

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Biomarcadores para predição de resposta terapêutica a inibidores de checkpoint imunológico no câncer de pulmão: uma análise exploratória

GUILHERME DANIELSKI VIOLA

Porto Alegre
Janeiro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Biomarcadores para predição de resposta terapêutica a inibidores de checkpoint imunológico no câncer de pulmão: uma análise exploratória

GUILHERME DANIELSKI VIOLA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Prof. Patrícia Ashton-Prolla

Co-orientador: Dr. Gabriel Macedo

Porto Alegre

Janeiro de 2022

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O trabalho constitui tema de dissertação de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e teve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fundação do Ministério da Educação (MEC). O trabalho contou ainda com a colaboração do programa de Medicina Personalizada do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tendo o Dr. Gabriel de Souza Macedo como co-orientador.

DEDICATÓRIA

“ Quem planta tâmaras, não colhe tâmaras ”

Antigo provérbio árabe que traz a ideia do não imediatismo e altruísmo como ato
cerne da natureza humana

Fazer ciência é, antes de mais nada, um ato altruísta.
A todos que esta leitura instigue a busca infindável por conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Dra Patricia Ashton-Prolla e ao Dr. Gabriel Macedo pela oportunidade, confiança e orientação. Vocês são peças fundamentais neste trabalho e pessoal exemplares e fonte de inspiração.

À minha família, por uma vida de amor incondicional sempre. Amo vocês

À minha companheira de vida, Juliana Candido, por todo amor e carinho.

Ao grupo do Laboratório de Medicina Genômica, que me acolheu e auxiliou. Fazendo do ambiente sempre um lugar de porto seguro e incrível crescimento profissional.

Aos meus amigos , que sempre se fizeram presentes ao longo dos altos e baixos da vida. Brindaremos sempre a vida!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela disposição e auxílio.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida, fundamental para conclusão deste mestrado.

Aos amigos do PPGBM, que foram meus colegas em várias disciplinas.

Aos membros e funcionários do PPGBM, que demonstraram empatia, compreensão e proatividade.

RESUMO

Embora nenhum biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia altamente preciso tenha sido identificado, algumas moléculas se estabeleceram como biomarcadores amplamente utilizados na prática clínica do tratamento do câncer de pulmão. Tumores com alta carga mutacional total, ou alto TMB (*Tumor Mutational Burden*) têm demonstrado melhores taxas de resposta a inibidores de checkpoint imunológico (ICIs). Apesar de sua estabelecida validade e utilidade clínica, ainda é considerado um biomarcador de valor preditivo limitado quando avaliado isoladamente. Este estudo tem como objetivo a busca por uma combinação de biomarcadores relacionados com um possível perfil tumoral imunogênico. Também pretende-se avaliar os mecanismos que podem contribuir com o ganho ou a perda de sensibilidade ao tratamento com ICIs no câncer de pulmão.

Em uma abordagem *in silico*, amostras de adenocarcinoma de pulmão (*Lung adenocarcinoma*, LUAD) (n=565) disponíveis no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) foram adquiridas para análise. Os dados RNA-seq para obtenção de perfis de expressão gênica foram adquiridos com o auxílio da plataforma R (TCGAbiolinks package) para análise. Mutações em genes *drivers* selecionados foram analisadas e comparadas de acordo com o status de hipermutação da amostra (>10 Mutations/Mb = tumores hipermutados), hábito tabagista e alteração no gene *TP53*, de forma individual e combinatória. Genes associados com o ganho e perda de sensibilidade ao tratamento imunoterápico e moléculas relacionadas com perfil inflamatório tumoral também tiveram seu perfil de expressão gênica analisado.

Genes relacionados com ativação do sistema imune como *CD8*, *CTLA4*, *IFNG* e *GZMA* se mostraram hiperexpressos no grupo de tumores hipermutados, tumores com alterações em *TP53* e em tumores de pacientes com hábito tabagista ($p < 0,05$). Tumores com mutações no gene *JAK2* apresentaram hipoexpressão de *IFNG* ($p = 0,0095$). Em contrapartida, amostras com mutações em *ARID1A* apresentaram um aumento da expressão gênica de *CTLA4* ($p = 0,0059$). Com isso, a combinação de *status* de hipermutação, presença de alterações em *TP53* e hábito tabagista parecem estar associadas a um perfil de maior imunogenicidade, com mudanças de

expressão de genes que contribuem para uma resposta aos ICI. Além disso, alterações nos genes *JAK2* e *ARID1A* parecem modular o perfil de expressão gênica de moléculas chave, podendo assim, interferir na perda ou ganho de sensibilidade, respectivamente, ao tratamento imunoterápico com ICIs.

Abstract

Currently there are no biomarkers that precisely select patients with a high clinical response to immunotherapeutic drugs in lung cancer. Patients with a high tumor mutational burden (TMB) demonstrated better response rates to immune checkpoint blockade (ICB) therapies in several studies in the past years. However, just as PD-L1 expression TMB is already another non-highly sensitive biomarker if used alone. This study aims to search for biomarkers possibly related to a more immunogenic tumoral profile, which could lead to a better understanding of the processes related to the loss or gain of sensitivity to ICB therapies, which could be used as surrogate markers in selecting candidate patients. The lung adenocarcinoma (LUAD) cohort available in The Cancer Genome Atlas (TCGA) public dataset was used to access clinical data, Simple Nucleotide Variation and RNA-seq datasets with the aid of the R platform (TCGAbiolinks package) for analysis. Mutations in driver genes were analyzed and compared according to their hypermutation status (>10 Mutations/Mb = hypermutated), smoking habit, and alteration in the TP53 gene alone and combined. Genes previously associated with gain and loss of sensibility to ICB's and tumor inflammatory microenvironment had gene expression profile analyzed. The gene expression associated with immune system cell activation in *CD8A*, *CTLA4*, *IFNG* and *GZMA*, demonstrated an increased expression profile change in the hypermutated group, smoking habit and mutant *TP53* ($p < 0,05$). In the analyzed cohort, 3% ($n=15$) exhibited mutations in *JAK2* and a decreased *IFNG* gene expression ($p=0.0095$) compared to all samples. *ARID1A* alterations account for 4% ($n=25$) and those tumors demonstrated increased *CTLA4* expression ($p=0,0059$). Hypermutated status, *TP53* alterations, and smoking habit are associated with a more immunogenic expression profile alone, leading to even higher key molecules expression profile change when combined. Additionally, alterations in the *ARID1A* and *JAK2* generated expression profile changes in immune checkpoint target molecules, suggesting that mutation in such genes may modulate the immunotherapeutic treatment response providing sensitivity gain or loss, respectively.

Keywords: Lung cancer, Biomarkers, Immunotherapy, Immune checkpoint blockade

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia do câncer de pulmão	14
1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão	15
1.3 Classificação histopatológica	16
1.4 Diagnóstico molecular do câncer de pulmão	17
1.5 Ativação de células T, exaustão e bloqueio imune por Checkpoints Imunológicos	18
1.6 Imunoterapia com Inibidores de Checkpoint Imunológicos (ICIs)	20
1.7 Biomarcadores preditivos de resposta à imunoterapia	21
1.7.1 Tumor Mutational Burden (TMB) como marcador preditivo de resposta à imunoterapia	21
1.7.3 Tumores imunogênicos	25
1.7.4 Genes associados a ganho e perda de sensibilidade ao tratamento com ICB's	26
1.8. The Cancer Genome Atlas	27
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. REFERÊNCIAS	30
5. MANUSCRITO - VERSÃO PRELIMINAR	37
Biomarkers to predict therapeutic response to checkpoint inhibitors in Lung Adenocarcinoma: An exploratory analysis	37
Abstract	37
Results	43
Co-occurrence of TP53 and selected driver gene mutations are associated with a hypermutated status profile	43
Hypermutated status is independently associated with the total amount of mutated drivers in the individual tumors	44
Smoking habit in itself is associated with a hypermutated profile and association appears increased in tumors of smokers with a TP53 mutation	45
Gene expression profile of genes related to the tumor immune microenvironment in stratified cohorts	47
HLA gene complex expression status	49

JAK2 alterations and abnormal expression of IFNG	50
Discussion	51
Conclusions/Disclosures	53
References	55
6. CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiologia do câncer de pulmão e outros tipos de neoplasia à nível mundial.....	14
Figura 2. Classificação histopatológica de câncer de pulmão.....	17
Figura 3. Esquema do mecanismo de checkpoint molecular na evasão imune e uso de inibidores de checkpoint molecular na reativação de linfócitos.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS - Organização Mundial da Saúde

CPCP - câncer de pulmão de células pequenas

CPNPC - câncer de pulmão de não-pequenas células

NSCLC - *non-small cell lung carcinoma*

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

ITQs - inibidores de tirosina quinase

TKI - *tyrosine kinase inhibitors*

PD-L1 - *programmed death ligand-1*

ICB - *immune checkpoint Blockade*

ICI - *immune checkpoint Inhibitors*

CTLA4 - *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*

PD-1 - *Programmed Death 1*

TMB - Tumor Mutational Burden

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

HLA - Human Leukocyte Antigen

APC - Antigen presenting cell

TME - *Tumor Microenvironment*

TCR - *T cell receptor*

IFN- γ - *Interferon gamma*

TNF- α - *Tumour Necrosis Factor alpha*

NK - *Natural Killers*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de pulmão

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2020), cânceres de traqueia, brônquios e pulmões representam a 6ª causa de morte no mundo, com aproximadamente 1,7 milhão de mortes registradas. No Brasil, a doença ocupa a preocupante 4ª colocação no ranking de maiores causas de morte.

O câncer de pulmão continua a ser um dos tumores sólidos de maior incidência mundial. Apesar de o câncer de mama feminino registrar o maior número de casos incidentes, o diagnóstico de 2,24 milhões de novos casos de câncer de pulmão (11,4% de todos casos novos de câncer) é extremamente alarmante pelo fato de apresentar altas taxas de mortalidade maiores do qualquer outro tipo de neoplasia maligna (Figura 1). De fato, acredita-se que cerca de 1,79 milhões de mortes (18,4% das mortes registradas por câncer) sejam decorrentes de câncer de pulmão (Sung et al., 2021). Ainda que diversas políticas públicas sejam adotadas para prevenção e tratamento da doença, estima-se que haja uma tendência de aumento no número de mortes de 39% até o ano de 2030, comparado ao ano de 2018. (Sung et al., 2021)

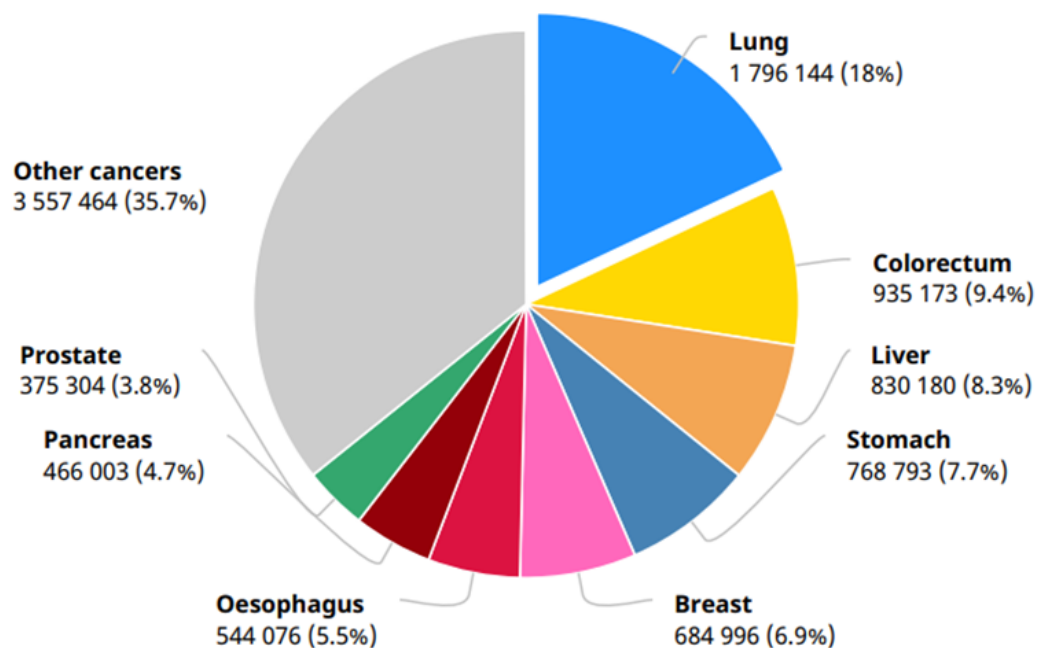


Figura 1: Epidemiologia do câncer de pulmão e outros tumores sólidos quanto a taxa de óbitos registrados a nível mundial. (adaptada de GLOBOCAN, 2020)

No Brasil, espera-se cerca de 30.000 novos casos de câncer de pulmão anualmente, sendo o segundo tipo de câncer mais frequente na região sul do país, com 36 casos a cada 100 mil pessoas, abaixo somente do câncer de pele não-melanoma. (Instituto Nacional do Câncer, 2019). Além disso, a taxa de sobrevivência em 5 anos para pessoas diagnosticadas com a doença é muito baixa, não chegando a 20% nem mesmo nos países mais desenvolvidos. No país, a taxa de sobrevivência relativa em cinco anos para câncer de pulmão é de 18% (15% para homens e 21% para mulheres) (Instituto Nacional do Câncer, 2019). O estado do Rio Grande do Sul (RS) é o segundo estado brasileiro com a maior incidência anual de câncer de pulmão em homens e terceiro em mulheres.

1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão

Como na maioria dos casos de câncer, existem fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento da doença. Para o câncer de pulmão, o fator de risco mais bem estabelecido é o consumo de tabaco e seus derivados, sendo o principal fator causal em aproximadamente 80-90% dos casos (Ozlü & Bülbül, 2005). Acredita-se que o hábito de tabagismo aumente a chance do indivíduo desenvolver câncer de pulmão ao longo da vida em uma ordem de 20 a 30 vezes quando comparado a um não-tabagista (Ridge et al., 2013)

Outros fatores potenciais de risco incluem exposição à metais como cromo, arsênico, cádmio, sílica, níquel, poluentes atmosféricos e até mesmo fatores ligados à dieta (Sun et al., 2007). Embora estudos para identificação de fatores de risco sejam componentes cruciais na luta contra o câncer de pulmão, tais estratégias sozinhas não são suficientes. Além de avanços na área de prevenção e diagnóstico em estágios iniciais da doença, avanços no tratamento, com a ajuda de medicina de precisão, são requeridos para uma melhora substancial da diminuição dos casos de óbito. Progressos nesta área trouxeram ganhos importantes na sobrevivência de pacientes acometidos nas últimas duas décadas, com o estabelecimento de uma

gama de alvos moleculares e fármacos criados para terapia alvo, e a introdução, na última década, da imunoterapia em pacientes com câncer de pulmão.

1.3 Classificação histopatológica

O câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos de acordo com o seu perfil histológico: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) , responsável por 15 a 20% dos tumores; e câncer de pulmão de células não-pequenas (CPNPC), presente em aproximadamente 80-85% dos diagnósticos (Lortet-Tieulent et al., 2014); (Pirker & Filipits, 2016). Na prática clínica, a fim de melhorar respostas a tratamento, o grupo CPNPC é ainda subdividido em dois subgrupos, correspondendo aos subtipos: câncer de pulmão de células escamosas e câncer de pulmão de células não-escamosas, que representam 30 e 70% dos casos, respectivamente. Por fim, dentre o grupo de câncer de pulmão de células não-escamosas, 90% dos casos são classificados como adenocarcinomas de pulmão, sendo assim o subtipo de câncer de pulmão mais frequentemente diagnosticado de acordo com seu perfil histopatológico (Figura 2) (Gridelli et al., 2015).

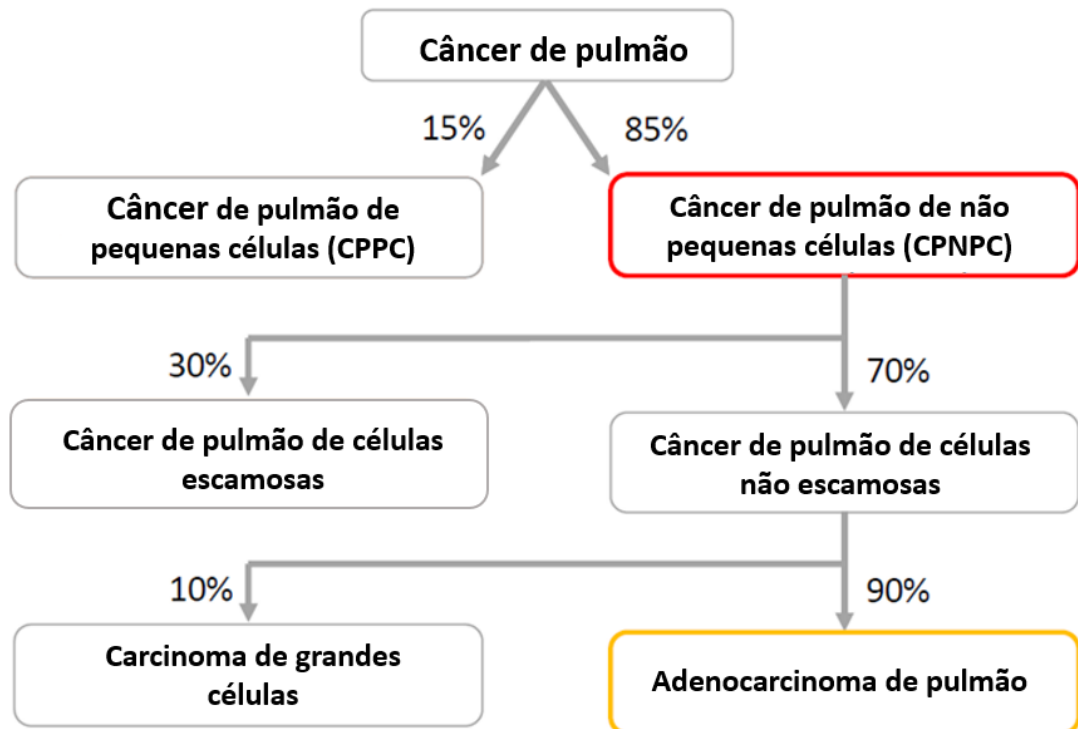


Figura 2: Classificação histopatológica de câncer de pulmão. (adaptado de (Gridelli et al., 2015))

1.4 Diagnóstico molecular do câncer de pulmão

Estudos genômicos já evidenciaram e estabeleceram que há uma ampla heterogeneidade molecular dos tumores de pulmão, mesmo entre aqueles de mesmo padrão histológico (Cancer Genome Atlas Research Network 2012); (Kandoth et al., 2013). Neste contexto, o uso de biomarcadores preditivos, representados por mutações *drivers* ou alterações no padrão de expressão de proteínas, permite que decisões terapêuticas sejam baseadas na genética do tumor, prevendo com maior precisão a provável resposta ao tratamento (Politi & Herbst, 2015). Por exemplo, determinadas alterações somáticas nos genes *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ERBB2* e *BRAF* são alvos substanciais para inibidores de tirosina quinase - ITQs (do inglês *tyrosine kinase inhibitors - TKIs*), trazendo a possibilidade de um tratamento mais personalizado e exemplificando o uso da medicina de precisão para otimizar resposta (Pao & Girard, 2011)

Entender a biologia do câncer de pulmão é crucial para o desenvolvimento de novas terapias efetivas. O tratamento de câncer de pulmão mudou desde o uso empírico de terapia citotóxica, como quimioterapia, baseada em uma preferência histológica até a introdução da imunoterapia, área da medicina de precisão, que vêm utilizando novas estratégias de tratamento. De acordo com alterações genéticas do tumor e o status de moléculas participantes do checkpoint imunológico, há a possibilidade de pacientes serem beneficiados por fármacos conhecidos como inibidores de *checkpoint* imunológico (ICIs, do inglês *Immune Checkpoint Inhibitors*).

1.5 Ativação de células T, exaustão e bloqueio imune por Checkpoints Imunológicos

O uso do sistema imunológico dos pacientes para o combate de neoplasias malignas não é um novo conceito (Coley, 1991). Já a reativação do sistema imune por meio da ação de ICIs, a partir do uso de anticorpos monoclonais direcionados para a molécula cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) e anticorpos anti-PD-1 (*programmed death 1*) e PD-L1 (*programmed death ligand 1*), desencadearam uma animadora quebra de paradigmas sobre tratamento de câncer de pulmão e noções moleculares da imunoterapia.

Em um organismo em condições normais, células T reconhecem e se tornam ativadas quando expostas a antígenos, como os secretados por células tumorais apresentadoras de antígenos (APC - *Antigen Presenting Cell*), por meio de ligações em receptores de membrana das células T. Para tal ativação, dois sinais são necessários. O primeiro sinal, chamado sinal 1, é gerado pela ligação da molécula de MHC (*major histocompatibility complex*) apresentando antígeno peptídeo imunogênico ao receptor de células T heterodimérico (TCR - *T cell receptor*) (Figura 3). Já o segundo sinal, também referido como co-estimulatório, é transduzido via a ligação do receptor de superfície co-estimulatório da célula T, CD28, ao ligante, CD80 ou CD86, na superfície da célula apresentadora de antígeno (Figura 3).

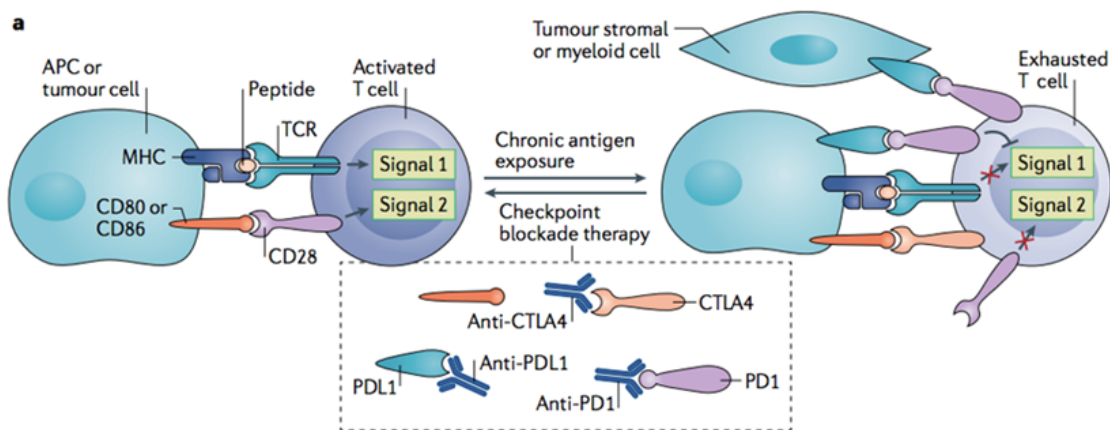


Figura 3: Esquema do mecanismo de checkpoint molecular na evasão imune e uso do bloqueio de checkpoint molecular na reativação de linfócitos (Figura adaptada de (Havel et al., 2019))

Uma vez ativadas, as células T começam a expressar receptores celulares de superfície com ação co-inibitória, como as proteínas CTLA4 e PD-1, que atuam no mecanismo de *checkpoint* imunológico, evitando, em condições normais, uma ação autoimune no organismo. A ligação de CTLA4 a CD80 ou CD86, além de ter mais afinidade que a ligação de estimulação (sinal 2) já descrita, faz com que haja o bloqueio do sinal de co-estimulação e impeça a contínua ativação de células T. Já a molécula de PD-1 quando ligada a PD-L1, inibe o sinal estimulatório da ligação de TCR, promovendo o bloqueio do sinal de ativação 1. Este mecanismo de inibição de dois sinais faz com que o linfócito diminua sua atividade citotóxica e capacidade de expansão clonal.

Como PD-L1 é frequentemente expresso em tumores, este é o mecanismo pelo qual o tumor consegue modular o sistema imune a seu favor. Portanto, a estratégia de uso de inibidores de *checkpoint* imunológicos com direcionamento nas moléculas PD1, PD-L1 e CTLA4 permite reativar células T exaustas (Figura 3) presentes no microambiente tumoral. Este tipo de terapia chama-se Bloqueio de Checkpoint Imunológico (ICB - *Immune Checkpoint Blockade*)

1.6 Imunoterapia com Inibidores de Checkpoint Imunológicos (ICIs)

Desde 2002 (Dong et al., 2002), (Iwai et al., 2002) o processo de reconhecimento de antígenos tumorais e inativação de células T, promovendo a evasão imune começou a chamar atenção de grupos de pesquisa ao redor do mundo. Desde então, diversos estudos utilizaram a abordagem de bloqueio de *checkpoint*, por meio de anticorpos, promovido por drogas anti-PD-1 e anti-PD-L1, principalmente, para restaurar o mecanismo imunológico antitumoral mediado por linfócitos T citotóxicos (Topalian et al., 2012), (Reck et al., 2016), (Herbst et al., 2014). Entretanto, o primeiro fármaco com ação de ICIs testado foi ipilimumabe (anti-CTLA4) e em um estudo clínico de 2010 com pacientes diagnosticados com melanoma metastático (Hodi et al., 2010). Para câncer de pulmão, desde 2012 já temos os primeiros dados demonstrando que a droga nivolumabe, um anticorpo monoclonal com ação anti PD-1, traz benefício em tumores estágio III e IV, com taxas de resposta de até 1 a cada 4 pacientes e com segurança aprovada no quesito de toxicidade (Topalian et al., 2012).

Adicionalmente, em 2015, Borghaei e colaboradores (Borghaei et al., 2015) demonstraram que o uso de nivolumabe estava associado a um maior sobrevida quando comparado ao uso de docetaxel em pacientes que apresentaram progressão da doença durante ou depois do tratamento quimioterápico a base de cisplatina. Já em 2016, o uso de Pembrolizumab, um anticorpo monoclonal com ação anti PD-1, apresentou atividade aumentada quando na presença de expressão da proteína *programmed death ligand 1* (PD-L1). O estudo de Reck e colaboradores (2016) demonstrou que o uso da droga em pacientes com CPNPC em estágio avançado e expressão de PD-L1 em pelo menos 50% de células tumorais foi altamente relacionado com uma melhor sobrevida livre de progressão e sobrevida global e estabeleceu o uso de pembrolizumabe como primeira linha de tratamento.

Com base nos estudos de câncer de pulmão, PD-L1 é superexpresso em 23 a 27% dos casos de câncer de pulmão de células grandes e adenocarcinoma e 19 a 56% dos carcinomas de células escamosas. Com isso, a ideia de que CPNPC que expressam altos níveis de PD-L1 respondem bem a imunoterapias que utilizem fármacos anti-PD-1/PD-L1 (Herbst et al., 2014) foi ganhando força e este biomarcador foi cotado como um biomarcador preditivo de resposta. No entanto,

uma resposta satisfatória com o uso de um único agente anti-PD-1/PD-L1 tem variado de 10%-45% em pacientes positivos, demonstrando seu limitado valor preditivo de resposta (Garon et al., 2015).

Estudos prévios como os de Garon e colaboradores (2015), e Taube e colaboradores (2014) demonstraram que a expressão de PD-L1 aferida antes do tratamento ajudaria aumentar a resposta à terapia com anti-PD-1 demonstrando uma resposta ao tratamento que chegou a 21%. Entretanto, muitos tumores que registraram altos níveis de expressão de PD-L1 não responderam ao tratamento e além disso, houve respostas positivas em tumores PD-L1 negativos. Estes dados explicitam que a expressão de PD-L1 ainda carece de sensibilidade para ser utilizada como um biomarcador preditivo de alta acurácia para resposta à imunoterapia.

1.7 Biomarcadores preditivos de resposta à imunoterapia

1.7.1 *Tumor Mutational Burden* (TMB) como marcador preditivo de resposta à imunoterapia

Entender os mecanismos moleculares que impactam na resposta à imunoterapia é um dos desafios a serem transpostos na oncologia. Dentre os tumores com melhores taxas de resposta estão CPNPC e melanomas, tumores cuja a exposição crônica a agentes mutagênicos, como carcinógenos derivados do tabaco e exposição à luz ultravioleta, respectivamente, apresentam papel etiológico importante (Rizvi et al., 2015).

Rizvi e colegas (2015) hipotetizaram que o “panorama mutacional” (tradução de: “*mutational landscape*”) influencia na resposta ao tratamento imunoterápico para câncer de pulmão. Isto é, demonstraram que neoantígenos específicos, decorrentes de mutações tumorais, podem ativar a resposta imunológica mediada por células T. (Rajasagi et al., 2014; Robbins et al., 2013). A ideia de que mutações somáticas podem gerar peptídeos alterados, e que estes podem ser apresentados para o organismo como neoantígenos, induzindo assim uma resposta imune adaptativa, começou a ganhar força no ano de 2014. Desde então, diversos estudos apresentaram não apenas a expressão de PD-L1 como biomarcador mas também

adotaram um olhar mais atento a respeito de alterações genômicas dos tumores, especialmente em tumores com elevada carga mutacional (Herbst et al., 2014)

Em geral, tumores com mais de dez mutações por megabase (Mb), classificados como hipermutados, têm maiores chances de resposta ao tratamento com ICIs (Rizvi et al., 2015)(Campbell et al., 2017). Além disso, mesmo em pacientes cujos tumores tinham baixa expressão de PD-L1, uma resposta positiva ao uso de drogas anti-PD-L1 e anti-CTLA-4 foi observada no grupo com carga mutacional >10Mut/Mb (Borghaei et al., 2018). Com isso, nos últimos anos, carga mutacional tem demonstrado utilidade clínica para elegibilidade ao uso de ICIs. Por exemplo, no estudo de Herbst e colaboradores (2019), pacientes que receberam o tratamento com Pembrolizumab (anti-PD1) e que apresentavam expressão de PD-L1 maior que 50% ou alto TMB, a taxa de resposta (ORR) ao tratamento foi de 75%, confirmando os achados anteriores que ambos TMB e PD-L1 poderiam atuar como biomarcadores preditivos de resposta à imunoterapia. Junto com este dado, um melhor perfil de toxicidade com o tratamento com ICB's e uma sobrevida equivalente ao tratamento quimioterápico corroborou a decisão de seleção de tratamento primário para pacientes com expressão de PD-L1 em CPNPC em estágio avançado, especialmente naqueles em que a terapia citotóxica não fosse a mais recomendada.

Um outro estudo importante foi o de Ready e colaboradores (2019), um ensaio clínico de fase II que avaliou a eficácia e segurança do uso de nivolumab com administração conjunta de baixa dose de ipilimumab como primeira linha de tratamento para CPNPC metastático. Neste caso, a associação de eficácia entre expressão de PD-L1 e TMB foi verificada. De acordo com os resultados, o tratamento usando a combinação das drogas imunoterápicas foi eficaz e bem tolerado, em termos de toxicidade. Ademais, tumores com 10 ou mais mutações por megabase (mut/Mb) demonstraram uma melhor resposta ao tratamento e maior sobrevida livre de progressão em tumores com expressão de PD-L1 baixa ou alta. Com isso, os autores concluíram que o número de 10 mut/Mb é possivelmente um *cut-off* tangível para uso na prática clínica, embora não haja um consenso universal definido. Por fim, por mais que haja uma relação entre o TMB e carga de neoantígenos, sua predição ainda não é exata (Anagnostou et al., 2017). Ademais,

somente o TMB sozinho não é um biomarcador preditivo de ativação do sistema imune. Novas vertentes vêm estudando o papel do microambiente tumoral e suas moléculas na evasão imune e reativação de linfócitos (Chalmers et al., 2017); (Ayers et al., 2017). Além disso, a participação de genes e moléculas associados a resistência e sensibilidade ao tratamento imunoterápico é um potencial campo a ser analisado, ganhando força a ideia de que um perfil tumoral mais imunogênico seja mais passível ao tratamento com êxito, já que o uso de um único biomarcador preditivo ainda parece insuficiente para definir indicação terapêutica.

1.7.2 Microambiente tumoral

Os tumores sólidos não consistem somente de uma população heterogênea de células, mas também abrigam uma variedade de células residentes e infiltrantes, como células tumorais, células do sistema imune, fibroblastos, células endoteliais. Além disso, componentes não celulares como fatores secretados, exossomos e proteínas de matriz extracelulares juntos constituem o chamado microambiente tumoral (do inglês *Tumor microenvironment* - TME) (Tan et al., 2020). A progressão tumoral é intimamente influenciada por interações entre células neoplásicas com o conteúdo do microambiente, e a partir desta interação é determinada a história natural do tumor e processos metastáticos. Além disso, o microambiente tumoral também pode influenciar na sensibilidade ou resistência a terapias e suas moléculas atuarem como marcadores sistêmicos. Por isso, há o recente ímpeto de identificar componentes e a atuação do microambiente tumoral em diferentes contextos tumorais.

Eventos genéticos que iniciam e conduzem a evolução tumoral também atuam na configuração do microambiente tumoral. Com isso, a arquitetura genética de um tumor determina não somente o *fitness* de células cancerosas mas também a composição do TME (Robinson et al., 2017). Mutações em oncogenes modulam o metabolismo do tumor e produzem impacto no TME para limitar ações de resposta imune e apresentam barreiras na terapia contra o câncer. Entretanto, essas mudanças também nos exemplificam oportunidades de reconfiguração de um microambiente tumoral (Bader et al., 2020).

Muitas células tumorais pode modular os níveis de expressão gênica de PD-L1, incluindo células tumorais e células imunes, em situações como após a exposição a citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ (Interferon gamma) e TNF-alpha (*Tumour Necrosis Factor alpha*) (Chen & Mellman, 2017). Então, quando há uma resposta anti PD-L1/PD-1, muito provavelmente isso se refletirá no nível de imunidade do organismo. Um primeiro parâmetro a pensar, seria nas células efectoras do sistema imune e se sua quantificação e status seriam relevantes para a resposta à imunoterapia. Este é o contexto em que foi observado que o número elevado de células T expressando CD8+ e moléculas deriva do locus gênico MHC-HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I e II , no sangue de pacientes após uma semana após início de tratamento anti- PD-L1 (Herbst et al., 2014). Estas informações demonstram que o microambiente tumoral além de multivariado, também é dinâmico.

Fatores multivariados influenciam a tolerância e imunidade em terapias anti-câncer, fazendo deste campo um dos mais desafiadores da oncologia e medicina moderna. A imunidade em humanos pode ser influenciada por uma diversa gama de fatores, entre eles a genética do indivíduo, idade, microbiota, presença de infecções e fatores extrínsecos como o tratamento de drogas moduladoras do sistema imune. Estes fatores vão determinar direta ou indiretamente a expressão de moléculas e perfis celulares mais imunogênicos.

Este balanço de perfil está relacionado com a probabilidade de determinada pessoa desenvolver um tumor com fenótipos mais inflamados ou não. Com isso, a ideia de que o microambiente tumoral e sua grande complexidade e maleabilidade precisam ser estudados é emergente. Por mais que PD-L1 e TBM sejam utilizados na prática clínica para seleção de pacientes para imunoterapia, muitos pacientes ainda não se classificam ou não reagem de acordo com o esperado com estes 2 biomarcadores. O futuro reside em combinar informações genéticas do paciente a informações sobre os componentes celulares presentes no TME, possivelmente impulsionando e permitindo assim atingir maior acurácia com terapias anti-neoplásicas (Chen & Mellman, 2017)

1.7.3 Tumores imunogênicos

Qual a base molecular para a diferenciação entre um tumor com e sem componente inflamatório? Inicialmente, diferenças entre estes perfis podem ser atribuídas a observação da presença ou ausência de microambiente tumoral inflamatório, o que reflete em inúmeros fatores celulares e extracelulares. Um microambiente tumoral com tendência inflamatória geralmente é acompanhado da expressão de PD-L1 em células infiltrantes ou do tumor e expressão de outras moléculas participantes do ao processo *checkpoint* imunológico mediado por moléculas co-inibitórias (Herbst et al., 2014); (Chen & Mellman, 2017); (Taube et al., 2014), o que sugere que certos tipos de tumores possam ter tenham uma maior resposta imune antitumoral.

Um primeiro passo a ser aferido nessa análise é o conteúdo celular do ambiente, como a presença de células do sistema imune e seus marcadores de ativação, como células Natural Killers (NK), status de ativação de macrófagos, M1 e M2 e principalmente, linfócitos ativado expresando moléculas CD8+. Com isso, a associação destes tumores com melhores respostas à imunoterapia de ICIs não é surpresa. Em pacientes com melanoma metastático, por exemplo, uma elevada densidade intratumoral de células T CD8+ foi associada a uma resposta favorável a tratamento anti-PD1 (Tumeh et al., 2014).

Além da presença ou não de células infiltrantes, a posição e espaço temporal dos componentes também é de suma importância. O estudo demonstrou que a abundância de células T na margem do tumor determinou uma maior associação à resposta ao tratamento, elucidando mais um desafio complexo ao tema da imunogenicidade tumoral. (Tumeh et al., 2014)

Já em contraste com o tratamento com anti-PD1, linfócitos infiltrantes presentes não demonstraram benefício prognóstico em pacientes tratados com drogas anti-CTLA4 (Huang et al., 2011). Embora, em outros estudos, os níveis de linfócitos circulantes durante o andamento do tratamento foram associados de maneira positiva à uma melhor taxa de resposta durante o tratamento (Chen et al., 2016).

Tumores com componente inflamatório também contém certas moléculas indicadoras de inflamação como citocinas pró-inflamatórias, que promovem um ambiente mais propício para ativação de células T e sua expansão clonal. No entanto, ainda é incerto se a presença destas moléculas são a causa ou consequência de influxo celular. Mesmo assim, tumores sem componente inflamatório geralmente expressam citocinas associadas à imunossupressão e tolerância, que é um perfil de microambiente tumoral distinto.

1.7.4 Genes associados a ganho e perda de sensibilidade ao tratamento com ICB's

Durante os últimos 20 anos, um progresso substancial no entendimento da biologia e manejo de CPNPC foi feito. Embora o tratamento de pacientes com CPNPC metastático ainda seja considerado paliativo, o contínuo avanço no campo do desenvolvimento de novos fármacos traz esperança para uma sobrevida prolongada para um grande número de pacientes e, pela primeira vez, traz a possibilidade de cura para aqueles acometidos com uma neoplasia metastática.

Além do desafio de identificar biomarcadores preditivos de resposta ao tratamento imunoterápico mais precisos, o desafio de identificar genes associados a ganho ou perda de sensibilidade ao tratamento é importante para aumentar o sucesso da imunoterapia no tratamento dos pacientes com câncer de pulmão. Alguns estudos já se utilizam da informação de mutações em genes específicos, como *ARID1A*, para prever uma maior sobrevida livre de progressão em pacientes tratados com o ICIs (Okamura et al., 2020). Estudos como o de Saigi e colaboradores (2018) propõe que alterações genéticas podem estar associadas a resistência ao tratamento, como mutações em *JAK2*. Por fim, o perfil de expressão de genes cuja interação na via de sinalização de ativação de linfócitos é crucial, como *IFNG*, pode ser utilizado como biomarcador de predição de resposta ao tratamento (Ayers et al., 2017).

1.8. *The Cancer Genome Atlas*

O *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* é um projeto que teve início em 2006 cujo propósito foi criar um banco de dados público internacional para catalogar mutações genéticas supostamente causadoras de câncer, usando tecnologias inovadoras na época, como o sequenciamento de nova geração e ferramentas de bioinformática. O esforço em conjunto entre o *National Cancer Institute (NCI)* e o *National Human Genome Research Institute* uniu o trabalho de milhares de pesquisadores de diversas disciplinas e múltiplas instituições para compor um dos maiores bancos de dados de câncer disponíveis até o momento.

Ao longo dos anos, o TCGA se tornou um marco no ramo da genômica de câncer, caracterizando, do ponto de vista molecular, mais de 20.000 tumores de 33 tipos diferentes, além de amostras de tecido normal. Positivamente, os dados já ajudaram a estabelecer melhorias na nossa habilidade de diagnóstico, tratamento e prevenção de câncer através de informações genômicas, epigenéticas, transcriptômicas, proteômicas e clínicas. Além disso, cientistas que pesquisam na área da metagenômica, imunológicas continuam a minerar conteúdo para dentro do banco de dados. (Brown et al., 2015; Zhang et al., 2015). Múltiplas análises usando dados do TCGA têm impulsionado avanços na área de biologia computacional. Em decorrência destas análises foram ainda desenvolvidas ferramentas de bioinformática com os mais variados processos, como chamada de variantes somáticas identificação de variantes germinativas, e predição de alterações estruturais e funcionais de genes relacionadas a prognóstico (Ellrott et al., 2018). (Masica & Karchin, 2011).

Todo o conhecimento e dados produzidos e depositados TCGA fornecem inúmeras possibilidades de analisar as mais diversas teorias no campo do câncer. Além disso, a variedade de conteúdos dentro do campo da genômica permite estudos investigativos, como, por de exemplo, com o propósito de identificar biomarcadores que possam estar relacionados a uma melhor resposta a tratamentos inovadores de câncer, que vem surgindo com força na última década, como por exemplo, imunoterapia em câncer de pulmão.

2. JUSTIFICATIVA

Embora nenhum biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia altamente preciso tenha sido identificado, algumas moléculas se estabeleceram como biomarcadores amplamente utilizados na prática clínica do tratamento do câncer de pulmão. Tumores com alta carga mutacional total, ou alto TMB (*Tumor Mutational Burden*) têm demonstrado melhores taxas de resposta a inibidores de checkpoint imunológico (ICIs). Apesar de sua estabelecida validade e utilidade clínica, ainda é considerado um biomarcador de valor preditivo limitado quando avaliado isoladamente.

Sendo assim, este estudo pretende buscar biomarcadores relacionados com um possível perfil tumoral imunogênico e avaliar os mecanismos que podem contribuir com o ganho ou a perda de sensibilidade ao tratamento com ICIs no câncer de pulmão.

Entendendo que um consenso não foi, e provavelmente não será atingido para a consolidação de um único biomarcador preditivo para o câncer de pulmão, a descoberta de combinações de biomarcadores associados a um perfil tumoral imunogênico e a exploração de genes associados a sensibilidade e resistência é um desafio extenso, porém necessário para atingir maior resposta ao tratamento imunoterápico. Além disso, a imunoterapia é considerada uma intervenção terapêutica agnóstica e portanto, a identificação de biomarcadores mais precisos poderá beneficiar não somente pacientes com câncer de pulmão mas também todos aqueles acometidos com tumores sólidos com características moleculares semelhantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar de forma conjunta características genômicas e clínicas a fim de identificar biomarcadores preditivos relacionados a um perfil tumoral mais imunogênico, podendo assim auxiliar na identificação de candidatos ao tratamento imunoterápico com ICIs, os quais tenham melhores taxas de resposta terapêutica.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar possíveis mutações somáticas *drivers* que estejam associadas a uma maior ou menor carga mutacional;
- 2) Identificar características clínicas e/ou tumorais que indiquem uma maior carga mutacional;
- 3) Avaliar o perfil de expressão gênica diferencial comparando as amostras de LUAD do TCGA, explorando em especial moléculas do microambiente tumoral;
- 4) Explorar o perfil mutacional e de expressão de genes associados, na literatura, com ganho ou perda de sensibilidade ao tratamento imunoterápico com ICIs.

4. REFERÊNCIAS

- Anagnostou, V., Smith, K. N., Forde, P. M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., White, J., Zhang, T., Adleff, V., Phallen, J., Wali, N., Hruban, C., Guthrie, V. B., Rodgers, K., Naidoo, J., Kang, H., Sharfman, W., Georgiades, C., Verde, F., Illei, P., Li, Q. K., Gabrielson, E., Brock, M. V., Zahnow, C. A., Baylin, S. B., Scharpf, R. B., Brahmer, J. R., Karchin, R., Pardoll, D. M., & Velculescu, V. E. (2017). Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*, 7(3), 264-276. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-16-0828>
- Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., Kaufman, D. R., Albright, A., Cheng, J. D., Kang, S. P., Shankaran, V., Piha-Paul, S. A., Yearley, J., Seiwert, T. Y., Ribas, A., & McClanahan, T. K. (2017). IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*, 127(8), 2930-2940. <https://doi.org/10.1172/jci91190>
- Bader, J. E., Voss, K., & Rathmell, J. C. (2020). Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Mol Cell*, 78(6), 1019-1033. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.034>
- Borghaei, H., Hellmann, M. D., Paz-Ares, L. G., Ramalingam, S. S., Reck, M., O'Byrne, K. J., Bhagavatheeswaran, P., Nathan, F. E., & Brahmer, J. R. (2018). Nivolumab (Nivo) + platinum-doublet chemotherapy (Chemo) vs chemo as first-line (1L) treatment (Tx) for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with <1% tumor PD-L1 expression: Results from CheckMate 227. *Journal of Clinical Oncology*, 36(15_suppl), 9001-9001. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.9001
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufel, M., Arrieta, O., Burgio, M. A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D. E., Gettinger, S. N., Rudin, C. M., Rizvi, N., Crinò, L., Blumenschein, G. R., Jr., Antonia, S. J., Dorange, C., Harbison, C. T., Graf Finckenstein, F., & Brahmer, J. R. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373(17), 1627-1639. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>
- Brown, S. D., Raeburn, L. A., & Holt, R. A. (2015). Profiling tissue-resident T cell repertoires by RNA sequencing. *Genome Medicine*, 7(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0248-x>

- Campbell, B. B., Light, N., Fabrizio, D., Zatzman, M., Fuligni, F., de Borja, R., Davidson, S., Edwards, M., Elvin, J. A., Hodel, K. P., Zahurancik, W. J., Suo, Z., Lipman, T., Wimmer, K., Kratz, C. P., Bowers, D. C., Laetsch, T. W., Dunn, G. P., Johanns, T. M., Grimmer, M. R., Smirnov, I. V., Larouche, V., Samuel, D., Bronsema, A., Osborn, M., Stearns, D., Raman, P., Cole, K. A., Storm, P. B., Yalon, M., Opocher, E., Mason, G., Thomas, G. A., Sabel, M., George, B., Ziegler, D. S., Lindhorst, S., Issai, V. M., Constantini, S., Toledano, H., Elhasid, R., Farah, R., Dvir, R., Dirks, P., Huang, A., Galati, M. A., Chung, J., Ramaswamy, V., Irwin, M. S., Aronson, M., Durno, C., Taylor, M. D., Rechavi, G., Maris, J. M., Bouffet, E., Hawkins, C., Costello, J. F., Meyn, M. S., Pursell, Z. F., Malkin, D., Tabori, U., & Shlien, A. (2017). Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell*, 171(5), 1042-1056.e1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.048>
- Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D. S., Roels, S., White, J., Otto, G. A., Ross, J. S., Garraway, L., Miller, V. A., Stephens, P. J., & Frampton, G. M. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321-330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>
- Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L., & Zhang, X. D. (2016). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*, 27(3), 409-416. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv615>
- Coley, W. B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*(262), 3-11.
- Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. (2012). *Nature*, 489(7417), 519-525. <https://doi.org/10.1038/nature11404>
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., & Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 8(8), 793-800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M. J.,

- Felip, E., Lee, J. S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J. C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., Zhang, J., Luceford, J. K., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Roach, C., Emancipator, K., & Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372(21), 2018-2028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., Petrella, F., Spaggiari, L., & Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Havel, J. J., Chowell, D., & Chan, T. A. (2019). The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 19(3), 133-150. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>
- Herbst, R. S., Lopes, G., Kowalski, D. M., Nishio, M., Wu, Y. L., de Castro Junior, G., Baas, P., Kim, D. W., Gubens, M. A., Cristescu, R., Aurora-Garg, D., Albright, A., Ayers, M., Loboda, A., Luceford, J., Kobie, J., Lubiniecki, G. M., Pietanza, M. C., Piperdi, B., & Mok, T. S. K. (2019). Association between tissue TMB (tTMB) and clinical outcomes with pembrolizumab monotherapy (pembro) in PD-L1-positive advanced NSCLC in the KEYNOTE-010 and -042 trials. *Annals of Oncology*, 30, v916-v917. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz394.077>
- Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanzetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., Sosman, J. A., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Gettinger, S. N., Kohrt, H. E., Horn, L., Lawrence, D. P., Rost, S., Leabman, M., Xiao, Y., Mok, A., Koeppen, H., Hegde, P. S., Mellman, I., Chen, D. S., & Hodi, F. S. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515(7528), 563-567. <https://doi.org/10.1038/nature14011>
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8), 711-723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Huang, R. R., Jalil, J., Economou, J. S., Chmielowski, B., Koya, R. C., Mok, S., Sazegar, H., Seja, E., Villanueva, A., Gomez-Navarro, J., Glaspy, J. A., Cochran, A. J., & Ribas, A. (2011). CTLA4 blockade induces frequent tumor

- infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans. *Clin Cancer Res*, 17(12), 4101-4109. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-11-0407>
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12293-12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J., & Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333-339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- Lortet-Tieulent, J., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Rutherford, M., Weiderpass, E., & Bray, F. (2014). International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*, 84(1), 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.009>
- Okamura, R., Kato, S., Lee, S., Jimenez, R. E., Sicklick, J. K., & Kurzrock, R. (2020). ARID1A alterations function as a biomarker for longer progression-free survival after anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000438>
- Ozlu, T., & Bülbul, Y. (2005). Smoking and lung cancer. *Tuberk Toraks*, 53(2), 200-209.
- Pao, W., & Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 12(2), 175-180. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(10\)70087-5](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(10)70087-5)
- Pirker, R., & Filipits, M. (2016). Personalized treatment of advanced non-small-cell lung cancer in routine clinical practice. *Cancer Metastasis Rev*, 35(1), 141-150. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9612-6>
- Politi, K., & Herbst, R. S. (2015). Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res*, 21(10), 2213-2220. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-14-2748>
- Rajasagi, M., Shukla, S. A., Fritsch, E. F., Keskin, D. B., DeLuca, D., Carmona, E., Zhang, W., Sougnez, C., Cibulskis, K., Sidney, J., Stevenson, K., Ritz, J., Neuberg, D., Brusica, V., Gabriel, S., Lander, E. S., Getz, G., Hacohen, N., & Wu, C. J. (2014). Systematic identification of personal tumor-specific

neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 124(3), 453-462.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-567933>

Ready, N., Hellmann, M. D., Awad, M. M., Otterson, G. A., Gutierrez, M., Gainor, J. F., Borghaei, H., Jolivet, J., Horn, L., Mates, M., Brahmer, J., Rabinowitz, I., Reddy, P. S., Chesney, J., Orcutt, J., Spigel, D. R., Reck, M., O'Byrne, K. J., Paz-Ares, L., Hu, W., Zerba, K., Li, X., Lestini, B., Geese, W. J., Szustakowski, J. D., Green, G., Chang, H., & Ramalingam, S. S. (2019). First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *J Clin Oncol*, 37(12), 992-1000.
<https://doi.org/10.1200/jco.18.01042>

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M. A., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Rangwala, R., & Brahmer, J. R. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 375(19), 1823-1833.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>

Ridge, C. A., McErlan, A. M., & Ginsberg, M. S. (2013). Epidemiology of lung cancer. *Semin Intervent Radiol*, 30(2), 93-98.
<https://doi.org/10.1055/s-0033-1342949>

Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmi, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Schumacher, T. N., & Chan, T. A. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), 124-128.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>

Robbins, P. F., Lu, Y. C., El-Gamil, M., Li, Y. F., Gross, C., Gartner, J., Lin, J. C., Teer, J. K., Clifton, P., Tycksen, E., Samuels, Y., & Rosenberg, S. A. (2013). Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med*, 19(6), 747-752.
<https://doi.org/10.1038/nm.3161>

Robinson, D. R., Wu, Y. M., Lonigro, R. J., Vats, P., Cobain, E., Everett, J., Cao, X., Rabban, E., Kumar-Sinha, C., Raymond, V., Schuetze, S., Alva, A., Siddiqui, J., Chugh, R., Worden, F., Zalupski, M. M., Innis, J., Mody, R. J., Tomlins, S. A., Lucas, D., Baker, L. H., Ramnath, N., Schott, A. F., Hayes, D. F., Vijai, J., Offit, K., Stoffel, E. M., Roberts, J. S., Smith, D. C., Kunju, L. P., Talpaz, M.,

- Cieślak, M., & Chinnaiyan, A. M. (2017). Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*, *548*(7667), 297-303. <https://doi.org/10.1038/nature23306>
- Saigi, M., Albuquerque-Bejar, J. J., Mc Leer-Florin, A., Pereira, C., Pros, E., Romero, O. A., Baixeras, N., Esteve-Codina, A., Nadal, E., Brambilla, E., & Sanchez-Cespedes, M. (2018). MET-Oncogenic and JAK2-Inactivating Alterations Are Independent Factors That Affect Regulation of PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, *24*(18), 4579-4587. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-18-0267>
- Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*, *7*(10), 778-790. <https://doi.org/10.1038/nrc2190>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tan, S., Xia, L., Yi, P., Han, Y., Tang, L., Pan, Q., Tian, Y., Rao, S., Oyang, L., Liang, J., Lin, J., Su, M., Shi, Y., Cao, D., Zhou, Y., & Liao, Q. (2020). Exosomal miRNAs in tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res*, *39*(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01570-6>
- Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., Chen, L., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*, *20*(19), 5064-5074. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-13-3271>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M., & Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, *366*(26), 2443-2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus,

C., Tomasic, G., Glaspy, J. A., Emerson, R. O., Robins, H., Pierce, R. H., Elashoff, D. A., Robert, C., & Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, *515*(7528), 568-571. <https://doi.org/10.1038/nature13954>

Zhang, C., Cleveland, K., Schnoll-Sussman, F., McClure, B., Bigg, M., Thakkar, P., Schultz, N., Shah, M. A., & Betel, D. (2015). Identification of low abundance microbiome in clinical samples using whole genome sequencing. *Genome Biology*, *16*(1), 265. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0821-z>

5. MANUSCRITO - VERSÃO PRELIMINAR

Biomarkers to predict therapeutic response to checkpoint inhibitors in Lung Adenocarcinoma: An exploratory analysis

Guilherme Danielski Viola^{1,2*} **Tiago Finger Andreis**^{1,2;} , **Patricia Ashton-Prolla**^{1,2;}
Gabriel de Souza Macedo³

- 1- Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brasil
- 2- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS;
- 3- Programa de Medicina Personalizada, HCPA, Porto Alegre 90035-903, Brasil

Corresponding author: Guilhermedviola@gmail.com

Manuscript submitted to JCO Precision Oncology

Abstract

Currently, there are no biomarkers that precisely select patients with a high clinical response to immunotherapeutic drugs in lung cancer. Patients with a high tumor mutational burden (TMB) have demonstrated better response rates to immune checkpoint blockade (ICB) therapies in several studies in the past years. However, just as PD-L1 expression, TMB is also not a highly sensitive biomarker if used alone. This study aims to search for biomarkers possibly related to a more immunogenic tumoral profile, which could lead to a better understanding of the processes related to the loss or gain of sensitivity to ICB therapies. These could in turn be used as surrogate markers in selecting candidate patients for ICB therapies. The lung adenocarcinoma (LUAD) cohort available in The Cancer Genome Atlas (TCGA) public dataset was used to assess clinical data, Simple Nucleotide Variation, and RNA-seq data and analyses were performed using the R platform (TCGAbiolinks package) f. Mutations in driver genes were analyzed and compared according to tumor hypermutation status (>10 Mutations/Mb = hypermutated), smoking habit, and concomitant somatic alterations in *TP53* gene; these factors

were analyzed individually and in combination. Expression profiles of genes previously associated with gain and loss of sensibility to ICB's and status of tumor microenvironment (inflammatory vs. noninflammatory) were also analyzed. We observed increased expression of *CD8A*, *CTLA4*, *IFNG*, and *GZMA*, in tumors of the hypermutated group, in tumors of smokers, and in tumors with mutant *TP53* ($p < 0,05$). In the overall cohort, 3% ($n=15$) exhibited mutations in *JAK2* and a decreased *IFNG* gene expression ($p=0.0095$). Somatic *ARID1A* alterations were observed in 4% ($n=25$) and these tumors also demonstrated increased *CTLA4* expression ($p=0,0059$). Hypermutated status, *TP53* alterations, and smoking habit were individually associated with a more immunogenic expression profile, and when combined, association was even higher. Additionally, alterations in the *ARID1A* and *JAK2* generated expression profile changes in immune checkpoint target molecules, suggesting that mutations in these genes may modulate the immunotherapeutic treatment response providing sensitivity gain or loss, respectively.

Keywords: Lung cancer, Predictive Biomarkers, Immunotherapy, Immune checkpoint blockade

Introduction

Immunotherapy is now broadly used to treat cancer through the reinvigoration of the patient's immune system to strike malignant cells, and the strategy has been used in multiple solid tumors, including lung cancer. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) with immunotherapy has shown promising results, especially with immune checkpoint blockade (ICB) therapies by the administration of immune checkpoint Inhibitors (ICIs) (Ready et al., 2019; Rizvi et al., 2015; Carbone et al., 2017; Mellman et al., 2011)

The expression of PD-L1 protein was the first candidate biomarker associated with response to anti-PD-1 therapy and is now widely used in the clinic. However, this association is not absolute and a substantial effort is ongoing to identify predictors of response and resistance to anti-PD-1/PD-L1 (anti-programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1) immunotherapy (Topalian et al., 2012; Taube et al., 2014). Nonetheless, the PD-L1 expression profile changes still hold a significant position as a predictive biomarker and also due to its association with gene alterations driving the carcinogenic process progression (Jiang et al., 2017)

In recent years, strong evidence has supported the idea that NSCLC tumors more likely respond to ICIs when harboring high tumor mutational burden (TMB) which is defined as the ultimate aggregate mutation count in the malignant cell's genome ("Pan-cancer analysis of whole genomes," 2020); (Chalmers et al., 2017). Genomic alterations can generate altered peptides presented to our immune system as neoantigens triggering an adaptive immune response throughout immunological checkpoints (Anagnostou et al., 2017). Although exciting, use of TMB alone needs caution, since 5% of patients with low TMB can respond well to ICIs and more than half of patients with high TMB do not respond to these therapies. (Jardim et al., 2021). In this scenario, the FDA approval of pembrolizumab use for solid tumors with high TMB (Hellmann et al., 2018) is a call to action to identify better immunotherapy sensitivity and resistance predictive biomarkers (Strickler et al., 2021). While TMB is

a significant step toward predicting immunotherapy response with surrogate markers, several limitations constrain its broad application.

Biological processes that drive tumorigenesis vary across different tumor types as varies their mutation burden (Campbell et al., 2017). High TMB tumors, or hypermutated tumors, can result from the influence of environmental factors, such as tobacco smoking (Alexandrov et al., 2016; Alexandrov et al., 2013; Gibbons et al., 2014; Hainaut & Hollstein, 2000). Which driver genes are altered during carcinogenesis can also dictate the immune landscape, as demonstrated in early-stage LUAD (Bao et al., 2020).

Since high TMB tumors are not accurately related to immune cells reactivation and tumor inflammatory microenvironment molecules expression profile may improve the immune system activity, the tumor microenvironment may act as predictive biomarker (Ayers et al., 2017; Chalmers et al., 2017; Lu & Robbins, 2016). In addition, several studies have contributed to discovering genes that influence the loss or gain of sensitivity to ICIs treatment response and even mutations related to ICIs treatment resistance (Ayers et al., 2017; Okamura et al., 2020; Saigi et al., 2018)

Understanding that a consensus has not been reached for the best and unique predictive treatment response biomarker in ICIs immunotherapy (Lu et al., 2019) the combination of genomic, molecular and clinical features can offer a new perspective on direct cancer treatments. Using the LUAD cohort available in TCGA, this study aims to search for biomarkers related to a more immunogenic tumoral profile which could be used as surrogate markers in the selection of candidate patients, and could ultimately lead to a better understanding of ICIs immunotherapy response.

Methods

Call and selection of variants

Data of the 515 Lung adenocarcinoma (LUAD) cohort available in The Cancer Genome Atlas (TCGA) public dataset were downloaded from the Genomic Data Commons (<https://portal.gdc.cancer.gov/>.) Call for variants was performed by the Mutect2 tool (R platform) by the TCGABiolinks package (Colaprico et al., 2016). The reference GRCh38 genome was considered. Synonymous variants and genomic alterations whose impact prediction was classified as benign by both predictors SIFT and PolyPhen-2 were excluded (Adzhubei et al., 2010; Choi et al., 2012; McLaren et al., 2016). Only mutations whose impact rating was high (likely with protein function loss), moderate (does not cause function, but probably reduces their biological efficacy), or Modifier (located in non-coding regions) were maintained, according to Variant Effect algorithm Predictor (McLaren et al., 2016). These variants were used to quantify the Tumor mutational burden score analysis per sample and variant investigation in selected genes.

Tumor Mutational Burden analysis

Each tumor sample had its TMB measured by the sum of variants called divided by the considered genome size (33 Mb) corresponding to the exome sequenced in each tumor, according to information provided by the GDC team responsible for the TCGA. Tumors were then classified into two subgroups: Hypermutated, containing ≥ 10 (ten) mutations per megabase (Mb), and non-Hypermutated, with less than ten mutations per Mb, according to the FDA cutoff established for immunotherapy use in High TMB samples and recent studies in the field (Chalmers et al., 2017; Cancer Genome Atlas Research Network 2020),

Selection of candidate drivers linked with hypermutated profile

We selected 46 candidate driver genes according to genomic studies in NSCLC based on their high mutational frequency in LUAD.(Campbell et al., 2016; Cancer Genome Atlas Research Network 2014; Pao & Girard, 2011; Peifer et al., 2012). Since the *TP53* gene is the most frequently mutated in LUAD, the mutational load of different subgroups was compared according to the presence or absence of mutations in the gene: mutations only in a certain driver gene, but not in *TP53*, *versus* mutations in a particular gene driver in co-occurrence with *TP53*. The selected genes were: *ABL1*, *AKT3*, *APC*, *ARHGEF12*, *ARID1A*, *ARID2*, *ATF7IP*, *ATM*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CMTR2*, *CTNNB1*, *DDR2*, *DOT1L*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FANCM*, *FBXW7*, *HOXB3*, *JAK2*, *KARS*, *KEAP1*, *KIT*, *KLHL5*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MGA*, *NF1*, *NFE2L2*, *NOTCH1*, *PIK3CA*, *PPP3CA*, *PTEN*, *PTPRU*, *RB1*, *RBM10*, *RIT1*, *SETBP1*, *SETD2*, *SMAD4*, *SMARCA4*, *STAT5A*, *STAT5B* *STAT3*, *STIM1*, *STK11* and *TP53*

Clinical features and gene expression profile

The RNA-seq gene expression profile (n=509) (RSEM normalized, Level 3) and clinical datasets (n=515) for the LUAD TCGA cohort were downloaded from the GDC data portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Gene expression values were normalized by log2 transformation before analysis. Gene transcripts for expression analysis were selected according to their canonical transcript Ensembl code number (<https://www.ensembl.org/index.html>). The gene expression cohort was stratified into hypermutation status, clinical features, and non-synonymous gene mutations (missense or nonsense mutations).

Immune system activation parameters

Gene transcripts were chosen by their participating role in the immune checkpoint process or maintenance of immune system activation and regulation for analysis of immune system activation parameters analysis.

Immunotherapy sensibility gain or loss genes selection

Selected tumor samples with altered driver genes associated with sensibility or resistance (*ARID1A* and *JAK2*) to ICI treatments were analysed for PD-L1, CTLA4

and IFNG gene expression, since these are key molecules in the immune checkpoint blockade biological process.

Statistical analysis

The chi-square test was applied for each factor (driver gene), using Yates correction in the Selection of candidate drivers linked with a hypermutated profile in R. All other Statistical analyses and graphs were performed with the GraphPad Prism software version 9.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). One-way ANOVA or unpaired Student's t-test were applied for different grouped analyses when suitable. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Co-occurrence of TP53 and selected driver gene mutations are associated with a hypermutated status profile

From the analyzed samples, we observed a 30.8% (n=159)

From the 515 tumor samples in the LUAD cohort, 30.8% (n=159) of the samples registered 30.8% (n=159) a hypermutated ($>10\text{Mut/Mb}$) status. There was a tendency for genes related to hypermutated status to group when co-occurring with mutations in *TP53*. The highest median mutational burden recorded was observed when *STAT5B*, *NRAS*, *PTEN*, *RAF1*, *ARHGEF12* genes appeared co-mutated with *TP53* (Figure 1A). Alterations in *MAP2K1*, *PTPRU*, *ATF7IP*, *KLHL5*, and *JAK2* genes alone recorded the highest TMB and recorded median TMB related to hypermutated profile (median $>10\text{Mut/Mb}$) (Figure 1A).

Among the tumor subgroups (Selected driver or selected driver+*TP53*) 63 (87%) registered a hypermutated profile when co-occurrence between at least one selected driver gene + presence of a *TP53* alteration was registered. On the other hand, of the 46 selected driver genes, only changes in the *ERBB2*, *EGFR*, and *RIT1*

genes when co-mutated with *TP53* were classified as non-hypermutated (6%) (Figure 1B). The samples containing no selected mutated driver and no *TP53* alterations were grouped and served as a control (Figure 1C). Furthermore, the combination of *TP53* alteration with mutation in at least one other selected driver gene increased the TMB when compared to mutations present only in a non-*TP53* driver gene (Figure C) (Unpaired T-test, P-value <0.0001). This combination demonstrated that 43 genes from the 46 initially selected when co-mutated with *TP53* are associated with a hypermutated status.

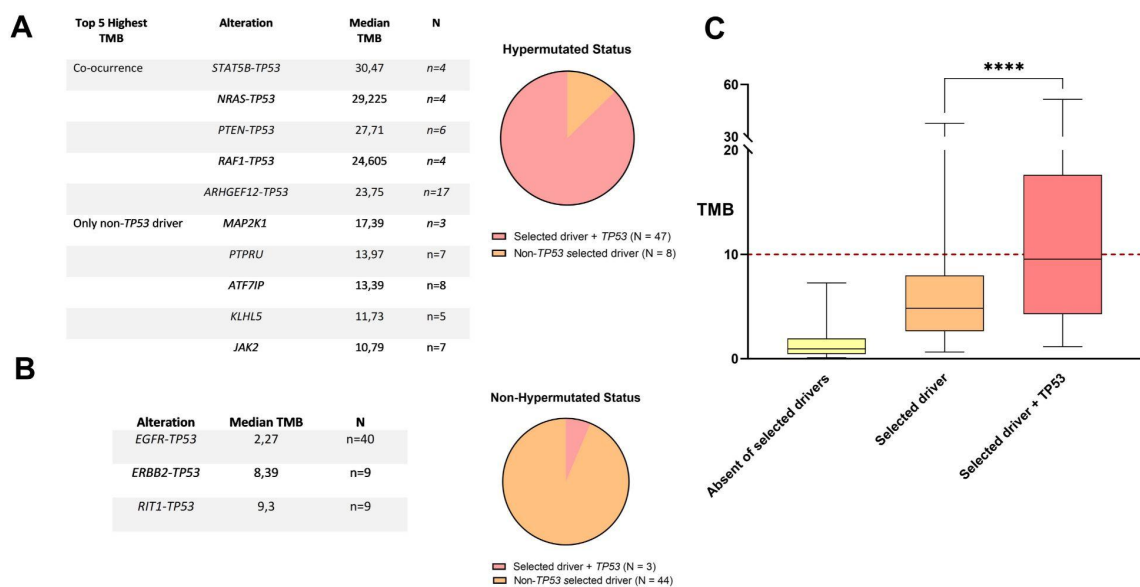


Figure 1. Hypermutated status profile **A)** Top median TMB recorded in groups with non-*TP53* selected drivers mutated alone and co-occurring with *TP53* mutations and hypermutated status profile among selected genes groups. n= number of samples, N=number of genes+*TP53* mutated with median TMB>10Mut/Mb **Non-Hypermutated status profile** **B)** Non-*TP53* Selected drivers + *TP53* mutations recorded with median TMB below 10 mut/mB and non-hypermutated status profile among selected genes groups.n= number of samples, N=number of genes+*TP53* mutated with median TMB<10Mut/Mb **C)** Boxplot showing TMB recorded among groups (**** = p<0,0001 - Unpaired T-test).

Hypermutated status is independently associated with the total amount of mutated drivers in the individual tumors

TP53 mutated individual tumors (n=278) were plotted in a crescent manner according to their registered median TMB and the number of mutated driver genes in

each sample (Figure 2A). TP53 mutated tumors demonstrated an increased TMB (Unpaired T-test, P-value <0.0001) when compared to TP53 wildtype tumors (Figure 2C). However, in both TP53 mutated and wildtype tumor groups, the increase in TMB does not seem to be related to an increase in altered non-TP53 selected drivers (Figure 2A and 2B). When plotted in a TMB crescent manner, the number of altered selected driver genes did not confer the same pattern, suggesting that the number of altered driver genes does not increase in samples with a higher TMB. However, among TP53 wildtype tumors (n=287), the total number of drivers mutated per individual tumor (represented by orange peaks) seems higher (Figure 2B). In addition, the mean number of mutated selected drivers when TP53 is altered is lower than in the TP53 mutated samples (p<0,001 - Unpaired T-test) (Figure D).

Following that, besides confirming that having TP53 mutations is unrelated to having more drivers mutated, the Hypermutant profile is not related to more drivers altered as well (p=0.4381 - Unpaired T-test) (figure 2E).

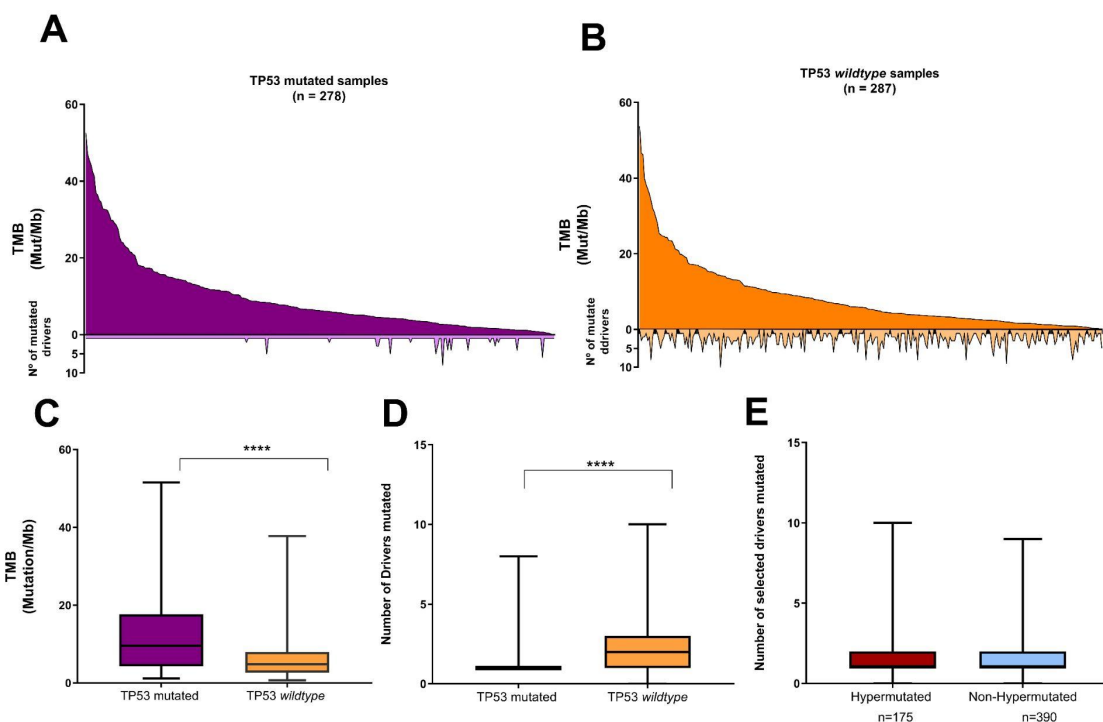


Figure 2. TP53 alterations and hypermutated profile **A)** TP53 mutated tumors and their respective TMB and paired with number of mutated selected driver genes **B)** TP53 wildtype tumors and their respective TMB paired with number of mutated selected driver genes **C)** Median TMB recorded for

tumors with or without mutated *TP53* (P <0.0001 - Unpaired T-test) **D**) Total number of mutated selected driver genes in tumors with and without mutated *TP53* (P <0.0001 - Unpaired T-test) **E**) Number of selected mutated driver genes and hypermutated status (P = 0, 4381 - Unpaired T-test)

Smoking habit in itself is associated with a hypermutated profile and association appears increased in tumors of smokers with a TP53 mutation

To understand if the hypermutant profile is correlated with disease progression, samples were stratified by tumor stage and their respective TMB. Analysis of variance (One-Way ANOVA) revealed that there is no difference in TMB in different tumor stages (p = 0.1247) (Figure 3A).

339 (65,8%) samples registered in samples with smoking history. To verify the relationship between smoking and amount of tobacco consumption with an increased TMB in this TCGA cohort, smoking habit was cross-tested with respective TMB of the tumors and age at LUAD diagnosis. Analysis using linear regression demonstrated a positive correlation between the amount of tobacco consumption (number of cigarette packs smoked per year), and the increase in TMB which was inversely proportional to the age at lung cancer diagnosis (Figure 3B).

After observing that tumor *TP53* alterations and smoking habit increase the tumor mutational load in LUAD samples, we investigated whether smoking habit or *TP53* alterations could significantly impact the mutational burden. Smoking was associated with an increased TMB regardless of the selected genomic factor (i.e. presence of *TP53* alteration) (Figure 3C). However, when combined with *TP53* mutation, the tumors from smokers recorded the highest median TMB (P <0.0001 - Unpaired T-test).

Interestingly, the subdivision of the smoking group clustered the data (p=0.0906) even when non-smoking individuals had mutations in *TP53*, suggesting that, even though *TP53* seems to be an aggravating factor in relation to increased TMB, smoking in itself plays a central role in genomic instability and mutational burden.

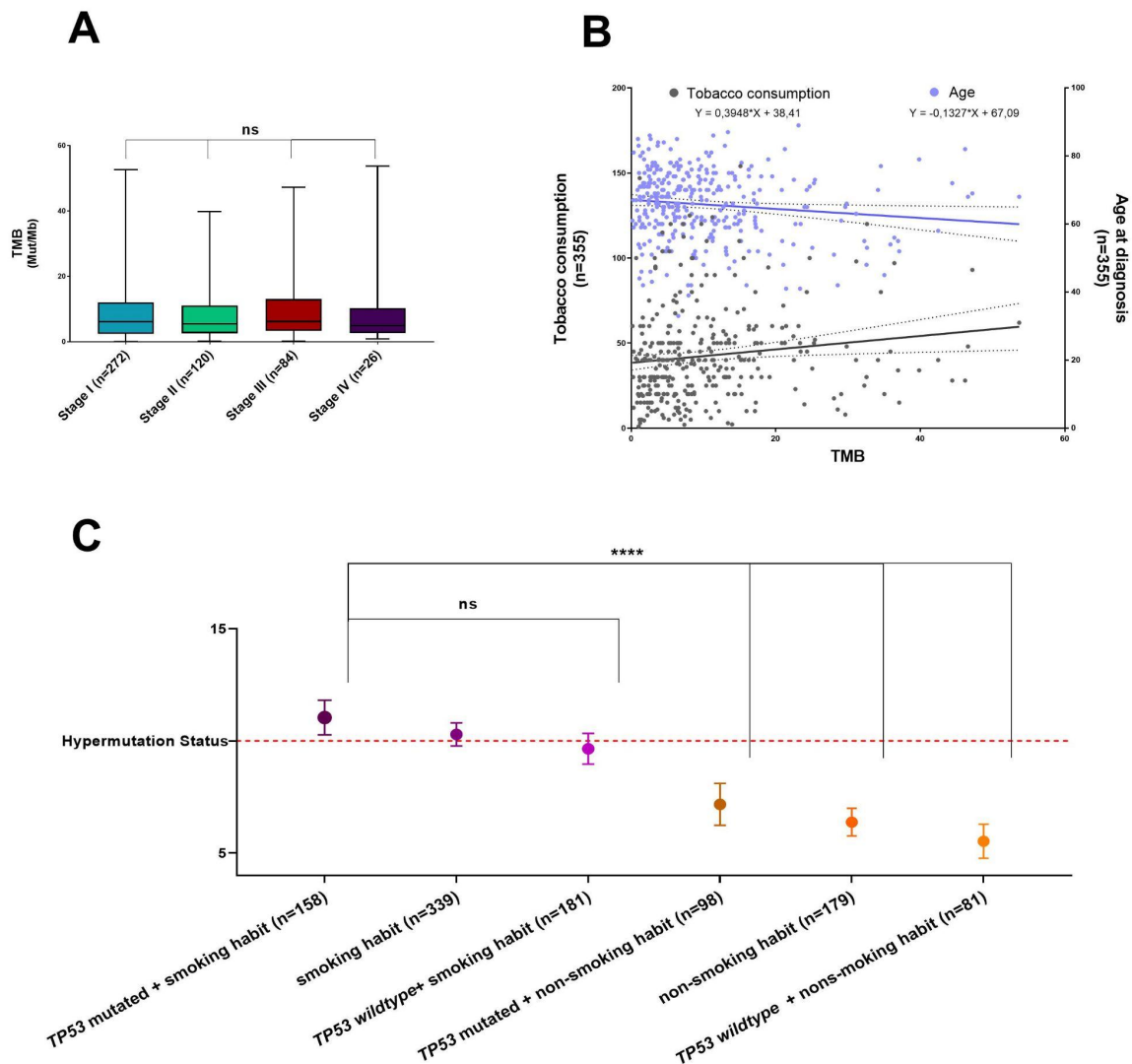


Figure 3. Clinical features and TMB in LUAD. A) Boxplot generated comparing median TMB and tumor stage data **B)** Comparison of tobacco consumption (gray), measured in cigarette packs per year, and age at diagnosis, in years (blue) of individuals described with a smoking habit and TMB, each dot represents a tumor sample analyzed. **C)** Mutational status of samples stratified in smoking habit and or *TP53* alterations. **** = p-value <0,0001 – T-test. Groups were analyzed against *TP53* mutated + smoking habit groups individually.

Gene expression profile of genes related to the tumor immune microenvironment in stratified cohorts

Beyond being a carcinogen, tobacco smoke inhalation leads to a chronic inflammatory status of respiratory tract tissues and, therefore, exerts an influence on

the LUAD tumor microenvironment. Since a higher TMB is related to the activation of the immune system through recognition of neoantigens, parameters of the immune system activation were analyzed comparing the groups named from now on as: "presumably immunogenic" (n=65) consisting of tumor samples with a hypermutated status, mutant *TP53*, and occurring in patients with a smoking history; and "presumably non-immunogenic" (n=69), which consists of samples with none of the previous features.

As a result from these analyses, we observed that the expression profile of CD8A, a gene that encodes the CD8 and GZMA, a gene encoding a serine protease, showed increased expression in the presumably immunogenic group (p-value = 0.0021 and p-value = 0,0182, respectively) (Figure 4A). In addition, the expression of ICI immunotherapeutic target molecules was also analyzed. Expression of CD274, which encodes PD-L1, was not different among groups but expression of CTLA4 was higher in the presumably immunogenic group (p-value = 0,0274) (Figure 4A). Expression of genes involved in activation of the immune system, such as CD68, B2M, also did not differ among groups

On the other hand, expression of the IFNG gene, which encodes the innate immune system regulatory molecule IFN- γ , was higher in the presumably immunogenic group. (p-value =0,0073) (Figure 4A). A trend towards increased expression of interleukins such as TNF- α was also observed but did not reach statistical significance (data not shown).

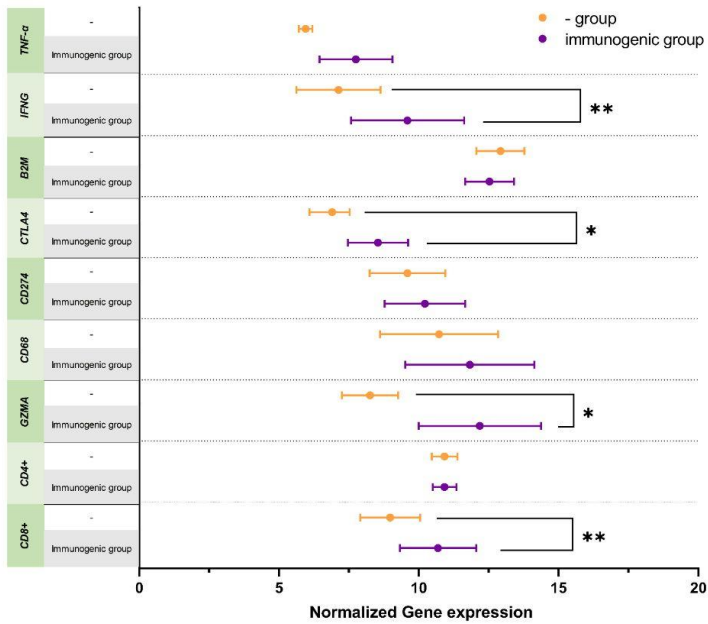
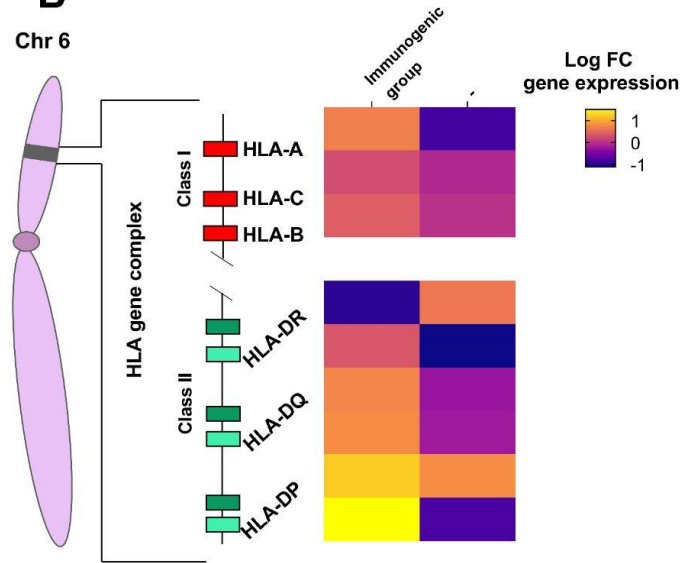
A**B**

Figure 4: Tumor immune microenvironment molecules expression profile in stratified cohorts. A) Normalized gene expression in several molecules involved in the TME. Values represent mean gene expression with SEM. T-test * = p-value < 0,05, ** p-value < 0,01. **B) HLA gene complex expression.** HLA gene complex scheme in chromosome 6 discriminating Class I and II genes in pairs for each gene A and B. Heatmap grading colors represent gene expression fold-changes in up to 1,5 FC and -1 FC.

HLA gene complex expression status

Since the HLA gene complex is vital for the immune system activity, downregulation of HLA genes may result in reduced antigen presentation and, therefore, mediate immune evasion. The heatmap with log fold-change gene expression values for HLA Class I molecules shows that all three genes (HLA-A, HLA-B, HLA-C) analyzed recorded a negative fold change expression in the presumably non-immunogenic group (Figure 4B). Except for HLA-DRA1 and HLA-DPA1, the class II molecules showed the same pattern. On the other hand, in

the presumably immunogenic group of tumors, a trend towards upregulation of several HLA gene complexes was observed. (Figure 4B)

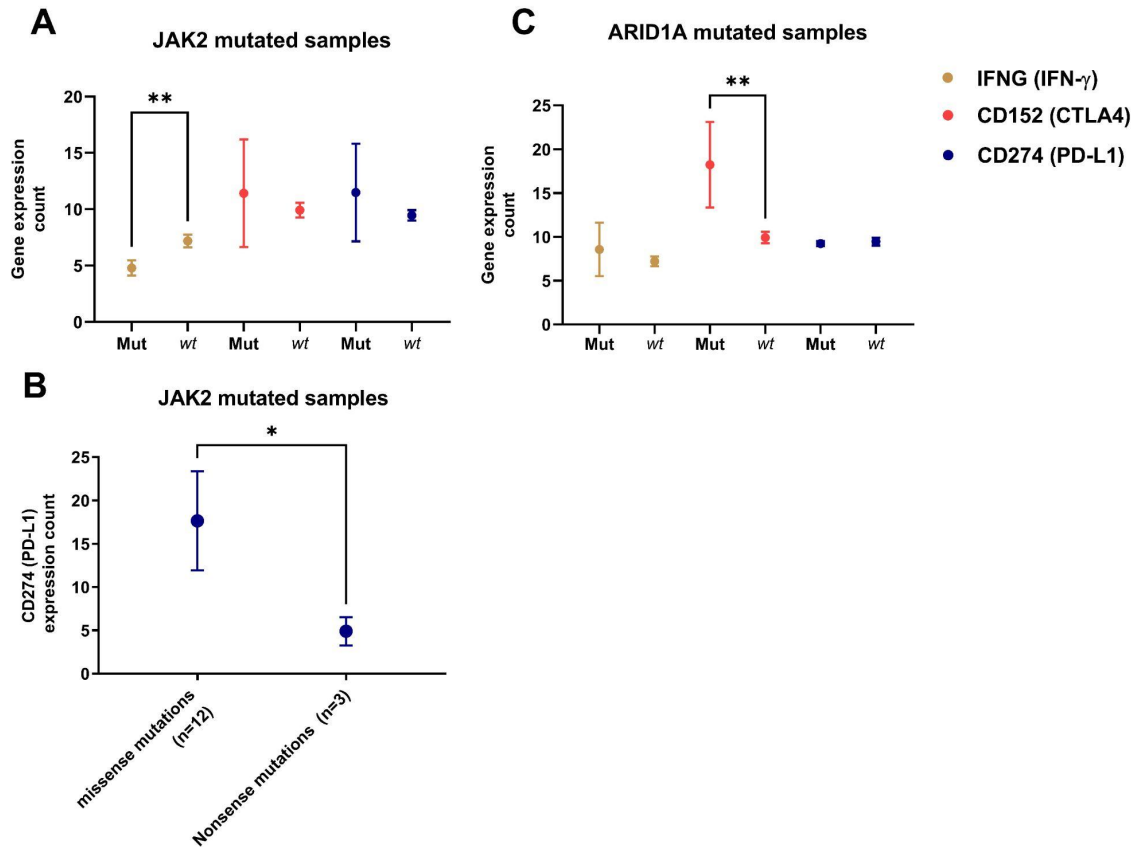


Figure 5: Genes related to immunotherapy sensitivity gain or loss. A) *JAK2* mutated samples vs non-*JAK2* mutated. Values represent mean gene expression with SEM. ** = p-value <0,01. **B)** *CD274* gene expression in between missense and nonsense mutations. * = p-value<0,05. **C)** *ARID1A* mutated samples vs non-*ARID1A* mutated. Values represent mean gene expression with SEM. ** = p-value <0,01.

ARID1A mutations and the expression profile of checkpoint blockage molecules

Among LUAD samples, 4% (n=25) of the tumors had non-synonymous alterations in the *ARID1A* gene. To investigate a possible relationship between *ARID1A* mutations with response (sensitivity gain) to ICI, we assessed expression rates of molecular targets such as *IFN- γ* , *CTLA4* and *PD-L1* in tumors with and without *ARID1A* mutations. *ARID1A* mutated tumors showed significantly increased

gene expression of *CTLA4* when compared to samples unaltered for *ARID1A* ($p = 0.0059$) (Figure 5C). The median gene expression of *IFN- γ* and *PD-L1* was increased, but the difference did not reach statistical significance (Figure 5C).

JAK2 alterations and abnormal expression of IFNG

Since only 15 (3%) of tumors showed *JAK2* mutations, it does not appear to be a highly mutated gene in LUAD. However, we observed an altered IFN- γ expression profile in these tumors when compared to samples unaltered for *JAK2* ($n=494$) ($p = 0.0095$) (Figure 5A). Just as in the previous analysis, PD-L1 expression profile did differ among groups. To further understand the relationship between mutations in *JAK2* and PD-L1 expression (Figure 5A), we analyzed nonsense mutations, which theoretically have a higher impact and usually compromise the molecular folding compared to missense mutations. We observed 3 different *JAK2* stop-codon gain mutations (p.R228*, p.Q1112*, p.E725*) in the LUAD cohort. As expected, the PD-L1 expression profile was severely affected in the tumors with these mutations when compared to tumors with *JAK2* missense mutations (Figure 5B). In particular, presence of the Q1112* was associated with a higher decay in PD-L1 expression.

Discussion

Tumor immune response, including both immune evasion and activation, is a complex and multifactorial process, and therefore, the combined assessment of clinical features and tumor characteristics may be important to improve the predictive potential of immunotherapy biomarkers.

In our study, from the 46 selected driver genes, 43, when co-mutated with *TP53* were associated with a hypermutated tumor status. Of note, although *TP53* is the more frequently mutated gene in cancer and a well-known cancer driver gene, in our analyses, it was among the original 46 selected driver genes, but it was considered a co-mutational event and indeed appeared as a key player in the development of an hypermutated status (Gibbons et al., 2014) Only three selected drivers (*ERBB2*, *EGFR*, and *RIT1*) were associated with a non-hypermutated status when co-mutated with *TP53*. Indeed, tumours harboring *ERBB2* and *EGFR* mutations are known for harboring a low TMB profile and patients with such

mutations are usually treated preferentially with target therapies (i.e. TKIs) (Offin et al., 2019).

Our results demonstrate that the hypermutated profile is already present in the early disease stages, although in some cases, a low TMB tumor may be converted to a high TMB tumor due to cytotoxic and mutagenic chemotherapies. (Strickler et al., 2021). Smoking habit and tobacco consumption are important and aggravating factors for the increase in TMB regardless of the age at LUAD diagnosis. Beyond that, smoking induces a chronic inflammatory status in the lung tissue and this may modulate the tumor microenvironment from early stages. Therefore, this simple clinical screening tool could help pre-select candidate patients for whom clinical information is available. In recent studies, smoking history has shown a positive association with the high response rate to PD-1 inhibitors (Garon et al., 2015; Herbst et al., 2014)

In our study we categorized tumors by phenotypic features and proposed a "presumably immunogenic" LUAD group (samples with "Hypermutated status"; "TP53 alterations," and "smoking habit"). Several studies in NSCLC and melanoma show that tumor response to immunotherapy is associated with the tumor immune profile (Jain et al., 2018). Furthermore, the increased CD8+ and GZMA gene expression observed in the proposed "immunogenic" group helps to support the idea of an inflammatory gene signature or a "T-cells Inflamed phenotype" in a tumor which would render it more amenable to checkpoint inhibition (Weber, 2017 ; Romero et al., 2020). In addition to increased expression of CD8+ and GZMA, CTLA4 was also overexpressed in the immunogenic group, contributing to the rationale and clinical response to CTLA4 inhibitors in certain lung tumors. For instance, a phase I study combining nivolumab and ipilimumab performed by Hellman and colleagues as first-line treatment for advanced NSCLC, had a tolerable safety profile and showed encouraging clinical activity and durable response (Hellmann et al., 2018).

The IFNG increased expression profile in the immunogenic group is potentially another highly promising biomarker. Indeed, High IFN- γ mRNA expression was associated with improved median PFS compared with low expression in NSCLC and melanoma patients (Karachaliou et al., 2018). In addition,

there is evidence that different T-cell inflamed tumors hyperexpressing IFN- γ -responsive genes related to antigen presentation, cytotoxic activity, and adaptive immune resistance, responded to pembrolizumab treatment (Ayers et al., 2017).

Another gene associated with sensitivity to ICIs is *ARID1A*, a chromatin modeling gene, negatively affecting the mismatch repair (MMR) system when mutated. In our study *ARID1A* mutations increased *CTLA4* expression. Indeed, *ARID1A* alterations have been associated with a better response rate to immunotherapy treatment of lung cancer but no molecular mechanism to explain this association has been identified to date (Okamura et al., 2020). In addition, Both *ARID1A* mutations and underexpression correlated with frequent *TP53* mutations, increased mutational burden and occurred almost exclusively in tumors from smokers (Hung et al., 2020).

An interesting finding in our work is that tumor samples harboring *JAK2* mutations showed reduced *IFNG* gene expression. Indeed, a study demonstrated that PD-L1 have their normal expression supported by *JAK2* could be mediated by IFN- γ expression as well, in melanoma (Thiem et al., 2019). So, *JAK2* could affect *IFNG* gene expression when mutated.

Finally, an unexpected finding in our study was the absence of a significant change in the PD-L1 expression profile in the "immunogenic" group when compared to the "non-immunogenic group". However, when the tumor harbored specific nonsense *JAK2* mutations (p.R228*, p.Q1112*, p.E725*), a significant decrease in PD-L1 expression was observed and this did not occur with *JAK2* missense alterations. This may explain why certain patients, even with highly PD-L1 expressing tumors do not respond to ICI, since other genomic alterations may be necessary to result in such a response. Overall, these findings also add to our understanding of molecular aspects of LUAD and illustrate that presence of specific somatic mutations may be key determinants of response to ICI treatment in this scenario.

Conclusions/Disclosures

Hypermethylated status, *TP53* alterations, and smoking habit are associated with a more immunogenic expression profile alone, leading to even higher key molecules expression profile change when combined. Additionally, alterations in the *ARID1A* and *JAK2* generated expression profile changes in immune checkpoint target molecules, suggesting that mutation in such genes may modulate the immunotherapeutic treatment response providing sensitivity gain or loss, respectively. Since treatment with ICIs is an agnostic therapeutic approach, the findings presented here may impact treatment of patients with multiple solid tumors whose molecular characteristics resemble and be responsive to immunotherapeutic treatment.

Limitations of the study

References

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4), 248-249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Alexandrov, L. B., Ju, Y. S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbell, P. J., Vineis, P., Phillips, D. H., & Stratton, M. R. (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*, 354(6312), 618-622. <https://doi.org/10.1126/science.aag0299>
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A. L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., Greaves, M., Hosoda, F., Hutter, B., Illicic, T., Imbeaud, S., Imielinski, M., Jäger, N., Jones, D. T., Jones, D., Knappskog, S., Kool, M., Lakhani, S. R., López-Otín, C., Martin, S., Munshi, N. C., Nakamura, H., Northcott, P. A., Pajic, M., Papaemmanuil, E., Paradiso, A., Pearson, J. V., Puente, X. S., Raine, K., Ramakrishna, M., Richardson, A. L., Richter, J., Rosenstiel, P., Schlesner, M., Schumacher, T. N., Span, P. N., Teague, J. W., Totoki, Y., Tutt, A. N., Valdés-Mas, R., van Buuren, M. M., van 't Veer, L., Vincent-Salomon, A., Waddell, N., Yates, L. R., Zucman-Rossi, J., Futreal, P. A., McDermott, U., Lichten, P., Meyerson, M., Grimmond, S. M., Siebert, R., Campo, E., Shibata, T., Pfister, S. M., Campbell, P. J., & Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415-421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
- Anagnostou, V., Smith, K. N., Forde, P. M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., White, J., Zhang, T., Adleff, V., Phallen, J., Wali, N., Hruban, C., Guthrie, V. B., Rodgers, K., Naidoo, J., Kang, H., Sharfman, W., Georgiades, C., Verde, F., Illei, P., Li, Q. K., Gabrielson, E., Brock, M. V., Zahnow, C. A., Baylin, S. B., Scharpf, R. B., Brahmer, J. R., Karchin, R., Pardoll, D. M., & Velculescu, V. E. (2017). Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*, 7(3), 264-276. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-16-0828>
- Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., Kaufman, D. R., Albright, A., Cheng, J. D., Kang, S. P., Shankaran, V., Piha-Paul, S. A., Yearley, J., Seiwert, T. Y., Ribas, A., & McClanahan, T. K. (2017).

- IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*, 127(8), 2930-2940. <https://doi.org/10.1172/jci91190>
- Bao, X., Shi, R., Zhao, T., & Wang, Y. (2020). Immune landscape and a novel immunotherapy-related gene signature associated with clinical outcome in early-stage lung adenocarcinoma. *J Mol Med (Berl)*, 98(6), 805-818. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01908-9>
- Campbell, B. B., Light, N., Fabrizio, D., Zatzman, M., Fuligni, F., de Borja, R., Davidson, S., Edwards, M., Elvin, J. A., Hodel, K. P., Zahurancik, W. J., Suo, Z., Lipman, T., Wimmer, K., Kratz, C. P., Bowers, D. C., Laetsch, T. W., Dunn, G. P., Johanns, T. M., Grimmer, M. R., Smirnov, I. V., Larouche, V., Samuel, D., Bronsema, A., Osborn, M., Stearns, D., Raman, P., Cole, K. A., Storm, P. B., Yalon, M., Opocher, E., Mason, G., Thomas, G. A., Sabel, M., George, B., Ziegler, D. S., Lindhorst, S., Issai, V. M., Constantini, S., Toledano, H., Elhasid, R., Farah, R., Dvir, R., Dirks, P., Huang, A., Galati, M. A., Chung, J., Ramaswamy, V., Irwin, M. S., Aronson, M., Durno, C., Taylor, M. D., Rechavi, G., Maris, J. M., Bouffet, E., Hawkins, C., Costello, J. F., Meyn, M. S., Pursell, Z. F., Malkin, D., Tabori, U., & Shlien, A. (2017). Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell*, 171(5), 1042-1056.e1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.048>
- Campbell, J. D., Alexandrov, A., Kim, J., Wala, J., Berger, A. H., Pedamallu, C. S., Shukla, S. A., Guo, G., Brooks, A. N., Murray, B. A., Imielinski, M., Hu, X., Ling, S., Akbani, R., Rosenberg, M., Cibulskis, C., Ramachandran, A., Collisson, E. A., Kwiatkowski, D. J., Lawrence, M. S., Weinstein, J. N., Verhaak, R. G., Wu, C. J., Hammerman, P. S., Cherniack, A. D., Getz, G., Artyomov, M. N., Schreiber, R., Govindan, R., & Meyerson, M. (2016). Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet*, 48(6), 607-616. <https://doi.org/10.1038/ng.3564>
- Campoli, M., & Ferrone, S. (2008). HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene*, 27(45), 5869-5885. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.273>
- Carbone, D. P., Reck, M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., Steins, M., Felip, E., van den Heuvel, M. M., Ciuleanu, T. E., Badin, F., Ready, N., Hiltermann, T. J. N., Nair, S., Juergens, R., Peters, S., Minenza, E., Wrangle, J. M., Rodriguez-Abreu, D., Borghaei, H., Blumenschein, G. R., Jr., Villaruz, L. C., Havel, L., Krejci, J., Corral Jaime, J., Chang, H., Geese, W. J., Bhagavatheeswaran, P., Chen, A. C., & Socinski, M. A. (2017). First-Line

- Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 376(25), 2415-2426. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613493>
- Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D. S., Roels, S., White, J., Otto, G. A., Ross, J. S., Garraway, L., Miller, V. A., Stephens, P. J., & Frampton, G. M. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2>
- Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., & Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*, 7(10), e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
- Colaprico, A., Silva, T. C., Olsen, C., Garofano, L., Cava, C., Garolini, D., Sabedot, T. S., Malta, T. M., Pagnotta, S. M., Castiglioni, I., Ceccarelli, M., Bontempi, G., & Noushmehr, H. (2016). TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res*, 44(8), e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>
- Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. (2014). *Nature*, 511(7511), 543-550. <https://doi.org/10.1038/nature13385>
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leigh, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M. J., Felip, E., Lee, J. S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J. C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., Zhang, J., Luceford, J. K., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Roach, C., Emancipator, K., & Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372(21), 2018-2028. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>
- Gibbons, D. L., Byers, L. A., & Kurie, J. M. (2014). Smoking, p53 mutation, and lung cancer. *Mol Cancer Res*, 12(1), 3-13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-13-0539>
- Hainaut, P., & Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, 77, 81-137. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60785-x](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60785-x)
- Hellmann, M. D., Ciuleanu, T. E., Pluzanski, A., Lee, J. S., Otterson, G. A., Audigier-Valette, C., Minenza, E., Linardou, H., Burgers, S., Salman, P., Borghaei, H., Ramalingam, S. S., Brahmer, J., Reck, M., O'Byrne, K. J., Geese, W. J., Green, G., Chang, H., Szustakowski, J., Bhagavatheeswaran, P., Healey, D., Fu, Y., Nathan, F., & Paz-Ares, L. (2018). Nivolumab plus

- Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med*, 378(22), 2093-2104. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801946>
- Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., Sosman, J. A., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Gettinger, S. N., Kohrt, H. E., Horn, L., Lawrence, D. P., Rost, S., Leabman, M., Xiao, Y., Mokatrín, A., Koeppen, H., Hegde, P. S., Mellman, I., Chen, D. S., & Hodi, F. S. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515(7528), 563-567. <https://doi.org/10.1038/nature14011>
- Hiraki, A., Fujii, N., Murakami, T., Kiura, K., Aoe, K., Yamane, H., Masuda, K., Maeda, T., Sugi, K., Darzynkiewicz, Z., Tanimoto, M., & Harada, M. (2004). High frequency of allele-specific down-regulation of HLA class I expression in lung cancer cell lines. *Anticancer Res*, 24(3a), 1525-1528.
- Hung, Y. P., Redig, A., Hornick, J. L., & Sholl, L. M. (2020). ARID1A mutations and expression loss in non-small cell lung carcinomas: clinicopathologic and molecular analysis. *Mod Pathol*, 33(11), 2256-2268. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0592-2>
- Jain, P., Jain, C., & Velcheti, V. (2018). Role of immune-checkpoint inhibitors in lung cancer. *Ther Adv Respir Dis*, 12, 1753465817750075. <https://doi.org/10.1177/1753465817750075>
- Jardim, D. L., Goodman, A., de Melo Gagliato, D., & Kurzrock, R. (2021). The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*, 39(2), 154-173. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.10.001>
- Jiang, L., Su, X., Zhang, T., Yin, X., Zhang, M., Fu, H., Han, H., Sun, Y., Dong, L., Qian, J., Xu, Y., Fu, X., Gavine, P. R., Zhou, Y., Tian, K., Huang, J., Shen, D., Jiang, H., Yao, Y., Han, B., & Gu, Y. (2017). PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget*, 8(16), 26845-26857. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15839>
- Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Crespo, G., Drozdowskyj, A., Aldeguer, E., Gimenez-Capitan, A., Teixido, C., Molina-Vila, M. A., Viteri, S., De Los Llanos Gil, M., Algarra, S. M., Perez-Ruiz, E., Marquez-Rodas, I., Rodriguez-Abreu, D., Blanco, R., Puertolas, T., Royo, M. A., & Rosell, R. (2018). Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol*, 10, 1758834017749748. <https://doi.org/10.1177/1758834017749748>

- Lee, C. H., Yelensky, R., Jooss, K., & Chan, T. A. (2018). Update on Tumor Neoantigens and Their Utility: Why It Is Good to Be Different. *Trends Immunol*, 39(7), 536-548. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.005>
- Lu, S., Stein, J. E., Rimm, D. L., Wang, D. W., Bell, J. M., Johnson, D. B., Sosman, J. A., Schalper, K. A., Anders, R. A., Wang, H., Hoyt, C., Pardoll, D. M., Danilova, L., & Taube, J. M. (2019). Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*, 5(8), 1195-1204. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1549>
- Lu, Y. C., & Robbins, P. F. (2016). Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol*, 28(1), 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.11.002>
- McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C. T., Rowan, A. J., Watkins, T. B. K., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Veeriah, S., Van Loo, P., Herrero, J., & Swanton, C. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell*, 171(6), 1259-1271.e1211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.001>
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480-489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>
- Offin, M., Rizvi, H., Tenet, M., Ni, A., Sanchez-Vega, F., Li, B. T., Drilon, A., Kris, M. G., Rudin, C. M., Schultz, N., Arcila, M. E., Ladanyi, M., Riely, G. J., Yu, H., & Hellmann, M. D. (2019). Tumor Mutation Burden and Efficacy of EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res*, 25(3), 1063-1069. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-18-1102>
- Okamura, R., Kato, S., Lee, S., Jimenez, R. E., Sicklick, J. K., & Kurzrock, R. (2020). ARID1A alterations function as a biomarker for longer progression-free survival after anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000438>
- Pan-cancer analysis of whole genomes. (2020). *Nature*, 578(7793), 82-93. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1969-6>
- Pao, W., & Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 12(2), 175-180. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(10\)70087-5](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(10)70087-5)

Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M. L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., Plenker, D., Leenders, F., Sun, R., Zander, T., Menon, R., Koker, M., Dahmen, I., Müller, C., Di Cerbo, V., Schildhaus, H. U., Altmüller, J., Baessmann, I., Becker, C., de Wilde, B., Vandesompele, J., Böhm, D., Ansén, S., Gabler, F., Wilkening, I., Heynck, S., Heuckmann, J. M., Lu, X., Carter, S. L., Cibulskis, K., Banerji, S., Getz, G., Park, K. S., Rauh, D., Grütter, C., Fischer, M., Pasqualucci, L., Wright, G., Wainer, Z., Russell, P., Petersen, I., Chen, Y., Stoelben, E., Ludwig, C., Schnabel, P., Hoffmann, H., Muley, T., Brockmann, M., Engel-Riedel, W., Muscarella, L. A., Fazio, V. M., Groen, H., Timens, W., Sietsma, H., Thunnissen, E., Smit, E., Heideman, D. A., Snijders, P. J., Cappuzzo, F., Ligorio, C., Damiani, S., Field, J., Solberg, S., Brustugun, O. T., Lund-Iversen, M., Sängler, J., Clement, J. H., Soltermann, A., Moch, H., Weder, W., Solomon, B., Soria, J. C., Validire, P., Besse, B., Brambilla, E., Brambilla, C., Lantuejoul, S., Lorimier, P., Schneider, P. M., Hallek, M., Pao, W., Meyerson, M., Sage, J., Shendure, J., Schneider, R., Büttner, R., Wolf, J., Nürnberg, P., Perner, S., Heukamp, L. C., Brindle, P. K., Haas, S., & Thomas, R. K. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet*, *44*(10), 1104-1110.

<https://doi.org/10.1038/ng.2396>

Ready, N., Hellmann, M. D., Awad, M. M., Otterson, G. A., Gutierrez, M., Gainor, J. F., Borghaei, H., Jolivet, J., Horn, L., Mates, M., Brahmer, J., Rabinowitz, I., Reddy, P. S., Chesney, J., Orcutt, J., Spigel, D. R., Reck, M., O'Byrne, K. J., Paz-Ares, L., Hu, W., Zerba, K., Li, X., Lestini, B., Geese, W. J., Szustakowski, J. D., Green, G., Chang, H., & Ramalingam, S. S. (2019). First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *J Clin Oncol*, *37*(12), 992-1000.

<https://doi.org/10.1200/jco.18.01042>

Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmir, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Schumacher, T. N., & Chan, T. A. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, *348*(6230), 124-128.

<https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>

- Romero, J. M., Grünwald, B., Jang, G. H., Bavi, P. P., Jhaveri, A., Masoomian, M., Fischer, S. E., Zhang, A., Denroche, R. E., Lungu, I. M., De Luca, A., Bartlett, J. M. S., Xu, J., Li, N., Dhaliwal, S., Liang, S. B., Chadwick, D., Vyas, F., Bronsert, P., Khokha, R., McGaha, T. L., Notta, F., Ohashi, P. S., Done, S. J., O'Kane, G. M., Wilson, J. M., Knox, J. J., Connor, A., Wang, Y., Zogopoulos, G., & Gallinger, S. (2020). A Four-Chemokine Signature Is Associated with a T-cell-Inflamed Phenotype in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, 26(8), 1997-2010 <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-19-2803>
- Saigi, M., Albuquerque-Bejar, J. J., Mc Leer-Florin, A., Pereira, C., Pros, E., Romero, O. A., Baixeras, N., Esteve-Codina, A., Nadal, E., Brambilla, E., & Sanchez-Cespedes, M. (2018). MET-Oncogenic and JAK2-Inactivating Alterations Are Independent Factors That Affect Regulation of PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 24(18), 4579-4587. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-18-0267>
- Strickler, J. H., Hanks, B. A., & Khasraw, M. (2021). Tumor Mutational Burden as a Predictor of Immunotherapy Response: Is More Always Better? *Clin Cancer Res*, 27(5), 1236-1241. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-20-3054>
- Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., Chen, L., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*, 20(19), 5064-5074. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-13-3271>
- Thiem, A., Hesbacher, S., Kneitz, H., di Primio, T., Heppt, M. V., Hermanns, H. M., Goebeler, M., Meierjohann, S., Houben, R., & Schrama, D. (2019). IFN-gamma-induced PD-L1 expression in melanoma depends on p53 expression. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1), 397. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1403-9>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M., & Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366(26), 2443-2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>

Weber, J. S. (2017). Biomarkers for Checkpoint Inhibition. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 37, 205-209. https://doi.org/10.1200/edbk_175463

6. CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.

O objetivo geral deste estudo foi o de avaliar de forma conjunta características genômicas e clínicas a fim de identificar biomarcadores preditivos relacionados a um perfil tumoral mais imunogênico, podendo assim auxiliar na identificação de candidatos ao tratamento imunoterápico com ICIs, os quais tenham melhores taxas de resposta terapêutica. Nesse sentido, obtivemos resultados importantes para contribuir com o tema proposto, conforme descrito a seguir com o detalhamento dos resultados atingidos em cada objetivo específico originalmente proposto.

Em relação ao OE1, "identificar possíveis mutações somáticas drivers que estejam associadas a uma maior ou menor carga mutacional", verificamos que 43 dos 46 genes selecionados, quando mutados e na co-ocorrência com mutações em *TP53*, associaram-se ao perfil tumoral hipermutado. Esse achado demonstra que talvez mais importante que a presença de mutações em genes drivers específicos, a combinação de mutação em gene driver e mutação em *TP53* seja um fator preditivo importante de TMB mais elevado.

Em relação ao OE2, "identificar características clínicas e/ou tumorais que indiquem uma maior carga mutacional", demonstramos que além do hábito tabagista (já demonstrado previamente na literatura), a carga tabágica também tem uma relação direta com o TMB. Além disso, os achados sugerem que esta característica, fácil de rastrear no contexto clínico, pode ajudar também a desvendar o perfil molecular do tumor, já que o aumento da carga tabágica se relacionou positivamente a tumores com TMB mais elevados.

Em relação ao OE3, "avaliar o perfil de expressão gênica diferencial comparando amostras de tumores, explorando em especial moléculas do microambiente tumoral" observamos que em uma análise de subgrupos de LUAD, tumores categorizados como "supostamente imunogênicos" (tumores hipermutados com alterações em *TP53* em pacientes com hábito tabagista) apresentavam perfil específico de expressão gênica de moléculas-chave para a manutenção do microambiente tumoral, incluindo os transcritos dos genes *CD8A*, *GZMA*, *IFNG*,

CTLA4. Estes achados sugerem que os tumores com estas características de maior imunogenicidade seriam mais suscetíveis a ativação imune através de tratamento imunoterápico.

Em relação ao OE4 "explorar o perfil mutacional e de expressão de genes associados, na literatura, com ganho ou perda de sensibilidade ao tratamento imunoterápico com ICIs" verificamos que mutações em alguns genes selecionados (como *ARID1A* e *JAK2*) estavam associadas a alterações no perfil de expressão gênica dos genes *CTLA4* (*ARID1A* mutado) e *IFNG* (*JAK2* mutado) que remetem a um possível papel na resposta a estes tratamentos. Estes dados, se confirmados em análises subsequentes, poderiam ser utilizados para desenvolver biomarcadores de predição de resposta ao tratamento com ICIs.

A diminuição dos diagnósticos e das mortes por câncer de pulmão nos próximos anos ainda parece ser uma meta otimista, porém não tão realista. Políticas públicas para o diagnóstico precoce ainda são a grande fonte de esperança para a diminuição da mortalidade por câncer de pulmão, ao passo que a árdua jornada de busca de fármacos de uso na medicina de precisão segue avançando.

Diferente de drogas com alvo molecular que são utilizadas apenas para tumores com mutações específicas, a indicação de imunoterapia no tratamento de tumores sólidos engloba um campo multifatorial com uma complexidade molecular ainda não bem compreendida, o que provavelmente é o principal obstáculo para o atingimento de taxas ótimas de resposta a este tipo de tratamento.

Nesse contexto, os resultados encontrados aqui contribuem para o entendimento dos múltiplos fatores que podem estar envolvidos na definição dos tumores candidatos a imunoterapia e na modulação da resposta a este tipo de tratamento. Demonstramos que determinadas mutações parecem estar associadas a perfis de expressão gênica distintas, reforçando que além da caracterização de mutações no genoma tumoral, é importante entender a consequência destas alterações, e qual o seu impacto nas funções da proteína e desbalanço metabólico das vias nas quais esta tem participação.

Como perspectivas, pretendemos expandir o trabalho com a incorporação de outros tipos de câncer de pulmão depositados no TCGA, como câncer de pulmão de células escamosas. Além disso, aprofundar a análise de tumores cujo perfil de expressão gênica de PD-L1 mostra-se abaixo da média, assim como aqueles tumores cujo PD-L1 está superexpresso, para identificar padrões moleculares que influenciam este biomarcador.

