

**Identificação das mutações nos genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*  
e *NRAS* em biópsia líquida representada pelo escarro e sua  
correlação com espécimes tumorais em pacientes com  
CPNPC**

**DÉBORA SOUZA ANDRADE**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para  
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dra. Vanessa Karen de Sá**

**Co-orientadora: Dra. Giovana Tardin Torrezan**

**São Paulo**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente**

Andrade, Débora Souza

**Identificação das mutações nos genes EGFR, KRAS, BRAF e NRAS em biópsia líquida representada pelo escarro e sua correlação com espécimes tumorais em pacientes com CPNPC / Débora Souza Andrade - São Paulo, 2021.**

45p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Dra. Vanessa Karen de Sá

Co-orientadora: Dra. Giovana Tardin Torrezan

Descritores. 1. Câncer de Pulmão/Lung Cancer. 2. Mutações Drivers/Drivers Mutations. 3. Escarro/Sputum. 4. Adenocarcinoma.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2779

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa de Jovem Pesquisador (nº 2015/26642-4) e Mestrado (nº 2019/09910-6).

*"Jedes Herz ist eine Revolutionäre Zelle".*

- Hans Weingartner

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais e irmãos, pois sem eles eu jamais chegaria onde estou e teria me tornado a mulher que venho construindo. Obrigada pelas doses de paciência, cuidado, amor, ensinamentos, e principalmente por me mostrar que a vida é mais bela quando compartilhada. Agradeço à minha família canina: Ariel (in memoriam), que nos deixou, mas me ensinou o amor puro e incondicional. Obrigada aos amigos que me apoiaram durante esta trajetória, em especial a Bárbara e o Lucas que sempre me escutaram e me ofereceram colo e acalanto.

Agradeço à Dra. Vanessa Karen de Sá, minha orientadora, por ter me recebido como sua aluna, mesmo sabendo que a priori eu não tinha experiências em laboratório, bem como a todo apoio e incentivo que me deu desde o primeiro dia que a encontrei. Obrigada por ter confiado em mim na execução deste projeto, por todo o ensinamento a mim passado, e pelo exemplo de que se pode crescer profissionalmente sem que para isso seja necessário abdicar do lado humano.

Aos médicos oncologistas do A.C. Camargo Cancer Center, que me auxiliaram e participaram deste estudo, o meu muito obrigada! Gostaria de agradecer também a todas as meninas da administração que sempre me acolheram e me tratavam como uma verdadeira amiga. Obrigada às funcionárias do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center - Ana Paula Suenaga e Louise Motta - que não pouparam tempo e esforços em meu projeto.

Minha eterna gratidão a todos os meus colegas de grupo, com quem passei tantas horas de todos estes dias juntas. Agradeço pelo auxílio genuíno sem exigir nada em troca, pela amizade dentro e fora do laboratório, e toda conversa despreocupada que tivemos nesses anos: Júlia, Nathália, Sara, Ana Araújo, Ana Kerekes, Juliano, Rafael, Cláudia, Karina, Giovana, Vanessa e Carol.

Agradeço o A.C. Camargo Cancer Center por todo o zelo com seus alunos, principalmente em tempos de pandemia. Além disso, obrigada pelo fornecimento de uma estrutura tão boa e ampla, além do apoio institucional. Obrigada a todos os pacientes que fizeram parte deste estudo fornecendo seu material biológico, visando uma possibilidade de melhoria à pacientes oncológicos em um futuro, da maneira mais generosa e genuína do mundo. Obrigada por compartilharem um momento tão delicado de suas vidas em prol do outro.

## RESUMO

Andrade, Débora Souza. **Título: Identificação das mutações nos genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* em biópsia líquida representada pelo escarro e sua correlação com espécimes tumorais em pacientes com CPNPC.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

**Introdução:** O Câncer de Pulmão (CP) é uma patologia de grande incidência e mortalidade no Brasil e no mundo. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou que em 2020 30.200 mil pacientes teriam CP no país, sendo 17.760 homens e 12.440 mulheres. Em 2019 cerca de 16.733 homens morreram, comparado com 12.631 óbitos em mulheres. Com índices elevados de incidência da doença, notou-se a necessidade de desenvolvimento de métodos não invasivos para o diagnóstico dos pacientes, visando principalmente o conforto destes. Com isto, surge a biópsia líquida, incluindo o escarro, como potencial candidato a alternativa não invasiva de diagnóstico do CP e das mutações *drivers*. **Objetivos:** Investigar a presença de DNA tumoral no escarro como uma alternativa de diagnóstico e monitoramento em pacientes com adenocarcinoma pulmonar. Correlacionar os níveis de detecção das mutações nos genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* encontradas no escarro, com resultados de biópsia tecidual (BT) e plasma. Comparar a detecção das mutações ativadoras em escarro, através dos métodos de NGS e ddPCR. **Métodos:** Foram recrutados pacientes virgens de tratamento, no momento do diagnóstico, após a assinatura do TCLE. Na disponibilidade de escarro de maneira espontânea, as coletas eram realizadas utilizando um frasco contendo uma solução preservante (solução de saccomano). Na ausência de produção natural, o paciente era submetido à coleta induzida, utilizando um nebulizador ultrassônico com uma solução salínica hipertônica à 7%. As amostras foram processadas no Biobanco da Instituição, para extração de DNA. Para análise da amostra foram utilizadas as técnicas de NGS e ddPCR para identificação da presença das mutações em *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* em pacientes com CPNPC. Através do método de NGS, 14 genes foram rastreados, com a utilização de um painel customizado. Para a análise de ddPCR, sondas das mutações mais frequentes em *EGFR* e *KRAS* (*EGFR* L858R, *EGFR* T790M, *KRAS* G12C e *KRAS* G12D) foram empregadas. Os dados gerados do escarro em ambos os métodos foram correlacionados com os resultados da BT e do plasma, através da correlação linear e sobrevida pelo método de Kaplan-Meier. **Resultados:** Das 42 amostras testadas

previamente por biópsia tecidual, 27 possuíam mutação e 15 eram *wild type*. Entre os 27 casos mutados na BT, 13 foram positivos para mutação driver em escarro através do NGS, sendo 4 em *KRAS* e 8 em *EGFR*, tendo uma concordância de 48,15% comparado à BT. De 15 casos *wild type* no tecido, 3 deles tinham uma mutação no escarro. As maiores VAFs foram encontradas em pacientes com coleta espontânea de escarro, em sua maior parte com estágio IV. Contudo, não houve correlação linear positiva ao comparar os resultados encontrados por NGS no escarro, com os resultados de BT. Com o método de ddPCR, de 17 casos positivos no tecido, identificamos 7 mutações no escarro, sendo 4 em *EGFR* e 3 em *KRAS*, com uma concordância de 41,17% com o tecido. Comparando os métodos de NGS e ddPCR em escarro, obtivemos uma correspondência de 57,17%. O NGS identificou 6 mutações em 7 casos analisados (85,7%), a ddPCR identificou 5 mutações (71,4%). Obtivemos uma associação linear positiva entre escarro analisado por NGS e escarro analisado por ddPCR ( $r=0,998$  e  $p=0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre EC II, III e IV ( $p=0,959$ , log rank), e em relação ao regime terapêutico entre pacientes que receberam QT convencional, imunoterapia+QT e terapia alvo ( $p=0,828$ , log rank). Na comparação entre pacientes sem mutação, e com mutação em *EGFR*, não houve diferença significativa ( $p=0,141$ , log rank), assim como pacientes sem mutação e com mutação em *KRAS* ( $p=0,959$ , log rank). **Conclusão:** De acordo com os dados apresentados, pudemos verificar que a presença de mutações *drivers* no escarro detectadas através dos métodos de NGS e ddPCR possui uma boa correlação com o perfil genômico observado nas biópsias teciduais (48,15% e 41,17% respectivamente), especialmente em pacientes com tumores localmente centrais, e com alta carga tumoral. Em relação a comparação entre os métodos, este estudo demonstrou alta sensibilidade e concordância quantitativa de NGS no escarro baseado em amplicons quando comparado com ddPCR para detectar mutações ativadoras em *EGFR* e *KRAS*, e a de resistência em *EGFR*. Por fim, ambos os métodos foram efetivos para este tipo de abordagem específica utilizando ctDNA.

**Palavras-chaves:** Neoplasia pulmonar, mutações *drivers*, biomarcadores, biópsia líquida, adenocarcinoma, escarro, ddPCR, NGS.

## ABSTRACT

Andrade, Débora Souza. **Title: Identification of mutations in EGFR, KRAS, BRAF and NRAS genes in liquid biopsy represented by sputum and its correlation with tumor specimens in patients with NSCLC.** [Dissertation]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

**Introduction:** Lung cancer (LC) is a pathology of high incidence and mortality in Brazil and worldwide. The National Cancer Institute (INCA) estimated that in 2020 30,200,000 patients would have PC in the country, with 17,760 men and 12,440 women. In 2019 about 16,733 men died, compared to 12,631 deaths in women. With high incidence rates of the disease, it was noted the need for the development of non-invasive methods for the diagnosis of patients, aiming mainly at their comfort. With this, liquid biopsy, including sputum, emerged as a potential candidate for a noninvasive alternative for the diagnosis of LC and driver mutations.

**Objectives:** To investigate the presence of tumor DNA in sputum as a diagnostic and monitoring alternative in patients with lung adenocarcinoma. To correlate the detection levels of mutations in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *NRAS* genes found in sputum, with tissue biopsy (TB) and plasma results. To compare the detection of activating mutations in sputum by NGS and ddPCR methods. **Methods:** Treatment virgin patients were recruited at the time of diagnosis, after signing the ICF. When spontaneous sputum was available, collections were performed using a vial containing a preservative solution (sacromane solution). In the absence of natural production, the patient underwent induced collection using an ultrasonic nebulizer with a 7% hypertonic saline solution. The samples were processed at the Biobanco of the institution for DNA extraction. For sample analysis, NGS and ddPCR techniques were used to identify the presence of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *NRAS* mutations in patients with NSCLC. Using the NGS method, 14 genes were screened, with the use of a customized panel. For ddPCR analysis, probes of the most frequent mutations in *EGFR* and *KRAS* (*EGFR* L858R, *EGFR* T790M, *KRAS* G12C and *KRAS* G12D) were employed. The generated sputum data in both methods were correlated with TB and plasma results by linear correlation and survival by the Kaplan-Meier method. **Results:** Of the 42 samples previously tested by tissue biopsy, 27 had a mutation and 15 were wild type. Among the 27 mutated cases in TB, 13 were positive for driver mutation in sputum by NGS, being 4 in *KRAS* and 8 in *EGFR*, having a concordance of 48.15% compared to TB. Of 15 wild type cases in tissue, 3 of them had a mutation in sputum. The

highest VAFs were found in patients with spontaneous sputum collection, mostly with stage IV. However, there was no positive linear correlation when comparing the results found by NGS in sputum, with the TB results. With the ddPCR method, of 17 positive cases in the tissue, we identified 7 mutations in the sputum, 4 in *EGFR* and 3 in *KRAS*, with a 41.17% agreement with the tissue. Comparing NGS and ddPCR methods in sputum, we obtained a 57.17% match. NGS identified 6 mutations in 7 cases analyzed (85.7%), ddPCR identified 5 mutations (71.4%). We obtained a positive linear association between sputum analyzed by NGS and sputum analyzed by ddPCR ( $r=0.998$  and  $p=0.0001$ ). There was no statistically significant difference between CE II, III and IV ( $p=0.959$ , log rank), and regarding the therapeutic regimen between patients receiving conventional QT, immunotherapy+QT and targeted therapy ( $p=0.828$ , log rank). In the comparison between patients without mutation, and with mutation in *EGFR*, there was no significant difference ( $p=0.141$ , log rank), as well as patients without mutation and with mutation in *KRAS* ( $p=0.959$ , log rank). **Conclusion:** According to the data presented, we could verify that the presence of driver mutations in sputum detected by NGS and ddPCR methods has a good correlation with the genomic profile observed in tissue biopsies (48.15% and 41.17% respectively), especially in patients with locally central tumors, and with high tumor burden. Regarding the comparison between the methods, this study demonstrated high sensitivity and quantitative agreement of NGS in sputum based amplicons when compared with ddPCR to detect activating mutations in *EGFR* and *KRAS*, and that of resistance in *EGFR*. Finally, both methods were effective for this type of specific approach using ctDNA.

**Key words:** lung neoplasia, driver mutations, biomarkers, liquid biopsy, adenocarcinoma, sputum, ddPCR and NGS.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Classificação histológica e molecular do CPNPC.....                                                                                                                                                               | 6  |
| <b>Figura 2</b> | Ilustração da ativação constitutiva do <i>EGFR</i> e sua via de sinalização....                                                                                                                                   | 9  |
| <b>Figura 3</b> | Ilustração das vias de sinalização a jusante de RAS e opções terapêuticas em adenocarcinoma de pulmão.....                                                                                                        | 10 |
| <b>Figura 4</b> | Ilustração das vias de sinalização envolvidas com o <i>BRAF</i> e seu mecanismo de resistência à medicação.....                                                                                                   | 11 |
| <b>Figura 5</b> | Ilustração dos mecanismos diferenciados de entrada de biomarcadores de células do câncer na circulação, e outros fluídos corpóreos.....                                                                           | 14 |
| <b>Figura 6</b> | Relação das mutações identificadas previamente na biópsia tecidual e amostras wild type, com as mutações identificadas em escarro pelo método de NGS.....                                                         | 29 |
| <b>Figura 7</b> | Avaliação da frequência das mutações encontradas no escarro em comparação com a biópsia tecidual e suas respectivas imagens tomográficas.....                                                                     | 32 |
| <b>Figura 8</b> | Avaliação da frequência das mutações encontradas no escarro em comparação com a biópsia tecidual e plasma para detecção de mutação original e de resistência (T790M) e suas respectivas imagens tomográficas..... | 33 |
| <b>Figura 9</b> | Avaliação da sobrevida em meses dos pacientes em diferentes estadiamentos clínicos.....                                                                                                                           | 38 |

**Figura 10** Avaliação da sobrevida em meses após tratamento com quimioterapia convencional, imunoterapia +QT e terapia alvo.....39

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                                                                              |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Definição e descrição do TNM 8ª Edição.....                                                                                                                                  | 3  |
| <b>Tabela 2</b> | Características demográficas dos 42 pacientes A.C.Camargo Cancer Center, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tabagismo e tempo de seguimento.....                           | 26 |
| <b>Tabela 3</b> | Análise descritiva das mutações encontradas por NGS em tecido, plasma e escarro, em suas respectivas frequências.....                                                        | 30 |
| <b>Tabela 4</b> | Padronização da técnica de ddPCR em amostras de tecido sabidamente mutadas para as sequências avaliadas.....                                                                 | 34 |
| <b>Tabela 5</b> | Comparação das frequências de mutação em KRAS G12D e G12C; EGFR L858R e T790M identificadas por ddPCR em amostras de escarro, e na biópsia tecidual.....                     | 35 |
| <b>Tabela 6</b> | Comparação das frequências de mutação em KRAS G12D e G12C; EGFR L858R e T790M identificadas por NGS e ddPCR em amostras de escarro.....                                      | 36 |
| <b>Tabela 7</b> | Correlação linear entre as frequências alélicas encontradas nas biópsias teciduais, detectadas por NGS, e as frequências alélicas detectadas no escarro por NGS e ddPCR..... | 37 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|              |                                                                  |
|--------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>CP</b>    | Câncer de Pulmão                                                 |
| <b>INCA</b>  | Instituto Nacional de Câncer                                     |
| <b>CPPC</b>  | Câncer de Pulmão de Pequenas Células                             |
| <b>CPNPC</b> | Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células                         |
| <b>PCR</b>   | do inglês "Polymerase Chain Reaction"                            |
| <b>CEC</b>   | Carcinoma de Células Escamosas                                   |
| <b>AD</b>    | Adenocarcinoma                                                   |
| <b>KPS</b>   | do inglês "Karnofsky Performance Status"                         |
| <b>TC</b>    | Tomografia Computadorizada                                       |
| <b>DPOC</b>  | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica                               |
| <b>NGS</b>   | do inglês "Next Generation Sequencing"                           |
| <b>cfDNA</b> | do inglês "circulating free DNA"                                 |
| <b>CEP</b>   | Comitê de Ética em Pesquisa                                      |
| <b>TKI</b>   | do Inglês "Tyrosine Kinase Inhibitors"                           |
| <b>μM</b>    | Micromolar                                                       |
| <b>μg</b>    | Micrograma                                                       |
| <b>μL</b>    | Microlitro                                                       |
| <b>ddPCR</b> | do inglês "Digital Droplet PCR"                                  |
| <b>DNA</b>   | Ácido Desoxirribonucleico                                        |
| <b>EC</b>    | Estadiamento Clínico                                             |
| <b>WT</b>    | do inglês "Wild Type"                                            |
| <b>VAF</b>   | do inglês "Variant Allele Frequency"                             |
| <b>TNM</b>   | Estadiamento Patológico                                          |
| <b>TCLE</b>  | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido                       |
| <b>NCI</b>   | do inglês "National Cancer Institute Non-small Cell Lung Cancer" |
| <b>ATP</b>   | Adenosina Trifosfato                                             |

|             |                                                   |
|-------------|---------------------------------------------------|
| <b>FDA</b>  | do inglês “Food and Drug Administration”          |
| <b>MIA</b>  | do inglês “minimally invasive adenocarcinoma”     |
| <b>AIS</b>  | Adenocarcinoma in situ                            |
| <b>ASCO</b> | do inglês “American Society of Clinical Oncology” |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ANEXOS .....                                                                                                                                   | 16        |
| APÊNDICES .....                                                                                                                                | 16        |
| 1.1 ENUNCIADO DO PROBLEMA .....                                                                                                                | 1         |
| 1.2 ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO .....                                                                                        | 1         |
| 1.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DO CÂNCER DE PULMÃO .....                                                                                             | 3         |
| 1.4 TIPOS HISTOLÓGICOS DO CÂNCER DE PULMÃO .....                                                                                               | 3         |
| 1.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E SUA RELAÇÃO COM AS MUTAÇÕES DRIVERS.....                                                                       | 4         |
| 1.5.1 <i>EGFR</i> (epidermal growth factor receptor).....                                                                                      | 6         |
| 1.5.2 <i>KRAS</i> (Kristen Rat Sarcoma viral) e <i>NRAS</i> .....                                                                              | 8         |
| 1.5.3 <i>BRAF</i> .....                                                                                                                        | 9         |
| 1.5.4 TERAPIA ALVO NO CÂNCER DE PULMÃO .....                                                                                                   | 10        |
| 1.5.5 O PAPEL DA BIÓPSIA LÍQUIDA NA PRÁTICA CLÍNICA.....                                                                                       | 12        |
| <b>2. HIPÓTESE.....</b>                                                                                                                        | <b>15</b> |
| <b>3. OBJETIVO .....</b>                                                                                                                       | <b>16</b> |
| 1. 3.1 OBJETIVO GERAL.....                                                                                                                     | 16        |
| 2. 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                             | 16        |
| <b>4. METODOLOGIA.....</b>                                                                                                                     | <b>17</b> |
| 3. 4.1 CASUÍSTICA.....                                                                                                                         | 17        |
| 4. 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....                                                                                                              | 18        |
| 5. 4.3 COLETA DE ESCARRO.....                                                                                                                  | 18        |
| 6. 4.4 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESCARRO                                                                                   | 19        |
| 7. 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DO ESCARRO .....                                                                                                        | 19        |
| 8. 4.6 TABULAÇÃO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES .....                                                                                  | 20        |
| 9. 4.7 SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> E <i>BRAF</i> - Plataforma Ion Torrent™ (ThermoFisher Scientific)..... | 20        |
| 4.7.1 PREPARO DE BIBLIOTECAS.....                                                                                                              | 20        |
| 4.7.2 INTERPRETAÇÃO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO .....                                                                                          | 22        |
| 10. 4.8 DIGITAL DROPLET PCR (ddPCR) .....                                                                                                      | 22        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                     | <b>24</b> |
| 11. 5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM CPNPC .                                                                                 | 24        |
| 12. 5.2 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DRIVERS POR NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS).....                                                                 | 26        |
| 5.3.1 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES <i>DRIVERS</i> POR DIGITAL DROPLET PCR (ddPCR).....                                                                 | 34        |
| 13. 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE NGS E ddPCR EM AMOSTRAS DE ESCARRO .....                                                                | 36        |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>    | <b>43</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS .....</b> | <b>44</b> |

## **ANEXOS**

**Anexo 1**      Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.

## **APÊNDICES**

**Apêndice 1**    Termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE

## 1.1 ENUNCIADO DO PROBLEMA

O câncer de pulmão (CP) é tido como um dos maiores desafios da oncologia por ser a neoplasia mais letal no mundo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que no ano de 2020, 30.200 mil pacientes tiveram CP no país. Destes, 17.760 novos casos ocorreriam em homens e 12.440 em mulheres. Em relação à mortalidade, o número de mortes na população masculina em 2019 foi de 16.733 homens e 12.621 mortes em mulheres.<sup>1,2</sup> O CP é ocasionado por exposição à poluição do ar, radiação ionizante, agentes carcinogênicos e também está associado a fatores econômicos. Apesar disto, o tabaco é o maior agente causador da patologia, correspondendo a 85-90% dos casos.<sup>3</sup> Ao decorrer dos anos houve uma redução de incidência e prevalência do tabagismo principalmente nos países mais desenvolvidos, porém, o consumo de tabaco e produtos semelhantes aumentou entre a população mais jovem.<sup>4,5,6,7,8</sup>

No Brasil, houve a criação e desenvolvimento de programas que visam o controle do uso do tabaco, assim como a prevenção do tabagismo em adultos e jovens menores de idade através de ações de comunicação e atenção à saúde no país como o Programa Nacional de Combate ao Fumo no Brasil, que vem sendo associado à diminuição das taxas de incidência e mortalidade pelo CP.<sup>9,10</sup> Levantamentos mais recentes indicam que os subtipos histológicos de CP também sofreram alterações na população mundial. TSUKAZAN MTR et al., realizou um estudo no ano de 2017, onde identificou um aumento na incidência do subtipo histológico de adenocarcinoma (AD), e diminuição do carcinoma de células escamosas (CEC) na população brasileira. Esta informação gerou a hipótese de correlação entre aumento de AD e venda de tabaco com filtro, demonstrando semelhança com o perfil mundial de CP.<sup>11,12,13,14</sup>

## 1.2 ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO

Para a grande parte dos autores, as excepcionais taxas de morbidade e mortalidade associadas à doença devem-se aos seguintes fatores prognósticos: *Karnofsky Performance Status* (KPS), estadiamento, tipo histológico, sexo, etnia, idade e estado nutricional.<sup>15</sup> No entanto, mesmo sob o controle de tais fatores prognósticos, aproximadamente 40% dos pacientes com , o carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) apresentam-se com doença estabelecida e avançada e não obstante os avanços no tratamento multidisciplinar, a taxa de sobrevida global em 5 anos permanece entre 8-10%.<sup>16</sup>

Para definição de estadiamento utiliza-se a atualização do sistema TNM 8ª Edição, demonstrada na Tabela 1, que tem como objetivo planejar o tratamento, avaliar o prognóstico do paciente, análise de resposta de tratamento, padronização das informações para a equipe e auxiliar na pesquisa das neoplasias.<sup>17,18,19,20,21,22,23</sup>

| T (Primary Tumor)        |                                                                                                                                                                                                           | Label                                                              |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| T0                       | No primary tumor                                                                                                                                                                                          |                                                                    |
| Tis                      | Carcinoma in situ (Squamous or Adenocarcinoma)                                                                                                                                                            | Tis                                                                |
| T1                       | Tumor ≤3 cm,                                                                                                                                                                                              |                                                                    |
| T1a(mi)                  | Minimally Invasive Adenocarcinoma                                                                                                                                                                         | T1a(mi)                                                            |
| T1a                      | Superficial spreading tumor in central airways <sup>a</sup>                                                                                                                                               | T1a <sub>SS</sub>                                                  |
| T1a                      | Tumor ≤1 cm                                                                                                                                                                                               | T1a <sub>≤1</sub>                                                  |
| T1b                      | Tumor >1 but ≤2 cm                                                                                                                                                                                        | T1b <sub>&gt;1-2</sub>                                             |
| T1c                      | Tumor >2 but ≤3 cm                                                                                                                                                                                        | T1c <sub>&gt;2-3</sub>                                             |
| T2                       | Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving:<br>visceral pleura <sup>b</sup> ,<br>main bronchus (not carina), atelectasis to hilum <sup>b</sup>                                                                 | T2 <sub>Visc Pl</sub><br>T2 <sub>Centr</sub>                       |
| T2a                      | Tumor >3 but ≤4 cm                                                                                                                                                                                        | T2a <sub>&gt;3-4</sub>                                             |
| T2b                      | Tumor >4 but ≤5 cm                                                                                                                                                                                        | T2b <sub>&gt;4-5</sub>                                             |
| T3                       | Tumor >5 but ≤7 cm<br>or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve<br>or separate tumor nodule(s) in the same lobe                                                                                  | T3 <sub>&gt;5-7</sub><br>T3 <sub>Inv</sub><br>T3 <sub>Satell</sub> |
| T4                       | Tumor >7 cm<br>or tumor invading: mediastinum, diaphragm,<br>heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve,<br>carina, trachea, esophagus, spine;<br>or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe | T4 <sub>&gt;7</sub><br>T4 <sub>Inv</sub><br>T4 <sub>Ipsi Nod</sub> |
| N (Regional Lymph Nodes) |                                                                                                                                                                                                           |                                                                    |
| N0                       | No regional node metastasis                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| N1                       | Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes                                                                                                                                                        |                                                                    |
| N2                       | Metastasis in ipsilateral mediastinal/subcarinal nodes                                                                                                                                                    |                                                                    |
| N3                       | Metastasis in contralateral mediastinal/hilar, or<br>supraclavicular nodes                                                                                                                                |                                                                    |
| M (Distant Metastasis)   |                                                                                                                                                                                                           |                                                                    |
| M0                       | No distant metastasis                                                                                                                                                                                     |                                                                    |
| M1a                      | Malignant pleural/pericardial effusion <sup>c</sup><br>or pleural /pericardial nodules<br>or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe;                                                            | M1a <sub>PI Dissem</sub><br>M1a <sub>Contr Nod</sub>               |
| M1b                      | Single extrathoracic metastasis                                                                                                                                                                           | M1b <sub>Single</sub>                                              |
| M1c                      | Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ)                                                                                                                                                         | M1c <sub>Multi</sub>                                               |

TX, NX: T or N status not able to be assessed

<sup>a</sup> Superficial spreading tumor of any size but confined to the tracheal or bronchial wall

<sup>b</sup> such tumors are classified as T2a if >3≤4 cm, T2b if >4≤5 cm.

<sup>c</sup> Pleural effusions are excluded that are cytologically negative, non-bloody, transudative, and clinically judged not to be due to cancer.

Fonte: Frank et al., 2017

**Tabela 1.** Definição e descrição do TNM 8ª Edição

### 1.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DO CÂNCER DE PULMÃO

Para auxílio do diagnóstico do CP, o corpo clínico possui duas ferramentas importantes: radiografias e as tomografias computadorizadas (TC). A utilização das radiografias apresenta efetividade quando são realizadas em pacientes de grupos de risco (tabagistas, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e etc.). Entretanto, demonstra baixa efetividade ao serem realizadas em grupos randomizados.<sup>24</sup> Os avanços na técnica de TC, que consegue realizar imagens em alta definição com baixas doses de radiação (LDCT), têm tornado possível a detecção de nódulos não visíveis nas radiografias de tórax, tornando essa uma ferramenta importante no rastreamento do CP. Um estudo realizado pelo *The National Lung Screening Trial Research Team* (2011) demonstrou que o rastreamento realizado através da LDCT ocasionou uma melhora na sobrevida dos pacientes acometidos pela doença quando comparado com os casos em que o rastreamento foi realizado por radiografia.<sup>24,25,26,27</sup> Em relação aos métodos diagnósticos para a detecção do CP, podemos destacar a toracocentese, a biópsia de linfonodos, a broncoscopia e biópsia por agulha transcutânea. Há urgência no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos não invasivos para maior conforto e diminuir a mortalidade por este tipo de neoplasia. Em meio a este cenário, diversos grupos de pesquisa têm trabalhado incessantemente na procura de marcadores moleculares e imuno-histoquímicos, e no desenvolvimento de novas técnicas que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos diversos tipos de cânceres e principalmente do CP.<sup>25,28,29</sup>

Atualmente, os pesquisadores estão focados na descoberta de marcadores moleculares em biópsias líquidas, seja no sangue, no escarro ou nos lavados brônquicos para a detecção precoce do CP. Porém, até o momento, nenhum grupo de pesquisa obteve sucesso na padronização desses marcadores em larga escala na prática clínica.

### 1.4 TIPOS HISTOLÓGICOS DO CÂNCER DE PULMÃO

O CP é classificado em dois principais grupos, o carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) que corresponde à 85% de todos os casos de câncer, e o câncer de pulmão de Pequenas Células (CPPC) que acomete entre 13-15% dos pacientes. O CPNPC é classificado de acordo com a WHO em três principais subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e o carcinoma de células grandes. Até a década de 1990, o principal tipo

histológico no CP foi o carcinoma de células escamosas (CEC), principalmente nos homens.  
30,31

O adenocarcinoma representa o tipo histológico de câncer de pulmão mais comum em ambos os sexos, não fumantes, e surge a partir de células alveolares localizadas no epitélio das vias aéreas e tende a expressar marcadores imunohistoquímicos, como TTF-1 e napsina A.

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), os padrões histológicos do adenocarcinoma mais comuns são o acinar, o sólido, o papilar, o micropapilar e o mucinoso.<sup>32,33.</sup>

Esse tipo histológico, manifesta-se, frequentemente, na forma de massa periférica, como fenótipo resultante da quebra dos mecanismos distais de defesa pulmonar.<sup>33</sup> Os aspectos microscópicos característicos incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina e normalmente se observa uma resposta tecidual desmoplásica adjacente. Pelo fato de apresentar um amplo espectro patológico, molecular e radiológico, foi proposta pela IASLC.ATS.ERS. 2011 uma nova classificação desses tumores, com o intuito de uniformizar os vários subtipos histológicos, visando maior exatidão no direcionamento do tratamento e prognóstico dos pacientes.<sup>33</sup> A classificação da OMS de câncer de pulmão também reconhece os estágios iniciais do câncer de pulmão como adenocarcinoma in situ (lesão pré-invasiva), adenocarcinoma minimamente invasivo ou adenocarcinoma invasivo com base na extensão de invasividade. O adenocarcinoma in situ é definido como um adenocarcinoma que compreende um padrão lepidico com um diâmetro de menos de 3 cm. O adenocarcinoma minimamente invasivo é definido como adenocarcinoma com diâmetro superior a 3 cm; os fatores de exclusão incluem um tamanho de invasão de mais de 5 mm, mesmo se o tamanho do tumor e o tamanho da invasão estiverem de acordo com a definição de adenocarcinoma minimamente invasivo e a presença de invasão linfovascular, invasão perineural ou necrose tumoral.<sup>27</sup>

## **1.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E SUA RELAÇÃO COM AS MUTAÇÕES *DRIVERS***

Por décadas a classificação dos tumores de pulmão não-pequenas células era realizada exclusivamente através de análise histológica em: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células, sendo os tipos mais frequentes e relevantes. Apesar

de refletir algumas características clínicas da doença, essa subdivisão não possuía real impacto preditivo, ou seja, não era capaz de ser usada como ferramenta para uma terapia personalizada. Mais recentemente, após o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento genômico e de métodos de avaliação de alteração moleculares como expressão, amplificação e fusão gênica, é possível identificar subgrupos de alterações moleculares responsáveis por determinados fenótipos tumorais, que guiam o comportamento clínico desses tumores.

Exemplo claro desse fato se dá pela detecção e pelo amplo uso de mutações condutoras (*drivers*) na classificação e tratamento dessa doença.<sup>34</sup>

Mutações *drivers* são alterações genéticas que quando presentes são diretamente responsáveis pela ativação constitutiva de cascatas de sinalização intracelular, que induzem proliferação e invasão. Ou seja, essas mutações são necessárias para o surgimento do fenótipo maligno. Ademais, as mutações *drivers* conferem uma dependência biológica em que as proteínas mutantes geradas se tornam fundamentais para a manutenção da sobrevivência dessas células malignas. Outra característica relevante dessas alterações genéticas é o seu caráter exclusivo, visto que quando uma determinada mutação *driver* é detectada, usualmente, ela é única. Dependência biológica e caráter exclusivo fazem com que as mutações *drivers* se tornem biomarcadores importantes para seleção de pacientes para terapias alvo.<sup>35</sup>

Neste contexto, a pesquisa básica aliada à pesquisa clínica foi capaz de identificar um pequeno grupo de mutações que não somente são necessárias para o desenvolvimento e progressão de tumores específicos, mas que também são necessárias para a manutenção e sobrevivência destes tumores. Citamos aqui as principais encontradas em CPNPC: *AKT1* (14q32.32), *ALK* (2p23), *BRAF* (7q34), *CTNNB1* (3p21), *DDR2* (1q23.3), *EGFR* (7p12), *ERBB2/HER2* (17q12), *ERBB4* (2q33.3-q34), *FBXW7* (4q31.3), *FGFR1* (8p12), *FGFR2* (10q26), *FGFR3* (4p16.3), *KRAS* (12p12.1), *MAP2K1* (15q22.1-q22.33), *MET* (7q31), *NOTCH1* (9q34.3), *NRAS* (1p13.2), *PIK3CA* (3q26.3), *PTEN* (10q23.3), *SMAD4* (18q21.1), *STK11* (19p13.3), e *TP53* (17p13.1).<sup>35,36,37</sup>

Inicialmente, os testes para avaliação das mutações *drivers* em CPNPC eram solicitados de forma sequencial. No entanto, o surgimento de novas plataformas de sequenciamento a um custo menor, a escassez de material de biópsia – inerente a maioria dos pacientes com câncer de pulmão – a necessidade de resultados rápidos que sustentem tanto linhas subsequentes de tratamento, como a inclusão de pacientes em estudos clínicos com novas drogas alvo, aponta para o uso crescente de testes moleculares em biópsias líquidas que permitam a análise simultânea de várias mutações *drivers* em fluídos biológicos. O cenário atual permite que a

biópsia líquida seja amplamente utilizada na prática clínica como uma ferramenta adicional no rastreamento, detecção, monitoramento e prognóstico do CPNPC.<sup>38</sup>

Neste contexto, a classificação proposta para os adenocarcinomas de pulmão, tem procurado direcionar o tratamento com novas drogas, em particular aquelas cujo alvo molecular já tenha sido estabelecido, no sentido de otimizar a taxa de controle de doença e minimizar os efeitos indesejáveis do tratamento.<sup>37,38</sup> Mudanças importantes têm ocorrido no tratamento da doença metastática, sobretudo no que tange às alterações moleculares específicas, como por exemplo, a mutação de *EGFR*, *KRAS*, e a translocação *EML4-ALK*. Na prática, as recentes descobertas de biomarcadores como alvos terapêuticos foram traduzidos de forma contundente em uma melhor seleção terapêutica e maiores benefícios para subgrupos de pacientes com história pobre em tabagismo. Exemplo que inclui este tipo de avanço advém da utilização de inibidores orais de tirosina quinase de *EGFR*, como erlotinibe e gefitinibe.<sup>39,40,41,42</sup>

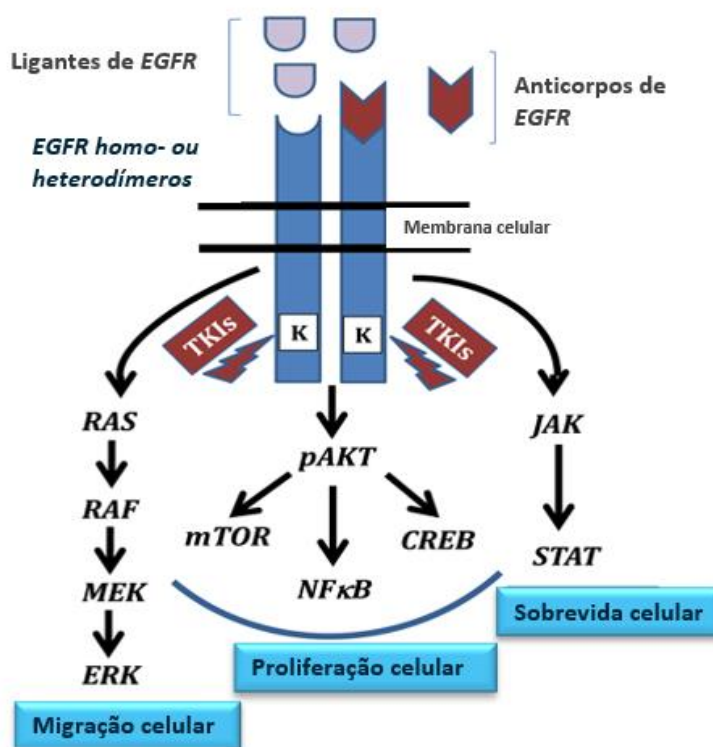
A seguir detalharemos algumas das principais alterações moleculares em câncer de pulmão, e seu impacto na prática clínica.

### 1.5.1 *EGFR* (epidermal growth factor receptor)

O gene *EGFR* (epidermal growth factor receptor) faz parte da família de quatro receptores: *EGFR* (*ErbB-1*), *HER-2/neu* (*ErbB-2*), *HER-3* (*ErbB-3*) e *HER-4* (*ErbB-4*).<sup>38,39</sup> Estruturalmente, é composto por um domínio de ligação extracelular (porção N-terminal), um domínio de transmembrana e um domínio intracelular de tirosina quinase (C-terminal).<sup>40,41</sup> A ativação dos receptores através de ligantes do *EGFR* acarretam em uma formação de homo ou heterodímeros em sua dimerização, ativando o domínio tirosina quinase no meio intracelular do receptor. Quando ativo, este domínio realiza a autofosforilação no interior do domínio intracelular C-terminal.<sup>42,43</sup>

Os sinais são transduzidos através da interação dos locais de autofosforilação e proteínas contendo um domínio SH2 ou domínio de ligação à fosfotirosina. A principal via ativada é a via RAS/RAF/MAPK, onde a proteína Grb2 se liga à resíduos de tirosina quinase que foram fosforilados, e ativa a proteína GRAS, iniciando uma fosforilação da via MAPK. Desta forma, a transcrição gênica é ativada de maneira constitutiva na presença da mutação *driver*, estimulando a divisão, motilidade e adesão da célula. Além desta via, a via mediada pela PI3K relacionada com Akt que estimula os sinais de apoptose, proliferação e angiogênese também é

relacionada com o *EGFR* e as mutações *drivers*.<sup>44,45,46</sup> Com a ativação do *EGFR*, há a modulação das vias RAS-RAF-MAPK que são induzidas quando os resíduos fosforilados ativam a via RAS por meio das proteínas GRB2 e SHC. Posteriormente o RAF e a via MAP são estimulados auxiliando a proliferação celular desenfreada, a invasão tumoral e a metástase (Figura 2).<sup>47</sup>



Adaptado de Honey, 2013

**Figura 2.** Ativação constitutiva do *EGFR* e sua via de sinalização.

A mutação em *EGFR* compreende cerca de 26-31% das mutações em CPNPC, sendo que destes, 50,7% das mutações são L858R e 39,3% são deleções do éxon 19.<sup>48</sup> Os inibidores de tirosina quinase do *EGFR* (EGFR-TKI) tem sido utilizado no tratamento para o CPNPC com mutação *driver*, tais como o gefitinibe, o erlotinibe, e o afatinibe, e principalmente o osimertinibe, inicialmente sendo utilizado em terapia de segunda linha, e atualmente tem sido amplamente administrado como principal linha de tratamento. Estes medicamentos inibem a atividade da tirosina quinase através de um mecanismo de competição entre a medicação e moléculas de ATP nos sítios C-terminal, impedindo a fosforilação e consequentemente a

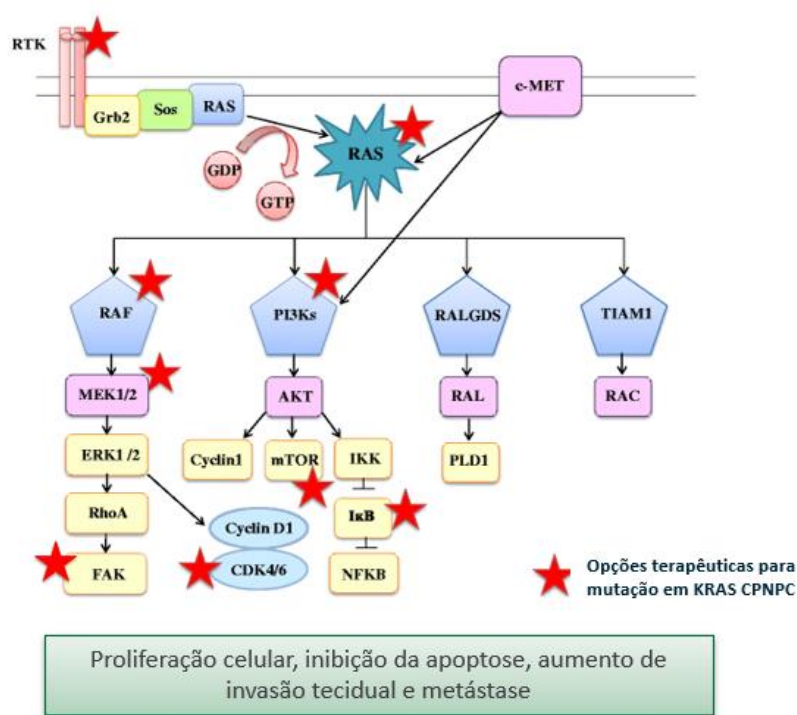
transdução de sinais. Com isto, há uma redução de sobrevivência, proliferação e angiogênese das células tumorais, além do estímulo à apoptose.<sup>44,49,50,51</sup>

### 1.5.2 *KRAS* (Kristen Rat Sarcoma viral) e *NRAS*

O *KRAS* é um oncogene pertencente à família RAS (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*), e codifica uma proteína de membrana GTPase. Esta pode se encontrar em duas formas: o GDP que é considerado como o estado inativo, e o GTP que é o estado ativo da proteína. As proteínas da via RAS são ligados por estímulos extracelulares, que faz com que haja uma transitoriedade da forma ativa e ativa vias de sinalização com funções relacionadas à processos celulares de suma importância como sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.<sup>52,53</sup>

A regulação da ativação de RAS é realizada através da troca do PIB-GTP (fator de troca de nucleotídeo de guanina; GEFs, ou pela atividade da GTPase (GAPs). Os GEFs fazem com que haja aumento dos fatores de troca de nucleotídeos, e possibilitam que estes sejam substituídos por GTP, o que consequentemente leva à uma ativação da via RAS. Os GAPs por sua vez permitem a conversão da forma ativa para a inativa. Quando há uma mutação em *KRAS* o GAP fica impossibilitado de aumentar a taxa catalítica intrínseca da GTPase, desta forma, mantém a via RAS no estado ativo de maneira constitutiva ligado ao GTP. Com isto, as vias oncogênicas são ativadas mesmo sem sinais extracelulares, o que acarreta em uma proliferação exacerbada e descontrolada, e uma diminuição de apoptose.<sup>52,53</sup>

O *KRAS* tem sido considerado como uma via de difícil acesso para sua inibição direta, o que torna o tratamento destas mutações um longo debate. Um dos principais motivos é pela via RAS ser considerada como "downstream" ou a jusante. Até o momento, as tentativas terapêuticas têm sido amplamente estudadas, como mostra a Figura 3. O *KRAS* compreende cerca de 30% das mutações em CPNPC, sendo que destes, 41% são mutações em G12C. Já o *NRAS* compreende apenas 1% das mutações em CPNPC, tendo o Q61L como a mutação mais frequente (64%).<sup>54,55</sup>



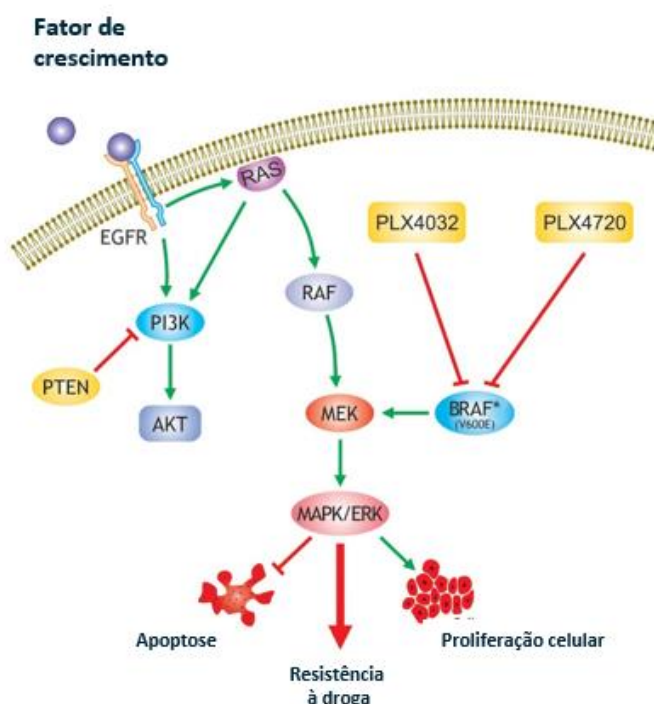
Adaptado de Roman, et al. 2018

**Figura 3.** Vias de sinalização a jusante de RAS e opções terapêuticas em adenocarcinoma de pulmão.

No ano de 2019 foi apresentado um estudo do medicamento sotorasib, que age de maneira específica no *KRAS* G12C (mutação que afeta cerca de 13% dos pacientes em CPNPC). O mecanismo de ação da molécula é a ligação irreversível à cisteína 23 mutada no *KRAS*, mantendo a via em estado inativo. Este medicamento pode revolucionar o tratamento da mutação *driver* em *KRAS*.<sup>56</sup>

### 1.5.3 *BRAF*

O *BRAF* é uma proteína quinase serina/treonina que possui um importante papel na via de MAPK/quinase (proteína quinase ativada por mitogênio), que é regulada através de um sinal extracelular (*ERK*) e é relacionada à proliferação, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. Assim como nas outras vias já citadas, a via MAPK/ERK permite a transdução de sinais de receptores de membrana para o meio intracelular, como mostra a Figura 4, e quando ativada através de uma mutação há uma proliferação celular exacerbada, assim como a inibição de apoptose.<sup>57</sup>



Adaptado de Leonardi GC et al. 2012

**Figura 4.** Vias de sinalização envolvidas com o *BRAF* e seu mecanismo de resistência à medicação.

A mutação em *BRAF* compreende de 3,4% a 4% das mutações *drivers* em CPNPC. Dentre essa porcentagem, 50% das mutações são V600E. Em pacientes com esta mutação presente é administrado o dabrafenib e trametinib que agem se ligando no *BRAF* e consequentemente, inibem a via MEK e MAPK/ERK, respectivamente. Ademais, já se há o mecanismo de resistência à estas drogas associadas à mutação citada.<sup>57</sup>

### 1.5.4 TERAPIA ALVO NO CÂNCER DE PULMÃO

A revolução na terapia do CP veio através da descoberta de novas alternativas terapêuticas, com base no foco em proteínas específicas condutoras oncogênicas no câncer. Antes disto, a quimioterapia sistêmica citotóxica era amplamente utilizada no tratamento de todos os cânceres, tendo uma resposta não tão satisfatória em alguns destes. Esta falha da quimioterapia clássica, juntamente com o intuito de uma abordagem inovadora no tratamento do câncer, que obtivesse uma melhor e mais ampla resposta, e uma menor toxicidade em relação à quimioterapia citotóxica padrão, levou a ampliação de estudos com a chamada terapia alvo.

Para tal, foi realizado o sequenciamento do genoma de diversos tumores de pulmão, onde foi possível identificar alguns condutores oncogênicos presentes nos tumores, de maneira distinta às mutações passageiras, como mencionados nos itens anteriores.<sup>58</sup>

A efetividade da terapia alvo foi avaliada após a eficácia com gefitinib em pacientes com CP com receptores de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), inibidores da sensibilização das mutações. Inicialmente, os testes clínicos com inibidores de *EGFR* demonstraram o porquê da identificação dos fatores de crescimento oncogênicos. Posteriormente, a terapia orientada foi empregada amplamente em diversos ensaios terapêuticos direcionados ao CP, mediante à sua efetividade comprovada.<sup>59</sup> A análise molecular, principalmente resultante do sequenciamento, demonstrou a heterogeneidade tumoral no CP, identificando alguns subtipos de mutações drivers e suas cargas mutacionais variantes.<sup>60</sup> Ademais, o tabagismo tem sido o principal fator estudado no que diz respeito à condução da heterogeneidade genética no CP. Não obstante, algumas mutações em *EGFR* e rearranjos em *ALK* e *ROS1* demonstraram uma frequência maior de presença em pacientes que não foram expostos, ou foram pouco expostos ao tabaco. Alguns exemplos de medicamentos alvos nas mutações *drivers* são o gefitinib, erlotinib, afatinib e osimetinib na mutação em *EGFR*.<sup>61</sup> Estudos adicionais demonstraram que pacientes com CP com uma alta taxa de resposta inicial ao EGFR-TKI em sua maior parte desenvolvem resistência à droga posterior à um período de livre de progressão de cerca de dez meses. Alguns estudos demonstram que cerca de 50% de pacientes com uma mutação primária em *EGFR*, possuem também a mutação *EGFR* T790M de resistência. Visto que a mutação T790M apresenta resistência aos medicamentos gefitinib e erlotinib, normalmente utilizados em primeira linha no tratamento do CPNPC, aumentando a afinidade do *EGFR* com ATP, em comparação ao *EGFR* aos TKIs, notou-se a necessidade de desenvolvimento de uma nova abordagem e classe de *EGFR*-TKIs, com uma maior ligação ao T790M. Atualmente o medicamento utilizado para tal mutação é o osimertinib, um inibidor de tirosina quinase de terceira geração que age no EGFR em CPNPC, que carregam a mutação de resistência de *EGFR* T790M, após a resistência desenvolvida com os TKIs.<sup>62,63</sup> Estudos como o de OXNARD et al realizado em 2018, demonstram que a resistência adquirida ao osimertinib (*EGFR* C797S, em 22% dos casos), tem se tornado um desafio clínico a ser resolvido.<sup>64</sup>

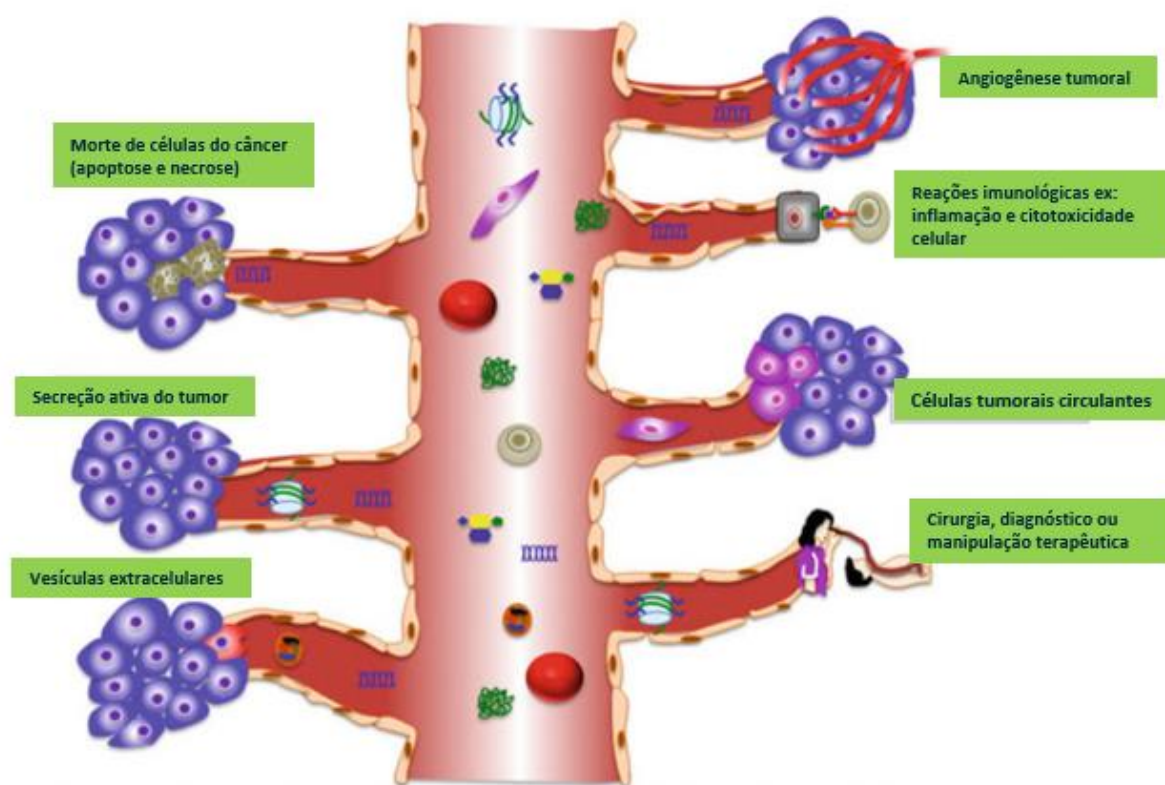
Além da mutação em *EGFR*, a mutação em *KRAS*, que além de ser a mutação *driver* mais frequente em CPNPC (25%), apresenta um grande desafio no tratamento do CPNPC, visto que ainda não se há terapias-alvo para esta categoria de mutação. A mutação de *KRAS* G12C é a mais prevalente entre todas as mutações em *KRAS* (cerca de 13%), tendo uma má sobrevida global e um prognóstico pior que nas outras mutações do gene. Diversas tentativas de terapia

alvo contra esta mutação já foram tentadas, porém, todas sem sucesso. Atualmente existem diversos ensaios clínicos em andamento neste tipo de mutação, e em 2021 o FDA aprovou o sotorasib, o primeiro e único tratamento direcionado aos pacientes com CPNPC localmente avançado ou metastático, com mutação em *KRAS* G12C e que receberam ao menos uma terapia sistêmica de primeira linha.<sup>65,66,67</sup>

A mutação em *BRAF*, apesar de não possuir uma alta incidência de pacientes no CPNPC (3%), atualmente já possui uma mutação de resistência aos EGFR-TKIs, a V600E. O vemurafenib, um inibidor da família de *BRAF* foi aprovado pelo FDA para uso em pacientes com a mutação, juntamente com o dabrafenib e trametinib, sendo que o uso de ambos em combinação já está sendo estudados como terapia de segunda linha em pacientes com mutação em *BRAF* V600E.<sup>68,69</sup>

### 1.5.5 O PAPEL DA BIÓPSIA LÍQUIDA NA PRÁTICA CLÍNICA

A biópsia tecidual é um procedimento invasivo e desconfortável, sobretudo aos pacientes com CP mais avançado, com o intuito de obtenção da amostra de tecido tumoral, o que nem sempre é possível devido à difícil localização do tumor ou a condição do paciente. Além disso, após as etapas iniciais de diagnóstico histopatológico das amostras provenientes da biópsia tecidual, pode não haver tecido suficiente para que seja traçado um perfil molecular ou este tecido não é representativo do tumor como um todo. Contudo, a biópsia líquida foi se tornando cada vez mais discutida e analisada, principalmente por sua capacidade de representar a heterogeneidade do tumor, e por ser um procedimento minimamente invasivo, mais barato e rápido que a biópsia tecidual.<sup>70,71</sup> As células tumorais e seu DNA podem ser encontradas na circulação e o DNA tumoral livre circulante (cfDNA) pode ser analisado, bem como as células tumorais circulantes (CTC), e os exossomos derivados do tumor.<sup>71</sup> Estes biomarcadores celulares de câncer podem entrar na circulação através de diversos mecanismos distintos, como demonstrado na figura 5.



Adaptado de: Cancer Biomarkers in Body Fluids: Principles, 2016

**Figura 5.** Mecanismos diferenciados de entrada de biomarcadores de células do câncer na circulação, e outros fluidos corpóreos.

O DNA tumoral circulante (cfDNA) é composto por pequenos fragmentos de DNA que são enviados pelo tumor na corrente sanguínea, sendo este, o mais abundante encontrado na corrente sanguínea. As células tumorais circulantes (CTCs), por sua vez, são células tumorais inteiras que acessam a corrente sanguínea, porém normalmente estão disponíveis em pequena quantidade (1-10 CTCs por 1 ml de sangue). A disposição destes biomarcadores permite que este procedimento alternativo possa ser utilizado na prática clínica na detecção de alterações moleculares, permitindo também o direcionamento e monitoramento da terapia empregada.<sup>70,71,72</sup> A necessidade de aplicabilidade do teste e de sua eficiência foi apresentada por, SPICER J et al. 2015, em que testes genéticos de *EGFR* não eram bem conduzidos em 19% dos casos de CPNPC, principalmente pela dificuldade na obtenção de uma quantidade suficiente de tecido tumoral, retardo na disponibilização dos resultados das mutações em 23% dos pacientes, no momento da escolha de tratamento.<sup>73</sup> A facilidade de obtenção da biópsia líquida também permite a possibilidade de monitorar a progressão de doença. Um exemplo de

aplicação já empregada atualmente foi dado por THRESS et al., demonstrando que as análises de cfDNA no plasma, permitem a identificação dos mecanismos de resistência na terapia alvo de *EGFR* em CPNPC, como por exemplo na mutação de *EGFR* T790M e, atualmente, a C797S.<sup>74</sup>

O sangue é a primeira escolha como alternativa à biópsia tecidual para o monitoramento no CP. Ele representa o paciente de forma global, além do tumor primário, algumas metástases que possam estar espalhadas pelo corpo. No entanto, o sangue não é tão específico como o escarro na detecção das alterações pulmonares.

A utilização do escarro por sua vez já tem sido empregada na prática clínica para auxílio no diagnóstico de CP. Isso se dá principalmente pela fácil acessibilidade do material biológico, e pelo menor desconforto no momento da coleta. O escarro além de ser menos invasivo que o sangue, dispõe da maior parte das células pulmonares como as células epiteliais brônquicas, os macrófagos alveolares e as células tumorais como um todo.<sup>75</sup> A citologia do escarro é um método simples e não invasivo para investigação do CP, que identifica as células morfolologicamente aberrantes. As amostras são consideradas representativas para a citologia quando há a presença dos macrófagos alveolares, células epiteliais brônquicas, metaplasias escamosas e a presença de células tumorais. Apesar da facilidade, do baixo custo e da não invasividade deste método, a sensibilidade da citologia do escarro gira em torno de 60%, como citado por RISSE et al, 1985.<sup>76</sup> Em países mais desenvolvidos, as biópsias teciduais ainda são realizadas na maior parte das análises, substituindo o uso da citologia do escarro para o diagnóstico do CP.<sup>77</sup>

O escarro já tem sido estudado como um meio de identificação de alterações moleculares no CP, principalmente por ser um fluido biológico que normalmente está muito perto do tumor primário, tendo uma efetividade maior em tumores localmente centrais, e com alta carga tumoral. Sobretudo, a obtenção da amostra de escarro pode ser realizada de maneira rápida, visto que normalmente pacientes com CP possuem uma produção maior do escarro naturalmente. Além disto, o escarro possui DNA de alta qualidade, e que permite a realização de coletas seriadas, além da possibilidade de indução da amostra com solução hipertônica de NaCl, na ausência de expectoração espontânea.<sup>72,75,76,78</sup>

## 2. HIPÓTESE

A utilização de fluídos biológicos tem sido amplamente considerada para a identificação de marcadores tumorais em diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer de pulmão. O escarro, por ser um fluido altamente representativo dos componentes contidos no trato respiratório inferior e superior, possui um grande potencial como ferramenta alternativa no diagnóstico das alterações moleculares contidas no câncer de pulmão, representando toda a heterogeneidade tumoral. Mediante a esses fatos, essa dissertação de mestrado levanta como hipótese a possibilidade de que o escarro possa ser utilizado como uma alternativa ao tecido e ao plasma, no diagnóstico das mutações acionáveis (*drivers*) bem como o monitoramento dos mecanismos de resistência durante o uso de inibidores de EGFR-tirosina quinase (TKIs).

### 3. OBJETIVO

#### 1. 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é investigar a presença de DNA tumoral contido em escarro como uma ferramenta alternativa de diagnóstico das mutações *drivers* ocorridas em pacientes com adenocarcinoma de pulmão.

#### 2. 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar os níveis de detecção das mutações ativadoras nos genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* encontrados no escarro com os resultados obtidos por biópsia tecidual e plasma (quando disponível para detecção de T790M).

Avaliar, comparativamente, a detecção das mutações ativadoras nos genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* em escarro pelos métodos de sequenciamento de nova geração (NGS) e PCR digital.

## 4. METODOLOGIA

### 3. 4.1 CASUÍSTICA

Do período de fevereiro de 2017 à fevereiro de 2020, foram recrutados 53 pacientes no ambulatório de cirurgia torácica e oncologia do A.C.Camargo Cancer Center, com diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar para coleta de escarro, sem nenhum tratamento prévio e no momento do diagnóstico. Destes, 11 pacientes foram excluídos por falha na indução de escarro e 42 amostras foram analisadas neste estudo. Destes, 27 eram positivos para uma das mutações (*EGFR*:17 casos e *KRAS*:10 casos) e 15 não possuíam mutação na biópsia tecidual (*wild type*).

Dos pacientes positivos para mutação em *EGFR*, 5 realizaram nova coleta após a confirmação da presença da mutação de resistência *EGFR* T790M, em ctDNA no plasma.

Com isto, rastreamos a presença de mutações ativadoras nos genes *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* no DNA tumoral obtidos do escarro de 42 pacientes. Os dados gerados do sequenciamento foram correlacionados com os resultados obtidos da biópsia tecidual e do plasma (quando solicitado para detecção de mutações de resistência) feitos na rotina do diagnóstico.

Durante o sequenciamento por NGS, foram rastreados 14 genes por paciente utilizando-se um painel customizado. A detecção de DNA tumoral circulante no sangue foi realizada de rotina, somente para a identificação de mutações de resistência (T790M) durante o monitoramento de resposta ao tratamento com inibidores de *EGFR*-TKI. Neste caso específico, realizamos uma nova coleta de escarro no momento em que detectamos a progressão tumoral durante a avaliação de resposta terapêutica com inibidores de *EGFR*-TKI.

Para a análise de ddPCR, foram utilizadas sondas para as mutações mais frequentes: *EGFR* L858R, *EGFR* T790M, *KRAS* G12C e *KRAS* G12D.

Por fim, as alterações genéticas identificadas no DNA circulante dos dois fluidos corpóreos, plasma e escarro, foram correlacionadas com a evolução clínica.

#### **4. 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

A primeira coleta foi realizada na ocasião do diagnóstico, em pacientes com CPNPC, subtipo histológico adenocarcinoma (AD) com presença ou ausência de mutações acionáveis em biópsia tecidual, sem tratamento prévio. A segunda coleta foi realizada no momento da recidiva tumoral indicada pelo oncologista clínico (conforme avaliação de resposta avaliada por TC ou PET-CT e/ou presença de mutação T790M no plasma).

#### **5. 4.3 COLETA DE ESCARRO**

Os indivíduos selecionados para a coleta de amostra de escarro foram previamente informados sobre os objetivos do estudo e os procedimentos aos quais seriam submetidos para a obtenção da amostra. Após a anuência, leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – resolução 466/2012) (Apêndice 2) e assinatura, os participantes foram encaminhados ao ambulatório, acomodados em cadeiras e submetidos a 3 etapas de inalação com solução salina hipertônica 7% com duração máxima de 7 minutos cada.

Os procedimentos de indução foram realizados com o inalador ultrassônico de micropartículas (Ultra-neb 2000 ultrasonic nebulizer, Devilbiss, sunrise Medical, EUA) capaz de alcançar o espaço alveolar na indução do escarro. Durante todos os procedimentos de indução, rigorosamente, houve a retaguarda de um médico e corpo de enfermagem para eventuais intercorrências. Ao término de cada inalação, solicitamos aos participantes a enxaguar a boca e a assoar o nariz. As amostras de escarro foram coletadas em recipientes contendo solução preservante (Cell Preserve, Kolplast ci LTDA, Itupeva, São Paulo).

## **6. 4.4 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESCARRO**

Ao término do procedimento de coleta, as amostras foram identificadas com o nome e registro hospitalar do participante, e, imediatamente, encaminhadas ao Biobanco, onde foram registradas sequencialmente, checadas juntamente com TCLE. As amostras de escarro foram separadas da solução preservante por centrifugação leve (1.500 rpm x 10 minutos) e o material sedimentado foi transferido para tubos eppendorf de 2 ml, identificado conforme o número sequencial gerado pelo biobanco e armazenado em freezer -80°C.

## **7. 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DO ESCARRO**

As amostras de escarro foram pré-processadas para retirada do excesso de solução preservante e o escarro foi congelado à -80°C até o momento da extração. O protocolo de extração de DNA foi conduzido de acordo com o protocolo operacional padrão interno criado pelo Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center para esta finalidade. Para a extração de DNA foi realizada inicialmente a lise celular utilizando aproximadamente 500ul das amostras de escarro, com tampão de lise, proteinase k em banho seco com agitação. Após a digestão das amostras, foi realizado o tratamento com a enzima RNase A (Qiagen, CA, EUA) conforme orientação do fabricante. A extração do DNA foi realizada de forma automatizada no equipamento QIASymphony e com o kit DSP DNA Midi (Qiagen, CA, EUA) utilizando um volume de 1100ul de cada da amostra. A pureza e concentração do DNA foram avaliadas nos equipamentos Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, EUA) e Qubit QUANT-IT dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies), respectivamente. A integridade foi determinada com equipamento Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, EUA). O TapeStation gera uma nota de qualidade do DNA que vai de 0-10, sendo 10 o DNA na sua forma mais íntegra.

## 8. 4.6 TABULAÇÃO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES

Os dados gerados foram divididos e categorizados de acordo com as informações clínicas dos pacientes e os resultados gerados em cada teste (biópsia tecidual, plasma e escarro). Para as características descritivas foram utilizados os critérios de média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo, variação e quartis. Ademais, o teste não paramétrico de Kaplan-Meier foi amplamente utilizado para obtenção dos resultados de sobrevida em diversos intervalos de tempo. Realizamos um levantamento das informações e dados epidemiológicos de cada paciente, tais como: idade, sexo, tabagismo, tipo histológico de câncer, subtipo histológico, estadiamento clínico (utilizando o sistema TNM 8ª Edição), mutações presentes no tecido e plasma, utilizando tabelas com ajuda do software Windows Excel. O pacote estatístico S-Plus (versão 8.04; TIBCO, Palo Alto, CA) foi usado para realizar todas as análises. Os valores de p menores do que 5% ( $p < 0,05$ ) foram considerados significantes.

## 9. 4.7 SEQUENCIAMENTO DOS GENES EGFR, KRAS, NRAS E BRAF - Plataforma Ion Torrent™ (ThermoFisher Scientific)

O sequenciamento na plataforma *Ion Torrent™* (ThermoFisher Scientific) inicia-se com a quantificação das amostras no aparelho *Qubit® 3.0 Fluorometer* (ThermoFisher Scientific), utilizando o kit *Qubit™ dsDNA Assay BR*, seguindo o protocolo do fabricante. Ao final do procedimento, todas as amostras foram diluídas com água ultrapura para obter concentração final de 10 a 15 ng/ul.

### 4.7.1 PREPARO DE BIBLIOTECAS

O preparo da molécula de DNA para a realização da técnica de sequenciamento inicia-se com a amplificação da região alvo. Foi feita uma reação de PCR com o Multiplex PCR Mix (Qiagen) para cada DNA de interesse, utilizando 2 pools (A e B) de primers customizados pelo grupo de pesquisa liderado pela Dra. Dirce Maria Carraro, primers que amplificam regiões hotspots de 14 genes frequentemente mutados em tumores sólidos (*BRAF*, *CDH1*, *EGFR*,

*ERBB2*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET* e *ROS1*), seguindo o protocolo do fabricante. Ao final desta etapa é possível guardar as amostras em temperatura -20°C ou seguir com o protocolo.

A biblioteca de DNA passou por um processo de purificação dos fragmentos de DNA, conforme descrito a seguir. O procedimento se dá com o uso do reagente Agencourt® AMPure® XP (*Beckam Coulter*) que deve ser retirado antecipadamente da geladeira e homogeneizado com auxílio de vórtex para dispersão das *beads* antes do uso. Neste reagente há *beads* magnéticas e um tampão que seletivamente favorece a ligação de fragmentos de DNA às *beads*, permitindo que o excesso de *primers*, nucleotídeos, sais e enzimas sejam removidos. Também foi preparado de forma prévia álcool 70%, assim como a identificação de microtubos de 1,5 mL DNA *LoBind* (*Eppendorf*). Nestes tubos foram adicionados 45 µl do reagente Agencourt® AMPure® XP e 30 µl da biblioteca. A mistura foi homogeneizada com a própria pipeta, seguiu-se com incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e então os tubos foram posicionados em estante magnética, por 2 minutos para reter *beads* ligados aos fragmentos de DNA. O sobrenadante foi retirado e descartado, e ao pellet de *beads* foi adicionado 150 µl de etanol 70%, os microtubos colocados na estante magnética foram girados em 180°, com rapidez para que as *beads* passassem através do álcool, realizando uma lavagem. Os microtubos foram girados novamente em 180°, completando 360°. O sobrenadante foi novamente retirado e novamente foi adicionado 150 µl de etanol 70%, realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente retirado e os microtubos foram brevemente centrifugados e colocados na estante magnética para retirada do excesso de etanol. Os microtubos foram deixados abertos para evaporação de qualquer resíduo de álcool, tomando o cuidado para que não ocorresse a secagem em excesso.

Segue-se para a etapa de amplificação das bibliotecas. Foram adicionados 2 µl de Library Amplification Primer Mix a 50 µl de Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (contendo dNTPs, tampão, DNA polimerase), sendo homogeneizados com o uso da própria pipeta. Todo o volume (52 µL) foi transferido para eluir o DNA das *beads*. As amostras foram submetidas ao seguinte programa: um ciclo de 98°C por dois minutos e 8 ciclos de 98°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após essa ciclagem, cada tubo foi colocado em estante magnética por 3 minutos ou até que a solução ficasse clara. O sobrenadante foi retirado com cuidado e colocado em um outro tubo de 1,5 mL. A esse conteúdo (~50 µL) foram adicionados 25 µl do reagente Agencourt® AMPure® XP e a mistura foi homogeneizada com a própria

pipeta, seguiu-se com incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e então os tubos foram posicionados em estante magnética, por 2 minutos para reter *beads* ligados aos fragmentos de DNA. O sobrenadante foi retirado com cuidado e colocado em um outro tubo de 1,5mL. A esse conteúdo (~75µL) foram adicionados 60µl do reagente Agencourt® AMPure® XP, a mistura foi homogeneizada com a própria pipeta, seguiu-se com incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e então os tubos foram posicionados em estante magnética, por 2 minutos para reter as *beads* ligadas aos fragmentos de DNA. O sobrenadante foi retirado e descartado, e então foi adicionado ao pellet de *beads* 150 µl de etanol 70% e os microtubos colocados na estante magnética foram girados em 180°, com rapidez para que as *beads* passassem através do álcool, realizando uma lavagem. Os microtubos foram girados novamente em 180°, completando 360°. O sobrenadante foi novamente retirado e novamente foi adicionado 150µl de etanol 70%, realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. O DNA purificado foi eluído com 30 µL de tampão low TE.

As bibliotecas foram quantificadas por PCR em tempo real com o Kit Ion Library TaqMan™ Quantitation, segundo instruções do fabricante. Após cada biblioteca ser diluída a 100 pM, seguiu-se com a PCR em emulsão, na qual ocorre a amplificação clonal dos fragmentos no interior de milhares de micelas geradas nesta solução. O sequenciamento foi realizado pela plataforma Ion PI com o Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing (Thermo Scientific), segundo as orientações do fabricante. A reação foi realizada em um Ion PI™ Chip, sendo possível obter uma quantidade de dados de cerca de 10 Gb de sequências.

#### 4.7.2 INTERPRETAÇÃO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

Mutações somáticas foram consideradas caso a variante estivesse presente em mais de 0,5% das leituras, considerando uma profundidade mínima de cobertura de 20.000X. Uma cobertura média de 172.524X foi obtida nas 42 amostras.

### 10. 4.8 DIGITAL DROPLET PCR (ddPCR)

A ddPCR foi realizada para validarmos parte dos casos positivos para mutações *drivers* no escarro por NGS, com o intuito de obter-se uma comparação de sensibilidade entre os dois

métodos. O método de ddPCR é uma tecnologia de padrão ouro, com capacidade de identificar pequenas quantidades de ácidos nucleicos. Isto é realizado de maneira em que o DNA de interesse seja separado em cerca de 20.000 gotículas de óleo, sendo que a PCR é realizada em cada uma destas, de maneira independente. Devido a esta análise individual de cada gotícula gerada, está é um método com alto nível de sensibilidade, que possibilita a quantificação da presença de moléculas de DNA selvagens ou mutados, através da fluorescência.

Para cada amostra, as reações foram realizadas em triplicata. O volume final de cada reação foi de 20 µl, contendo 10 µl de 2x ddPCR SuperMix for Probes (noUDTP) (Bio-Rad), 1 µl (20x) de mix contendo primers e sonda selvagens (HEX), 1 µl (20x) de mix contendo primers e sondas mutados (FAM), 8 µl de template (cfDNA – 2 ng), água livre de nucleases UltraPure Distilled Water (Invitrogen) caso seja necessário. As reações foram aplicadas em cartuchos DG8 (Bio-Rad) juntamente com 7 µl de Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad) para cada amostra, para a geração de gotículas na plataforma QX100/QX200 Droplet Generator (Bio-Rad). Cada reação continha cerca de 20 mil gotículas de emulsão água-óleo gerados. Os droplets foram dispostos em uma placa de 96 poços (Eppendorf), que foi selada na plataforma PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad) para reação de amplificação no T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Após amplificação, a placa foi carregada na plataforma QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) e os resultados foram verificados no software QuantaSoft 1.7.4 (Bio-Rad). Mutações somáticas foram consideradas caso a variante estivesse presente em mais de 0,5% das leituras, dentro de no mínimo 20 mil droplets gerados.

As sondas utilizadas nas amostras provenientes da Bio-Rad foram: *EGFR* L858R, *EGFR* T790M, *KRAS G12C* e *KRAS G12D*, levando em consideração as mutações *drivers* mais frequentes no CPNPC.

## 5. RESULTADOS

### 11. 5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM CPNPC

Na tabela 2, estão descritas as características demográficas dos 42 pacientes recrutados, referentes a idade, sexo, status mutacional, estadiamento, tabagismo, tempo de seguimento e sobrevida.

**Tabela 2.** Características demográficas dos 42 pacientes A.C.Camargo Cancer Center, quanto ao sexo, idade, estadiamento, tabagismo e tempo de seguimento.

|                      |                          |
|----------------------|--------------------------|
| Total de pacientes   | 42                       |
| Idade (anos)         | 63 (32-88) <sup>a</sup>  |
| Sexo                 | 28 homens<br>14 mulheres |
| Mutações             |                          |
| <i>EGFR</i>          | 17                       |
| <i>KRAS</i>          | 10                       |
| <i>WT</i>            | 15                       |
| <i>BRAF</i>          | 0                        |
| <i>NRAS</i>          | 0                        |
| <i>EGFR</i> G719A    | 01                       |
| <i>EGFR</i> L858R    | 08                       |
| <i>EGFR</i> W731X    | 01                       |
| <i>EGFR</i> T790M    | 08                       |
| <i>EGFR</i> S768I    | 01                       |
| <i>KRAS</i> G12D     | 04                       |
| <i>KRAS</i> G12C     | 04                       |
| <i>KRAS</i> Q61L     | 01                       |
| Estadiamento clínico |                          |
| II                   | 02                       |
| III                  | 12                       |
| IV                   | 28                       |

|                     |                                |
|---------------------|--------------------------------|
| Estadio T*          |                                |
| 1                   | 06                             |
| 2                   | 12                             |
| 3                   | 10                             |
| 4                   | 14                             |
| Estadio N*          |                                |
| 0                   | 12                             |
| 1                   | 06                             |
| 2                   | 18                             |
| 3                   | 04                             |
| Estadio M*          |                                |
| M0                  | 15                             |
| M1                  | 27                             |
| Cirurgia            |                                |
|                     | 02                             |
| Imunoterapia+QT     |                                |
|                     | 10                             |
| QT convencional     |                                |
|                     | 22                             |
| Terapia alvo        |                                |
|                     | 08                             |
| Tabagistas          | 17 <sup>a</sup> (42 maços/ano) |
| Ex tabagistas       | 10 <sup>a</sup> (27 maços/ano) |
| Não tabagistas      | 15                             |
| Tempo de seguimento | <sup>a</sup> 12 meses          |
| Óbitos              | 05                             |

Dados demográficos obtidos através de prontuário eletrônico e prontuário convencional

<sup>a</sup> Valores representam a média (mínimo e máximo). WT: wild type/gene selvagem.

\*02 pacientes não apresentam estadiamento patológico em seus prontuários eletrônicos.

Foram recrutados, 42 pacientes (28 homens e 13 mulheres) com média de idade de 63 anos (32 a 88 anos), todos com diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar. Destes, 27 eram positivos para uma das mutações (*EGFR*:17 casos e *KRAS*:10 casos) e 15 não possuíam mutação na biópsia (*wild type*). O estadiamento clínico (EC) IV foi o mais frequente dentre os participantes (n=28) seguido pelo EC III (n=12) e EC II (n=2). O estadiamento patológico (TNM) apresentou-se da seguinte maneira: T1 (n=6), T2 (n=12), T3 (n=10), T4 (n=14).

Comprometimento linfonodal (N): N0 (n=12), N1 (n=6), N2 (n=18) e N3 (n=14) e metástases (M): M0 (n=15) e M1 (n=27). Quanto a história de tabagismo, 17 pacientes eram fumantes (média de 42 maços/ano), 10 ex-fumantes (média de 27 maços/ano) e 15 não fumantes. O tempo médio de seguimento foi de 12 meses, com 5 pacientes mortos e 37 vivos, avaliados no último levantamento do prontuário (julho de 2021). Dois pacientes foram tratados com cirurgia (4,8%), enquanto 10 pacientes foram tratados com QT+ imunoterapia (23,8%), 22 com quimioterapia convencional (52,4%), e 8 pacientes receberam terapia alvo (19,4%).

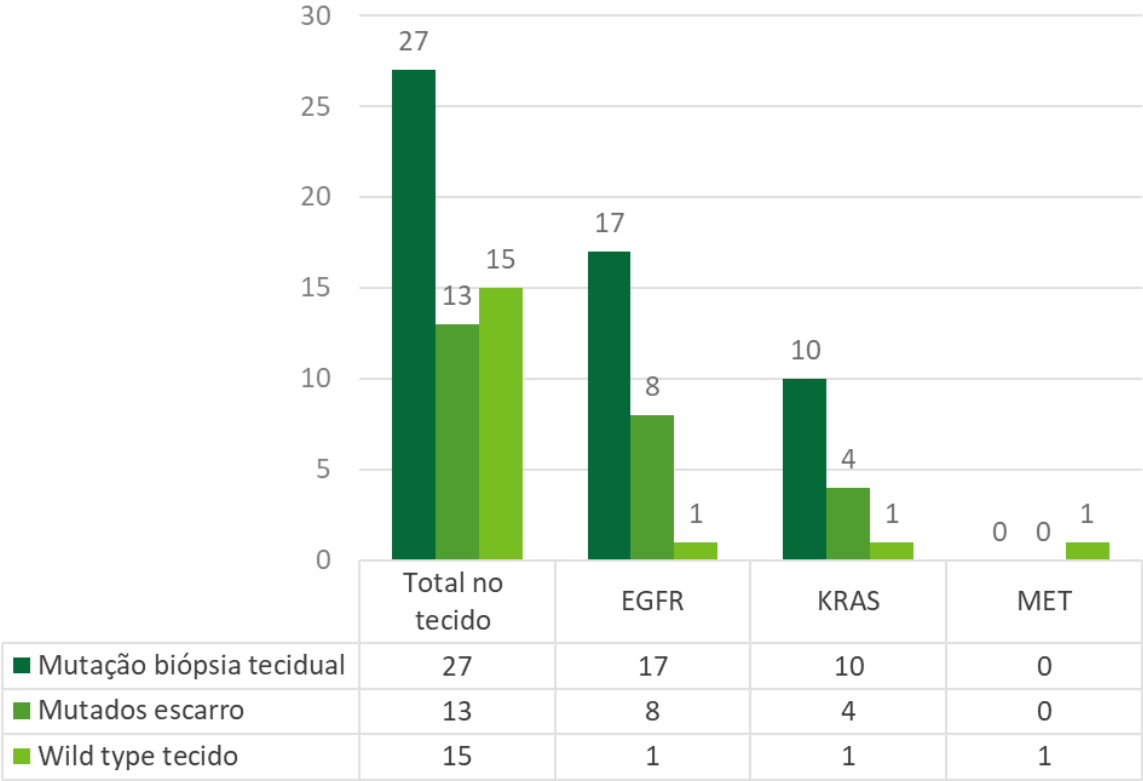
## 12. 5.2 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DRIVERS POR NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)

Das 42 amostras de escarro testadas pelo método de NGS, 27 eram mutadas e 15 eram amostras não mutadas (*wild type*).

A mutação em *EGFR* foi marginalmente associada a não fumantes (40,8% vs. 23,7%,  $p=0,06$ ). Não houve diferença, estatisticamente significativa detectada no sexo (feminino: 46,1%, 6/13; masculino: 39,3%, 11/27,  $p=0,08$ ).

Dos 27 casos oriundos de pacientes mutados na biópsia tecidual, 13 amostras de escarro foram positivas para uma das mutações: 4 em *KRAS* (Q61H, Q61L, G12D e G12C) e 8 em *EGFR* (2 deleções do éxon 19, 3 mutações pontuais L858R, 1 mutação no éxon 18 G719A e 1 em T790M), correspondendo a 48,15% de concordância com a biópsia tecidual (Figura 6).

Dos 15 casos, considerados não mutados (*wild type*) no tecido, 3 pacientes tinham mutação presente somente no escarro, sendo 1 com mutação G12C em *KRAS*, 1 com deleção do éxon 19 em *EGFR* e uma em *MET*-ex14. A mutação de resistência T790M, foi positiva em 1/6 (16,66%) dos casos identificados em ctDNA isolado do plasma (Tabela 3).



**Figura 6.** Relação das mutações identificadas previamente na biópsia tecidual e amostras wild type, com as mutações identificadas em escarro pelo método de NGS.

**Tabela 3.** Análise descritiva das mutações encontradas por NGS em tecido, plasma e escarro, em suas respectivas frequências.

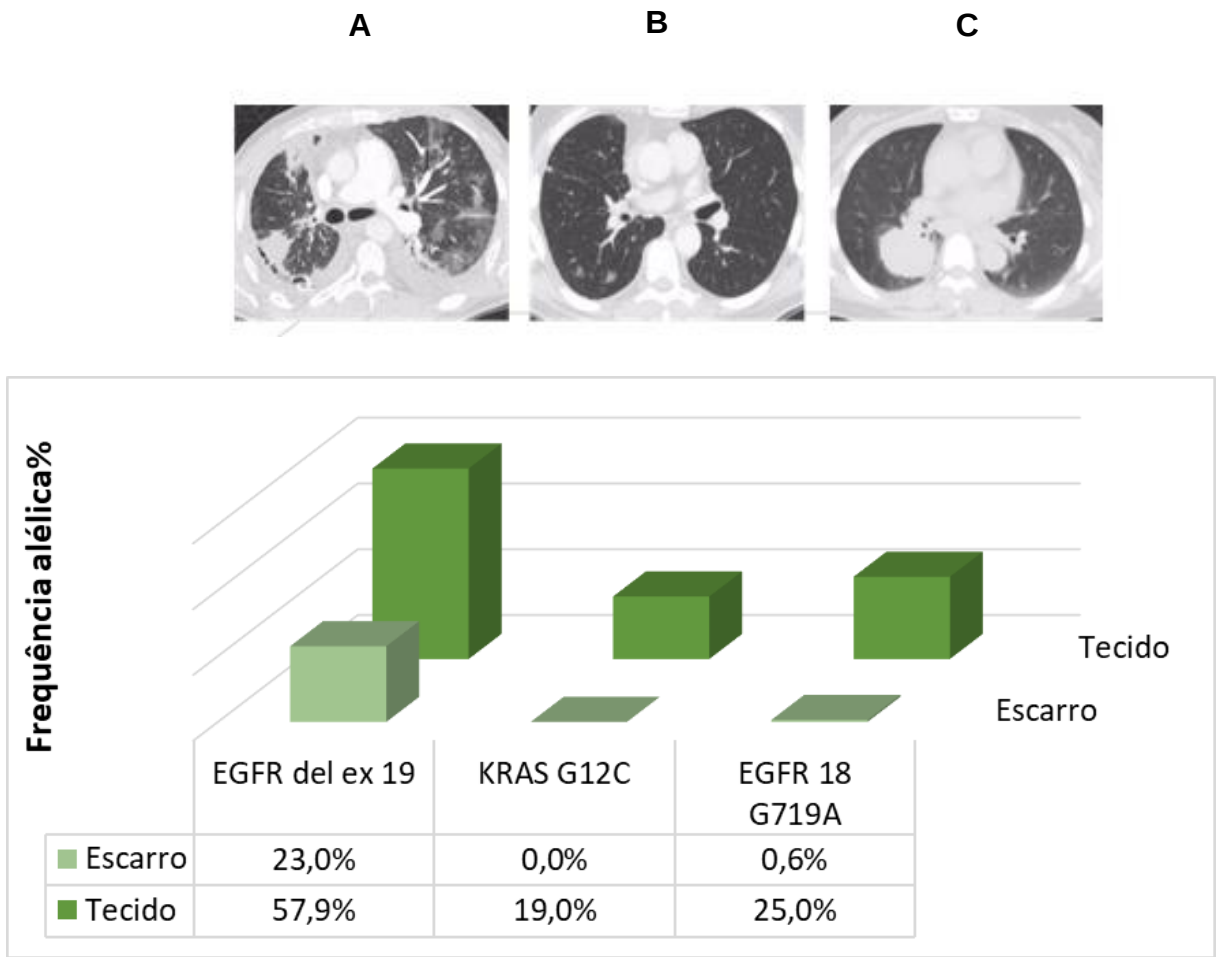
| <b>Amostras</b> | <b>Tecido<br/>(biópsia)</b> | <b>VAF<br/>(%)</b> | <b>Plasma*</b>    | <b>VAF<br/>(%)</b> | <b>Escarro</b>         | <b>VAF<br/>(%)</b> |
|-----------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| <b>1</b>        | EGFR<br>(S752_I759del)      | 57,9               | Não<br>avaliado   | -                  | EGFR<br>(S752_I759del) | 23,0               |
| <b>2</b>        | KRAS (Q61H)                 | 49,2               | Não<br>avaliado   | -                  | KRAS (Q61H)            | 9,0                |
| <b>3</b>        | KRAS (Q61L)                 | 20,4               | Não<br>avaliado   | -                  | KRAS (Q61L)            | 6                  |
| <b>4</b>        | EGFR (L858R)                | 50,4               | Não<br>avaliado   | -                  | EGFR (L858R)           | 1                  |
| <b>5</b>        | KRAS (G12D)                 | 28,1               | Não<br>avaliado   | -                  | KRAS (G12D)            | 8                  |
| <b>6</b>        | EGFR (L858R)                | 54,2               | EGFR -<br>(T790M) | 0,5                | EGFR (L858R)           | 12,2               |
| <b>7</b>        | KRAS (G12C)                 | 49,2               | Não<br>avaliado   | -                  | KRAS (G12C)            | 2,2                |
| <b>8</b>        | EGFR<br>(S752_I759del)      | 13,2               | EGFR<br>(T790M)   | 0,9                | EGFR<br>(T790M)        | 0,4                |
| <b>9</b>        | EGFR (L858R)                | 21,3               | Não<br>avaliado   | -                  | EGFR (L858R)           | 0,5                |
| <b>10</b>       | EGFR (G719A)                | 62,7               | Não<br>avaliado   | -                  | EGFR<br>(G719A)        | 0,6                |
| <b>11</b>       | WT                          | -                  | WT                | -                  | MET (EX14)             | 3,5                |
| <b>12</b>       | WT                          | -                  | Não<br>avaliado   | -                  | KRAS (G12C)            | 2,0                |
| <b>13</b>       | WT                          | -                  | WT                | -                  | EGFR del éxon<br>19    | 5,9                |
| <b>14</b>       | WT                          | -                  | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |
| <b>15</b>       | KRAS (G12C)                 | 19,4               | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |
| <b>16</b>       | EGFR (L858R)                | 45,9               | EGFR<br>(T790M)   | 0,5                | Negativo               | -                  |
| <b>17</b>       | EGFR<br>(E746_A750del)      | 18,2               | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |
| <b>18</b>       | EGFR<br>(E746_A750del)      | 12,5               | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |
| <b>19</b>       | EGFR (L858R)                | 7,6                | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |
| <b>20</b>       | KRAS (G12C)                 | 36,5               | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |
| <b>21</b>       | KRAS (G12C)                 | 11,3               | Não<br>avaliado   | -                  | Negativo               | -                  |

|                                                                                                                                                                    |                                 |                |              |      |          |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------|--------------|------|----------|---|
| 22                                                                                                                                                                 | EGFR (L858R)                    | 22,2           | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 23                                                                                                                                                                 | EGFR (L858R)                    | 45,9           | EGFR (T790M) | 0,8  | Negativo | - |
| 24                                                                                                                                                                 | KRAS (G719A)                    | 24             | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 25                                                                                                                                                                 | EGFR (del éxon 19)              | 35             | EGFR (T790M) | <1   | Negativo | - |
| 26                                                                                                                                                                 | EGFR del éxon 19, T790M e C797S | 33,7/30,0/11,0 | EGFR (T790M) | 9,0% | Negativo | - |
| 27                                                                                                                                                                 | EGFR (L858R)                    | 18,2           | Não avaliado | -    | Negativo | - |
|                                                                                                                                                                    |                                 |                |              |      |          |   |
| 28                                                                                                                                                                 | EGFR (del éxon 19)              | 15,0           | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 29                                                                                                                                                                 | KRAS (G12D)                     | 10,8           | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 30                                                                                                                                                                 | EGFR (del éxon 19)              | 13,0           | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 31                                                                                                                                                                 | KRAS (G12D)                     | 17,3           | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 32                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 33                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 34                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | WT           | -    | Negativo | - |
| 35                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | WT           | -    | Negativo | - |
| 36                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 37                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 38                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 39                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 40                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 41                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| 42                                                                                                                                                                 | WT                              | -              | Não avaliado | -    | Negativo | - |
| *Pesquisa de mutação de resistência pós-terapia com EGFR TKI; VAF: frequência alélica da variante. WT: selvagem/sem mutação. Não avaliado: não testado para T790M. |                                 |                |              |      |          |   |

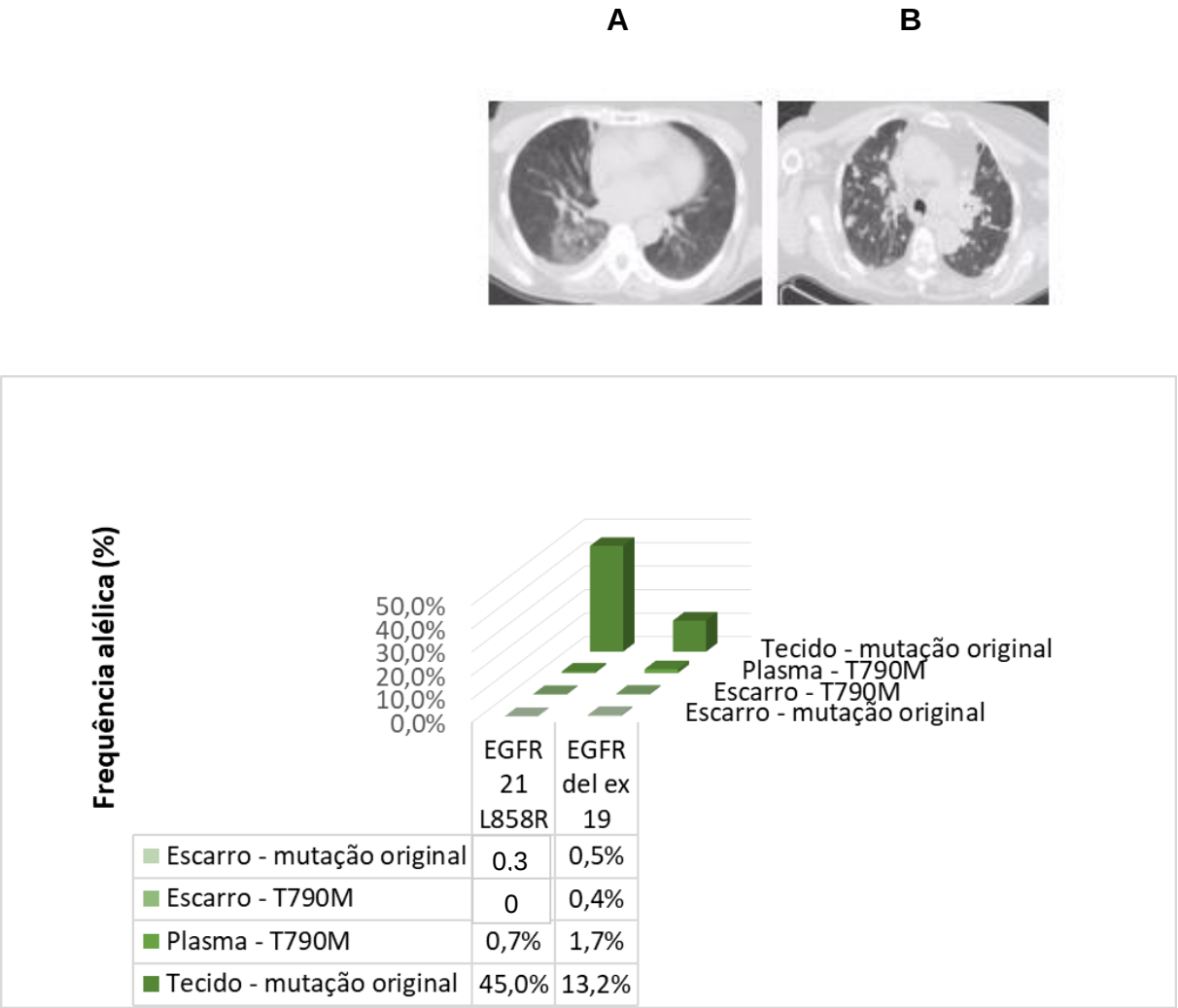
As maiores frequências alélicas (VAF) foram detectadas em pacientes com coleta espontânea de escarro (9-23%) e, significativamente mais comuns no estágio IV do que no

estágio III (45,5% vs. 20,8%,  $p < 0,05$ ). As VAFs de médias e baixas frequências (0,4 a 5,9%) foram detectadas em sua grande maioria em amostras derivadas de pacientes com lesões periféricas ou baixo volume de doença, avaliados pelas tomografias (Figura 7 e 8).

Não houve correlação linear positiva entre as frequências alélicas encontradas nas biópsias teciduais, detectadas por NGS, e as frequências alélicas detectadas no escarro ( $r=0,109$ ,  $p=0,538$ ).



**Figura 7.** Avaliação da frequência das mutações encontradas no escarro em comparação com a biópsia tecidual e suas respectivas imagens tomográficas. **A)** Paciente com tumor bilateral e alta carga tumoral, com coleta de escarro espontânea. A frequência alélica encontrada no escarro da deleção do éxon 19 em *EGFR* foi de 23% e na biópsia tecidual foi de 57,9%. **B)** Paciente com tumor periférico e baixa carga tumoral, com coleta espontânea. A mutação em *KRAS* (G12C) não foi encontrada no escarro, estando presente em 19% na biópsia tecidual. **C)** Paciente com tumor centralmente localizado, bilateral, e alta carga tumoral, com coleta de escarro induzida. A frequência alélica encontrada no escarro da mutação no éxon 18 em *EGFR* (G719A) foi de 0,6% e na biópsia tecidual foi de 25%. Critério para a chamada de variante:  $\geq 0,5\%$  das leituras.



**Figura 8.** Avaliação da frequência das mutações encontradas no escarro em comparação com a biópsia tecidual e plasma para detecção de mutação original e de resistência (T790M) e suas respectivas imagens tomográficas. **A)** Paciente com tumor bilateral, central, com padrão intersticial, com coleta de escarro induzida. A frequência alélica encontrada no escarro da mutação original no éxon 19 em *EGFR* (L858R) foi negativa no escarro e na biópsia tecidual foi de 45%. A frequência alélica encontrada no escarro da mutação de resistência em *EGFR* (T790M) foi de 0,3% e no plasma de 0,7%. **B)** Paciente com tumor centralmente localizado e alta carga tumoral, com coleta espontânea. A frequência alélica encontrada no escarro da mutação original da deleção do éxon 19 em *EGFR* foi de 0,5% e na biópsia tecidual foi de 13,2%. A frequência alélica encontrada no escarro da mutação de resistência em *EGFR* (T790M) foi de 0,4% e no plasma de 1,7%. Critério para a chamada de variante:  $\geq 0,5\%$  das leituras.

### 5.3.1 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES *DRIVERS* POR DIGITAL DROPLET PCR (ddPCR)

Inicialmente, realizamos uma padronização do método de PCR digital, utilizando 3 amostras de DNAs de tecido tumoral, sabidamente positivas para as mutações mais frequentes: *EGFR L858R*, *EGFR T790M*, *KRAS G12C* e *KRAS G12D*, como mostra a Tabela 4.

**Tabela 4.** Padronização da técnica de ddPCR em amostras de tecido sabidamente mutadas para as sequências avaliadas

| <i>ID do Tecido</i> | <i>Mutação(gene)</i> | <i>VAF (%)</i><br><i>NGS</i> | <i>VAF (%)</i><br><i>ddPCR</i> |
|---------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| <b>1</b>            | <i>EGFR L858R</i>    | 12.90                        | 11.95                          |
|                     | <i>EGFR T790M</i>    | <0.5                         | <0.5                           |
| <b>2</b>            | <i>KRAS G12D</i>     | 12.80                        | 11.65                          |
| <b>3</b>            | <i>KRAS G12C</i>     | 5.0                          | 1.55                           |

*VAF (%) -frequência alélica das variantes.*

Após a padronização, seguimos para a avaliação de todas as amostras de escarro que foram positivas no tecido de biópsia e/ou no plasma por NGS, para as mutações *KRAS G12D* e *G12C*; *EGFR L858R* e *EGFR T790M* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação das frequências de mutação em KRAS G12D e G12C; EGFR L858R e T790M identificadas por ddPCR em amostras de escarro, e na biópsia tecidual.

| ID | Mutação(gene)                                   | %NGS tecido   | %NGS plasma | %ddPCR escarro | Droplets gerados ddPCR |
|----|-------------------------------------------------|---------------|-------------|----------------|------------------------|
| 1  | KRAS G12C                                       | 19,4          | NA          | 4,7            | 38.922                 |
| 2  | EGFR L858R <sup>1</sup> /<br>T790M <sup>2</sup> | 45,9/<br>0    | 0/<br>0,5   | 0/<br>0,7      | 42.376 <sup>2</sup>    |
| 3  | EGFR L858R <sup>1</sup> /<br>T790M <sup>2</sup> | 47,9/<br>13,0 | 0/<br>0,8   | 0/<br><0,5     | 40.499 <sup>2</sup>    |
| 4  | EGFR T790M                                      | 0             | 0,5         | 0              | 38.508                 |
| 5  | KRAS G12D                                       | 28,1          | NA          | 14,7           | 42.462                 |
| 6  | EGFR L858R                                      | 7,6           | NA          | 0              | 48.899                 |
| 7  | EGFR L858R                                      | 25,0          | 0           | 0              | 31.241                 |
| 8  | KRAS G12C                                       | 11,3          | 0           | 0              | 33.946                 |
| 9  | EGFR L858R                                      | 22,2          | NA          | 0              | 42.789                 |
| 10 | EGFR T790M                                      | 30,0          | 9           | 0              | 39.078                 |
| 11 | KRAS G12D                                       | 10,8          | NA          | 0              | 40.639                 |
| 12 | EGFR T790M                                      | 13,0          | NA          | 0              | 40.705                 |
| 13 | KRAS G12D                                       | 17,3          | NA          | 0              | 43.614                 |
| 14 | EGFR L858R <sup>1</sup> /<br>T790M <sup>2</sup> | 54,1/<br>0    | 0/<br>0,5   | 0/<br>1        | 40.073 <sup>2</sup>    |
| 15 | EGFR L858R                                      | 15,4          | NA          | 0              | 36.603                 |
| 16 | EGFR L858R                                      | 50,4          | NA          | 14,4           | 30.480                 |
| 17 | KRAS G12C                                       | WT            | NA          | 3,4            | 36.581                 |

\*NA=não avaliado

Os resultados das análises feitas por ddPCR, referem-se a 17 amostras de escarro, oriundos de pacientes em que o tecido foi positivo para uma das mutações avaliadas.

Dos 17 casos positivos no tecido, 7 mutações (41,17% de concordância) foram detectadas por ddPCR, sendo: 3 T790M (0,7%, <0,5% e 1%), uma em L858R (14,4%), 2 em KRAS: G12C (4,7% e 3,4%), e uma em KRAS: G12D (14,7%).

### 13. 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE NGS E ddPCR EM AMOSTRAS DE ESCARRO

Dos 7 casos avaliados comparativamente, obtivemos uma concordância entre NGS e ddPCR em 4 amostras (57,17%), sendo 1 em *EGFR T790M* (<0,5% e <0,5%), 1 em *EGFR L858R* (12,2% e 14,4%) 1 em *KRAS G12C*, e 1 mutação em *KRAS G12D* (2,2 % e 3,4%) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Comparação das frequências de mutação em *KRAS G12D* e *G12C*; *EGFR L858R* e *T790M* identificadas por NGS e ddPCR em amostras de escarro

| <i>ID</i> | <i>Mutação (gene)</i> | <i>%NGS tecido</i> | <i>%NGS plasma</i> | <i>%NGS escarro</i> | <i>%ddPCR</i> |
|-----------|-----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------|
| 2         | <i>EGFR T790M</i>     | 0                  | 0,5                | 0                   | 0,7           |
| 3         | <i>EGFR T790M</i>     | 13,0               | 0,8                | <0,5                | <0,5          |
| 5         | <i>KRAS G12D</i>      | 28,1               | NA                 | 8,0                 | 9             |
| 7         | <i>EGFR L858R</i>     | 25,0               | NA                 | 1,0                 | 0             |
| 8         | <i>KRAS G12C</i>      | 11,3               | NA                 | 2,0                 | 0             |
| 16        | <i>EGFR L858R</i>     | 50,4               | NA                 | 12,2                | 14,4          |
| 17        | <i>KRAS G12C</i>      | WT                 | NA                 | 2,2                 | 3,4           |

O NGS detectou 6 mutações em sete casos avaliados (85,7%) e a ddPCR encontrou 5 mutações (71,4%).

As frequências alélicas das variantes analisadas nas amostras, foram sensivelmente maiores nas detecções feitas por ddPCR em comparação ao NGS em 3/5 casos (*T790M*: 0,7% vs 0%); (*KRAS G12D*: 9% vs 8%); (*L858R* 14,4% vs 12,2%); (*G12C*: 3,4% vs 2,2%), respectivamente.

Os resultados da análise de correlação, demonstraram uma associação linear positiva razoável, entre os resultados de biópsia tecidual avaliados por NGS com escarro avaliado por

ddPCR ( $r= 0,20$  e  $p=0,023$ ). Houve uma associação linear positiva forte entre escarro avaliado por NGS e escarro avaliado por ddPCR ( $r=0,998$  e  $p=0,0001$ ), como demonstrado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Correlação linear entre as frequências alélicas encontradas nas biópsias teciduais, detectadas por NGS, e as frequências alélicas detectadas no escarro por NGS e ddPCR.

|                                      |                       | <b>NGS<br/>(escarro)</b> | <b>ddPCR<br/>(escarro)</b> |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Biópsia tecidual<br/>(Padrão)</b> | Correlação de Pearson | 0,109                    | 0,520*                     |
|                                      | Sig. (Bilateral)      | 0,538                    | 0,023**                    |
|                                      | N                     | 27                       | 7                          |
| <b>NGS escarro</b>                   | Correlação de Pearson | 1                        | 0,998*                     |
|                                      | Sig. (Bilateral)      |                          | 0,0001**                   |
|                                      | N                     |                          | 7                          |

\* Coeficiente de determinação. \*\*  $p \leq 0,05$  – existe correlação.

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos cinco anos, diferentes técnicas minimamente invasivas foram introduzidas para melhorar o diagnóstico das alterações moleculares em diversos tipos de câncer, incluindo o de pulmão. Dentre as técnicas, destaca-se a detecção de DNA circulante livre de células (cfDNA), exossomos, células tumorais circulantes (CTCs) e DNA tumoral circulante (ctDNA), determinado no sangue, soro ou plasma, que é referido como biópsia líquida.<sup>82,83</sup>

A análise de biópsia líquida pode ser realizada em quase todos os fluidos corporais, incluindo hemoderivados, derrame pleural, ascite, urina e também escarro.

Neste estudo, após o conhecimento de tais evidências científicas da função dos fluídos biológicos no diagnóstico das mutações acionáveis (*drivers*), bem como no monitoramento do desenvolvimento de mutações de resistência, exploramos o potencial do escarro como uma ferramenta alternativa de diagnóstico das mutações *drivers* no adenocarcinoma de pulmão, bem como sua utilização no monitoramento da doença estabelecida.

Inicialmente, através do método de NGS, detectamos mutações em treze amostras de escarro do total de 27 amostras sabidamente mutadas no tecido, conferindo uma sensibilidade de 48,15% para o escarro. Adicionalmente, foram identificadas mutações em 3 pacientes considerados *wild type* no tecido [*KRAS* (G12C), *EGFR* (L858R) e *MET* (EX14)]. No entanto, das 4 amostras positivas para a mutação de resistência em *EGFR* T790M no plasma, apenas 1 foi identificada no escarro, o que corresponde a apenas 16,66% de concordância com o plasma.

Contudo, não houve concordância entre as frequências alélicas encontradas nas biópsias teciduais, detectadas por NGS, e as frequências alélicas detectadas no escarro ( $r=0,109$ ,  $p=0,538$ ).

As maiores frequências alélicas (VAF) foram detectadas em pacientes com tumores mais centrais e expectoração espontânea (9-23%) e, as médias e baixas frequências (0,4 a 5,9%) em amostras oriundas de pacientes com lesões periféricas ou baixo volume de doença, avaliados pelas tomografias.

A nossa taxa de concordância entre tecido e escarro foi menor do que as encontradas por dois estudos chineses (94.6% e 70%) em que as mutações em EGF foram avaliadas pela técnica de ARMS-PCR em escarro e lavado brônquico, respectivamente.<sup>84</sup>

A segunda etapa do projeto foi avaliar o potencial da ddPCR em detectar as mutações mais frequentes em *KRAS* (G12D e G12C) e *EGFR* (L858R e *EGFR* T790M). Em 17 amostras positivas para mutações na biópsia tecidual, encontramos 7 mutações no escarro (41,17% de sensibilidade), sendo 3 mutações de resistência de *EGFR* T790M, 1 em *EGFR* L858R, 2 em *KRAS* G12C e 1 em *KRAS* G12D, sendo que esta última não havia sido detectada na biópsia tecidual. Os resultados da análise de correlação, demonstraram uma associação linear positiva razoável, entre os resultados de biópsia tecidual avaliados por NGS com escarro avaliado por ddPCR ( $r=0,20$  e  $p=0,023$ ).

A sensibilidade da ddPCR já foi testada na identificação de mutações em *EGFR* e *KRAS* no estudo de TETSUYA et al, que utilizou a ddPCR para detecção de mutação de *EGFR* em pacientes com adenocarcinoma pulmonar, onde observou uma sensibilidade entre 0,03%-0,001% na detecção de *EGFR* T790M e 0,0005% nas mutações em *KRAS*.<sup>85</sup>

Dos 7 casos avaliados comparativamente, obtivemos uma concordância entre NGS e ddPCR em 4 amostras (57,17%), sendo 1 em *EGFR* T790M (<0,5% e <0,5%), 1 em *EGFR* L858R (12,2% e 14,4%) 1 em *KRAS* G12C, e 1 em *KRAS* G12D (2,2 % e 3,4%)

O NGS detectou 6/7 mutações (85,7%) enquanto que a ddPCR encontrou 5/7 mutações (71,4%).

Houve uma associação linear positiva forte entre as VAFs de escarro avaliado por NGS e escarro avaliado por ddPCR ( $r=0,998$  e  $p=0,0001$ ).

Em 3/5 casos, as VAFs das amostras foram sensivelmente maiores na feita por ddPCR em comparação ao NGS (*T790M*: 0,7% vs 0%); (*KRAS* G12D: 9% vs 8%); (*L858R* 14,4% vs 12,2%); (*G12C*: 3,4% vs 2,2%), respectivamente. DING et al, em 2019, comparou a sensibilidade dos métodos de NGS e ddPCR na detecção das mutações *EGFR* no plasma, demonstrando alta sensibilidade de detecção da ddPCR (0,001%) e concordância quantitativa entre NGS, baseado em amplicon, quando comparado à ddPCR para detectar mutações de resistência e ativadoras de EGFR.<sup>86</sup>

O impacto das mutações no prognóstico dos pacientes ainda é muito controverso na literatura. O comportamento agressivo das mutações em *KRAS* em pacientes com CPNPC foi sugerido pela primeira vez por SLEBOS et al, em 1990, que relatou pior sobrevida de pacientes com CPNPC e *KRAS* mutado. A hipótese é fornecida pela função e pelos efetores a jusante da família de proteínas RAS, incluindo a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK).<sup>87</sup>

O estudo de GUAN et al, de 2013, demonstrou que as mutações em *KRAS* estão associadas a um pior prognóstico, em relação aos não mutados ou *EGFR* mutado (14,47 meses, 20,57 meses e 42,73 meses, respectivamente).<sup>88</sup>

Uma hipótese muito interessante é que diferentes tipos de mutação *KRAS* estão associados a diferentes respostas aos regimes de quimioterapia. GARASSINO et al., descreveram isso em um estudo em linhagem de células de CPNPC com mutações em *KRAS*. Foram encontradas diferenças em três tipos de mutação *KRAS*: p.G12C, p.G12V e p.G12D. Em comparação com os clones WT, a mutação p.G12C foi associada a uma resposta reduzida à cisplatina, mas aumentou a sensibilidade ao taxol e pemetrexede, enquanto a mutação p.G12V mostrou uma forte sensibilidade à cisplatina, e menor sensibilidade ao pemetrexede.<sup>89</sup>

Estudos clínicos anteriores mostraram que a grande maioria dos pacientes com mutações de sensibilização de *EGFR* realmente respondem favoravelmente aos *EGFR*-TKIs de primeira e segunda geração, quando usados em primeira linha de tratamento. No entanto, a identificação de mutações específicas de *EGFR* não sensibilizantes, também é de profunda importância, servindo para separar pacientes não respondedores de *EGFR* TKIs, que atualmente são considerados tratamentos ineficazes neste grupo.<sup>90,91</sup>

Observamos que lesões periféricas, baixa carga tumoral e obtenção do escarro através da indução com solução hipertônica de NaCl representou um desafio. A técnica de indução de escarro é um método não-invasivo reconhecido, permitindo a coleta e a análise das células das vias aéreas, o que é interessante em várias doenças respiratórias como a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), tosse crônica ou fibrose pulmonar idiopática e câncer.<sup>92,93,94</sup> Análises adicionais podem ser efetuadas no sobrenadante e as células presentes no escarro, que podem permitir a investigação sobre processos inflamatórios e mecanismos imunes através de citometria de fluxo, proteômica e biologia molecular. Por outro lado, se a massa tumoral for muito pequena e estiver muito distante do brônquio principal, serão necessárias diversas coletas seriadas para que se consiga alguma representação do DNA tumoral.

Apesar dessas limitações, o escarro pareceu refletir melhor as alterações moleculares do tumor nos casos em que detectou as mutações onde a biópsia tecidual era negativa, demonstrando que um único nódulo pulmonar representado pela biópsia tecidual não é informativo do tumor como um todo.

Esta informação é de suma importância e tem sido amplamente estudada por diversos autores a fim de constatar a relevância do escarro como um possível meio de obtenção de amostra por uma técnica não invasiva. A aplicação da biópsia líquida na identificação do CPNPC por sua vez tem sido discutida e utilizada na prática clínica. Com a evolução no tratamento empregado para a doença e o estudo constante de expansão de terapia-alvo através de biomarcadores, além da identificação de mecanismos de resistência tumoral à terapêutica aplicada, há cada vez mais a necessidade de utilização de um método diagnóstico não invasivo, alternativo e que torne possível além do diagnóstico, o acompanhamento de resposta da doença as terapias-alvo, principalmente no que diz respeito ao mecanismo de resistência da doença. Neste contexto, o escarro pareceu ser uma ferramenta adicional importante de detecção dessas alterações, quando avaliado conjuntamente com tecido e o plasma.

De acordo com os dados apresentados pudemos verificar que a presença de mutações *drivers* no escarro com os métodos de NGS e ddPCR possui uma boa correlação com o perfil genômico observado nas biópsias teciduais (48,15% e 41,17% respectivamente), especialmente em pacientes com tumores localmente centrais, e com alta carga tumoral.

Em relação a comparação entre os métodos, este estudo demonstrou alta sensibilidade e concordância quantitativa de NGS no escarro baseado em amplicons quando comparado com ddPCR para detectar mutações ativadoras em *EGFR* e *KRAS*, e a de resistência em *EGFR*.

Ambos os métodos são atraentes para este tipo de abordagem específica utilizando ctDNA. Comparado ao NGS, o ddPCR é suposto ter uma sensibilidade mais alta de até 0,001%.<sup>95</sup> Além disso, ele tem um processo de execução mais fácil, tempo de resposta mais rápido e não requer suporte de informática complexa para análise. No entanto, apenas alterações genéticas conhecidas podem ser detectadas, e o potencial para detecção multiplex de vários biomarcadores é limitado. Em contraste, NGS pode identificar quaisquer alterações genéticas em todas as regiões alvo rastreadas, incluindo novas mutações. O NGS permite avaliar múltiplas regiões genéticas simultaneamente. No entanto, é um teste mais demorado, mais caro e requer suporte de informática mais complexo para a análise de dados. Um estudo recente

mostrou que a tecnologia NGS baseada em amplicons, também pode ser usada para detectar rearranjos cromossômicos e fusões de genes em ctDNA de pacientes com NSCLC com alta sensibilidade e especificidade.<sup>96</sup> Enquanto o ensaio de NGS no escarro baseado em amplicon forneceu cobertura das principais alterações dos genes comumente mutados em adenocarcinoma, trazendo à tona, inclusive, mutações que não foram encontradas em biópsias teciduais, as alterações específicas foram confirmadas por resultados de ddPCR em quase todos os casos, sugerindo desempenho e precisão semelhantes em ambas as técnicas. Com o aumento da acessibilidade dessas tecnologias, sugerimos que elas possam ter papéis complementares no diagnóstico e monitoramento do tratamento no câncer metastático, dependendo das questões clínicas em questão, custo, acessibilidade com suporte de bioinformática apropriado e se alterações genéticas clinicamente relevantes já são conhecidas.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados, pudemos verificar que a presença de mutações *drivers* no escarro através dos métodos de NGS e ddPCR possui uma correlação relativamente boa com o perfil genômico observado nas biópsias teciduais (48,15% e 41,17% respectivamente), especialmente em pacientes com tumores localmente centrais, e com alta carga tumoral. No entanto, A biópsia líquida representada pelo escarro, pareceu refletir a heterogeneidade tumoral de maneira mais abrangente que na biópsia tecidual. Neste contexto, o escarro desponta-se como uma ferramenta adicional, importante, de detecção dessas alterações, quando avaliado conjuntamente com tecido e o plasma.

As técnicas de NGS e ddPCR mostraram-se efetivas e similares na detecção das mutações *drivers* no escarro. Ambos os métodos são atraentes para este tipo de abordagem específica utilizando ctDNA.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Instituto Nacional do Câncer. (2019). Estimate/2019 – Cancer Incidence in Brazil. In Inca - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. <https://doi.org/978-85-7318-194-4>
3. McErlean A, Ginsberg MS. Epidemiology of lung cancer. *Semin Roentgenol*. 2011 Jul;46(3):173-7. <https://doi.org/10.1053/j.ro.2011.02.002>
4. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
5. Romero, L. C.; Costa e Silva, V. L. 23 anos de Controle do Tabaco no Brasil: a atualidade de Programa Nacional de Combate ao Fumo de 1988. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2011; 57(3): 305-314.
6. Alberg, A.J.; Ford, J.G.; Samet, J.M. *Epidemiology of Lung Cancer: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*, 2nd ed.; American College of Chest Physicians: Glenview, IL, USA, 2007; pp. 29S–55S. doi: 10.1378/chest.07-1347.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). O controle do tabaco no Brasil: uma trajetória. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

8. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, 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):1243-1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
9. Fernandes, G. A., Algranti, E., Conceição, G. M. de S., Filho, V. W., & Toporcov, T. N. (2019). Lung cancer mortality trends in a Brazilian city with a long history of asbestos consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(14), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph16142548>
10. Malta, D. C., Abreu, D. M. X. de, Moura, L. de, Lana, G. C., Azevedo, G., & França, E. (2016). Trends in corrected lung cancer mortality rates in Brazil and regions. *Revista de Saude Publica*, 50, 1–9. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006209>
11. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1240-124. doi: 10.1097/JTO.0000000000000663
12. Houston KA, Henley SJ, Li J, White MC, Richards TB. Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004-2009. *Lung Cancer.* 2014 Oct;86(1):22-8. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.08.001
13. Araujo LHL, Baldotto CS, Zukin M, Vieira FMA, Victorino AP, Rocha VR, Helal RF, Salem JH, Teich N, Ferreira CG. Survival and prognostic factors in patients with Non-Small Cell Lung Cancer treated in private health care. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2016; 17(4), 1001–1014. <https://doi.org/10.1590/1809-4503201400040017>
14. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 122: 1037-57, 2002.
15. Schrump D, Altorki N, Henschke C, Carter D, Turrisi A, Gutierrez M. Non-small cell lung cancer. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S, editors. *Cancer: principles and practice of oncology.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; P. 753-54, 2005.

16. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchieh H, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angeletti CA. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106(1):80-9. PMID: 8391612.
17. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The eighth edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* 2017;151:193-203. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.010>
18. Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Wolf WG, Iglehart JD, Marks Jr. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res* 55: 51-6, 1995.
19. Saji H, Tsuboi M, Shimada Y et al. A proposal for combination of total number and anatomical location of involved lymph nodes for nodal classification in non-small cell lung cancer. *Chest.* 2013; 143: 1618-1625. doi: 10.1378/chest.12-0750
20. Asamura H et al. International Association for the Study of Lung Cancer. *Journal Thoracic Oncology*, 2015: 10(12). DOI: 10.1097/JTO.000000000
21. American Joint Committee on Cancer. Lung. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017: 431-456. Pujol JL, Molinier O, Ebert W, et al. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer* 2004;90 2097-105
22. Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, Tokunaga T, Ito M. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer.* 2004;101(4):803-9. doi: 10.1002/cncr.20421. PMID: 15305413.
23. Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, Tokunaga T, Ito M. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer.* 2004;101(4):803-9. doi: 10.1002/cncr.20421. PMID: 15305413.

24. National Cancer Institute (NCI). Non-small cell lung cancer treatment. (Physician Data Query) <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung-healthprofessional/page1>, 2015.
25. Andre F, Grunenwald D, Pignon JP, Dujon A, Pujol JL, Brichon PY, Bouchet L, Quoix E, Westeel V, Le Chevalier T. Survival of patients with resected N2 non-small-cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2981-9. doi: 10.1200/JCO.2000.18.16.2981. PMID: 10944131
26. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Vynnychenko I, Park K, Yu CT, Ganul V, Roh JK, Bajetta E, O'Byrne K, de Marinis F, Eberhardt W, Goddemeier T, Emig M, Gatzemeier U; FLEX Study Team. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*. 2009;373(9674):1525-31. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60569-9. PMID: 19410716.
27. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409. doi: 10.1056/NEJMoa1102873.
28. Ichinose Y, Yano T, Asoh H, Yokoyama H, Yoshino I, Katsuda Y. Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small cell lung cancer: na analysis in each pathologic stage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 601-5, 1995
29. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, 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 Sep;10(9):1243-1260.
30. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1240-1242.

31. Zhou, J. X., Yang, H., Deng, Q., Gu, X., He, P., Lin, Y., Zhao, M., Jiang, J., Chen, H., Lin, Y., Yin, W., Mo, L., & He, J. (2013). Oncogenic driver mutations in patients with non-small-cell lung cancer at various clinical stages. *Annals of Oncology*, 24(5), 1319–1325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds626>
32. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb;6(2):244-85.
33. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, et al. Implementing multiplexedof non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol* 2011;22(12):2616–24
34. Rengan R, Maity AM, Stevenson JP, Hahn SM. New strategies in non-small cell lung cancer: improving outcomes in chemoradiotherapy for locally advanced disease. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1; 17(13):4192- 9.
35. Pao, W., & Girard, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology*, 12(2), 175–180. 2011 [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70087-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70087-5)
36. Barlesi F, Blons H, Beaur-Faller M et al. Biomarkers (BM) France:Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). 2013 ASCO annual Meeting abstract #8000
37. Nebhan C, Pao W. Further advances in genetically informed lung cancer medicine. *J Thorac Oncol*. 2013 May; 8(5):521-2.
38. Sedlacek HH. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. *Drugs*. 2000 Mar;59(3):435-476. doi: 10.2165/00003495-200059030-00004.
39. Baldotto C, Masson P, Zukin M, Araujo LH. Mutações drivers em câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC). *Pulmão RJ.*, v.25(2):23-28, 2016.

40. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(1):66-72. doi: 10.1043/2008-0586-RAR1.1. PMID: 20073607.
41. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19(56):6550-65. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204082>
42. Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, et al. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J*. 1997;16(2):281-94. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.2.281>
43. Downward J, Parker P, Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1984;311(5985):483-5. <http://dx.doi.org/10.1038/311483a0>
44. Lopes, Gabriel Lima, Vattimo, Edoardo Filippo de Queiroz, & Castro Junior, Gilberto de. (2015). Identificação de mutações ativadoras no gene EGFR: implicações no prognóstico e no tratamento do carcinoma pulmonar de células não pequenas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 41(4), 365-375. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132015000004531>
45. da Cunha G, Shepherd F, Tsao M. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:49-69. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130206. PMID: 20887192.
46. Jorge S, Kobayashi S, Costa D. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014;47(11), 929-939. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144099>
47. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5268–72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1554.
48. Kumari N, Singh S, Haloi D, Mishra SK, Krishnani N, Nath A, Neyaz Z. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Frequency in Squamous Cell Carcinoma and Its Diagnostic Performance in Cytological Samples: A Molecular and Immunohistochemical Study. *World J Oncol*. 2019 Jun;10(3):142-150. doi: 10.14740/wjon1204.

49. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ Jr, Prager D, Belani CP, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2003;290(16):2149-58. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.290.16.2149>
50. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):777-84. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2004.08.001>
51. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, Kaukel E, Roubec J, De Rosa F, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1545-52. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.05.1474>.
52. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2018; (124):53-64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>.
53. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):459-65. doi: 10.1038/nrc1097. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep;3(9):708.
54. Román, M., Baraibar, I., López, I. et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer*. 2018;17, 33. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0789-x>.
55. Ohashi K, Sequist L, Arcila M, Lovly C, Chen X, Rudin C, Moran T, Camidge D, Jones C, Berry L, Pan Y, Sasaki H, Engelman J, Garon E, Dubinett S, Franklin W, Riely G, Sos M, Kris M, Santagata D, Ladanyi M, Bunn P, Pao W. Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res*. 2013;19(9) 2584-2591. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3173.
56. Fakih M, O'Neil B, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo J, Govindan R, Rasmussen E, Morrow PKH, Ngang J, Henary HA, Hong DS. Phase 1 study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and efficacy of AMG 510, a novel small molecule KRASG12C

- inhibitor, in advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2019 37:15\_suppl, 3003-3003. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.3003.
57. Alvarez JGB, Otterson GA. Agents to treat BRAF-mutant lung cancer. *Drugs Context*. 2019; 13; 8:212566. doi: 10.7573/dic.212566.
58. De Sá, V.K., Carvalho, L., Gomes, A., Alarcao, A., Silva, M.R., Couceiro, P., Sousa, V., Soares, F.A., Capelozzi, V.L. Role of the extracellular matrix in variations of invasive pathways in lung cancers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v.46, p.21 - 31, 2013.
59. De Sá VK, Canavez FC, Silva IA, Srougi M, Leite KR. Isoforms of hyaluronidases can be a predictor of a prostate cancer of good prognosis. *Urol. Oncol.* Jul-Aug;27(4):377-81, 2009.
60. Rolfo, C., Mack, P. C., Scagliotti, G. V., Baas, P., Barlesi, F., Bivona, T. G., Herbst, R. S., Mok, T. S., Peled, N., Pirker, R., Raez, L. E., Reck, M., Riess, J. W., Sequist, L. V., Shepherd, F. A., Sholl, L. M., Tan, D. S. W., Wakelee, H. A., Wistuba, I. I., ... Gandara, D. R. (2018). Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(9), 1248–1268. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.030>.
61. Shieh Y, Bohnenkamp M. Low-Dose CT Scan for Lung Cancer Screening: Clinical and Coding Considerations. *Chest*. 2017 Jul;152(1):204-209. doi: 10.1016/j.chest.2017.03.019.
62. Yuan, M., Huang, LL., Chen, JH. et al. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Sig Transduct Target Ther* 4, 61 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0099-9>.
63. Metro G, Finocchiaro G, Toschi L, Bartolini S, Magrini E, Cancellieri A, Trisolini R, Castaldini L, Tallini G, Crino L, Cappuzzo F. Epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted therapies in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Rev Recent Clin Trials*. 2006 Jan;1(1):1-13. doi: 10.2174/157488706775246157.
64. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, Husain H, Costa DB, Tracy P, Feeney N, Sholl LM, Dahlberg SE, Redig AJ, Kwiatkowski DJ, Rabin MS, Paweletz CP, Thress KS, Jänne PA. Assessment of

- Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients with EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol.* 2018 Nov 1;4(11):1527-1534. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2969.
65. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol.* 2005;23(25):5900-5909. doi:10.1200/JCO.2005.02.857.
  66. Liu, J., Kang, R. & Tang, D. The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance. *Cancer Gene Ther* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00383-9>.
  67. Hong DS, Marwan G, Fakih MD, et al. KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med.* 2020; 383:1207-1217. doi:10.1056/NEJMoa1917239.
  68. Alvarez, J., & Otterson, G. A. (2019). Agents to treat BRAF-mutant lung cancer. *Drugs in context*, 8, 212566. <https://doi.org/10.7573/dic.212566>.
  69. O'Leary CG, Andelkovic V, Ladwa R, Pavlakis N, Zhou C, Hirsch F, Richard D, O'Bryne K. *Transl Lung Cancer Res.* 2019;8(6):1119-1124. doi:10.21037/tlcr.2019.10.22.
  70. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early-stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Sep;15(9):577-586. doi: 10.1038/s41571-018-0058-3.
  71. Russo A, De Miguel Perez D, Gunasekaran M, Scilla K, Lapidus R, Cooper B, Mehra R, Adamo V, Malapelle U, Rolfo C. Liquid biopsy tracking of lung tumor evolutions over time. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019 Dec;19(12):1099-1108. doi: 10.1080/14737159.2020.1680287.
  72. Xing L, Su J, Guarnera MA, Zhang H, Cai L, Zhou R, Stass ST, Jiang F. Sputum microRNA Biomarkers for Identifying Lung Cancer in Indeterminate Solitary Pulmonary Nodules. *Clinical Cancer Research.* 2015; 21(2) 484-489. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1873.

73. Spicer J, Tischler B, Peters M. EGFR Mutation Testing and Oncologist Treatment Choice in Advanced NsclC: Global Trends and Differences. *Annals of Oncology*. 2015; 26: I57-I61. doi:10.1093/annonc/mdv128.4.
74. Thress KS, Brant R, Carr TH, Dearden S, Jenkins S, Brown H, Hammett T, Cantarini M, Barrett JC. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer*. 2015 Dec;90(3):509-15. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.004.
75. Bagheri A, Khorram Khorshid HR, Mowla SJ, Mohebbi HA, Mohammadian A, Yaseri M, Solaymani-Dodaran M, Sherafatian M, Tavallaie M. Altered miR-223 Expression in Sputum for Diagnosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2017 Oct-Dec;9(4):189-195. .
76. Risse EK, van't Hof MA, Laurini RN, Vooijs PG. Sputum cytology by the Saccomanno method in diagnosing lung malignancy. *Diagn Cytopathol*. 1985 Oct-Dec;1(4):286-91. doi: 10.1002/dc.2840010406.
77. Rivera MP, Mehta AC; American College of Chest Physicians. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007 Sep;132(3 Suppl):131S-148S. doi: 10.1378/chest.07-1357.
78. Hubers AJ, Prinsen CF, Sozzi G, Witte BI, Thunnissen E. Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(3):530-537. doi:10.1038/bjc.2013.393.
79. MAO, L. 2002. Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer. *Oncogene* 21: 6960–6969
80. Minami Y, Muratani M, Sato Y, Usui S, Hayashihara K, Noguchi M. P2.11-34 Application of Next-Generation Sequencing for Screening of Sputum Samples. *Journal of Thoracic Oncology*. 2019;14(10): S806-S807. doi: https: 10.1016/j.jtho.2019.08.1734.
81. Seijo LM, Peled N, Ajona D, Boeri M, Field JK, Sozzi G, Pio R, Zulueta JJ, Spira A, Massion PP, Mazzone PJ, Montuenga LM. Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements,

- Promises, and Challenges. *J Thorac Oncol.* 2019 Mar;14(3):343-357. doi: 10.1016/j.jtho.2018.11.023.
82. Normanno N, Denis MG, Thress KS, Ratcliffe M, Reck M. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017 Feb 14;8(7):12501-12516. doi: 10.18632/oncotarget.13915.
  83. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, Zwaenepoel K, Gil-Bazo I, Passiglia F, Carreca AP, Taverna S, Vento R, Santini D, Peeters M, Russo A, Pauwels P. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846:539–546. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.10.001.
  84. Su F, Fu Y, Wu Q, et al. High concordance of EGFR mutation status between sputum and corresponding tissue specimens of late-stage lung cancers using amplification refractory mutation system-PCR. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(5):2683-2690. Published 2018 May 1;
  85. Tang Y, Wang WY, Zheng K, Jiang L, Zou Y, Su XY, Chen J, Zhang WY, Liu WP. EGFR mutations in non-small cell lung cancer: an audit from West China Hospital. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016 Aug;16(8):915-9. doi: 10.1080/14737159.2016.1199961.
  86. Isaka, T., Yokose, T., Ito, H. *et al.* Detection of EGFR mutation of pulmonary adenocarcinoma in sputum using droplet digital PCR. *BMC Pulm Med* **21**, 100 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01468-9>.
  87. Ding PN, Becker T, Bray V, Chua W, Ma Y, Xu B, Lynch D, de Souza P, Roberts T. Plasma next generation sequencing and droplet digital PCR-based detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in patients with advanced lung cancer treated with subsequent-line osimertinib. *Thorac Cancer.* 2019 Oct;10(10):1879-1884. doi: 10.1111/1759-7714.13154.
  88. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, Wagenaar SS, Vanderschueren RG, van Zandwijk N, Mooi WJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990 Aug 30;323(9):561-5. doi: 10.1056/NEJM199008303230902.

89. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, Millot F, El Harrak A, Hutchison JB, Larson JW, Link DR, Laurent-Puig P, Griffiths AD, Taly V. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*. 2011;11(13):2156–66. doi:10.1039/C1LC20128J.
90. Garassino MC, Marabese M, Rusconi P et al. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2011; 22: 235-237. doi: doi.org/10.1093/annonc/mdq680.
91. Yang J.C., Sequist L.V., Geater S.L. et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol*. 2015; 16: 830-838. doi: doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00026-1.
92. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992;47(1):25-29. doi:10.1136/thx.47.1.25.
93. Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:1s-2s. doi: 10.1183/09031936.02.00000102.
94. Scheicher ME, Terra Filho J, Vianna EO. Sputum induction: review of literature and proposal for a protocol. *Sao Paulo Med J*. 2003 Sep 1;121(5):213-9. doi: doi.org/10.1590/S1516-31802003000500008
95. Chiu CH, Yang CT, Shih JY, Huang MS, Su WC, Lai RS, Wang CC, Hsiao SH, Lin YC, Ho CL, Hsia TC, Wu MF, Lai CL, Lee KY, Lin CB, Yu-Wung Yeh D, Chuang CY, Chang FK, Tsai CM, Perng RP, Chih-Hsin Yang J. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Response in Advanced Lung Adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I Mutations. *J Thorac Oncol*. 2015 May;10(5):793-799. doi: 10.1097/JTO.0000000000000504.

96. Yatabe Y, Hida T, Horio Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn*. 2006;8(3):335-341. doi:10.2353/jmoldx.2006.050104.
97. Young EC, Owens MM, Adebisi I, Bedenham T, Butler R, Callaway J, Cranston T, Crosby C, Cree IA, Dutton L, Faulkes C, Faulkner C, Howard E, Knight J, Huang Y, Lavender L, Lazarou LP, Liu H, Mair D, Milano A, Sandell S, Skinner A, Wallace A, Williams M, Spivey V, Goodall J, Frampton J, Ellard S; Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) Scientific Subcommittee. A comparison of methods for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2013 Dec;22(4):190-5. doi: 10.1097/PDM.0b013e318294936c.
98. Guan JL, Zhong WZ, An SJ, Yang JJ, Su J, Chen ZH, Yan HH, Chen ZY, Huang ZM, Zhang XC, Nie Q, Wu YL. KRAS mutation in patients with lung cancer: a predictor for poor prognosis but not for EGFR-TKIs or chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2013 Apr;20(4):1381-8. doi: 10.1245/s10434-012-2754-z.
99. Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V. Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv Clin Chem*. 2017;79:43-91. doi: 10.1016/bs.acc.2016.10.001.
100. Guibert N, Hu Y, Feeney N, Kuang Y, Plagnol V, Jones G, Howarth K, Beeler JF, Paweletz CP, Oxnard GR. Amplicon-based next-generation sequencing of plasma cell-free DNA for detection of driver and resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018 Apr 1;29(4):1049-1055. doi: 10.1093/annonc/mdy005.

## ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP



**A.C. Camargo Cancer Center**  
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA - CEP**

São Paulo, 07 de junho de 2019.

À

**Dra. Dirce Maria Carraro.**

**Aluna: Debora Souza Andrade (Mestrado)**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2237/16C**

**"Identificação das mutações nos genes EGFR, KRAS, BRAF e NRAS em biópsia líquida representada pelo escarro e sua correlação com espécimes tumorais em pacientes portadores de CPNPC."**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/06/2019, tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático "Detecção de ácido hialurônico, cofilina-1 e mutações em biópsia líquida de escarro como rastreamento de pacientes com câncer de pulmão", registrado neste CEP sob nº. 2237/16. O projeto afiliado em referência será Mestrado da aluna Debora Souza Andrade, sob orientação do Dra. Vanessa Karen de Sá.

Atenciosamente,

**Dra. Sandra Caires Serrano**  
**1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1



---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA  
PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

**1. NOME DO PARTICIPANTE:**

.....  
..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO:

M ( ) F ( ) DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº  
.....

APTO: .....BAIRRO: .....CIDADE:  
.....

CEP:..... TELEFONE: DDD  
(.....).....

**2. RESPONSÁVEL LEGAL:**

.....  
....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

.....  
..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO:

M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº  
.....

APTO: .....BAIRRO: .....  
.....CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD

---

(.....).....

## II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

### 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

**DETECÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO, COFILINA-1 E MUTAÇÕES EM BIÓPSIA LÍQUIDA DE ESCARRO COMO RASTREAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO**

### 2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Dra. Dirce Maria Carraro

Centro Internacional de pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (CIPE) - São Paulo.

### 3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS

- Dra Vanessa Karen de Sá– A.C.Camargo Cancer Center/CIPE
- Dr. Helano Carioca Freitas – A.C.Camargo Cancer Center/Oncologia
- Dr. Vladimir Lima (Hospital-A.C.Camargo Cancer Center/Oncologia
- Dra. Elisa Napolitano, Ferreira-A.C.Camargo Cancer Center/CIPE

### 4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

48 meses

---

## III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa chamado **“Detecção de ácido hialurônico, cofilina-1 e mutações em biópsia líquida de escarro como rastreamento de pacientes com câncer de pulmão”**, no A.C.Camargo Cancer Center.

As coletas de escarro serão feitas nos seguintes momentos: a) após a confirmação do diagnóstico b) 60 dias após o início do primeiro ciclo de quimioterapia ou radioterapia previsto para 4-8 semanas; c) 60 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia e d) 180 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia, ou no momento da recidiva tumoral (se o tumor voltar a crescer). Todas as coletas serão realizadas em consultório

pelo médico ou auxiliar de enfermagem, somente nos dias em que vier ao hospital por procedimentos de rotina (consulta ou retorno), não havendo necessidade de retornar ao hospital apenas para a realização do protocolo de pesquisa.

#### **IV – OBJETIVOS DA PESQUISA**

No mundo todo há um esforço para identificar métodos para o diagnóstico precoce do câncer de pulmão, com isso tentando aumentar as chances de cura dos pacientes. Acredita-se que níveis diferentes de duas substâncias chamadas: ácido hialurônico e cofilina-1, no escarro podem auxiliar no diagnóstico de uma forma mais precoce. Por isso, você está sendo convidado (a) a participar deste estudo. Os pesquisadores envolvidos vão estudar, no seu escarro, a existência e o nível dessas substâncias.

#### **V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA**

Atualmente, quando o médico vai decidir qual o melhor tratamento para um paciente, ele leva em consideração o estado de saúde do paciente e o tamanho da doença. Entretanto, nos últimos anos, vários estudos vêm mostrando que existem outras características, que podem ser analisadas em pedaços do câncer ou em células provenientes do pulmão, e que podem ajudar a entender melhor o desenvolvimento da doença e detectar o câncer em estágios iniciais. Estas características do tumor são chamadas “características moleculares” porque são modificações que ocorrem em moléculas, dentro das células do câncer.

O objetivo desta pesquisa é investigar se essas “características moleculares” podem ser detectadas no escarro em estágios iniciais do câncer de pulmão e também após a recidiva (retorno) do tumor após o tratamento da doença.

#### **VI – DESENHO DA PESQUISA**

- Serão selecionados aproximadamente 100 pacientes com câncer de pulmão provenientes do A.C.Camargo Cancer Center.

Todas as coletas serão realizadas em consultório pelo médico ou auxiliar de enfermagem, somente nos dias em que vier ao hospital por procedimentos de rotina (consulta ou retorno), nos seguintes momentos: a) após a confirmação do diagnóstico b) 60 dias após

o início do primeiro ciclo de quimioterapia ou radioterapia previsto para 4-8 semanas; c) 60 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia e d) 180 dias após o término da quimioterapia ou radioterapia, ou no momento da recidiva tumoral (se o tumor voltar a crescer).

Não haverá necessidade de retornar ao hospital apenas para a realização do protocolo de pesquisa.

## **VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS**

Neste estudo, você não receberá nenhum tratamento experimental. Com a sua autorização, será realizado uma coleta de escarro e o material será utilizado para as análises. Após a assinatura do termo, o senhor será submetido a até 3 inalações com soro fisiológico, com duração máxima de 7 minutos cada uma, para a indução do escarro com o auxílio do aparelho de inalação. Durante o procedimento de indução haverá sempre a presença de um médico ou enfermeiro.

Após cada inalação, o senhor será orientado a enxaguar a boca, assoar o nariz e o escarro será colhido em recipiente estéril próprio e armazenado em isopor contendo gelo picado até a separação. Após a coleta, o escarro será separado da saliva e o material será armazenado em tubos a -80°C até o momento de análise.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição. Os pesquisadores do estudo vão procurar, no escarro coletado, a presença de algumas substâncias que podem ter se modificado com o desenvolvimento de sua doença. O material utilizado não comprometerá o andamento de outros exames de rotina realizados para seu tratamento.

## **VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO**

Durante as inalações, você poderá sentir a boca seca, aumento de produção da saliva (cuspe) e enjôo. Esses sintomas podem ser evitados lavando a boca com água. Pode acontecer tosse, leve falta de ar e chiado no peito, mas geralmente esses efeitos são passageiros.

Os pesquisadores envolvidos se comprometem a preservar seus dados de identificação pessoal. No entanto, não podemos excluir totalmente o risco da perda de sigilo das suas informações.

#### **IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS**

Não haverá benefícios aos participantes do estudo. Os benefícios serão indiretos através da contribuição na identificação de novos biomarcadores para detecção precoce e recidiva (retorno) da doença.

#### **X - CONFIDENCIALIDADE**

A confidencialidade (sigilo) de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

#### **XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA**

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

#### **XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (011) 2189-5000 – ramal: 5023, entrar em contato com Dra. Vanessa Karen de Sá ou Dra. Dirce Carraro; ramal: 2765, entrar em contato com Dr. Helano Freitas

---

#### **XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do

participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

☐ Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.

☐ Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Em caso da utilização das suas amostras em outras pesquisas, favor assinalar uma das seguintes opções:

☐ Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

☐ Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

☐ Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas. Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: .....

Grau de Parentesco: .....

Telefone: (            )

.....

☐ Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Os dados fornecidos, coletados e obtidos neste protocolo de pesquisa, poderão ser

utilizados em estudos futuros. A partir de seu material biológico armazenado, futuras pesquisas poderão realizar novas abordagens científicas com o intuito de, por exemplo, investigar a ocorrência de outras alterações em seu DNA. Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

---

### **XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:**

Pesquisador Responsável: Dr(a). Dirce Maria Carraro

Centro Internacional de pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center - São

Paulo. Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramal 5023.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,

.....  
declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável  
legal

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data

Assinatura do responsável pela pesquisa  
Dra. Dirce Maria Carraro

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data