

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GUILHERME DANIELSKI VIOLA**

**BUSCA POR NOVOS BIOMARCADORES PREDITIVOS DE  
RESPOSTA A INIBIDORES DE *CHECKPOINT* NO CÂNCER DE  
PULMÃO: EXPLORANDO DADOS DO *THE CANCER GENOME*  
*ATLAS* EM TUMORES HIPERMUTADOS**

Porto Alegre

2018

GUILHERME DANIELSKI VIOLA

**BUSCA POR NOVOS BIOMARCADORES PREDITIVOS DE  
RESPOSTA A INIBIDORES DE *CHECKPOINT* NO CÂNCER DE  
PULMÃO: EXPLORANDO DADOS DO *THE CANCER GENOME*  
*ATLAS* EM TUMORES HIPERMUTADOS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção de título de bacharel em  
Ciências Biológicas pela Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof. Patrícia Ashton-Prolla

Co-orientador: Tiago Finger Andreis

Porto Alegre

2018

## Resumo

As neoplasias de traquéia, brônquios e pulmão são os tipos de câncer que mais causam mortes no mundo, levando a cada ano aproximadamente 1,7 milhões de pessoas ao óbito. Marcadores moleculares (ou biomarcadores) surgiram na última década como uma nova ferramenta para auxiliar na escolha de tratamento para pacientes com adenocarcinoma de pulmão e alterações moleculares específicas. Além das drogas de alvo molecular, mais recentemente foram aprovados novos tratamentos para o CPNPC pertencentes à classe dos imunoterápicos, denominados inibidores de *checkpoint* imunológicos (Rizvi *et al.*, 2015).

Sua prescrição depende da expressão de certos biomarcadores na superfície celular do tumor, como a proteína PD-L1, que se liga ao seu receptor PD-1 em células-T, impedindo sua proliferação. O uso de fármacos anti-PD-1/PD-L1 impede tal ligação, reativando a resposta imune do paciente (Herbst *et al.*, 2014). Porém, mesmo com uma alta expressão de PD-L1, a resposta a inibidores de *checkpoint* tem variado de 10% - 45% (Garon *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017). Novos estudos demonstraram que tumores hipermutados (>10mt/Mb), os quais possuem uma maior chance de apresentarem neoantígenos, tendem a responder bem ao uso de inibidores de *checkpoint*, independente da expressão de PD-L1 (Ramalingam *et al.*, 2018).

Apesar do uso promissor da carga mutacional para a seleção de pacientes que se beneficiarão da imunoterapia, o diagnóstico ainda é custoso, uma vez que demanda sequenciamento completo de exoma ou ainda painéis com um número muito elevado de genes (Roszik *et al.*, 2016). Portanto, biomarcadores com aplicação clínica que sejam indicadores de maior sensibilidade à imunoterapia ainda são escassos.

O presente trabalho tem como objetivo identificar novos biomarcadores potencialmente associados com uma maior ou menor carga mutacional em pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pulmão. Para isso, dados do TCGA (*the human genome cancer atlas*) foram explorados e 47 genes selecionados como *drivers* foram submetidos à análises de bioinformática a fim de relacionar a carga mutacional dos tumores com mutações sem genes *drivers* junto com a co-ocorrência de mutação no gene *TP53*. Este perfil de co-ocorrência de mutações evidenciou que mutações em *TP53* e *drivers* selecionados podem ser bons indícios de biomarcadores de alta taxa tumoral e perfil de hipermutação.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é o tipo de neoplasia maligna com maior incidência a nível mundial, correspondendo a 11,6% dos casos de câncer. Estima-se que cerca de 1,7 milhão de pessoas venham a óbito a cada ano em decorrência da doença, números que tendem a aumentar nos próximos anos (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, espera-se cerca de 30.000 novos casos de câncer de pulmão a cada ano, 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. (INCA, 2018).

Como na maioria dos casos de neoplasia, existem fatores de risco para desenvolvimento da doença. Para os casos de pulmão, o mais bem estabelecido é consumo de derivados de tabaco, responsável por aproximadamente 90% dos casos, levando, na maior parte das vezes, os pacientes a óbito (Ozlu e Bülbül, 2005). Diferentemente de outros fatores de risco como a exposição à cromo, arsênico, cádmio, sílica, níquel, poluentes atmosféricos e até mesmo fatores ligados a dieta (Sun et al., 2007), acredita-se que o hábito de tabagista 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).

O câncer de pulmão é dividido em dois grandes grupos de acordo com o perfil histológico: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP), responsável por 15 a 20% dos tumores; e câncer de pulmão de não-pequenas células NSCLSC's (do inglês *non small cell lung carcinoma*), presente em aproximadamente 80% dos diagnósticos (Lortet-Tieulent et al., 2014; Pirker e Filipits, 2016). Na prática clínica, a fim de melhorar respostas a tratamento, o grupo NSCLSC's foi subdividido em mais três sub-grupos, correspondendo aos subtipos adenocarcinoma, câncer de pulmão de células escamosas e câncer de pulmão de células grandes. (Scagliotti et al., 2008)

Estudos genômicos evidenciaram a ampla heterogeneidade molecular dos tumores de pulmão, mesmo entre aqueles de mesmo padrão histológico, (Network, 2012; Kandoth et al., 2013). O uso de biomarcadores de predição permite que decisões terapêuticas sejam baseadas na genética do tumor, prevendo com mais precisão a provável resposta ao tratamento, (Politi e Herbst, 2015). Por exemplo, determinadas

alterações somáticas nos genes *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ERB2* 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 (Pao & Girard, 2011).

A imunoterapia como tratamento de câncer surgiu como um mecanismo de ativação e direcionamento de células do sistema imune, mais particularmente Linfócitos T, para agirem contra células cancerosas, não interferindo com células de tecido normal. O sistema imune do paciente consiste tanto da imunidade inata, quanto adaptativa e ambos têm papel fundamental na vigilância da imunidade total, reconhecimento e destruição de células malignas. Este tipo de tratamento vem demonstrando eficácia, na medida em que linfócitos T atuam diretamente na rejeição tumoral tanto em modelos animais, como em humanos, como verificado em experimentos de transferências de células (WANG, 2016).

Embora a imunoterapia consiga tratar uma ampla gama de pacientes ao redor do mundo, ainda ocorrem casos em que os pacientes não respondem ao tratamento. Atualmente, os estudos com imunoterapia aos poucos tentam elucidar os mecanismo de interação das células imunes com células malignas.

O sistema imune, assim com todos os sistemas biológicos, possui *checkpoints* de controle. Dentre as moléculas *checkpoint* mais estudadas estão CTLA-4 (do inglês *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), PD-1 (do inglês *programmed cell death-1*) e seu ligante PD-L1 (do inglês *programmed cell death ligant-1*), devido sua participação no balanço de regulação de células T (JIANG et al., 2017). Sob condições normais, estão envolvidas no balanço de reações pro- e antimune (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011). Entretanto, células tumorais se beneficiam de evasão do sistema imune, o que promove a sobrevivência tumoral (Pardoll 2012).

O bloqueio de *checkpoints* imunológicos, como os sinais das proteínas PD-1 e PD-L1 tem demonstrado grande potencial para o tratamento de NSCLSC's (Rizvi *et al.*, 2015). PD-L1 é superexpresso em 23 a 27% dos casos de câncer de pulmão de células grandes e adenocarcinoma de 19 a 56% dos carcinomas de células escamosas. NSCLSC's que expressam altos níveis de PD-L1 respondem bem a imunoterapias que utilizem fármacos anti-PD-1/PD-L1 (Herbst *et al.*, 2014). 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 para este biomarcador, demonstrando seu limitado valor preditivo de resposta (Garon *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017).

Entender os mecanismos moleculares que ditam a resposta à imunoterapia, como o tratamento anti-PD-1 é um dos desafios a serem transpostos na oncologia. Dentre os tumores com melhor taxa de resposta estão NSCLC's e melanomas, tumores cuja maior causa e predisposição seja a exposição crônica a agentes mutagênicos, como carcinogênicos do consumo de derivados de tabaco e exposição à luz ultravioleta, respectivamente (Rizvi *et al.*, 2015).

Recentemente a carga mutacional tumoral (em inglês *Tumor Mutation Burden – TMD*) tem sido utilizada como um novo biomarcador de resposta a inibidores de *checkpoint*. Em geral, tumores com mais de dez mutações por megabase (Mb), que são classificados como hipermutados, tem maiores chances de resposta positiva ao tratamento (Rizvi *et al.*, 2015). Este padrão é muito observado em NSCLCs, principalmente em pacientes com hábito tabagista (GOVINDAN et al., 2012 Campbell et al 2017). Ensaios clínicos também demonstraram que mesmo em pacientes cujos tumores possuíam baixa expressão PD-L1, houve uma resposta positiva ao uso de drogas anti-PD-L1 e anti-CTL-4 no grupo com carga mutacional >10Mt/Mb (Borghaei *et al.*, 2018).

Estudos como o de LU; ROBBINS (2016) sugerem que um possível e emergente biomarcador para predição da resposta ao tratamento imunoterápico seja o número total de mutações presentes no tumor específico. Uma alta carga mutacional resulta em maior apresentação de neoantígenos, gerados principalmente por mutações não-sinônimas.

Apesar do estabelecimento da alta carga mutacional como indicativo para o uso de inibidores de *checkpoint*, seu uso na prática clínica é demasiadamente custoso, uma vez que demanda o sequenciamento do exoma tumoral ou análise com amplos painéis gênicos. Portanto, a descoberta de novos biomarcadores associados a um perfil hipermutado seria de grande utilidade, potencialmente reduzindo os custos de diagnóstico. Neste contexto, o presente estudo utilizou dados do perfil mutacional de 563 adenocarcinomas de pulmão depositados no repositório público do projeto *The Cancer Genome Atlas*, comparando grupos de pacientes com tumores hipermutados e não-hipermutados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e análise dos dados

#### 2.1.1. Chamada e seleção de variantes

Foram avaliados casos de adenocarcinoma de pulmão disponibilizados no banco de dados público do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). A chamada de variantes foi realizada com a ferramenta Mutect2 com auxílio da plataforma R, utilizando o pacote TCGABiolinks (Colaprico *et al.*, 2016). Foi considerado o genoma de referência GRCh38. Foram excluídas variantes sinônimas e aquelas cuja predição de impacto era classificada como benigna por ambos preditores SIFT e PolyPhen-2 (Adzhubei *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012; Choi e Chan, 2015). Também foram mantidas somente mutações cuja classificação de impacto era Alta (maior probabilidade de perda de função), Moderada (não causa perda de função, mas provavelmente reduz sua eficácia biológica) ou Modificadora (localizada em regiões não-codificantes), conforme algoritmo *Variant Effect Predictor* (McLaren *et al.*, 2016).

#### 2.1.2. Análise da carga mutacional

As amostras tumorais foram classificadas em dois subgrupos: um com 10 ou mais mutações por megabase (Mb), denominado Hipermutados, e outro com menos de 10 mutações por Mb, denominado não-hipermutados. Para esta classificação, foi considerado um total 33Mb, correspondente ao exoma sequenciado em cada tumor, conforme informação fornecida pela equipe do *Genomic Data Commons*, responsável pelo TCGA.

#### 2.1.3. Seleção de drivers candidatos e correlação com perfil hipermutado

A fim de determinar se alterações em genes específicos estavam mais frequentemente relacionadas a um *status* de hipermutação, foram selecionados 46

*drivers* candidatos, conforme estudos genômicos já publicados para CPNPC (Pao e Girard, 2011; Peifer et al., 2012; Network, 2014; Campbell et al., 2016). Uma vez que o gene *TP53* é o mais frequentemente mutado em adenocarcinoma de pulmão, foi comparada a carga mutacional de diferentes subgrupos conforme presença ou ausência de mutações no gene: mutações somente em determinado gene *driver*, mas não em *TP53*, VS mutações em determinado gene *driver* em co-ocorrência com *TP53*.

Para análise estatística dos dados, foi utilizado teste t de Student. Também foi aplicado o teste qui-quadrado para cada fator (gene *driver*), com correção de Yates.

#### 2.1.4. *Tamanho amostral e aspectos éticos*

Por se tratar de um estudo exploratório, o tamanho da amostra não foi calculado, sendo esta série considerada uma amostra de conveniência. Por ora, estão disponíveis publicamente para análise uma série de 515 casos com informações clínicas, todos disponibilizados pelo TCGA. Como este é um banco de dados público que conta com anonimização das informações pessoais dos pacientes, não foi necessária aprovação pelo comitê de ética.

### 3. OBJETIVOS

Identificar novos biomarcadores potencialmente associados com uma maior ou menor carga mutacional em pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pulmão.

#### 3.1. *Objetivos específicos*

3.1.1 Identificar possíveis mutações *drivers* que estejam associadas a uma maior ou menor carga mutacional;

3.1.2 Propor um painel de alterações somáticas preditivo de benefício à imunoterapia a fim de identificar mutações relacionadas à alta carga mutacional, maior probabilidade de apresentação de neoantígenos e resposta a inibidores de *checkpoint*.

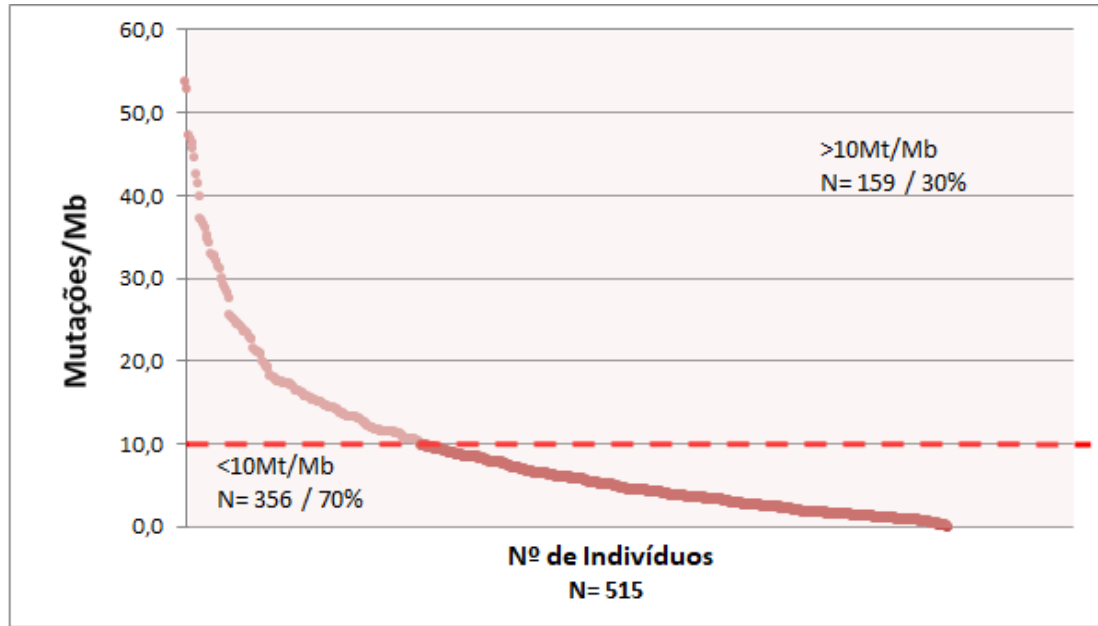
### 4. RESULTADOS



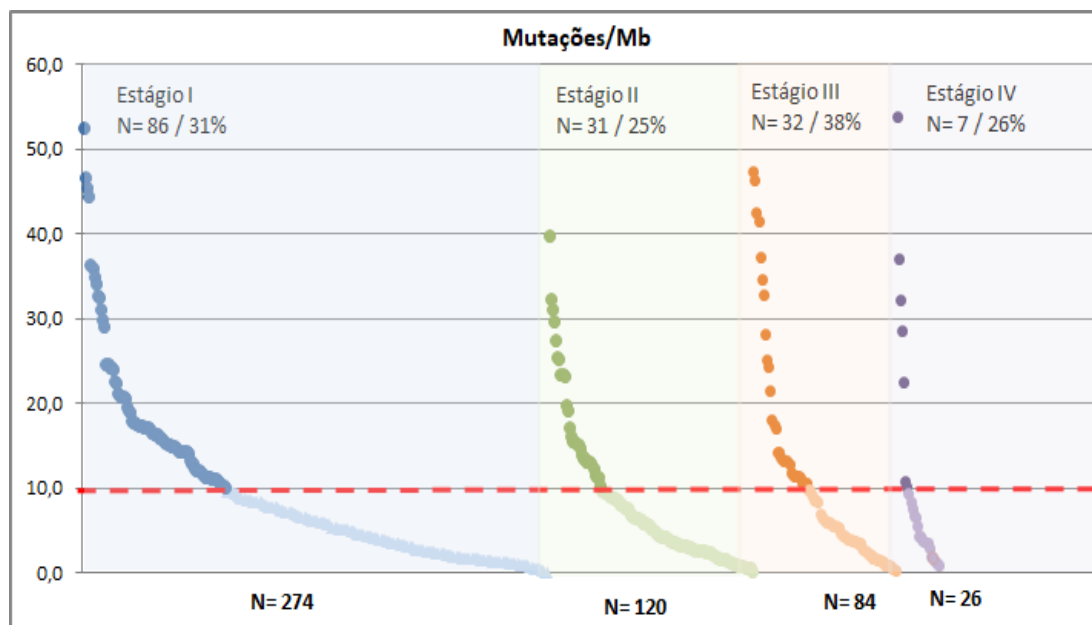
#### 4.1. Perfil hipermutado em adenocarcinoma de pulmão independente do estadiamento tumoral

Das 515 amostras de tumores analisadas, 30% (N = 159) possuíam um perfil considerado hipermutado ( $\geq 10$  Mt/Mb). Já os casos não-hipermutados ( $< 10$  Mt/Mb) representaram 70% (N = 356) do total (**Figura 1**).

A fim de verificar se o *status* de hipermutação está relacionado ou não a doença avançada, os dados de carga mutacional foram confrontados com a clínica dos pacientes. Foram utilizados os dados de estadiamento tumoral, já disponibilizados pelo TCGA, conforme a classificação TNM da *American Joint Committee on Cancer*, disponível para 504 das 515 amostras. Os resultados demonstram que o perfil hipermutado já se estabelece nos estágios iniciais da doença, com 31% dos tumores em estágio I já apresentando uma alta carga mutacional ( $\geq 10$  Mt/Mb) (**Figura 2**). Ademais, a análise de variância (One-Way ANOVA) revelou que não há diferença estatisticamente significativa no número de mutações por Mb entre os quatro estágios tumorais ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1.** Carga mutacional das 515 amostras de adenocarcinomas de pulmão disponibilizadas no TCGA. Pontos acima da linha em vermelho pontilhada representam casos hipermutados, com 10 ou mais mutações por megabase (Mb).



**Figura 2. Carga mutacional dos 504 casos cujo dados clínicos estavam disponíveis, divididos conforme estadiamento tumoral. Nota-se que um perfil hipermutado ( $\geq 10\text{Mt/Mb}$ ) já se estabelece nos primeiros estágios da carcinogênese.**

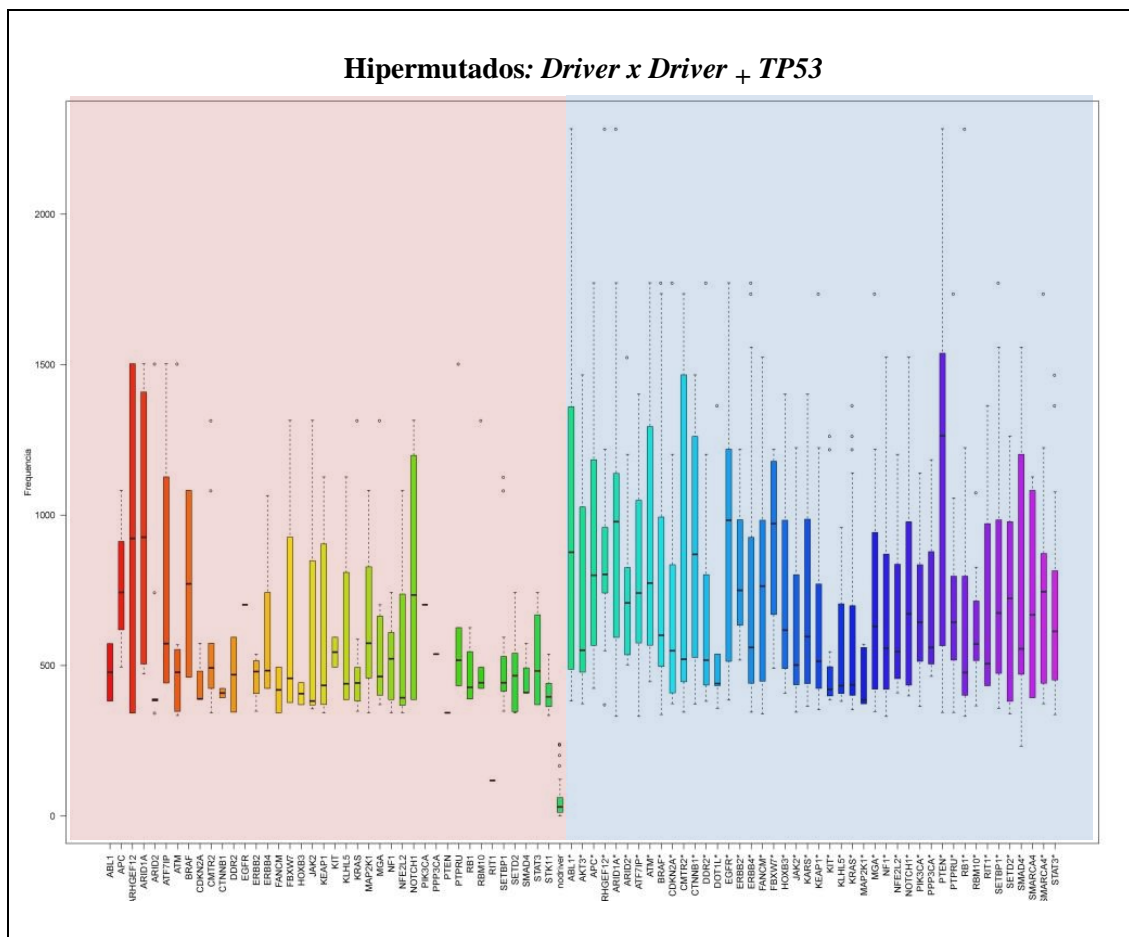
#### 4.2. Co-ocorrência de mutações em *TP53* com outros genes *driver* parece conferir uma maior probabilidade de geração de um perfil hipermutado.

A fim de elucidar os mecanismos moleculares que levam a um perfil hipermutado, foram selecionadas alterações em genes *driver* no processo de carcinogênese como possíveis alvos para identificação da carga mutacional total. Foram selecionados 46 genes a fim de determinar sua frequência em casos hipermutados ou não-hipermutados. Também foi avaliada a co-ocorrência de mutações em genes *driver* com alterações em *TP53*, gene mais frequentemente mutado em adenocarcinoma de pulmão.

O *boxplot* gerado demonstra que há uma tendência dos casos hipermutados se agruparem no grupo de tumores que possuem mutação em um gene *driver* co-ocorrendo com alterações em *TP53*. Dentre os genes com maior carga mutacional destacam-se *STA5B*, *NRAS*, *PTEN*, *RAF1* com as médias mais elevadas. Já alterações nos genes *PTPRU*, *ATF7IP*, *KLHL5*, *JAK2*, *CMTR2*, *ARID2*, *ABL* induzem, por si só, o perfil hipermutado. O caso em que não há genes *drivers* selecionados mutados mostra-se com a menor taxa de mutações, o que evidencia que o painel de genes escolhidos seja um bom alvo para determinar o padrão de hipermutação (**Figura 3**).



Quando considerado apenas o grupo de tumores hipermutados, também observa-se, no geral, uma tendência a uma maior carga mutacional nas amostras onde há co-ocorrência com alterações *TP53* (**Figura 4**).

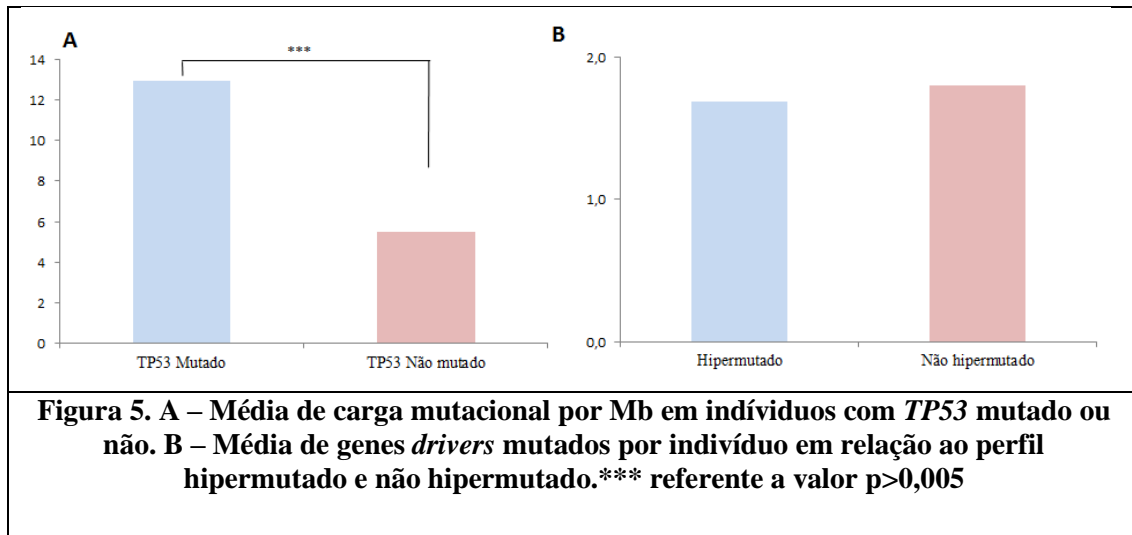


**Figura 4. Comparativo entre o grupo hipermutado: “GENE” = tumores com *driver* mutado, mas não *TP53*; “GENE”\* = tumores com *driver* mutado e alterações em *TP53*. Nota-se uma tendência no grupo com mutações em *TP53* apresentarem um segundo quartil (mediana) superior, o que reflete uma maior carga mutacional.**

Para verificar se alterações em *TP53* estão relacionadas a uma maior carga mutacional, foram comparados os tumores com e sem alterações neste *driver*. A partir de testes estatísticos foi observado que amostras com *TP53* mutado apresentam, em média, maior carga mutacional (média de 13,6 Mt/Mb) do que as amostras sem este *driver* mutado tiveram uma média inferior de 10 Mt/Mb (**Figura 5A**).

Os grupos hipermutados e não-hipermutados também foram comparados em relação ao número de *drivers* mutados, uma vez que o número destes genes alterados

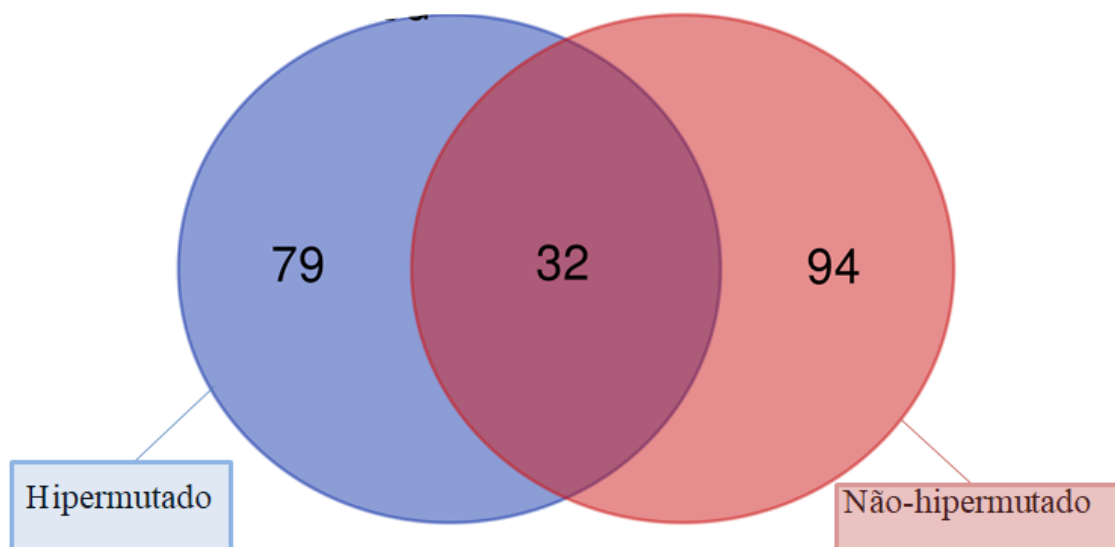
poderia ter papel importante no aumento da carga mutacional. Os resultados desta análise reforçam o papel de alterações em *TP53* no processo de hipermutação, uma vez que a média de *drivers* alterados entre os dois grupos não difere (teste T de Student,  $p=0.438$ ; **Figura 5 B**)



#### 4.3 Mutações em *TP53* exclusivas do perfil hipermutado e mutações independentes da carga mutacional.

Depois de verificar a importância de mutações no gene *TP53* para geração de um perfil hipermutado, foi verificado, no total de mutações presentes no gene, quais delas seriam exclusivas de cada grupo, tanto do perfil hipermutado quanto do perfil não hipermutado. Com a construção de um diagrama de Venn, das 205 mutações encontradas em *TP53*, 79 (38,5%) foram exclusivas do grupo hipermutados, 94 (45,8%) dos não-hipermutados e 32 (15,6%) comuns aos dois grupos.

### Mutações em TP53

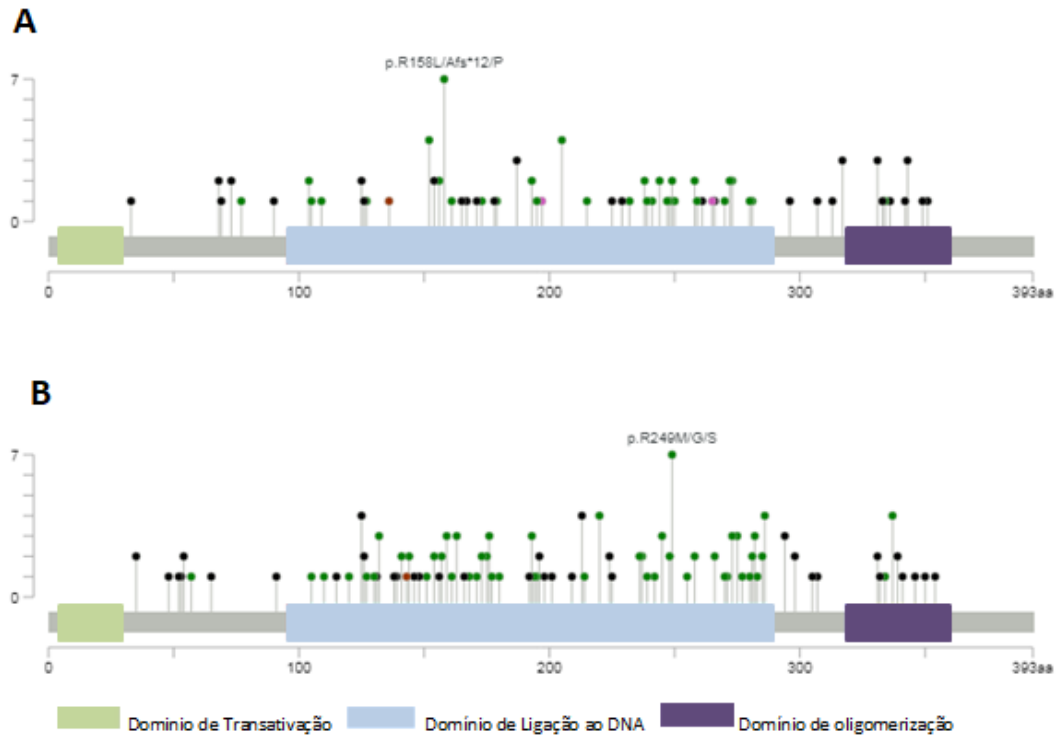


**Figura 6. Mutações em TP53. Dentre o total de mutações no gene identificadas, 32 se mostraram presentes em ambos grupos, enquanto mutações exclusivas ocorreram na mesma proporção nos tumores com carga mutacional > 10 e < 10 mutações por Megabase.**

#### 4.5 Localização das mutações em TP53

As mutações em *TP53* se localizaram majoritariamente no domínio de ligação ao DNA, em ambos grupos de carga mutacional. O domínio de transativação não se mostrou comprometido, que corresponde ao domínio de interação com o gene *MDM2*. Houve mutações em regiões não funcionais, o que leva ao entendimento que tais mutações mudam a conformação da proteína e, portanto afetam diretamente seu dobramento e funcionamento.

Nos tumores com perfil hipermutado (**Figura 7A**) a mutação R158afs\*12P, com ocorrência apenas neste perfil, localizada na região de ligação ao DNA, foi a mais frequente, ocorrendo em 7 de 111 casos. Este domínio também foi o que apresentou maior taxa de mutações nos casos com perfil não hipermutado, com as mutações R249M/G/S aparecendo como as mais frequentes. Comparando os perfis hipermutados e não-hipermutados, parece não haver um domínio que tenha uma maior frequência de mutações em nenhum dos grupos (**Figura 7A/B**).



**Figura 7. Localização das mutações presentes no gene *TP53* e seus domínios funcionais. O eixo X representa o tamanho total do gene e sua sequência de aminoácidos. O eixo Y representa o número de mutações presentes. Cada domínio foi identificado com caixas e os pontos representam uma mutação com troca de aminoácidos na sequência.**

## 5. DISCUSSÃO

Carga mutacional (TMB) é um biomarcador emergente, relacionado à resposta a inibidores de *checkpoint* do sistema imune e que vem demonstrando-se um melhor preditor de eficácia a resposta à imunoterapia do que com a própria expressão de PD-L1 ou PD-1, medido por imunohistoquímica. A distribuição do padrão de carga mutacional, e o grupo específico de pacientes com alta carga mutacional não são bem caracterizados no cenário atual para a maioria de tipos de câncer (CHALMERS et al., 2017) .

Embora nos últimos anos a imunoterapia venha mostrando ser uma promessa no tratamento de diversos tipos de câncer, a resposta ao tratamento parece ser mais acentuada em casos de câncer de bexiga, pulmão, rim e pele do tipo melanoma, bem como em tumores nos quais os genes que coordenam os mecanismos de reparo de

malpareamentos no DNA estejam deficientes (justamente casos em que a carga mutacional é alta) (ROSENBERG et al., 2016).

Supõe-se que em tumores com uma alta carga mutacional haja também uma alta carga de produção de neoantígenos, que são alvos diretos de ativação de células de sistema imune. Borghaei *et al.*(2018) demonstraram que o perfil de carga mutacional foi um marcador mais efetivo para prever resposta ao tratamento com inibidores de *checkpoint* do que a taxa de expressão de PD-L1 por si.

Ainda que a quantificação da carga mutacional por sequenciamento de genoma seja um bom preditivo de sensibilidade do câncer à imunoterapia, os elevados custos e o trabalho operacional para a análise individual de cada paciente trazem limitações para tais abordagens. Sendo assim, seria de interesse desenvolver painéis gênicos, como o proposto neste trabalho, que pudessem permitir uma inferência acerca do perfil mutacional sem realizar sequenciamento total do genoma. Neste estudo exploratório foi realizada análise do total de possíveis genes preditores de perfil hipermutado, juntamente com a análise de co-ocorrência de mutação em *TP53*.

A perda de função de p53, atividade de reparo em DNA por mutações somáticas, perda de número de cópias do gene ou silenciamento epigenético aumentam a o dano ao DNA total, sendo atividades associadas a um aumento na frequência mutacional. Mutações que levam à perda de função de p53 são muito comuns na maioria dos tumores e a perda da integridade de seu gene é crucial para o processo de tumorigênese. (PETITJEAN et al., 2007). No presente trabalho, observamos que presença de mutações em *TP53* parece ser um dos principais fatores para a caracterização de um perfil hipermutado, sendo ainda mais relevante que o número total de genes *drivers* mutados.

Nossos resultados sugerem que não há um tipo de mutação específica em *TP53* relacionado a uma alta carga mutacional nos tumores, mas as mutações e sua consequente perda de função parecem ter um papel direto e sinérgico com mutações em genes *drivers* como um bom indicativo de perfil hipermutado.

## 6. CONCLUSÃO

A busca por um melhor entendimento dos fatores associados à indução de um perfil de hipermutação no adenocarcinoma de pulmão é necessária para que esse evento importante que resulta na sensibilidade a tratamento com inibidores de *checkpoint* seja



reconhecido e direcionado adequadamente a escolha do tratamento. Nossos resultados demonstraram que mutações em *TP53* parecem estar mais frequentemente associadas a um perfil hipermutado. Os mecanismos biológicos subjacentes para explicar essa associação precisam ainda ser elucidados.

## Referências:

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nat Methods**, v. 7, n. 4, p. 248-9, Apr 2010. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354512> >.

ANAGNOSTOU, Valsamo et al. Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Discovery**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.264-276, 28 dez. 2016. American Association for Cancer Research (AACR).  
Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;

BORGHAEI, H. et al. 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**, v. 36, n. 15\_suppl, p. 9001-9001, 2018/05/20 2018. ISSN 0732-183X.

CAMPBELL, J. D. et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. **Nat Genet**, v. 48, n. 6, p. 607-16, 06 2016. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158780> >.

CHALMERS, Zachary R. et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. **Genome Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-14, 19 abr. 2017. Springer Nature.

CHALMERS, Zachary R. et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. **Genome Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-14, 19 abr. 2017. Springer Nature.

CHOI, Y. et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46688, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056405> >.

CHOI, Y.; CHAN, A. P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. **Bioinformatics**, v. 31, n. 16, p. 2745-7, Aug 2015. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25851949> >.

COLAPRICO, A. et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 8, p. e71, 05 2016. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26704973> >.

COLLISSON, Eric A. et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**, [s.l.], v. 511, n. 7511, p.543-550, 9 jul. 2014. Springer Nature.  
*Engl J Med*. 2012;366:2443–54.

GOVINDAN, Ramaswamy et al. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. **Cell**, [s.l.], v. 150, n. 6, p.1121-1134, set. 2012. Elsevier BV.

JIANG, Liyan et al. PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 16, p.26845-26857, 2 mar. 2017. Impact Journals, LLC.

LORTET-TIEULENT, J. et al. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. **Lung Cancer**, v. 84, n. 1, p. 13-22, Apr 2014. ISSN 1872-8332.

LU, Yong-chen; ROBBINS, Paul F.. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. **Seminars In Immunology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.22-27, fev. 2016. Elsevier BV.

MCLAREN, W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biol**, v. 17, n. 1, p. 122, 06 2016. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268795> >

NETWORK, C. G. A. R. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 543-50, Jul 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25079552> >.

OZLÜ, T.; BÜLBÜL, Y. Smoking and lung cancer. **Tuberk Toraks**, v. 53, n. 2, p. 200-9, 2005. ISSN 0494-1373

PAO, W.; GIRARD, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 2, p. 175-80, Feb 2011. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277552> >.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:252–264.

PEIFER, M. et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. **Nat Genet**, v. 44, n. 10, p. 1104-10, Oct 2012. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941188> >.

PETITJEAN, Audrey et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.622-629, jun. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20495>.

PIRKER, R.; FILIPITS, M. Personalized treatment of advanced non-small-cell lung cancer in routine clinical practice. **Cancer Metastasis Rev**, v. 35, n. 1, p. 141-50, Mar 2016. ISSN 1573-7233.

RIZVI, N. A. et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. **Science**, [s.l.], v. 348, n. 6230, p.124-128, 12 mar. 2015. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

ROSENBERG, Jonathan e et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **The Lancet**, [s.l.], v. 387, n. 10031, p.1909-1920, maio 2016. Elsevier BV.

SCAGLIOTTI, G. V. et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 21, p. 3543-51, Jul 2008. ISSN 1527-7755.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et WANG, Rong-fu; WANG, Helen y. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. **Cell Research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.11-37, 27 dez. 2016. Springer Nature.

GLOBOCAN - World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC) [homepage on the Internet]. Lyon: IARC; c2018