normais;
- iv. Levantamento sociodemográfico e clinicopatológico dos 200 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 destes pacientes por NGS e PCR digital.
- vii. Realizar ensaios funcionais em linhagens celulares de câncer de pulmão para avaliar a participação de genes relevantes evidenciados no exoma (a saber, gene HERC2) na patogênese dessa doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores:

Riscos:

Não há risco de identificação de alterações hereditárias (mutações germinativas) e, portanto, não

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: 4.941.533

há possibilidade de encontrar, acidentalmente, nenhum tipo de câncer hereditário. O risco principal deste estudo é a quebra accidental 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 accidental.

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 Emenda E8 do projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1813702_E8.pdf;
- Form_Emenda_Ass.jpg;
- Formulário_EMENDA_Ago2021.docx;
- Projeto_CEP_EMENDA_8.docx.

O que se propõe a EMENDA apresentada:

1. Inclusão de membros da equipe (pagina 1):

Bruna Beatriz Duarte de Souza, residente e mestranda em Biomedicina, para elaboração do Trabalho de Conclusão de Residência (TCR) da Residência Multiprofissional e do Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Oncologia, ambos do Hospital de Amor/Fundação PIO XII- Barretos, Brasil.

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: 4.941.533

2. Validação das alterações observadas no gene HERC2 e realização de ensaios funcionais (página 14, 15 e 18):

Devido à alta frequência de mutações no gene HERC2, especialmente em CEC, justifica-se um estudo mais aprofundado deste gene. Para tanto, os resultados do perfil mutacional serão validados através de sequenciamento Sanger e a participação de HERC2 na patogênese pulmonar será avaliada por meio de ensaios funcionais em células de linhagens pulmonares tumorais.

Item a ser revisado e onde localiza-lo do Projeto Completo:

As alterações realizadas no projeto encontram-se destacadas nas páginas 1, 10, 14, 15, 18 e 21.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

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 Amor de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1139/2016, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 23/08/2021;

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

- ☒ (x) O Estudo deve Continuar;
- ☐ () O Estudo dever ser Interrompido;
- ☐ () O Estudo está Finalizado;
- ☐ () Solicita-se Esclarecimento.

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo “relatório” para que sejam

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: 4.941.533

devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional nº001/13, item XI.2.d.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1813702_E8.pdf	23/08/2021 13:47:52		Aceito
Outros	Form_Emenda_Ass.jpg	23/08/2021 10:51:05	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Formulario_EMENDA_Ago2021.docx	23/08/2021 10:50:55	Letícia Ferro Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_EMENDA_8.docx	23/08/2021 10:49:59	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Formulario_EMENDA_Jan2020_signed.pdf	06/01/2020 07:23:14	Letícia Ferro Leal	Aceito
Outros	Formulario_EMENDA_Jan2020.docx	06/01/2020 07:22:47	Letícia Ferro Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_EMENDA_7.docx	06/01/2020 07:22:17	Letícia Ferro Leal	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	16/01/2019 12:51:28	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

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: 4.941.533

BARRETOS, 30 de Agosto de 2021

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

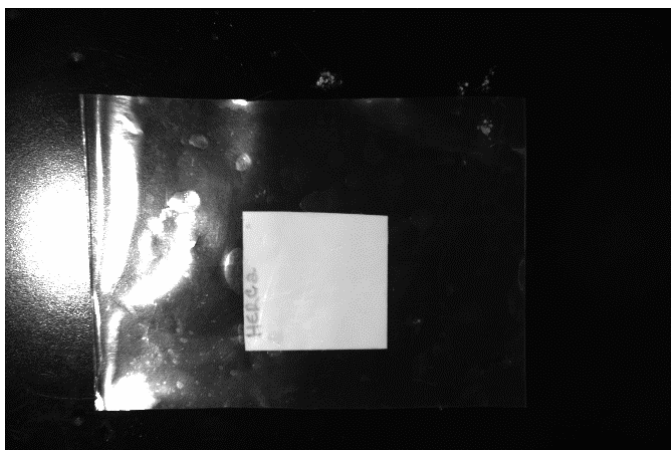
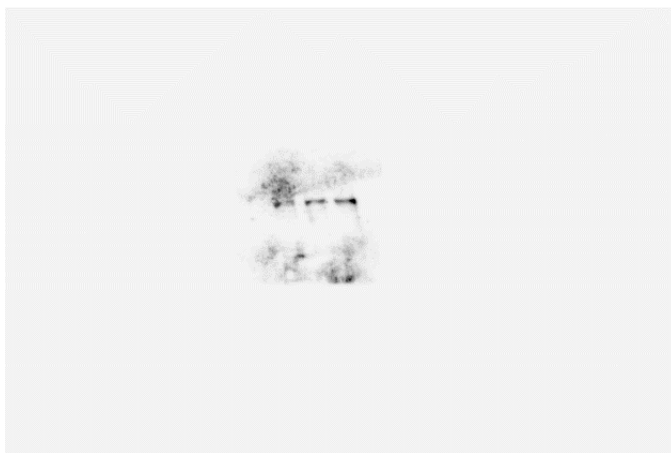
Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

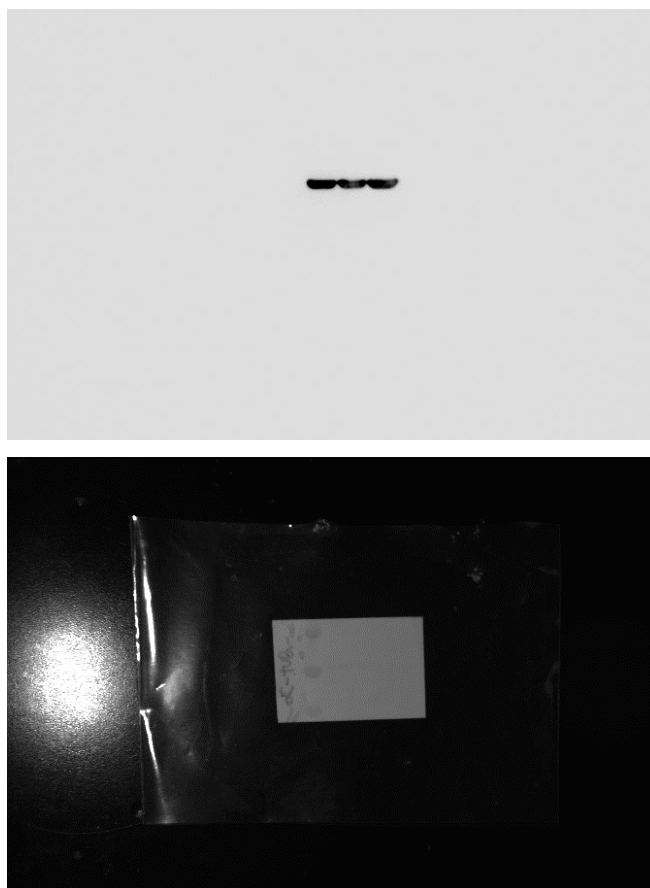
E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

ANEXO B

Imagens sem cortes das membranas de Western Blot após revelação.

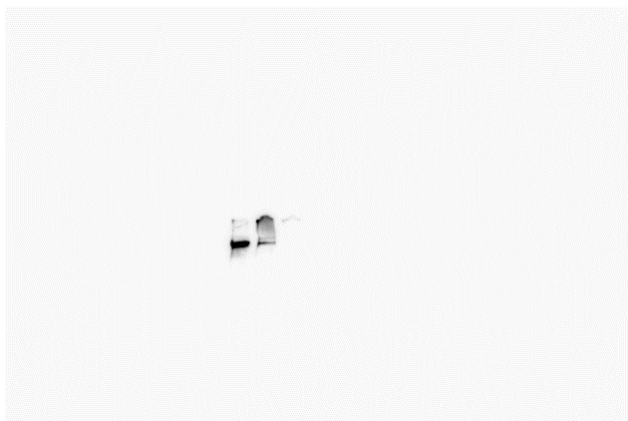
Basal

Revelação da expressão proteica basal de HERC2 nas linhagens COR-L105, SK-MES-1 e NCI-H292. Na parte superior está a membrana revelada e na parte inferior a membrana digitalizada (luz branca).



Revelação do controle endógeno alfa-tubulina nas linhagens COR-L105, SK-MES-1 e NCI-H292 na condição basal. Na parte superior está a membrana revelada e na parte inferior a membrana digitalizada (luz branca).

48h



Revelação da expressão proteica de HERC2 após 48h de silenciamento na linhagem SK-MES-1. Na parte superior está a membrana revelada e na parte inferior a membrana digitalizada (luz branca).

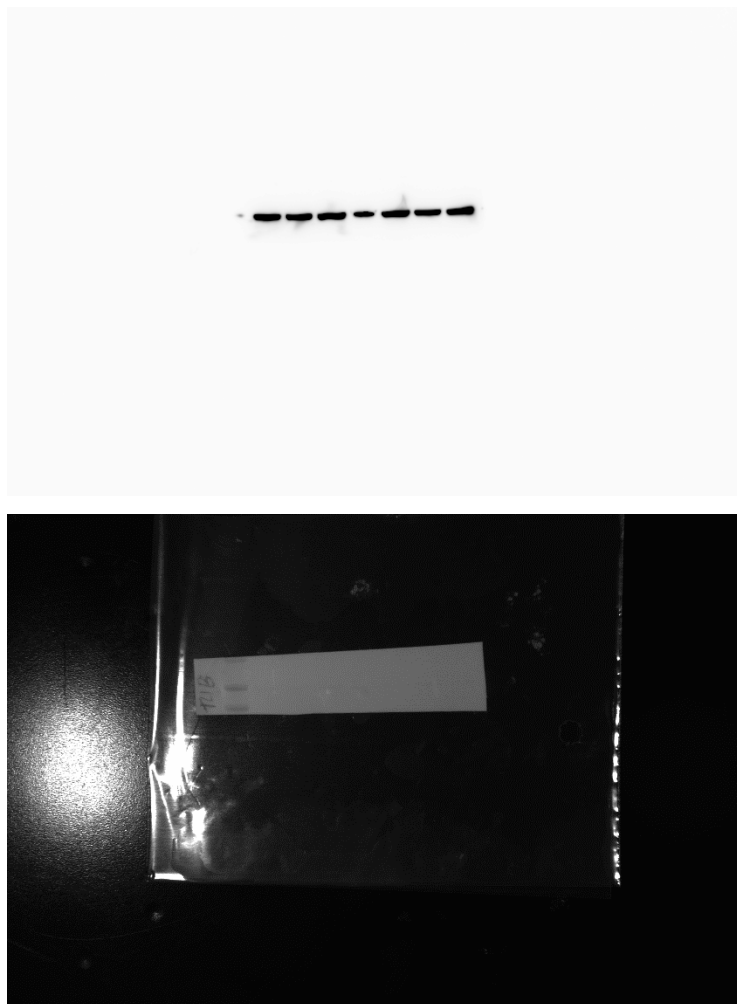


Revelação do controle endógeno alfa-tubulina após 48h de silenciamento na linhagem SK-MES-1. Na parte superior está a membrana revelada e na parte inferior a membrana digitalizada (luz branca).

72h e 96h



Revelação da expressão proteica de HERC2 após 72h (3 colunas da esquerda) e 96h (3 colunas da direita) de silenciamento na linhagem SK-MES-1. Na parte superior está a membrana revelada e na parte inferior a membrana digitalizada (luz branca). Podemos observar que havia duas membranas sendo reveladas para o gene HERC2, a de cima funcionou e a de baixo não funcionou.



Revelação do controle endógeno alfa-tubulina após 72h (3 colunas da esquerda) e 96h (3 colunas da direita) de silenciamento na linhagem SK-MES-1. No poço do meio houve um problema técnico, ele estava sem integridade e parte da amostra vazou para o tampão, por este motivo, o poço foi desconsiderado e a amostra reaplicada no poço seguinte. Na parte superior está a membrana revelada e na parte inferior a membrana digitalizada (luz branca).