U.PORTO

MESTRADO

MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR

Caracterização molecular do cancro do pulmão na população portuguesa

Variantes acionáveis e Variantes não acionáveis

Cátia Sofia de Sousa Pereira

M

2023

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular
Cátia Sofia de Sousa Pereira

Caracterização molecular do cancro do pulmão na população portuguesa

Variantes acionáveis e Variantes não acionáveis

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina e Oncologia Molecular submetida à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Orientador: Professor Doutor Fernando Schmitt
Afiliação: Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Diretor do Laboratório Associado RISE (Rede de Investigação em Saúde)

Coorientador: Mestre Luís Cirnes
Afiliação: IPATIMUP

Agradecimentos

Gratidão, sentimento que torna um caminho mais leve e que nos faz acreditar é possível … basta continuar!!!

Neste sentido, gostaria de deixar umas palavras de apreço a todos os quantos, de forma direta ou indireta, permitiram que este percurso fosse feito.

Em primeiro lugar, à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e à Comissão Organizadora do Mestrado MOM, representada na pessoa do Professor Doutor Henrique Almeida, é de louvar o cuidado na construção de uma formação tão rica em termos de conteúdo e contacto com o pensamento crítico de profissionais que partem da experiência do terreno para discutirem connosco o conhecimento que aportam em si.

Agradeço ao meu orientador, o meu GPS, Professor Doutor Fernando Schmitt, por se manter sempre à frente com as atualizações do conhecimento que reúne em si, por saber o destino e quais as rotas para o alcançar, mas sobretudo pela disponibilidade e paciência infindáveis do "Recalculando …". Obrigada por todas as colocações na rota e OBRIGADA por me ter confiado a um conjunto de profissionais cujo trabalho incansável, selado com um sorriso no rosto, possibilitou eu estar aqui hoje …

Expresso a minha gratidão ao meu coorientador, Mestre Luís Cirnes, pela generosidade em me abrir a porta e me convidar a entrar numa área que é "a sua"! Obrigada pelo GPS recomendado! E Obrigada por todo o teu empenho e disponibilidade na aproximação e sincronização da clínica e do laboratório em prol da nossa razão de existir … o doente.

Mary e Bruno Escudeiro, para vocês … não há palavras para a grandeza de pessoa(s) que sois!!! Sois a prova que há bondade na vida, que há corações generosos que nos tocam a alma e nos fazem seguir com a certeza de que "façamos tudo como se tudo dependesse de nós, no que vai além o auxílio aparece!" … a vós, o meu mais profundo OBRIGADA!!! … estou certa que nunca vos faltará a ajuda necessária!

Agradeço ainda, ao núcleo de pós-graduação representado na pessoa da Dra. Susana Reis. Obrigada por toda a disponibilidade e paciência perante as minhas dúvidas e limitações de compreensão!!! Sem a vossa intervenção, sem os vossos alertas, nada disto seria possível!!! E, neste âmbito, tenho de expressar novamente a minha gratidão à Faculdade de Medicina, na pessoa do seu Diretor Professor Doutor Altamiro da Costa Pereira, e ao Conselho Executivo pelo "Sim" em meio às minhas falhas (de todo não intencionais).

À minha equipa do dia-a-dia, Obrigada!!! Mesmo na ausência de um conhecimento explícito de que acrescia ainda o papel de estudante, foi providência de alentos que restauraram as forças

… Faço particular menção às eternas "meninas do LDG": a minha já referida Mary, a minha camarada Márcia, a minha compincha Diana, a minha eterna parceira **Sofia** e a nossa experiência Sónia Sousa)… Adiciono também a Regina, cuja discrição me falou mais do que pensa; o meu rezingão preferido mas sempre lá, Pedro Simas Leite; e o professor Sérgio Castedo, exemplo concreto de quem ajuda com uma mão sem que a outra o saiba!

Numa vertente mais pessoal, sou grata por todos os sorrisos e cuidados ministrados pelos profissionais, de modo especial os do HSJ, com quem tive o privilégio de contactar ao longo do último ano … Professor Fernando Osório, Dr. Nuno Tavares, Enfermeira Margarida, Auxiliar Paulinha, Sr. Silva, a vós e a todos os quantos representais, o meu mais puro OBRIGADA!!!

E, eis que chego à raiz, àqueles que nos suportam e nos mantêm firmes em meio às tempestades, àqueles que se colocam debaixo da mesma cruz, da cruz que é nossa, e a tornam mais leve para que possamos recuperar forças, para que nos possamos concentrar naquilo que, de momento, requer mais de nós … Aqueles são Estes, a minha família – Pai, Mãe, Irmã e Irmão – que tantas vezes acolheram aqueles que me foram confiados, aqueles pelos quais tenho uma responsabilidade maior no cuidado, na edificação, no Amor … a Vós, OBRIGADA!!!

Quanto a ti filho, reuniste em ti a dualidade, foste quem mais me desviou, foste quem mais me firmou … sei que ainda és pequeno demais para teres uma consciência clara disso mas acredita foste sábio conselheiro, foste sábio interrogador … OBRIGADA!!!

Por fim, o meu cônjuge, aquele que está sob o mesmo jugo, este trabalho tem tanto de meu como teu! Fomos efetivamente "um", abraçamos ambos o mesmo propósito, porém executando tarefas diferentes, funções complementares!!! Claramente o caminho foi longo e a carga a ser levada por dois, tu a tomaste para ti, quando não fui eu própria a ser carregada! Pelo que te predispôs e pelo que emergiu de todo o teu esforço, de todo o teu sacrifício, de todo o teu desgaste … OBRIGADA!!!

Peço perdão pela extensão deste excerto mas é quando nos experimentamos limitados que os nossos olhos veem com apurada nitidez a bondade que há no outro!!! =)

Índice

Índice de Figuras 3

Índice de Tabelas 3

Abreviaturas 5

Resumo 11

Abstract 13

Introdução 15

Subtipos histológicos 17

Carcinogénese e perfil molecular 20

Abordagens terapêuticas no cancro do pulmão 25

Terapias direcionadas a alvos moleculares 26

Imunoterapia 37

Objetivos 41

Material e métodos 43

Dados demográficos e clinicopatológicos 43

Classificação das neoplasias pulmonares e estadiamento 44

Análise molecular 44

Análise estatística 44

Ética e confidencialidade 45

Resultados 47

Caracterização da população amostrada 47

Análise molecular 48

Distribuição das variantes acionáveis na população amostrada 49

Distribuição das variantes não acionáveis na população estudada 54

Genes/variantes concomitantes a variantes acionáveis 60

Expressão de PD-L1 62

Discussão 65

Conclusão 75

Referências bibliográficas 77

Anexos 91

Anexo I Fármacos dirigidos a alvos moleculares aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) 92

Anexo II Amostras biológicas estudadas molecularmente 96

Anexo III Painel *Oncomine Focus Assay* 97

Anexo IV Amostras tumorais com variantes nos genes acionáveis 99

Anexo V Distribuição das amostras com e sem variantes acionáveis 102

Anexo VI Distribuição das variantes não acionáveis em função da concomitância a variantes acionáveis 105

Anexo VII Distribuição das amostras de acordo com o gene alterado e a histologia do tumor 107

Índice de Figuras

Figura 1 *– Distribuição geográfica das taxas de incidência (/100.000 pessoas-ano) padronizada (população europeia padrão) de cancro do pulmão em 2019* 16

Figura 2 *– Taxas de incidência padronizadas (população europeia padrão) dos tumores da traqueia, laringe e pulmão (topografias C33-34) facultadas nas publicações do Registo Oncológico Nacional (RON)* 17

Figura 3 *– Distribuição das frequências relativas das amostras biológicas dos casos admitidos a estudo* [*in* Anexo II]..... 96

Figura 4 *– Distribuição das variantes acionáveis, das potenciais resistências e da expressão de PD-L1 em função da histologia do tumor* [*in* Anexo V].. 102

Índice de Tabelas

Tabela 1 *– Critérios de identificação da componente invasiva dos adenocarcinomas*..... 18

Tabela 2 *– Padrões de crescimento dos adenocarcinomas reconhecidos na classificação da Organização Mundial da Saúde (2021) e respetivos valores prognósticos*..... 19

Tabela 3 *– Classificação das variantes de BRAF segundo a sua dependência de RAS e nível de atividade*..... 29

Tabela 4 *- Caracterização e distribuição da população estudada pelos diferentes tipos de neoplasias do pulmão segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (2021) dos tumores do tórax*..... 47

Tabela 5 *– Variantes somáticas com fármacos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) no tratamento do cancro do pulmão* [*in* Anexo I]..... 92

Tabela 6 *– Distribuição da proveniência (Região de Portugal) dos casos admitidos a estudo* [*in* Anexo II] 96

Tabela 7 *– Lista de genes cobertos pelo painel* Oncomine Focus Assay *e respetivos NM* [*in* Anexo III] 97

Tabela 8 *– Distribuição das amostras tumorais com variantes nos genes acionáveis em função dos dados demográficos e clinicopatológicos* [*in* Anexo IV] 99

Tabela 9 *– Distribuição das variantes não acionáveis em função da presença/ausência de variantes acionáveis na amostra* [*in* Anexo VI]..... 105

Tabela 10 *– Repartição das amostras com variantes identificadas nos genes listados em função da classificação histológica do tumor* [*in* Anexo VII]..... 107

Abreviaturas

Acrónimo	Designação
ABL1	Símbolo oficial do gene *ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*
A	Adenina
ADC	Adenocarcinoma
ADCi	Adenocarcinoma invasivo
ADCmi	Adenocarcinoma minimamente invasivo
AKT1	Símbolo oficial do gene *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*
AKT3	Símbolo oficial do gene *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3*
ALK	Símbolo oficial do gene *Anaplastic lymphoma receptor tyrosine Kinase*
ANOVA	Teste estatístico de análise das variâncias [do inglês, *ANalysis Of Variance*]
AR	Símbolo oficial do gene *Androgen receptor*
ARID1A	Símbolo oficial do gene *AT-rich interaction domain 1A*
ASCL1	Símbolo oficial do gene *Achaete-scute family bHLH transcription factor 1*
ASR	Taxa padronizada por idade [do inglês, *Age-standardized rate*]
ATP	Adenosina trifosfato
AXL	Símbolo oficial do gene *AXL receptor tyrosine kinase*
BHE	Barreira hematoencefálica
BRAF	Símbolo oficial do gene *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*
C	Citosina
CAE	Carcinoma adenoescamoso
CBL	Símbolo oficial do gene *Casitas B-lineage Lymphoma*
CCDC6	Símbolo oficial do gene *Coiled-coil domain containing 6*
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCND1	Símbolo oficial do gene *Cyclin D1*
CCNE1	Símbolo oficial do gene *Cyclin E1*
CD74	Símbolo oficial do gene *CD74 molecule*
CDK4	Símbolo oficial do gene *Cyclin dependent kinase 4*
CDK6	Símbolo oficial do gene *Cyclin dependent kinase 6*
CDKN2A	Símbolo oficial do gene *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*
CeTDM	Caso(s) elegível(is) a terapia(s) dirigida(s) a alvos moleculares

CGC	Carcinoma de grandes células
CNG	Ganho no número de cópias [do inglês, *Copy number gain*]
CNGC	Carcinoma neuroendócrino de grandes células
CNV	Variação no número de cópias [do inglês, *Copy number variation*]
CPNPC	Carcinoma pulmonar de não pequenas células
CPPC	Carcinoma pulmonar de pequenas células
CREBBP	Símbolo oficial do gene *CREB binding protein*
CS	Carcinoma sarcomatóide
CTLA-4	Antigénio 4 de linfócito T citotóxico [do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated protein 4*]
CTNNB1	Símbolo oficial do gene *Catenin beta 1*
CUL3	Símbolo oficial do gene *Cullin 3*
DDR2	Símbolo oficial do gene *Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2*
DLL3	Símbolo oficial do gene *Delta like canonical Notch ligand 3*
DNA	Ácido desoxirribonucleico [do inglês: *deoxyribonucleic acid*]
EGFR	Símbolo oficial do gene *Epidermal growth factor receptor*
EML4	Símbolo oficial do gene *EMAP like 4*
EP300	Símbolo oficial do gene *E1A binding protein p300*
ERG	Símbolo oficial do gene *ETS transcription factor ERG*
ESR1	Símbolo oficial do gene *Estrogen Receptor 1*
ETV1	Símbolo oficial do gene *ETS variant transcription factor 1*
ETV4	Símbolo oficial do gene *ETS variant transcription factor 4*
ETV5	Símbolo oficial do gene *ETS variant transcription factor 5*
EZR	Símbolo oficial do gene *Ezrin*
FDA	*Food and Drug Administration*
FGFR1	Símbolo oficial do gene *Fibroblast growth factor receptor 1*
FGFR2	Símbolo oficial do gene *Fibroblast growth factor receptor 2*
FGFR3	Símbolo oficial do gene *Fibroblast growth factor receptor 3*
FGFR4	Símbolo oficial do gene *Fibroblast growth factor receptor 4*
Fisher	Teste exato de Fisher
G	Guanina
GC	Guanina-Citosina
GH	Teste *post-hoc* Games-Howell
GLR	Gânglios linfáticos regionais

GNA11	Símbolo oficial do gene *G protein subunit alpha 11*
GNAQ	Símbolo oficial do gene *G protein subunit alpha Q*
HER2	Símbolo oficial do gene *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2*
HER3	Símbolo oficial do gene *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 3*
HER4	Símbolo oficial do gene *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4*
HH	Símbolo oficial do gene *Hedgehog*
HRAS	Símbolo oficial do gene *HRAS proto-oncogene, GTPase*
IDH1	Símbolo oficial do gene *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1*
IDH2	Símbolo oficial do gene *Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2*
IHQ	Imunohistoquímica
Ipatimup	Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
ICI	Inibidores de pontos de controlo imunológico
JAK1	Símbolo oficial do gene *Janus kinase 1*
JAK2	Símbolo oficial do gene *Janus kinase 2*
JAK3	Símbolo oficial do gene *Janus kinase 3*
KEAP1	Símbolo oficial do gene *Kelch like ECH associated protein 1*
KIF5B	Símbolo oficial do gene *Kinesin family member 5B*
KIT	Símbolo oficial do gene *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*
KMT2D	Símbolo oficial do gene *Lysine methyltransferase 2D*
KRAS	Símbolo oficial do gene *KRAS proto-oncogene, GTPase*
LRE	Leucina-Arginina-Glutamato
LRP1B	Símbolo oficial do gene *LDL receptor related protein 1B*
MAP2K1	Símbolo oficial do gene *Mitogen-activated protein kinase kinase 1*
MAP2K2	Símbolo oficial do gene *Mitogen-activated protein kinase kinase 2*
MAP3K1	Símbolo oficial do gene *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogéneo [do inglês *Mitogen-activated protein kinase*]
MDM2	Símbolo oficial do gene *MDM2 proto-oncogene*
MET	Símbolo oficial do gene *MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*
mTOR	Símbolo oficial do gene *Mechanistic target of rapamycin kinase*
MYC	Símbolo oficial do gene *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*
MYCL	Símbolo oficial do gene *MYCL proto-oncogene, bHLH transcription factor*
MYCN	Símbolo oficial do gene *MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor*
NCCN®	*National Comprehensive Cancer Network®*

NCOA4 Símbolo oficial do gene *Nuclear receptor coactivator 4*

NF1 Símbolo oficial do gene *Neurofibromin 1*

NFE2L2 Símbolo oficial do gene *NFE2 like bZIP transcription factor 2*

NKX2-1 Símbolo oficial do gene *NK2 homeobox 1*

NOTCH1 Símbolo oficial do gene *Notch receptor 1*

NRAS Símbolo oficial do gene *NRAS proto-oncogene, GTPase*

NRG1 Símbolo oficial do gene *Neuregulin 1*

NTRK1 Símbolo oficial do gene *Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1*

NTRK2 Símbolo oficial do gene *Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2*

NTRK3 Símbolo oficial do gene *Neurotrophic receptor tyrosine kinase 3*

OFA *Oncomine Focus Assay*

OMS Organização Mundial da Saúde

ORR Taxa de resposta objetiva [do inglês, *Objective response rate*]

OS Sobrevida geral [do inglês, *Overall survival*]

PASK Símbolo oficial do gene *PAS domain containing serine/threonine kinase*

PD-1 Proteína de morte celular programada 1 [do inglês, *Programmed cell death protein 1*]

PDGFRA Símbolo oficial do gene *Platelet derived growth factor receptor alpha*

PD-L1 Ligando da proteína de morte celular programada 1 [do inglês, *Programmed cell death-ligand 1*]

PFS Sobrevida livre de progressão [do inglês, *Progression free survival*]

PI(3)K Fosfatidilinositol-3-cinase [do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*]

RICTOR Símbolo oficial do gene *RPTOR independent companion of MTOR complex*

PIK3CA Símbolo oficial do gene *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PKB Símbolo oficial do gene *Rac-beta serine/threonine protein kinase, putative*

PPARG Símbolo oficial do gene *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*

PTEN Símbolo oficial do gene *Phosphatase and tensin homolog*

RAF1 Símbolo oficial do gene *Raf-1 Proto-oncogene, serine/threonine kinase*

RASA1 Símbolo oficial do gene *RAS p21 protein activator 1*

RB1 Símbolo oficial do *gene RB transcriptional corepressor 1*

RBL1 Símbolo oficial do gene *RB transcriptional corepressor like 1*

RBL2 Símbolo oficial do gene *RB transcriptional corepressor like 2*

RBM10 Símbolo oficial do gene *RNA binding motif protein 10*

RET	Símbolo oficial do gene *RET proto-oncogene*
RIT1	Símbolo oficial do gene *Ras like without CAAX 1*
RNA	Ácido ribonucleico [do inglês: *Ribonucleic acid*]
RON	Registo Oncológico Nacional
ROS1	Símbolo oficial do gene *ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*
RTK	Recetor tirosina quinase [do inglês, *Receptor tyrosine kinase*]
SDC4	Símbolo oficial do gene *Syndecan 4*
SETD2	Símbolo oficial do gene *SET domain containing 2, histone lysine*
SLC34A2	Símbolo oficial do gene *Solute carrier family 34 member 2*
SMARCA4	Símbolo oficial do gene *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*
SMO	Símbolo oficial do gene *Smoothened, frizzled class receptor*
SNC	Sistema nervoso central
SOE	Sem outra especificação
SOX2	Símbolo oficial do gene *SRY-box transcription factor 2*
STK11	Símbolo oficial do gene *Serine/threonine kinase 11*
STRN	Símbolo oficial do gene *Striatin*
T	Timina
TDM	Terapia(s) dirigida a alvo molecular
T-Dxd	Trastuzumab Deruxtecan
TERT	Símbolo oficial do gene *Telomerase reverse transcriptase*
TGFB1	Símbolo oficial do gene *Transforming growth factor beta 1*
TKI	Inibidores tirosina quinase [do inglês, *Tyrosine kinase inhibitor*]
TMB	Carga mutacional do tumor [do inglês, *Tumor mutational burden*]
SHM1	Símbolo oficial do gene *Glycine hydroxymethyltransferase SHM1*
TP53	Símbolo oficial do gene *Tumor protein p53*
TP63	Símbolo oficial do gene *Tumor protein p63*
TP73	Símbolo oficial do gene *Tumor protein p73*
TRK	Recetor tropomiosina quinase [do inglês, *Tropomyosin receptor kinase*]
TTF-1	Fator de Transcrição da Tiroide 1 [do inglês, *Thyroid transcription factor-1*]
U2AF1	Símbolo oficial do gene *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*
VAc	Variante(s) acionável(is)
VnAc	Variante(s) não acionável(is)
$\chi 2$	Teste Qui-quadrado de Pearson

Resumo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o cancro do pulmão tem sido a doença oncológica mais incidente mas também a mais mortal. Em cerca de 80%, o tabaco encontra-se envolvido na sua etiologia. O adenocarcinoma (ADC) constitui a principal forma de apresentação e, como nas demais histologias tumorais, a sua distribuição tem variado com fatores de ordem demográfica, ambiental e comportamental. As alterações moleculares subjacentes tendem a acompanhar algumas destas variações e o valor preditivo que aportam pode traduzir-se em consideráveis diferenças na qualidade e sobrevida dos doentes, ao ditarem a elegibilidade a terapias dirigidas a alvos moleculares (TDM). O presente trabalho teve como propósito a avaliação do envolvimento de determinados genes na carcinogénese pulmonar bem como da incidência das variantes acionáveis (VAc) e não acionáveis (VnAc) na população portuguesa.

Numa análise retrospetiva, foram admitidos a estudo os dados demográficos, clinicopatológicos e moleculares de 1987 doentes previamente anonimizados. Os seus carcinomas pulmonares foram estudados via painel *Oncomine Focus Assay* (OFA; *Thermo Fisher Scientific*, Cat. No. A28548). A análise estatística foi efetuada para um nível de significância de 0,05 usando o *Statistical Package for the Social Sciences Statistics* (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Os doentes foram predominantemente do sexo masculino (63,1%). O tabaco esteve subjacente a 72,4% dos casos analisados e o seu consumo ativo traduziu-se numa idade média inferior (61,6 ± 9,8 anos). O tipo histológico mais frequente foi o ADC (89,3%). Os genes alterados e as respetivas variantes distribuíram-se diferencialmente em função da histologia, sexo e hábitos tabágicos. *KRAS* (26,5%), *EGFR* (23,3%) e *MET* (6,4%) foram os genes mais comummente alterados. As amplificações génicas e o *skipping* do *MET* foram mais prevalentes no carcinoma de células escamosas (CCE), enquanto que os rearranjos foram mais incidentes nas mulheres e nos não fumadores. Nos casos com VAc, *EGFR*, *KRAS* e *MET* seriam prováveis alvos terapêuticos em 44,5%, 21,1% e 12,4%, respetivamente. Em 8,5% das amostras, as VAc foram acompanhadas de variantes compatíveis com mecanismos de resistência *on-target* e 121 alterações fora do gene-alvo podiam ser indicadas como causadoras de uma possível progressão tumoral. Adicionalmente, foram encontradas associações entre a expressão de PD-L1 e alterações moleculares, nomeadamente *CTNNB1* e *EGFR* associados a PD-L1<50% e as variantes de *KRAS* e *MET* em amostras com PD-L1≥50%.

Em suma, (1) os resultados obtidos encontram-se maioritariamente em consonância com o relatado no cancro do pulmão em populações ocidentais; (2) as TDM poderiam ser atualmente

em Portugal uma opção em, pelo menos, metade dos doentes de estadios avançados da doença; e (3) a análise molecular somática passará provavelmente, num futuro próximo, pelo alargamento dos seus propósitos bem como do painel de genes de estudo recomendado.

Palavras-chave: Cancro do pulmão; Variantes somáticas; Terapias dirigidas; Inibidores moleculares; Imunoterapia; Resistências.

Abstract

According to the World Health Organization (WHO), lung cancer has been the most common oncological disease, but also the deadliest. About 80% is associated with tobacco in its etiology. Adenocarcinoma (ADC) is the predominant histological type and, as other lung carcinomas, its distribution depends on demographic, environmental and behavioral factors. The molecular variants tend to accompany some of these variations and their predictive value can translate into considerable differences in the life quality and survival of patients, by dictating eligibility for targeted therapies. The purpose of the present work was to evaluate the involvement of certain genes in lung carcinogenesis as well as the incidence of actionable (VAc) and non-actionable (VnAc) variants in the Portuguese population.

In a retrospective study, the data of 1987 patients previously anonymized was admitted. The data included demographic and clinicopathological information as well as the molecular analyses obtained by sequencing of their sampled lung carcinomas via the *Oncomine Focus Assay* panel (*Thermo Fisher Scientific*, Cat. No. A28548). Statistical analysis was performed at a significance level of 0,05 using the *Statistical Package for the Social Sciences Statistics* (*IBM SPSS Statistics for Windows*, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp).

The patients were predominantly male (63,1%). Smoking history was underlying 72,4% of the cases and its active consumption resulted in a lower average age (61,6 ± 9,8 years). The most common histological type was ADC (89,3%). The mutated genes and their variants were distributed differentially depending on histological type, gender and smoking habits. *KRAS* (26,5%), *EGFR* (23,3%) and *MET* (6,4%) were the most recurrently altered genes. Gene amplifications and *MET skipping* were more prevalent in squamous cell carcinoma, while rearrangements were more common in women and non-smokers. In cases with VAc, *EGFR*, *KRAS* and *MET* would be likely therapeutic targets in 44,5%, 21,1% and 12,4%, respectively. In 8,5% of the samples, VAc were accompanied by variants compatible with *on-target* resistance mechanisms and 121 *off-target* variants could be indicated as possible causes of tumor progression. Additionally, PD-L1 expression and molecular variants were correlated, namely *CTNNB1* and *EGFR* variants were more frequent in samples with PD-L1<50% and *KRAS* and *MET* in samples with PD-L1≥50%.

In conclusion, (1) the results were mostly consistent with reported data in western lung carcinomas; (2) targeted therapy could currently be an option for at least half of patients with advanced lung disease in Portugal; and (3) in the near future, somatic molecular analysis could expand its purposes as well as the recommended gene panel.

Key-words: Lung cancer; Somatic variants; Targeted therapies; Molecular inhibitors; Immunotherapy; Resistances

Introdução

Ao longo dos últimos anos, o cancro tem sido revisto como uma das principais causas de morte chegando mesmo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a superar a fatalidade das doenças cardíacas coronárias e dos acidentes vasculares cerebrais em alguns países[1–4]. A sua incidência, em 2020, foi estimada pela GLOBOCAN em 19,3 milhões de novos casos, quase o dobro da registada em 2002 (10.9 milhões), e a mortalidade teve um aumento de aproximadamente 48,0% no mesmo período (10.0 milhões vs. 6,7 milhões, respetivamente)[1,3].

O cancro do pulmão tem sido a doença oncológica mais comummente diagnosticada desde 1985 a nível mundial. Em 2020, segundo o observatório global para o cancro, este foi ultrapassado pelo cancro da mama em 0,3 pontos percentuais (11,4% vs. 11,7% de todos os cancros mundiais independentemente do sexo) mas continua a ser o cancro mais mortal (18,0% das mortes por cancro)[1,3,5]. Nos homens, o cancro do pulmão continuou a ser o cancro mais incidente com uma taxa padronizada por idade [do inglês, *Age-standardized rate* (ASR)] de 31,5 por 100.000 pessoas-ano, superior às registadas no cancro da próstata (30,7) e no cancro gástrico (15,8)[3]. As mulheres totalizaram 34,9% dos novos casos de cancro do pulmão, máximo histórico desde 2002[3]. Embora não explique a totalidade dos cancros do pulmão, o tabaco tem sido apontado como o principal fator de risco. Nas populações ocidentais, chega a ser responsável por mais de 80% dos novos casos e o seu impacto sobre a mortalidade no cancro do pulmão tem sido estimada em 70% nos homens e 51% nas mulheres[2,3,6]. Apesar de, nos países com altos níveis de desenvolvimento humano, a incidência do cancro do pulmão já ter começado a diminuir (particularmente nos homens), crê-se que o número de novos casos continue a aumentar nas próximas décadas devido ao facto de, nos países em desenvolvimento, o consumo de tabaco estar em crescimento ou de ter atingido recentemente o pico[2,3].

Segundo o Registo Oncológico Nacional (RON)[7], em 2019, foram registados em Portugal 5208 novos casos de cancro do pulmão (9,0% do total de casos registados). Com uma taxa de incidência de 32,2 (/100000 pessoas-ano), constituiu o segundo cancro mais frequente em Portugal e o primeiro mais mortal (15,4% da mortalidade por cancro). Os distritos do Porto, Faro e Lisboa tiveram as taxas de incidência mais altas – 44,9, 37,2 e 36,6 (/100000 pessoas-ano), respetivamente [Figura 1] – e nos homens o risco de cancro do pulmão foi três vezes superior ao das mulheres[7].

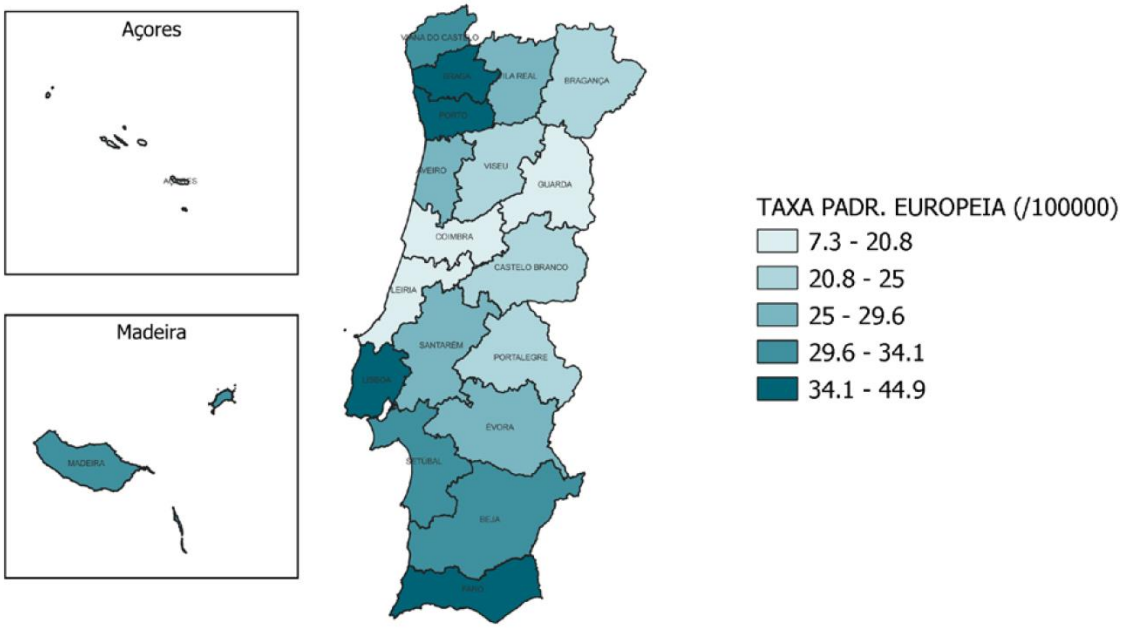


Figura 1 – Distribuição geográfica das taxas de incidência (/100.000 pessoas-ano) padronizada (população europeia padrão) de cancro do pulmão em 2019. [imagem proveniente do Registo Oncológico Nacional 2019[7]]

No decorrer das últimas décadas, a taxa de incidência padronizada (população europeia padrão) dos tumores da traqueia, brônquios e pulmão teve um aumento de, por exemplo, 64,3% entre 2001 e 2019 [Figura 2]. Embora esse acréscimo tenha sido transversal a ambos os sexos, nas mulheres foi quatro vezes superior ao dos homens – de 6,3 para 17,0 (/100000 pessoas-ano) no sexo feminino e de 35,9 para 51,0 (/100000 pessoas-ano) no masculino[7–15].

Comparativamente com outros países da Europa, Portugal tem-se caracterizado por baixas prevalências de consumo de tabaco: cerca de 30% dos homens e 17% das mulheres com idade superior a 15 anos são fumadores ativos (estimativas de 2018)[6]. Todavia, o seu envolvimento na incidência e mortalidade do cancro do pulmão em Portugal não é muito díspar do registado à escala mundial. Forjaz *et al.* (2020) estimaram que, em 2018, 73,2% dos novos casos e 74,1% das mortes foram devidas ao consumo de tabaco[6].

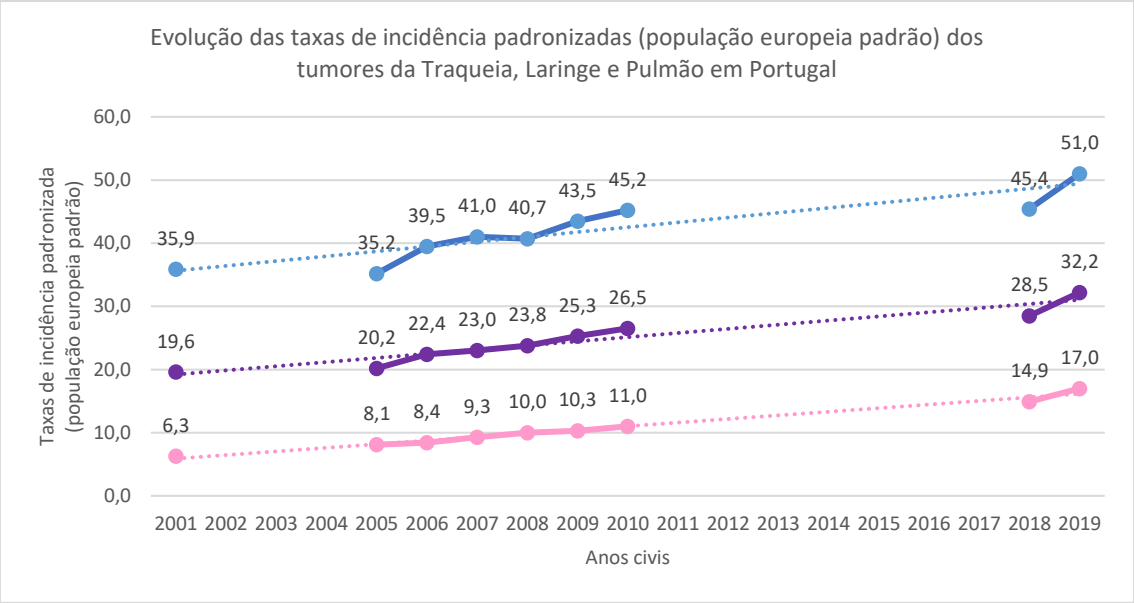


Figura 2 – Taxas de incidência padronizadas (população europeia padrão) dos tumores da traqueia, laringe e pulmão (topografias C33-34) facultadas nas publicações do RON (2001, 2005, 2006,2007,2008,2009, 2010, 2018 e 2019) para o sexo masculino (azul), feminino (rosa) e ambos (roxo)

Subtipos histológicos

Cerca de 80-85% dos tumores malignos do pulmão correspondem a adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma adenoescamoso (CAE) e a carcinoma de grandes células (CGC)[16]. Estes são conhecidos como carcinomas pulmonares de não pequenas células (CPNPC) em oposição ao carcinoma neuroendócrino mais comum: o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC). A frequência de cada subtipo histológico tem variado quer geográfica quer temporalmente em função do desenvolvimento humano e industrial das sociedades. Um exemplo é a mudança nas prevalências do ADC em detrimento do CCE com a introdução de filtros no tabaco ou a predominância do ADC entre os não fumadores de países desenvolvidos[17,18]. À exceção de escassos países como a Dinamarca e Espanha, onde o CCE ainda continua a ser o tipo histológico mais prevalente, o ADC passou a ser o principal tipo histológico com praticamente metade dos casos mundiais[19–21]. Este tumor tem a sua origem nas células do epitélio alveolar que reveste as vias áreas e, como tal, tende a expressar marcadores dos pneumócitos como Fator de Transcrição da Tiroide 1 [do inglês, *Thyroid transcription factor-1 (TTF-1)*] e Napsina A[22]. De acordo com a extensão das suas componentes invasivas, a OMS (2021) reconhece e define como: (1) ADC *in situ*, a lesão precursora do ADC composta exclusivamente por padrão lepídico e cujo diâmetro é igual ou inferior a 3cm; (2) ADC minimamente invasivo (ADCmi), o ADC solitário composto predominantemente por padrão lepídico e cuja componente invasiva não excede os 5mm; (3) ADC invasivo (ADCi), a lesão glandular maligna cuja

componente invasiva excede os 5mm e/ou que apresenta: invasão linfovascular, perineural ou da pleura; necrose tumoral; ou difusão ao longo dos espaços aéreos [Tabela 1][23]. Em 80% dos casos, o ADCi consiste numa mistura complexa de padrões arquiteturais[24,25]. Com valores prognósticos distintos, estes deverão ser registados em incrementos de 5% sendo o ADCi classificado de acordo com o padrão histológico predominante [Tabela 2][17,23,25]. O padrão cribriforme foi considerado uma variante do padrão acinar porém com características clinicopatológicas distintas e um prognóstico mais desfavorável[19].

Tabela 1 – Critérios de identificação da componente invasiva dos adenocarcinomas (ADC)

Componentes invasivas

• Qualquer padrão de crescimento excluindo o padrão lepídico:
  ○ acinar, cribriforme, micropapilar, papilar ou sólido (histologias mais comuns)
  ○ coloide, entérico, fetal e/ou mucinoso invasivo (variantes menos frequentes de ADC)
• Infiltração do estroma por células tumorais

Fatores de exclusão de ADC (minimamente) invasor
• Invasão linfovascular • Invasão perineural • Invasão da pleura • Necrose tumoral • Difusão ao longo dos espaços aéreos

Na revisão de 2021 da OMS, foram ainda reconhecidas variantes menos frequentes do ADC: ADC mucinoso invasivo, ADC coloide, ADC fetal e ADC entérico. O ADC mucinoso representa cerca de 3-10% dos ADC pulmonares[26–28]. Tal como o ADC convencional, na sua etiologia tem sido implicado o fumo do tabaco e a sua distribuição geográfica pode sofrer variações[23]. Histologicamente, caracteriza-se por células tumorais de morfologia colunar e/ou caliciforme preenchidas por abundante mucina intracelular sob um padrão lepídico[17,28]. Às vezes, podem ser observados focos invasivos acinares, (micro)papilares e de mucina intra-alveolar[17,27]. Este apresenta uma capacidade particular de invasão e, em contraste com o ADC convencional, tende a não expressar TTF-1 e Napsina A (<30%)[17,27]. Os genes e tipo de alterações envolvidos na sua patogénese também diferem do ADC não mucinoso[26–28]. As demais formas particulares do ADC são relativamente raras e com frequência o seu diagnóstico é estabelecido após exclusão de metástases oriundas de tumores primários não pulmonares[17,28].

O CCE representa cerca de 25-30% dos tumores malignos do pulmão[22,29,30]. Habitualmente oriundo das células epiteliais que revestem as vias aéreas, tem sido fortemente associado a hábitos tabágicos e ao sexo masculino[22,29]. Morfologicamente, pode ser identificado pela presença de pérolas escamosas, pontes intercelulares ou queratinização[31,32]. Por vezes, estes tumores não demonstram uma clara diferenciação escamosa[31]. Nestas situações, o estudo imunohistoquímico (IHQ) é mandatório para o diagnóstico diferencial: a positividade dos marcadores de diferenciação pavimentosa como p40 e p63 e a negatividade de TTF-1 e/ou Napsina A atestam a natureza escamosa deste carcinoma sólido[31,33,34]. Com base na sua apresentação histológica, o CCE pode ser classificado em três subtipos – queratinizante, não queratinizante e basalóide – os quais, contrariamente ao ADC, parecem não ter valor prognóstico[31].

Tabela 2 – Padrões de crescimento dos adenocarcinomas reconhecidos na classificação da Organização Mundial da Saúde (2021) e respetivos valores prognósticos [19,23,24]

Padrão de Crescimento	**Morfologia**	**Valor prognóstico**
Padrão Lepídico	Proliferação de células neoplásicas ao longo dos alvéolos, sem complexidade arquitetural nem evidências de invasão do estroma e de invasão linfovascular.	Prognóstico favorável (principalmente nos estadios I; tipicamente classificado como um tumor de baixo grau)
Padrão Acinar (*)	Formação glandular onde as células tumorais colunares se dispõem em ácinos e túbulos.	Prognóstico Intermédio
Padrão Papilar	Substituição da estrutura alveolar por estruturas papilares caracterizadas por centro fibrovasculares onde se identifica pelo menos um vaso sanguíneo. Os corpos *psamomatosos* são um achado que também pode estar presente.	Prognóstico Intermédio
Padrão Micropapilar	Arquitetura semelhante à papilar, porém com papilas de menor dimensão na ausência de centros fibrovasculares bem definidos.	Prognóstico desfavorável
Padrão Sólido	Células tumorais dispostas em ninhos sólidos	Prognóstico desfavorável
(*) Padrão Cribriforme, variante do padrão acinar		Associado a um prognóstico mais desfavorável do que o associado ao padrão acinar

O CGC e o CAE constituem tipos histológicos mais raros, com percentagens entre os 3-10% e 1-2% dos cancros do pulmão, respetivamente[22,32]. Ambos diagnósticos só podem ser realizados na peça cirúrgica, sendo o primeiro realizado por exclusão dos demais subtipos histológicos e o CAE aquando da presença de 10% (ou mais) de cada um dos seus componentes (ADC e CCE) na constituição do tumor[16,34,35].

O carcinoma sarcomatóide (CS) é ainda um outro subtipo de CPNPC menos frequente (0,1-0,4% dos cancros do pulmão)[36,37]. Caracterizado pela presença de elementos sarcomatosos (ex.: células fusiformes gigantes) aliados a uma componente epitelial (ex.: ADC, CCE ou CGC), este carcinoma de fraco prognóstico é geralmente resistente à radioterapia e à quimioterapia convencional baseada em agentes de platina[37,38].

No contexto dos carcinomas neuroendócrinos, o CPPC constitui o mais comum (13-15% dos cancros do pulmão)[39]. Caracterizado por índices proliferativos elevados (70 a 90% de positividade para o Ki67) bem como necrose extensa, este tumor pulmonar tem sido associado a um prognóstico desfavorável: rápida progressão e metástases precoces[39–41]. Histologicamente, consiste em células tumorais pequenas (redondas a fusiformes), de escasso citoplasma e bordos celulares pouco definidos, cromatina finamente granular e nucléolo discreto ou ausente[31,39]. O número de mitoses é elevado (>10 mitoses por $2mm^2$)[39,42]. A sua diferenciação neuroendócrina pode ser comprovada por marcadores como CD56, cromogranina e sinaptosina os quais são particularmente úteis aquando do diagnóstico em pequenas amostras como as biopsias[31,33]. Como o CCE, a sua etiologia tem estado fortemente associada a uma história de consumo de tabaco e a sua ocorrência tem sido mais comum entre o sexo masculino[41,43].

O carcinoma neuroendócrino de grandes células (CNGC) é igualmente um tumor indiferenciado de fraco prognóstico[44,45]. Partilha ainda com o CPPC, os altos índices proliferativos e a expressão de marcadores neuroendócrinos[44,45]. Todavia, os achados citomorfológicos são mais próximos dos CPNPC e a sua frequência é inferior à do CPPC (1-3% dos cancros do pulmão)[44,45].

Carcinogénese e perfil molecular

O cancro do pulmão caracteriza-se por um perfil mutacional único que compreende uma grande diversidade de genes e alterações genómicas. Acometendo proteínas envolvidas na transdução de sinais extracelulares, variantes com ganho de função têm culminado na ativação de genes promotores de processos básicos à progressão tumoral como a proliferação, diferenciação, crescimento e migração celulares[16]. Não obstante, mutações de perda de função em genes supressores tumorais têm sido igualmente registadas[16].

Os genes afetados e o tipo de alterações envolvidas têm prevalecido diferencialmente nos vários subtipos histológicos[46]. No ADC, cerca de 60-80% das alterações genómicas residem em genes envolvidos na via de sinalização RTK (*Receptor tyrosine kinase*)/*RAS*/*MAPK* (*Mitogen-activated protein kinase*)[47,48]. Variantes de ganho-de-função registadas na via *PI(3)K (Phosphoinositide 3-kinase)/mTOR* têm residido em 25% dos ADC, as alterações nas vias de p53 em 63% e as disfunções da via subjacente à resposta oxidativa têm sido relatadas em 22%[49]. Outros genes frequentemente mutados no ADC são os codificadores de reguladores do ciclo celular (64%), modificadores da cromatina e fatores de *splicing* (49%, conjuntamente)[49]. Embora com frequências variáveis entre populações geográficas, sexos e exposição a carcinogéneos, os oncogenes mais vulgarmente alterados no ADC são *KRAS* (33%), *EGFR* (14%), *BRAF* (10%), *PIK3CA* (7%) e *MET* (7%)[49]. As mutações pontuais são as variantes somáticas mais frequentes e geralmente traduzidas em ganho-de-função nos genes mencionados[49]. Os rearranjos envolvendo genes codificadores de RTK têm um peso significativo quer no ADC quer no próprio gene no contexto do cancro do pulmão[49,50]. *ALK*, *RET*, *ROS1* e *NTRK1* são exemplos de recetores cujas fusões génicas têm por consequência a sua ativação constitutiva[50,51]. Variações no número de cópias [do inglês, *Copy Number Variation (CNV)*] têm sido constatadas em genes como *NKX2-1* (gene codificador de TTF-1), *TERT*, *KRAS*, *EGFR*, *MET*, *CCNE1* e *CCND1* os quais, por norma, se encontram amplificados[49]. Variantes com perda-de-função têm também constado no perfil mutacional dos ADC porém em genes supressores tumorais como *TP53* (46%), *STK11* (17%), *KEAP1* (17%), *NF1* (11%), *RB1* (4%) e *CDKN2A* (4%) e com uma frequência menor que a constatada no CCE[49,50]. Nos tumores sem variantes oncogénicas conhecidas, as mutações em *TP53*, *KEAP1*, *NF1* e *RIT1* (2%) encontram-se particularmente enriquecidas[47,49]. Os genes modificadores da cromatina como *SETD2*, *ARID1A* e *SMARCA4* têm-se encontrado alterados em 9%, 7% e 6%, respetivamente. E, genes envolvidos no *splicing* do RNA – *RBM10* e *U2AF1* – têm mostrado ordenamente frequências de 8% e 3%[49]. As diferentes formas de apresentação do ADC parecem ter ligação às alterações somáticas subjacentes. O ADC mucinoso, e outros ADC caracterizados por abundante mucina, têm estado associados a uma maior frequência de mutações em *KRAS* seguidos de rearranjos em genes como *ALK*, *NRG1* e *NTRK1*[52]. No estudo de Kadota *et al.* (2014), as mutações de *KRAS* estiveram presentes em 61% das amostras de ADC mucinoso e em 85% aquando da exclusão dos ADC mistos deste grupo[53]. As transições G (Guanina) > A (Adenina) em *KRAS* foram significativamente mais frequentes entre os ADC mucinosos (50%) do que nos ADC convencionais (23%). Em contraste, *EGFR* não apresentou qualquer variante detetada em amostras de ADC mucinoso e os rearranjos de *ALK* estiveram estatisticamente associados a achados mucinosos como células em anel de sinete e mucina extracelular[53]. Os padrões de crescimento têm igualmente correlação com o perfil mutacional

do tumor. As mutações em *EGFR* têm sido mais comuns entre os ADC de padrão lepídico e micropapilar enquanto que, o padrão acinar tem sido portador de uma maior proporção de fusões em genes como *ALK*, *ROS1* e *RET*[52]. Os rearranjos de *RET* têm ainda estado ligados a histologias pouco diferenciadas e os de *ALK* associados ao padrão cribriforme[52,53]. No padrão sólido, as mutações em *TP53*, *KRAS* e *LRP1B* tem estado presentes em maior proporção do que nos demais padrões histológicos[26,54,55]. A expressão de PD-L1 (do inglês, *Programmed cell death-ligand 1*) e o TMB (do inglês, *Tumor Mutational Burden*) têm também sido reportados como significativamente superiores no padrão sólido e em amostras com mutações em *LRP1B*[55]. Li *et al.* (2021) constatou ainda que a frequência de mutações em *TP53* e o total médio de variantes detetadas por amostra seguiu uma moda crescente desde o padrão lepídico ao sólido[55].

O CCE tem sido caracterizado por altas frequências de mutações em genes supressores tumorais. As mutações em *TP53* são quase ubíquas nas amostras de CCE (91%)[54]. *CDKN2A* está inativado em 72% das amostras via deleção homozigótica (29%), mutações de perda-de-função (18%), *skipping* do exão 1b (4%) e silenciamento epigenético (21%)[56]. Os CNV e TMB são expressivamente mais elevados comparativamente com o ADC mas também com outros tumores primários[56]. As transições e transversões nucleotídicas envolvendo citosinas (C) e guaninas constituem os principais tipos de mutação nos CCE, inclusive fora das ilhas GC[56,57]. O envolvimento de genes codificadores da via de sinalização RTK/*RAS*/*MAPK* tem sido reduzido sendo a amplificação da família FGFR a alteração mais comum (17% dos CCE)[54]. As variantes registadas em *EGFR* e *KRAS* parecem tendencialmente diferentes das subjacentes ao ADC[50,56,57]. A partilha de variantes em genes como *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, *CDKN2A*, *NOTCH1* e *HRAS* tem sido observada com CCE da cabeça e pescoço, facto que sugere uma patogénese semelhante nestas duas doenças[56]. As vias de sinalização *NFE2L2*/*KEAP1*/CUL3 (resposta ao stress oxidativo) e *SOX2*/*TP63*/*NOTCH1* (diferenciação escamosa) têm sido as mais comummente disfuncionais[56,57]. Alterações genómicas afetas à resposta ao stress oxidativo residem em 34% dos CCE: *NFE2L2* (19%), *KEAP1* (12%) e CUL3 (7%)[56]. As variantes nos genes de diferenciação escamosa ocorrem em 44% dos CCE e consistem maioritariamente em amplificações e expressões aumentadas de *SOX2* e *TP63* com reduzida concomitância com variantes em outros genes desta via[56]. Alterações na via *PI(3)K*/*mTOR* tem sido descritas em quase metade dos CCE e tem sido mutuamente exclusivas das variantes em *EGFR*[56,57].

O CAE caracteriza-se pela sua composição morfologicamente híbrida. Em termos moleculares, as variantes clássicas do ADC e do CCE têm sido detetadas no CAE porém com frequências dissemelhantes[58]. *TP53* e *EGFR* têm constituído os genes mais frequentemente alterados, inclusive em ambas componentes glandular e escamosa pós-microdisseção[58–60]. No estudo de Lin *et al.* (2020), os genes mutados mais recorrentes na porção de ADC foram *EGFR* (79%), *TP53*

(46%) e *MAP3K1* (14%), enquanto que a parte escamosa foi rica em *EGFR* (75%), *TP53* (64%), *SMARCA4* (14%), *RB1* (14%) e *TERT* (14%)[58]. Os CNV estiveram equitativamente presentes em ambas as morfologias onde as amplificações de *MDM2* e *EGFR* foram as mais comuns[58]. As mutações em *KRAS* parecem ser menos prevalentes no CAE, pelo menos na população caucasiana[61]. Alterações em genes como *CDKN2A* (21%) e *LRP1B* (18,5%) também foram observadas e as fusões clássicas de *ALK* (*ALK-EML4*) e *ROS1* (*CD74-ROS1*) foram indicadas como prevalentes[59]. Como no ADC, as principais mutações de *EGFR* foram as deleções do exão 19 e *EGFR* p.(Leu858Arg) e as suas prevalências parecem diferir com a etnia[59,61]. Mutações na via de sinalização de *PIK3CA* têm sido reportadas em 30% das amostras de CAE nas quais *PIK3CA* tem estado envolvido em metade da casuística[60,61]. Não obstante à mistura de perfis moleculares das componentes que formam o CAE, estudos como o de Vassella *et al.* (2015) têm reforçado a eventual origem monoclonal deste carcinoma visto que mutações consideradas "*driver*" da carcinogénese têm estado presentes em ambas componentes glandular e escamosa microdissecadas de um mesmo tumor[61].

Como o CAE, o CS tem sido considerado um tumor de mau prognóstico e, como tal, o seu perfil molecular tem suscitado particular interesse com o desenvolvimento crescente de fármacos dirigidos a alvos moleculares. Em comparação com os subtipos histológicos mais vulgares de CPNPC, o CS não apresenta um perfil que se diferencie[37,62]. *TP53* tem sido o gene mais alterado (58-74%), seguido de *CDKN2A* e *KRAS* com aproximadamente um terço dos casos[37,62]. Cerca de 30-40% dos CS apresentam alterações genómicas em genes com variantes sensíveis a inibidores moleculares como *EGFR* (9%), *BRAF* (7%), *HER2* (<2%) e os genes caracterizados por rearranjos como *ALK* e *RET* (<1%, cada)[37,62]. *MET*, e em particular a sua principal mutação (*skipping* do exão 14), aparenta estar alterado com maior frequência nos CS do que nos convencionais CPNPC[63]. A sua incidência tem sido variável (9-32%) em função dos componentes morfológicos que constituem o tumor[64]. Por exemplo, a presença de ADC na composição do CS foi associada a uma maior proporção de amostras com o *skipping* do *MET*[37]. O CS tem estado ainda ligado a elevados TMB e a uma expressão de PD-L1 ≥ 50%[37,38,65,66].

Os carcinomas neuroendócrinos são tumores de alto grau caracterizados por altas taxas e elevada complexidade mutacionais[43,67,68]. No CPPC, a perda concomitante dos supressores tumorais *TP53* (98%) e *RB1* (91%) é praticamente ubíqua e mandatória[39,40,68]. Cite-se o mecanismo de resistência a inibidores tirosina quinase (TKI) desenvolvido em 15% dos CPNPC – a transformação fenotípica em CPPC – onde a inativação bialélica de *TP53* e *RB1* está presente em altas proporções[52,69]. *TP73* (13%), *RBL1* (6%), *RBL2* (6%), *CDKN2A* (5%) e *CCND1* (2%) são também reguladores do ciclo celular com alterações genómicas identificadas no contexto dos CPPC[40]. A via de sinalização NOTCH tem estado envolvida no processo inicial de transformação

da célula normal em neoplásica. As suas mutações inativadoras são detetadas em 25% dos CPPC e a sua incidência tem sido maior nos tumores primários comparativamente com as metástases de CPPC[39,40,68]. Alterações ao nível de reguladores de transcrição como *HH*, *MYC*, *KMT2D*, *CREBBP* e *EP300* têm tido frequências de, pela ordem, 80%, 20%, 8-13%, 3% e 2% nos CPPC[40,69]. Destas, a amplificação de *MYC* (*MYC*, *MYCL* e *MYCN*) aparece durante a progressão tumoral e tem estado ligada a resistência à quimioterapia. Os diferentes grupos moleculares de CPPC identificados têm refletido os seus níveis de expressão[69,70]. A ativação da via RTK/*PI(3)K*/*mTOR* tem estado implicada na proliferação e resistência à apoptose das células que compõem os CPPC[69]. Esta tem resultado de variantes genómicas em genes como: *PIK3CA* (15%), *PTEN* (9%), *FGFR1* (8%) e *KIT* (6%)[68]. As variantes *missense* de *PIK3CA* alocadas aos codões 542, 545, 546 e 1047 constituem 80% dos casos e traduzem-se em ganho-de-função[40]. Em *PTEN*, gene supressor tumoral que regula a AKT/*PKB*, as mutações refletem-se na sua inativação a qual, por exemplo, em sinergia com a perda de *TP53* e *RB1* promove a transformação do ADC em carcinoma neuroendócrino[40]. No âmbito dos RTK, mutações pontuais, CNV e rearranjos têm estado subjacentes à sinalização aumentada. A amplificação de *FGFR1*, descrita nos estadios precoces da doença, tem tido um prognóstico negativo[40]. As mutações de *KIT* têm acometido o domínio quinase e as fusões de *RET* têm sido recorrentes mas de prevalência desconhecida[40]. Não obstante ao facto de TMB ter o seu valor preditivo na resposta à imunoterapia, uma baixa percentagem de CPPC (<20%) apresenta uma expressão aberrante de PD-L1[39,70,71].

O CNGC é dentre os tumores neuroendócrinos do pulmão o que tem o espectro mutacional mais amplo e heterogéneo[67]. Segundo o estudo de Rekhtman *et al.* (2016), os principais genes mutados são *TP53* (78%), *RB1* (38%), *STK11* (33%), *KEAP1* (31%), e *KRAS* (22%)[44]. A via *PI(3)K*/*mTOR* tem-se encontrado alterada em 15% dos CNGC: *PTEN* (4–5%), *PIK3CA* (3%), AKT2 (4%), *RICTOR* (5%) e *mTOR* (1%)[45,67]. A amplificação de *MYC* tem sido registada sob *MYC* (5-13%), MYCL1 (12%) e *MYCN* (2%)[45]. As mutações em oncogenes como *EGFR*, *ALK* e *RET* são pouco frequentes e amplificação de *FGFR1* ocorre em 4-7% dos CNGC[67]. Com base nos perfis genómico e transcricional foram identificados recentemente dois subtipos moleculares: (1) CNGC tipo I, caracterizado pelo painel de expressão ASCL1^{alto}/DLL3^{alto}/NOTCH^{baixo}; e o (2) CNGC tipo II, de apresentação complementar ao CNGC tipo I (ASCL1^{baixo}/DLL3^{baixo}/NOTCH^{alto}) e atividade aumentada das vias ligadas à imunidade[67,72].

Por fim, como resultado da sequenciação massiva de uma serie de tumores, a identificação de padrões genéricos mutacionais associados a fatores endógenos e exógenos tem sido possível em diferentes cancros[73]. No contexto do cancro do pulmão, o tabaco, a etnia e o sexo tendem a apresentar diferenças na frequência de determinadas alterações genómicas e histológicas bem como em termos de prognóstico[51,70]. A assinatura mutacional causada pelo tabaco geralmente

traduz-se em: (1) altas taxas de mutações não sinónimas por megabase (TMB); (2) hegemonia das transversões nucleotídicas entre citosinas e adeninas (C>A); e (3) por um número acrescido de mutações em genes como *KRAS* e *TP53*[54,70,74]. São exemplos claros de tumores com estas alterações o CPPC e CNGC nos quais mais de 95% dos doentes têm história de consumo pesado de tabaco[44,45,70]. Em oposição, nos não fumadores a carcinogénese pulmonar tem-se transposto (1) em transições nucleotídicas de citosinas para timinas (C>T); (2) num número médio de uma mutação por megabase; e (3) em alterações envolvendo genes como *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *PIK3CA* e *RB1*[54]. Embora o tabaco seja um fator de risco ao desenvolvimento de ADC do pulmão, estas alterações têm sido tipicamente mais observadas nos ADC e em mulheres, dois grupos significativamente prevalentes entre os não fumadores[54]. Não obstante, uma história passada ou presente de tabaco tem estado associada a uma maior frequência de transversões nucleotídicas de C>A nos ADC[49]. Relativamente aos padrões mutacionais associados ao sexo e etnia no cancro do pulmão, estes não estão tão bem definidos como o do tabaco, apenas existem algumas evidências que sublinham essas tendências. Cite-se, a título de exemplo, (1) a proporção significativamente superior de mulheres nos cancros do pulmão enriquecidos em alterações em *EGFR* e *RB1* e a de homens em SMARC4 e *PASK*[54]; e (2) a propensão superior dos CPNPC de doentes europeus-americanos em serem portadores de alterações genómicas nas vias de sinalização subjacentes à proliferação e ciclo celular comparativamente com os Afro-americanos[75].

Abordagens terapêuticas no cancro do pulmão

Ao longo das duas últimas décadas, o tratamento do cancro do pulmão tem transitado de uma abordagem sistémica e generalista para uma medicina mais personalizada[76]. O conhecimento crescente sobre a carcinogénese pulmonar subjacente a cada subtipo histológico tem potenciado uma estratificação mais precisa dos doentes em função do prognóstico e das terapias disponíveis[77]. A cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e as terapias dirigidas a alvos moleculares (TDM) têm sido os recursos disponíveis no tratamento curativo e/ou paliativo desta patologia[78].

Durante vários anos, nos CPNPC, a abordagem terapêutica foi ditada pelo estadio da doença e os diferentes subtipos histológicos eram tratados como uma única entidade[77]. Nos carcinomas neuroendócrinos, por sua vez, o tratamento tem sido independente do estadio e à base de quimioterapia com agentes de platina combinados com um etoposídeo e/ou radioterapia[70]. Atualmente, sabe-se que não é apenas o CPPC que apresenta um comportamento díspar das demais neoplasias pulmonares[77]. Os subtipos de CPNPC têm demonstrado respostas e efeitos

colaterais distintos a certas terapias, facto que coloca a histologia tumoral como fator preponderante na eleição de tratamentos e/ou respetivos fármacos[77]. De igual forma, a pesquisa de biomarcadores intrínsecos às células tumorais ou ao microambiente impõe-se na definição da abordagem terapêutica: os fármacos direcionados a certos alvos moleculares só são efetivos aquando da sua presença no tumor e a exposição do doente à toxicidade de um fármaco ineficaz não acar*reta* qualquer mais valia[79]. Não obstante, fatores como a idade, a condição geral e a existência de comorbilidades têm de ser considerados pois o doente pode não ter capacidade para suportar a agressividade de determinados tratamentos[78–80].

Mais de 70% dos cancros do pulmão são diagnosticados em estadios avançados[28,79,80]. Nestes, a cirurgia com fins curativos é praticamente inexequível e a radioterapia assume comummente uma função paliativa e/ou sinérgica do efeito de outras terapias[28,80,81]. As estratégias farmacológicas tornam-se assim o principal recurso e o mais amplamente explorado em termos investigacionais. A quimioterapia orientada pela histologia tumoral continua a ser o tratamento padrão a uma parte considerável dos CPNPC[78]. A sua conjugação com novos fármacos citotóxicos melhorou as sobrevidas registadas nos tumores mais avançados, porém acompanhada de níveis mais elevados de toxicidade para o doente[81]. Não obstante, o maior impacto na qualidade de vida e prolongamento da sobrevida ocorreu com a introdução das terapias assentes em macromoléculas e/ou em pequenas moléculas inibidoras de função que, ao salvaguardarem as células normais da ação farmacológica, tendem a ser mais eficientes e a apresentar menores efeitos colaterais[82,83].

Portanto, e embora se perspetivem mudanças nas recomendações, correntemente têm indicação para pesquisa de alterações oncogénicas sensíveis aos fármacos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*): doentes com CPNPC não escamosos irressecáveis e/ou de estadios avançados ou metastáticos[84]. Nos CCE, a pesquisa de alterações moleculares deve ser ponderada na presença de características geralmente associadas a variantes acionáveis (VAc) como a inexistência de hábitos tabágicos, uma idade jovem bem como aquando da realização do diagnóstico em pequenas amostras como as biopsias[84]. Esta última advém de uma salvaguarda de, tratando-se de um CAE, apenas se encontrar representada a sua componente escamosa[84].

Terapias direcionadas a alvos moleculares

Para o tratamento do cancro do pulmão, atualmente encontram-se aprovados pela FDA mais de 20 fármacos dirigidos a alvos moleculares. Estes compreendem quer macromoléculas (anticorpos monoclonais e anticorpos conjugados com drogas citotóxicas) quer pequenas

moléculas inibidoras que bloqueiam vias de sinalização intra- e intercelulares favoráveis ao crescimento e progressão tumorais[78,85].

Terapia orientada por alterações moleculares

Os fármacos baseados em pequenas moléculas inibidoras atuam nas vias de transdução de sinal comummente alteradas na carcinogénese[86]. Estes visam uma ampla gama de proteínas quinase, reguladores epigenéticos, enzimas de reparação de DNA e proteossomas[85]. No tratamento do cancro do pulmão, os RTK são os alvos primordiais não só no que respeita à quantidade de recetores passíveis de serem inibidos, mas também à diversidade de inibidores disponíveis. Das famílias de proteínas treonina-quinases e das pequenas GTPases, apenas *BRAF* e *KRAS* apresentam fármacos aprovados capazes de se ligarem às suas proteínas quando alteradas especificamente por uma variante.

ALK

Os rearranjos de *ALK* têm sido reportados em aproximadamente 3-7% dos CPNPC[76,87]. O gene *EML4* é o principal parceiro de fusão (90%) e está presente em 3-5% dos CPNPC[76,87,88]. Com pontos de quebra diferentes, várias fusões têm sido relatadas sendo as mais habituais: *EML4*(13)::*ALK*(20) (33%), *EML4*(6)::*ALK* (20) (29%) e *EML4*(20)::*ALK*(20) (10%)[89]. Outros genes como *TGFB1*, *KIF5B* e *STRN* têm sido descritos como parceiros de *ALK*[87]. O resultado destas variantes é a hiperativação deste recetor e das vias de sinalização a jusante: *RAS*/*MAPK*, promotora do crescimento, proliferação e diferenciação celulares; e as vias *JAK*/*STAT3* e *PI(3)K*/*mTOR* associada à apoptose e sobrevida celulares[89]. A sua ocorrência é mais comum em ADC de doentes mais jovens, do sexo feminino e sem história tabágica associada[76,90]. A tendência para metastatizar para o sistema nervoso central (SNC) com a progressão da doença (60%) confere aos seus tumores um pior prognóstico[88,91]. Contudo, a introdução dos inibidores de *ALK* na terapia destes doentes mudou significativamente o seu prognóstico[76].

Crizotinib foi o primeiro TKI aprovado pela FDA para o tratamento dos CPNPC em estadios avançados (2005)[76,92]. Tal como os inibidores das gerações subsequentes, traduziu-se em sobrevidas geral (OS, do inglês *Overall Survival*) e livre de progressão (PFS, do inglês *Progression Free Survival*) mais longas, em melhores taxas de resposta (ORR, do inglês *Objective Response Rate*) e em menores efeitos adversos quando comparado com a quimioterapia[76,93]. Adicionalmente, crizotinib exerce ainda um efeito inibitório sob os rearranjos de *ROS1* e sob a amplificação de *MET* sendo o seu uso aprovado e/ou recomendado no tratamento de CPNPC portadores destas alterações[90,93]. As gerações seguintes de TKI revelaram-se todas superiores ao crizotinib em termos de PFS e mostraram-se eficazes num amplo espectro de mutações em *ALK*[76]. Ceritinib, alectinib e brigatinib são TKI de 2ª geração eficazes quer nos rearranjos de *ALK*

quer nas mutações que emergem do tratamento com crizotinib [Anexo I, Tabela 5][90]. Contudo, salvo brigatinib, os TKI de 2ª geração falham a sua atividade no que respeita à mutação *ALK* p.(Gly1206Arg)[90]. Lorlatinib é o único TKI de 3ª geração aprovado para o tratamento de CPNPC e é eficaz contra *ALK* p.(Gly1206Arg)[90,94]. A sua atividade (64 vezes mais potente que a de crizotinib) ultrapassa as superioridades de 12 e 20 vezes registadas em brigatinib e ceritinib face ao TKI de 1ª geração, respetivamente[90]. Contudo, os efeitos adversos de graus 3 e 4 são mais frequentes com este fármaco. Adicionalmente, os TKI de 2ª e 3ª gerações foram concebidos com uma maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), facto especialmente relevante dada a incidência de metástases no SNC dos portadores de CPNPC do pulmão com rearranjos do *ALK*[88]. Estes revelaram uma eficácia superior à registada com crizotinib (considerado de baixa eficácia no tratamento de metástases cerebrais) e a resposta aos mesmos parece ser independente da existência de tratamentos prévios com TKI[91]. A administração de alectinib mostrou ainda reduzir o risco de desenvolvimento de metástases ao nível do SNC em 60-70% dos doentes[90]. Atualmente, todos os TKI citados encontram-se aprovados como tratamentos de primeira linha ou subsequentes de CPNPC avançados[76].

BRAF

Cerca de 3-8% dos CPNPC apresenta variantes em *BRAF*[95]. Estas residem na sua maioria nos exões 11 e 15 e, em função da sua dependência de *RAS* e nível de atividade de *BRAF,* são classificadas em três categorias [Tabela 3]: Classe I corresponde as variantes que conferem uma atividade ímpar ao *BRAF* devido à sua capacidade de ativação na independência de *RAS* e no seu estado monomérico; Classe II compreende as variantes que permitem independência de *RAS* para ativação de *BRAF* mas requerem a dimerização de *BRAF* para a sua atividade ser completa (intermédia a alta); e a Classe III, abrange as variantes pontuais que se refletem em prejuízo da atividade quinase de *BRAF* e em dependência de sinalização a montante (*RAS* e/ou RTK)[95–97]. As mutações da classe I são as mais comuns em *BRAF* (40-50%) e entre populações de não fumadores e do sexo feminino[95,97]. Estas foram ainda associadas a uma menor incidência de metástases cerebrais quando comparadas com as demais variantes de *BRAF* e a uma fraca resposta à quimioterapia[95]. Em contraste, as mutações não-Val600 (classes II e III) são mais comuns entre homens e doentes com história de consumo de tabaco[95,97].

Dentre o amplo espectro de mutações, apenas *BRAF* p.(Val600Glu) apresenta fármacos aprovados no contexto do cancro do pulmão. A combinação de dabrafenib (inibidor de *BRAF*) e trametinib (inibidor de MEK1/2) foi aprovada em 2017 pela FDA. Não obstante à eficácia da atividade antitumoral de dabrafenib, a adição de trametinib melhorou consideravelmente os indicadores obtidos anteriormente para dabrafenib em monoterapia[95]. Adicionalmente, a

inibição da proteína imediatamente abaixo de *BRAF* na via de sinalização – MEK1/2 – maximiza o bloqueio da sinalização de ERK sem toxicidades adicionais[95]. Em comparação com a quimioterapia tradicionalmente usada no tratamento destes tumores, a abordagem combinada destes dois inibidores beneficiou claramente a ORR (23% vs. 68%), a PFS (7,5 vs. 10,2 meses) e a OS (13,8 vs. 18,2 meses) dos CPNPC metastáticos portadores de *BRAF* p.(Val600Glu)[95,96]. Estes resultados foram independentes da linha de tratamento[95]. O estudo de outros fármacos e/ou combinações encontra-se em curso, inclusive de fármacos direcionados para as mutações não-Val600[95,96,98].

Tabela 3 – Classificação das variantes de BRAF segundo a sua dependência de RAS e nível de atividade[95–97]

	Variantes	**Dependência de *RAS* para a ativação de *BRAF***	**Nível de atividade de *BRAF***
Classe I	*BRAF* p.(Val600Glu/Lys/Asp/Met/Leu/Arg)	Sim	Alto
Classe II	*BRAF* p.(Pro367Leu/Ser), *BRAF* p.(Arg462Ile), *BRAF* p.(Ile463Ser), *BRAF* p.(Gly464Glu/Val/Arg), *BRAF* p.(Gly469Ala/Val/Ser/Arg/Glu), *BRAF* p.(Leu485Trp), *BRAF* p.(Glu586Lys), *BRAF* p.(Leu597Gln/Arg/Ser/Val), *BRAF* p.(Ala598Val), *BRAF* p. (Thr599Ile), *BRAF* p.(Lys601Glu/Asn/Thr), *BRAF* p.(Ala727Val)	Não	Intermédio a alto
Classe III	*BRAF* p.(Asp287His/Tyr), *BRAF* p.(Val459Leu), *BRAF* p.(Gly466Ala/Glu/Val/Arg/Leu), *BRAF* p.(Ser467Ala/Glu/Leu), *BRAF* p.(Lys483Met), *BRAF* p.(Asn581Tyr/Ile/Ser), *BRAF* p.(Phe595Leu), *BRAF* p.(Asp594Ala/Glu/Gly/His/Asn/Val/Tyr), *BRAF* p.(Gly596Ala/Cys/Asp/Arg)	Sim	Reduzido

EGFR

EGFR é talvez o gene mais amplamente estudado no cancro do pulmão. A prevalência mundial das suas mutações encontra-se estimada em aproximadamente 12% dos CPNPC, sendo mais frequentes na população asiática (40-50%), seguida da população africana (29%) e da caucasiana (10-15%)[99–101]. Mais frequentes no ADC, estas têm estado igualmente correlacionadas com o sexo feminino e com a ausência de hábitos tabágicos[102,103]. As deleções do exão 19 e a

substituição *EGFR* p.(Leu858Arg) no exão 21 correspondem a 85-90% das mutações de *EGFR*. Estas caracterizam-se pela sua alta sensibilidade a TKI direcionados ao domínio quinase de *EGFR*: gefitinib e erlotinib (inibidores reversíveis de 1ª geração); afatinib e dacomitinib (inibidores irreversíveis de 2ª geração); e osimertinib (inibidor irreversível de 3ª geração)[103,104]. Todavia, as deleções do exão 19 são um grupo heterogéneo. As deleções residentes no fragmento LRE (Leucina-Arginina-Glutamato; Leu747 a Glu749) são mais sensíveis a TKI e compreendem as principais deleções de *EGFR*: *EGFR* p.(Glu746_Ala750del), *EGFR* p.(Leu747_Pro753delinsSer), *EGFR* p.(Leu747_Ala750delinsPro) e *EGFR* p.(Leu747_Tyr751del)[103,105]. Em oposição, as deleções não-LRE têm uma baixa resposta e substituições como *EGFR* p.(Leu747Ser), *EGFR* p.(Asp761Tyr) e *EGFR* p.(Thr854Ala) conferem resistência a TKI[103]. As mutações vulgarmente nomeadas de não clássicas perfazem 10-15% das mutações de *EGFR* e incluem as substituições *EGFR* p.(Gly719-) (2%; exão 18), *EGFR* p.(Ser768Ile) (1%; exão 20), *EGFR* p.(Leu861-) (3%; exão 21) e as inserções do exão 20 (4-10%)[101,103,106]. Este grupo é menos sensível à ação dos TKI (concretamente os de 1ª geração) e inclui também as variantes compostas[103,104]. No entanto, afatinib permanece como o regime preferencial para *EGFR* p.(Gly719-), *EGFR* p.(Ser768Ile) e *EGFR* p.(Leu861-). As inserções do exão 20 abrangem um conjunto heterogéneo de inserções e duplicações de tamanho variado (1-7 aminoácidos) residentes na α-hélice C e *loop* subsequente (sequência de aminoácidos 762-774). *EGFR* p.(Val769_Asp770ins) e *EGFR* p.(Asp770_Asn771ins) são as inserções mais frequentes e contam com quase metade dos CPNPC portadores de inserções no exão 20[106]. A suscetibilidade destas variantes a TKI é limitada, sendo uma das principais causas de resistência aos inibidores aprovados. Recentemente, amivantamab (Ac biespecífico) e mobocertinib (TKI irreversível) foram aprovados pela FDA para o tratamento de doentes com CPNPC avançado ou metastático que progrediram após quimioterapia e cujos tumores abrigam inserções *in-frame* no exão 20 de *EGFR*[103,104]. Erlotinib pode ser ainda administrado aquando de tumores portadores da inserção *EGFR* p.(Ala763_Tyr764insPheGlnGluAla). Outras alterações menos comuns compreendem as substituições do codão 709, a deleção dos exões 2-7 (*EGFR* vIII) e a amplificação do gene[103,104]. Destas, *EGFR* p.(Glu709Lys/Ala/Gly/Val) ocorrem frequentemente como uma variante composta e, em oposição às demais, *EGFR* p.(Glu709Lys/Ala) apresenta sensibilidade a TKI (designadamente afatinib). *EGFR* vIII e ganho no número de cópias [do inglês, *Copy Number Gain (CNG)*] de *EGFR* têm sido descritas como desreguladoras das vias de sinalização: via *RAS*/*MAPK*; via *PI(3)K*/*mTOR*; e *JAK*/*STAT3*[107]. Embora as suas associações com os níveis de expressão aumentados careçam de elucidação, os seus impactos negativos no prognóstico bem como na resposta tumoral aos inibidores de *EGFR* encontra-se claramente estabelecido[107–109].

HER2

HER2 é um RTK pertencente à família do *EGFR*. Nos CPNPC, a sua atividade alterada tem emergido de três tipos de alterações: mutação, CNG e expressão aumentada[110–112]. As mutações, traduzidas em 80-90% em inserções *in-frame* no exão 20, estão presentes em 2-4% dos CPNPC[112–114]. Estas, como em *EGFR,* têm estado associadas ao sexo feminino, à ausência de hábitos tabágicos e ao ADC[111,113,115]. *HER2* p.(Tyr772_Ala775dup) é a sua principal variante e é seguida de *HER2* p.(Gly776delinsValCys), *HER2* p.(Gly778_Pro780dup) e *HER2* p.(Gly776delinsLeuCys)[112,114]. Mutações mais raras alocadas a domínios extracelulares também têm sido reportadas [ex.: *HER2* p.(Ser310-) no exão 8][114,116]. A amplificação primária de *HER2* ocorre em 1-3% dos CPNPC[110]. No entanto, a sua incidência sobe para 10-20% quando emerge secundariamente à aplicação de TKI[110,112]. A expressão aumentada de *HER2* tem sido relatada em 2-38% dos CPNPC e tem estado associada a um pior prognóstico [111,112]

Em contraste com a realidade presente no cancro da mama, nos CPNPC, apenas as mutações oncogénicas apresentam um fármaco direcionado aprovado: Trastuzumab Deruxtecan (T-Dxd). Este consiste de um anticorpo monoclonal conjugado com um fármaco citotóxico (inibidor da topoisomerase I) que age via disrupção do DNA[115,117,118]. O T-Dxd está aprovado para doentes com CPNPC metastáticos ou irressecáveis portadores de mutações ativadoras em *HER2* e pré-tratados sistemicamente[115].

KRAS

As variantes no gene *KRAS* têm estado envolvidas na carcinogénese pulmonar desde os estadios precoces. Com frequências variáveis entre as populações ocidentais (20-30%) e asiáticas (10-15%), estas têm sido mais prevalentes no ADC (20-40%) e entre doentes com história de hábitos tabágicos (32-37%)[119–121]. No CCE, a sua incidência tem sido inferior a 5%[120]. As suas alterações são na sua maioria substituições *missense* e encontram-se praticamente restritas aos codões 12 (85-90%), 13 (10%) e 61 (5%)[121,122]. *KRAS* p.(Gly12Cys) constitui a principal variante de *KRAS* (40-50%)[120,122]. Presente em 11-13% dos CPNPC, esta variante emerge da transversão nucleotídica G>T e parece ser mais frequente entre mulheres, doentes mais jovens (idade média de 63,1 anos) e fumadores[120,123,124]. *KRAS* p.(Gly12Val) e *KRAS* p.(Gly12Asp) são as segunda e terceira variantes mais prevalentes em KRAS. O seu peso conjunto nos *KRAS* mutados tem sido de praticamente metade do registado em *KRAS* p.(Gly12Cys) e as suas ligações ao consumo de tabaco são dispares, com *KRAS* p.(Gly12Asp) mais incidente entre os não fumadores[120,122].

Até agora, *KRAS* p.(Gly12Cys) é a única variante com fármacos aprovados e/ou em vias de aprovação. Estes fármacos tiram partido do bolso alostérico observado na região *switch* II de *KRAS* p.(Gly12Cys) e do facto desta proteína mutante preservar a sua capacidade de alternar

entre o seu estado ativo (GTP ligado) e inativo (GDP ligado)[125]. Assim, por ligação covalente ao resíduo Cys12, estas pequenas moléculas inibidoras fixam *KRAS* mutante no seu estado inativo travando a progressão do sinal[121]. Sotorasib é o único inibidor altamente seletivo para *KRAS* p.(Gly12Cys) aprovado pela FDA. A ORR (37%) e a durabilidade da resposta observadas conduziram à aceitação e recomendação do seu uso no tratamento de CPNPC avançados ou metastáticos, portadores de *KRAS* p.(Gly12Cys) e que progrediram após uma linha de tratamento[122,126]. Com ORR (45%) e controlo da doença (96%) superiores a Sotorasib, Adagrasib foi reconhecido recentemente pela FDA como terapia inovadora com potencial uso no tratamento de CPNPC[121,124]. Ambos de ligação irreversível ao resíduo Cys 12 e tempos de meia-vida longos, estes são dois inibidores são altamente seletivos para a proteína mutante *KRAS* p.(Gly12Cys) e apresentam uma ampla capacidade de distribuição por diferentes tecidos humanos[124,125]. Todavia, as suas ORR e controlo de doença são inferiores às observadas em outros inibidores como os usados aquando de mutações em *EGFR* ou dos rearranjos de *ALK*[120]. Neste sentido, uma serie de outros inibidores encontram-se atualmente em desenvolvimento a fim de melhorarem estes indicadores mas também alargar o espectro de mutações em *KRAS* suscetíveis à ação de fármacos direcionados[120].

MET

A desregulação das vias de sinalização ativadas por *MET* pode ser promovida por diversas alterações (mutações pontuais, amplificação e fusões), as quais conferem a *MET* uma atividade aumentada que sustenta o crescimento, invasão e metastização tumorais[127–129]. Estas alterações têm sido identificadas em diversos tumores. Nos CPNPC, *MET* mutado têm totalizado 3-4% dos casos[130]. As mutações que acometem as regiões flanqueadoras do exão 14 são as mais comuns e tem por consequência o *skipping* deste exão. Em termos estruturais e funcionais, o domínio intracelular justamembranar é eliminado e, devido à residência do resíduo envolvido na ligação do gene *CBL* (Tyr1003), a sua degradação via ubiquitinização fica inviabilizada[128,131]. O *skipping* do exão 14 apresenta ainda uma distribuição díspar entre os subtipos histológicos de CPNPC. No CS, a ocorrência desta variante (9-22%) é significativamente superior às apontadas nos demais tipos histológicos nos quais o CAE surge em segunda posição com 6% seguido do ADC com 3%[128,132128]. Não obstante, o registo acrescido do *skipping* do *MET* é uma realidade também entre fumadores, estadios mais avançados da doença e em doentes com idades superiores a 70 anos[128,132].

A amplificação *de novo* de *MET* tem sido registada entre 1-6% dos CPNPC[127]. Mais comum entre os fumadores, a sua emergência é frequentemente secundária à administração de diversos TKI[132]. Em *EGFR,* por exemplo, os CNG envolvendo *MET* têm sido reportados em 10-20% das

resistências a TKI e noutros RTK (como *ALK*, *RET*, *ROS1* e no próprio *MET*) o seu registo acontece com regularidade aquando das respetivas resistências[127,133]. As fusões envolvendo *MET* correspondem a menos de 1% das suas variantes e, como nas demais fusões registadas nos CPNPC, conduzem ou à ativação constitutiva independente do ligando ou à sua expressão acrescida.

Capmatinib e tepotinib são inibidores seletivos do domínio tirosina quinase de *MET*[134]. Aprovados pelo FDA para o tratamento de CPNPC metastáticos portadores de mutações causadoras de *skipping* do exão 14, estes apresentaram ORR decrescentes com a linha de tratamento: 1ª linha, ORR de 68%; 2ª linha, ORR de 52%; e 3ª linha, ORR de 41%[127]. O bloqueio do local de ligação de adenosina trifosfato (ATP) no domínio quinase deste recetor é o mecanismo pelo qual exercem a sua ação[134]. Capmatinib é ainda eficaz no tratamento de metástases cerebrais sendo o seu uso preferível nestas situações[84,127]. O estudo da eficácia destes dois inibidores sobre a amplificação de *MET* encontra-se em curso com resultados preliminares promissores[84]. Contudo, aquando de um baixo número de amplificações o efeito parece ser limitado[84,129]. Ainda assim, o seu uso tem sido indicado nos tumores com amplificação de *MET*. De igual forma que a administração de crizotinib tem sido recomendada pela NCCN®(*National Comprehensive Cancer Network*®) nas mesmas situações que Capmatinib e Tepotinib.

NTRK1/2/3

A família de genes *NTRK* codifica um conjunto de três recetores tropomiosina quinase [do inglês, *Tropomyosin Receptor Kinase (TRK)] – TRKA* (gene *NTRK1*), *TRKB* (gene *NTRK2*) e *TRKC* (gene *NTRK3*) – implicados na ativação de vias de sinalização responsáveis pela regulação do crescimento e proliferação celulares (*RAS*/*MAPK*), diferenciação neuronal (fosfolipase C-γ, PLC-γ) e prevenção da apoptose [*PI(3)K*/*mTOR*][135,136]. Com um elevado número de genes-parceiros e uma transversalidade a mais de 100 tipos histológicos diferentes, as frequências das fusões de *NTRK*, circunscritas a menos de 5%, variam em função do tipo de cancro[135]. Nos CPNPC, estas encontram-se reportadas em menos de 1% dos casos e têm envolvido mais regularmente *NTRK1* e *NTRK3*[135,137]. Os doentes portadores de tumores *NTRK* positivos têm tido uma idade média jovem e uma história de hábitos tabágicos ausente ou reduzida[135,137]. A sua coocorrência com variantes canónicas noutros genes é praticamente inexistente, salvam-se as mutações ativadoras de *EGFR* onde as fusões de *NTRK* têm sido descritas como mecanismos de resistência a TKI[135,137]. Larotrectinib e entrectinib são TKI de 1ª geração aprovados e recomendados como tratamento de 1ªlinha ou de linhas subsequentes de CPNPC avançados/metastáticos portadores de fusões em *NTRK*. Os doentes com CPNPC *NTRK* mutados e que progrediram após terapias sistémicas

prévias também estão incluídos no grupo anterior[135]. As suas atividades antitumorais e as boas tolerabilidades têm sido ubíquos a todos os tumores sólidos, independentemente da histologia[135]. Larotrectinib é uma molécula inibidora altamente específica para o domínio quinase dos três recetores TRK. A fim de reduzir a toxicidade ao nível do SNC, a sua conceção teve em consideração os papeis destes recetores neste sistema[136,138]. A sua eficácia parece ser independente da existência de tratamentos prévios e reflete-se em melhores PFS[135]. Entrectinib atua também mediante competição com ATP ao seu local de ligação nestes recetores[135,136]. A sua ação é transversal aos três recetores TRK e alargada a *ALK* e *ROS1*[135,136]. Em contraste com larotrectinib, apresenta uma boa capacidade de penetrar a BHE sendo efetivo em metástases no SNC[135–137]. Ambos inibidores são de administração oral e têm a sua atividade limitada aquando de mutações na fenda de ligação de ATP[137,138].

RET

As fusões de *RET* constituem um grupo de variantes oncogénicas identificadas em 1-2% dos CPNPC[139,140]. A maioria dos rearranjos são intracromossómicos e têm como genes-parceiros: *KIF5B* (72%), *CCDC6* (23%) e *NCOA4* (2%)[139,140]. Nestes, o domínio tirosina quinase de *RET* é preservado e alocado a 3'[141]. Em função do gene-parceiro, o resultado da fusão geralmente traduz-se em autofosforilação de *RET* independente do ligando ou na sua expressão aumentada[141]. Consequentemente, vias de sinalização *RAS*/*MAPK*, *JAK*/*STAT3* e *PI(3)K*/*mTOR* ficam ativamente desreguladas culminando numa proliferação descontrolada das células[139,140]. Como em *ALK* e *ROS1*, o potencial carcinogénico destas variantes geralmente reflete-se na exclusão de outras variantes oncogénicas promotoras da tumorigénese[140,142]. Não obstante, têm sido relatados alguns casos de concomitâncias entre as fusões de *RET* e variantes oncogénicas em genes como *KRAS*[140]. De igual forma, os rearranjos de *RET* tem sido mais incidentes em doentes com idades inferiores a 60 anos, mulheres, não fumadores ou com história de consumo leve de tabaco[140,143]. O risco de metastização do SNC também se encontra aumentado nos doentes com fusões somáticas de *RET*[141,142].

Selpercatinib e pralsetinib são dois TKI altamente específicos para *RET*. Face aos inibidores multiquinases testados anteriormente no contexto dos seus rearranjos, estes apresentam (1) melhores ORR, independentemente da existência de tratamentos prévios; (2) maior eficácia; e (3) menores níveis de toxicidade[142,144]. Na sua conceção, foi tido em atenção não só a sua habilidade em tratar metástases no SNC como também eventuais mutações que desconfigurem os locais-chave de ligação neste recetor[142]. Selpercatinib é um inibidor eficaz quer com fusões quer com mutações oncogénicas de *RET*[143]. As suas respostas não são afetadas pelo gene-parceiro da fusão visto ser direcionado ao domínio quinase de *RET*[143]. Pralsetinib é 8-28

vezes mais potente no domínio quinase inalterado de *RET* do que os inibidores multiquinase cabozantinib e vandetanib[143]. A sua alta afinidade para os respetivos locais de ligação de ATP, permite-lhe ser eficaz não só perante os rearranjos de *RET* e mutações ativadoras como *RET* p.(Cys634Trp) e *RET* p.(Met918Thr) mas também sobre as mutações de resistência relatadas no contexto dos inibidores multiquinase[145]. Ambos os inibidores são de administração oral e recomendados como tratamentos de primeira linha e/ou em linhas subsequentes em CPNPC metastásticos[141,146]

ROS1

Os rearranjos de *ROS1* têm ocorrido em 1-2% dos CPNPC[147,148]. Tal como os demais genes dominados pelas fusões génicas, tendem a ser mais prevalentes em ADC (2,4-2,9%), não fumadores, mulheres e numa idade mais jovem[84,147,149]. *CD74* é o seu gene-parceiro mais assíduo compreendendo mais de 50% das fusões envolvendo *ROS1*[147]. Genes como *SLC34A2*, *CCDC6*, *TMP3*, *SDC4* e *EZR* têm estado igualmente implicados nos rearranjos de *ROS1* os quais integram completamente o domínio tirosina quinase de *ROS1*[84,148]. A sua ativação constitutiva conduz à fosforilação de *RAS* e culmina com a proliferação das células malignas[148].

Em virtude dos 70% de homogeneidade entre os domínios quinase de *ALK* e *ROS1*, fármacos como crizotinib, ceritinib e lorlatinib têm mostrado eficácia no tratamento de CPNPC portadores de rearranjos em *ROS1*[150]. Entrectinib é um TKI transversal a *ROS1* e aos rearranjos envolvendo os genes *NTRK*. Dentre os fármacos referenciados, crizotinib e entrectinib encontram-se aprovados pela FDA como tratamento de primeira linha em doentes com CPNPC avançado (metastático) *ROS1* mutados. Face a crizotinib, entrectinib apresenta ORR, PFS e controlo da doença equivalentes, porém a sua maior capacidade de permear a BHE coloca-o como mais eficaz no tratamento de metástases cerebrais[150]. À data, ceritinib e lorlatinib ainda não se encontram aprovados pela FDA no tratamento de CPNPC *ROS1* positivos, contudo a sua administração tem sido recomendada. Por fim, em resposta às resistências que emergem em *ROS1*, uma serie de outros inibidores com eficácia demonstrada contra as ditas resistências encontram-se com ensaios clínicos a decorrer. São exemplos disso cabozantinib, taletrectinib e repotrectinib[148].

Resistências às terapias dirigidas a alterações moleculares

Apesar dos aspetos promissores das terapias baseadas em pequenas moléculas, apenas um grupo restrito de doentes responde positivamente a estas terapias[85]. Na base podem residir mecanismos primários como as variantes concomitantes a alterações acionáveis (pré-tratamento) mas também alterações adquiridas na sequência da sujeição das células a um dado fármaco[85,87].

Embora uma parte considerável das resistências permaneça desconhecida ou baseada no observado noutros cancros/inibidores homólogos, as mutações têm sido a principal causa de resistência[85,110,151]. Quando presentes no próprio gene-alvo, podem (1) alterar a conformação dos locais de ligação do inibidor; (2) substituir resíduos envolvidos na ligação covalente com a molécula inibidora; e/ou (3) fomentar uma alta atividade da proteína-alvo do TKI.

As variantes pontuais de *ALK,* registadas ao nível do domínio quinase, constituem exemplos da interferência da conformação alterada na ligação das pequenas moléculas inibidoras[87]. *ALK* p.(Leu1196Met) e *ALK* p.(Gly1201Arg), ambas residentes na bolsa de ligação de ATP, têm sido reportadas correspondentemente em 7% e 4% das amostras após o tratamento com crizotinib, enquanto que *ALK* p.(Gly1202Arg) tem sido registada em 2%, 21% e 29% das amostras após tratamento com crizotinib, ceritinib ou alectinib, , respetivamente[87,90,93].

EGFR p.(Thr790Met) é outro exemplo do exposto. Residente na fenda de ligação de ATP, a alteração conformacional induzida confere a *EGFR* mutante uma maior afinidade para se ligar a ATP, o que coloca em desvantagem os inibidores ATP-competitivos reversíveis como os TKI de 1ª e 2ª gerações[106,151]. Embora identificada em 50-60% das progressões pós-TKI, esta variante tem ainda existido como mutação primária nos CPNPC [105,152].

A existência paralela de variantes não sinónimas noutros genes (que não os alvos de inibição) pode constituir outra via de resistência. Ao servirem de mecanismos *bypass,* podem incitar a ativação secundária das vias de sinalização reguladas e/ou promovidas pela proteína inibida mas também de outras vias envolvidas na proliferação, apoptose, diferenciação e ciclo celular das células tumorais.

Em *MET*, os mecanismos de *bypass* parecem constituir as principais causas de resistência a TKI de modo particular via *RAS*/*MAPK*[153]. Segundo Guo *et al.* (2021), cerca de 33% das progressões adquirem alterações em *EGFR*, *KRAS* ou *RASA1* (dados obtidos pela análise comparativa de biopsias emparelhadas relativas aos momentos pré-tratamento e progressão)[153].

Em EGFR, a ativação secundária (via outros RTK) da sinalização por este mediada tem sustentado a progressão tumoral após inibição de *EGFR* mutado. A amplificação (2%) e as mutações ativadoras (5%) de *HER2* bem como a amplificação de *MET* (15%) constituem alguns exemplos disso [106,152,154].

Em *BRAF*, alterações ativadoras nas proteínas a jusante na via de sinalização são a resistência mais frequentemente observada e um bom exemplo de que o ataque simultâneo de diferentes frentes é possível e minimiza as resistências desenvolvidas[95,155]. Não obstante, a ativação de vias alternativas como *PI(3)K*/*mTOR* também tem sido apontada como uma via de fuga à inibição de *BRAF* e tem-se refletido num prognóstico mais desfavorável[95].

As alterações genómicas em genes relacionados com o ciclo celular têm sido descritas em 10% das resistências adquiridas a osimertinib (TKI para *EGFR*)[154]. Estas têm-se traduzido principalmente em amplificações de genes como *CCND1*/2 e *CDK4*/6 bem como em deleções *frameshift* em *CDKN2A*[154]. Estas variantes têm sido igualmente associadas a um prognóstico desfavorável[154]

Por fim, as transformações fenotípicas das células tumorais têm sido descritas em progressões da doença pós-TKI. Embora carentes de entendimento, estas poderão também surgir da ativação de vias alternativas e conferir insensibilidade a fármacos e/ou um comportamento tumoral mais agressivo. A transformação de CPNPC em CPPC e a transição epitélio-mesenquimal são exemplos relativamente recorrentes na sequência da inibição de ALK e/ou EGFR. A primeira, associada à inativação completa de *RB1* e *TP53,* tem sido estimada em 3-10% em ALK e 4-15% em EGFR, enquanto que a transição epitélio-mesenquimal tem sido reportada em casos de progressão após gefitinib e osimertinib[107,154,155].

Em suma, a frequência com que as resistências ocorrem parece variar não só com o gene alterado mas também com o inibidor administrado. Na Tabela 5 [Anexo I] encontram-se compilados os principais mecanismos *on-target* e *off-target* descritos no âmbito das TDM aprovadas no cancro do pulmão.

Imunoterapia

Por recurso a anticorpos monoclonais, a imunoterapia consegue reverter a tolerância imunológica induzida pelas células tumorais e, consequentemente, promover a sua eliminação via sistema imunitário do hospedeiro[16,156,157]. A proteína de morte celular programada 1 (PD-1), o seu ligando (PD-L1) e o antigénio 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) têm sido os alvos mais comuns e os únicos com fármacos aprovados pela FDA no tratamento do cancro do pulmão[158].

Nivolumab e pembrolizumab, anticorpos anti-PD-1, foram os primeiros aprovados no contexto do cancro do pulmão (CPNPC). Comparativamente à quimioterapia convencional, estes fármacos revelaram-se significativamente superiores no que respeita a ORR radiológica, PFS bem como OS[159]. A sua associação a uma reduzida frequência de efeitos adversos (25 a 30% dos doentes) mas também de toxicidade (graus 3-5 observados em apenas 8-10% dos doentes), tem acrescentado uma maior qualidade de vida ao doente[156]. Todavia, apenas 15-20% dos doentes respondem à monoterapia facto que realça a necessidade não só de dispor de biomarcadores preditivos de resposta mas também de estratégias terapêuticas que potenciem o efeito destes inibidores[81].

Em 2015, juntamente com a aprovação de pembrolizumab, a expressão de PD-L1 foi aceite como um biomarcador preditivo de resposta do tumor à imunoterapia: Tumores com percentagens

iguais ou superiores a 50% de células neoplásicas PD-L1 positivas seriam mais beneficiados[156]. No entanto, o seu valor preditivo encontra-se limitado na medida em que o microambiente tumoral é flutuante e influenciável[158].

Até ao momento apenas a quimioterapia está aprovada em combinação com imunoterapia[160]. O seu efeito sinérgico tem sido corroborado nos diferentes ensaios clínicos ao evidenciarem respostas semelhantes no mesmo subtipo histológico independentemente da expressão de PD-L1. Neste sentido, todos os tumores malignos do pulmão tornam-se virtualmente potenciais candidatos à imunoterapia desde que conjugados com quimioterapia ajustada às suas histologias[161–163].

A expansão do grupo de tumores abrangidos por esta ferramenta terapêutica tem progressivamente chegado a estadios mais precoces da doença. Para além das promoções a tratamentos de 1ª linha nos estadios mais avançados das diversas histologias tumorais do pulmão, recentemente assistiu-se a uma mudança de paradigma inclusive no uso da quimioterapia como tratamento neoadjuvante (prática de benefícios limitados). São exemplos disso as aprovações de: (1) Nivolumab (conjugado com quimioterapia à base de platina) como tratamento neoadjuvante de CPNPC suscetíveis de excisão cirúrgica [tumores ≥4 cm ou gânglios linfáticos regionais (GLR) positivos][164]; e (2) Pembrolizumab como tratamento adjuvante de CPNPC nos estadios IB, II e IIIA sujeitos a resseção cirúrgica e a quimioterapia baseada em agentes de platina (2023)[165].

Os mecanismos de resistência primária e secundária têm também sido constatados na imunoterapia[158]. Embora possa ser um tratamento aplicado independentemente do *status* mutacional das células, estas influenciam o microambiente tumoral inclusive através do resultado das suas alterações genómicas[78]. Por exemplo, as mutações de *KRAS* foram associadas a elevada expressão de PD-L1, enquanto que variantes ao nível de *EGFR* (mutações) foram correlacionadas com baixos níveis de PD-L1[166,167]. Outros fatores têm sido apontados para uma resposta diminuta: (1) a evolução do perfil antigénico do tumor; (2) mutações de perda-de-função nos genes codificadores de proteínas associadas ao complexo de histocompatibilidade major; e (3) a estabilidade da regulação epigenética das células T exaustas.

Apesar de pouco elucidados, estratégias têm sido investigadas para contornar a baixa resposta observada aquando de resistência à imunoterapia. Dentre elas a perpetuação da tentativa de conjugação da radiação ionizante mas também o ataque simultâneo de dois pontos de controlo

imunológico como os regimes combinados aprovados recentemente para ipilimumab e tremelimumab (anticorpos monoclonais anti-CTLA-4)[168,169].

Por fim, encontram-se em curso uma serie de ensaios clínicos na tentativa de conciliar Imunoterapia e TDM. Alguns resultados têm sido promissores. Todavia, altos níveis de toxicidade têm também sido registados em algumas combinações pelo que é ainda uma área em estudo[170].

Objetivos

Em virtude do impacto das terapias dirigidas no prognóstico e qualidade de vida dos doentes com cancro do pulmão, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a distribuição das variantes alvo da ação de fármacos direcionados, em diferentes tipos histológicos submetidos a análise molecular.

Adicionalmente, e considerando os factos expostos na secção anterior, foram propósitos secundários deste estudo: (1) averiguar as frequências de envolvimento de determinados genes/variantes na carcinogénese pulmonar na população portuguesa; e (2) compreender a distribuição e o impacto das concomitâncias moleculares presentes, quer com variantes acionáveis quer nas diferentes categorias de expressão de PD-L1.

Material e métodos

Este estudo retrospetivo foi realizado no Laboratório de Patologia Molecular do Ipatimup Diagnósticos com o propósito de caracterizar o perfil molecular subjacente a diferentes tipos de cancro do pulmão presentes na população portuguesa com particular atenção nos genes/variantes acionáveis.

O período amostrado decorreu entre 04/07/2019 e 31/12/2020 e contemplou todos os casos que deram entrada no Ipatimup diagnósticos destinados à pesquisa de VAc/resistência a TDM no âmbito do cancro do pulmão (n=2272; exame *TissueLungCustom*). A proveniência dos casos (regiões de Portugal) encontra-se descrita na Tabela 6 [Anexo II].

Num total de 1987 casos, foram admitidos a estudo todos os casos que respeitaram as seguintes condições: (1) amostras biológicas referenciadas como sendo de neoplasia pulmonar independentemente do tipo de lesão amostrada (primária/metastática) [Anexo II, Figura 3]; e (2) análise molecular efetuada pelo painel *Oncomine Focus Assay* (OFA; *Thermo Fisher Scientific*, Cat. No. A28548) [Anexo III, Tabela 7]. Foram excluídos do estudo: (1) todos os casos provenientes de controlos de qualidade; (2) casos cuja amostra de neoplasia pulmonar não estava identificada como neoplasia primária; (3) casos sem qualquer informação clínica e/ou anatomopatológica; e (4) os casos cujo resultado molecular foi indeterminado.

Dados demográficos e clinicopatológicos

A população amostrada foi caracterizada mediante recolha de dados demográficos como idade, sexo e hábitos tabágicos. A informação clínica como estadiamento e metastização (regional e/ou à distância) foi registada com o(s) propósito(s) de contextualizar a amostra analisada e/ou aliar com os achados moleculares. Os dados relativos ao tumor primário (localização, dimensões, tipo histológico, padrões de crescimento histológico e marcadores IHQ) bem como os inerentes ao material biológico analisado (topografia, método de colheita, percentagem de núcleos neoplásicos) foram obtidos para caracterização da neoplasia pulmonar bem como para estabelecimento de correlações com os resultados moleculares. Resultados de estudos adicionais como a expressão de PD-L1 foram ainda anotados quando disponíveis. Estas informações foram obtidas por consulta de processos e/ou relatórios anatomopatológicos previamente anonimizados.

Classificação das neoplasias pulmonares e estadiamento

A classificação das neoplasias pulmonares foi revista e atualizada segundo as diretrizes da OMS para os tumores do tórax (2021). A informação relativa ao estadiamento esteve disponível em ambas 7ª e 8ª edições de classificação de estadios do cancro do pulmão. A sua atualização e uniformização para a 8ª edição não foi possível de ser feita devido à informação limitante presente na maioria dos casos. Assim, foram considerados quatro grupos: estadio I (IA1, IA2, IA3 e IB), estadio II (IIA e IIB), estadio III (IIIA, IIIB e IIIC) e estadio IV (IVA e IVB).

Análise molecular

A análise molecular foi efetuada pelo painel *OFA*. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) foram extraídos a partir de amostras – citológicas ou histológicas – representativas do tumor. A presença do tumor foi previamente confirmada ao microscópio e a percentagem de núcleos neoplásicos determinada. 10ng de DNA e RNA foram usados na preparação manual da biblioteca e do *template* segundo as instruções do fabricante. A sequenciação foi realizada via *Ion S5 System* (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, USA) e os dados analisados com *Ion Reporter Analysis Software* (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, USA). As variantes com uma frequência alélica igual ou superior a 5%, com métrica qualitativa adequada e classificadas como patogénicas, provavelmente patogénicas ou de significado incerto foram reportadas. As amplificações génicas apenas foram consideradas nas amostras com uma percentagem de núcleos neoplásicos igual ou superior a 50% e cuja mediana dos valores absolutos de todas as diferenças de pares (MAPD) foi inferior a 0,5. Os rearranjos génicos foram considerados aquando de um valor mínimo de 20 leituras, enquanto os *skippings* do *MET* e *EGFR* foram tidos como válidos a partir das 120 leituras. As variantes classificadas como polimorfismos, benignas, provavelmente benignas ou neutras não foram relatadas. Na classificação das variantes foram consideradas as bases de dados de variantes associadas a cancro como *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC), *cBioPortal for Cancer Genomics* e *ClinVar–NCBI–NIH* e *MSK's Precision Oncology Knowledge Base (OncoKB^{TM}).*

Análise estatística

As características dos pacientes e das amostras foram analisadas descritivamente. Para as variáveis categóricas consideraram-se as frequências absolutas (n) e relativas, nas variáveis contínuas atenderam-se, quando apropriado, às médias e respetivos desvios-padrão ou às medianas e respetivos intervalos interquartis bem como aos valores mínimos e máximos.

Todos os cálculos estatísticos foram efetuados com o programa *Statistical Package for the Social Sciences Statistics* (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp) para um nível de significância de 0,05 (duas caudas). Nas variáveis contínuas recorreram-se a testes paramétricos, como o teste t e ANOVA [do inglês, *ANalysis Of Variance*], para comparação das variáveis entre grupos e/ou face à generalidade da população estudada e sempre que os pressupostos para a aplicação destes testes estavam garantidos. Caso contrário, consideraram-se os resultados dos testes não paramétricos de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. As correlações de variáveis categóricas foram estudadas via teste Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher (Fisher), este último aquando de uma proporção de células com frequência esperada inferior a 5 maior ou igual a 20% na tabela de contingência. A avaliação de uma proporção específica num grupo ou entre dois grupos foi efetuada via teste Z.

Ética e confidencialidade

Ao abrigo do disposto no n.º 6 do artigo 19º da Lei n.º 12/2005, de 26 de Janeiro e em consonância com a Declaração de Helsínquia, os dados relativos aos 2272 casos analisados foram processados apenas para fins de investigação científica e obtenção de dados estatísticos sem comprometimento da confidencialidade das amostras. Neste sentido, toda a informação relativa à população amostrada foi previamente anonimizada e numericamente codificada por um membro do Ipatimup Diagnósticos externo ao estudo. Fizeram parte da informação anonimizada: processo, relatório anatomopatológico e base de dados com as respetivas variantes moleculares identificadas.

Resultados

Caracterização da população amostrada

Num total de 1987 casos admitidos a estudo, 36,9% (729/1977) das amostras foram oriundas de mulheres e 63,1% (1248/1977) de homens [Tabela 4]. A idade média da população amostrada foi de 67,9 ± 10,7 anos, a maioria entre os 51 e os 90 anos (92,6%). O ADC foi o tipo histológico predominante com 89,3% (1697/1900) das amostras. Destes, 4,4% (62/1414) foram ADC mucinosos e o padrão acinar foi o mais frequente (≥ 68,2% de 658 amostras informativas)[Anexo IV, Tabela 8]. A representação dos demais subtipos histológicos ocorreu segundo a Tabela 4. A distribuição entre homens e mulheres foi desigual tendo o predomínio masculino sido estatisticamente significativo no CCE (73,9%; Teste Z, p=0,043). O CS apresentou-se maioritariamente como carcinoma pleomórfico e, nos tumores neuroendócrinos, o CPPC foi o principal. Devido à natureza da amostra e/ou características histológicas menos específicas, em 3,4% das amostras a classificação do tumor ficou restrita a CPNPC sem outra especificação (SOE).

Tabela 4 - Caracterização e distribuição da população estudada pelos diferentes tipos de neoplasias do pulmão segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (2021) dos tumores do tórax

	Nº de casos	**Idade (anos)** (Média ± desvio-padrão)	**Proporção (%) de mulheres**	**Proporção (%) de homens**
Tumores epiteliais				
Adenocarcinoma	1697	68,0 ± 10,67	38,0%	62,0%
Carcinoma de células escamosas	92	69,5 ± 10,98	26,1%	73,9%
Carcinoma adenoescamoso	14	69,7 ± 6,90	28,6%	71,4%
CPNPC, SOE	65	65,8 ± 9,89	23,1%	76,9%
Carcinoma sarcomatóide	13	64,8 ± 10,51	46,2%	53,8%
Tumor tipo glândula salivar				
Carcinoma mucoepidermóide	1	59,0	100,0%	0,0%
Neoplasias neuroendócrinas do pulmão				
Carcinoma neuroendócrino				
Carcinoma neuroendócrino de grandes células	6	64,0 ± 9,92	33,3%	67,7%
Carcinoma pequenas células	11	72,4 ± 11,54	27,3%	72,7%
Tumor neuroendócrino				
Tumor carcinóide	1	60,0	0,0%	100,0%
Sem informação	**87**	**65,7 ± 11,46**	**39,0%**	**61,0%**
Total Geral	**1987**	**67,9 ± 10,69**	**36,9%**	**63,1%**

Os estadios IV constituíram 95,5% (613/642) dos casos com informação completa quanto ao estadiamento. *Status* dos GLR foi disponibilizado em 259 casos e haviam metástases em 191 casos. Metástases à distância estiveram ausentes em 15 casos e confirmadas em 620 casos onde a pleura foi o órgão mais afetado (38,6%), seguida do osso (20,5%), SNC (19,5%) e fígado (12,0%) [Anexo IV, Tabela 8].

A expressão de PD-L1 foi possível de ser apurada em 958 amostras. Nestas, 27,8% tiveram mais de 50% das células PD-L1 positivas (doravante "PD-L1≥50%")[Anexo IV, Tabela 8].

A informação relativa aos hábitos tabágicos esteve disponível em 213 casos: nos grupos fumador e ex-fumador houve um predomínio estatisticamente significativo dos homens (72,7% e 89,5%, respetivamente; p<0,001), enquanto nos não fumadores houve predomínio das mulheres (79,7% dos casos) [Anexo IV, Tabela 8].

Análise molecular

Os dados moleculares foram obtidos em 61,7% (1226/1987) a partir de amostras de tumor primário e em 20,2% (402/1987) a partir de lesões metastáticas [Anexo II, Figura 3]. Em 77,8% (1545/1987) foram detetadas variantes pelo painel OFA (doravante designados casos positivos). Num total de 2054 variantes, 78,6% (1614/2054) foram relativas a variantes pontuais/*indel*; 9,1% (186/2054) a fusões génicas; e 7,1% (146/2054) foram variantes do tipo CNG. Variantes particulares como o *skipping* do exão 14 do *MET* e a deleção EGFRvIII perfizeram 5,1% (104/2054) e 0,2% (4/2054), respetivamente.

As variantes pontuais totalizaram 81,3% (1312/1614) do seu grupo e estiveram associadas a um maior número médio de variantes por caso (1,43 variantes) comparativamente às *indel* (1,10 variantes; Mann-Whitney, p<0,001). No seu conjunto, este tipo de variantes esteve em menor proporção no CCE (44%; Teste Z, p<0,001).

As fusões génicas estiveram associadas a uma maior percentagem de mulheres (53,9%; Teste Z, p=0,001) bem como à ausência de hábitos tabágicos (Fisher, p=0,007).

Os CNG foram associados a um maior número médio de variantes por caso (1,90 variantes; Welch e Games-Howell – GH, p<0,001) e a sua proporção em exclusividade nas amostras foi baixa (4,2%; Teste Z, p<0,001). A percentagem de mulheres foi significativamente inferior neste tipo de variante (29,6%; Teste Z, p=0,007). Em contraste, a proporção de CNG foi consideravelmente mais alta no CCE (36,0%; Teste Z, p<0,001) e aquando da análise de lesões metastáticas (15,6%; Teste Z, p<0,001). Acresce ainda a sua associação a amostras de fígado (32,0%; Teste Z, p<0,001) e de gânglio linfático (17,9%; Teste Z, p=0,011) e a sua reduzida proporção em amostras de pulmão (6,1%, Teste Z, p=0,036).

O *Skipping* esteve associado a uma idade média superior (75,4 ± 10,16 anos; ANOVA e GH, p<0,001) bem como à expressão de PD-L1 (Teste de Qui-quadrado de Pearson - χ^2, p=0,009).

Distribuição das variantes acionáveis na população amostrada

Oito dos 11 genes com fármacos aprovados pela FDA apresentaram VAc reportadas em 47,9% (951/1987) das amostras analisadas [Anexo V, Figura 4]. Destas, 7,2% (68/951) apresentaram mais do que uma VAc (inclusive no próprio gene) e nenhuma apresentou alterações nos genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3.*

As VAc (n=1026), comparativamente com as VnAc (n=1028), foram associadas a um menor número médio de variantes por caso (1,45 vs. 1,75; Mann-Whitney, p=0,000); foram ainda mais frequentes em mulheres (63,3%; Teste Z, p=0,000) bem como aquando da ausência de hábitos tabágicos (68,4%; Teste Z, p<0,001). No ADC, a proporção de VAc foi superior à observada no CCE (50,8% vs. 36,7%; Teste Z, p=0,043) mas também à registada no CPNPC, SOE (50,8% vs. 34,6%; Teste Z, p=0,030). A natureza mucinosa do ADC esteve ligada a uma menor proporção de casos com VAc em comparação com os ADC não mucinosos (28,6% vs. 51,4%; Teste Z, p=0,001). No âmbito da metastização à distância, a ocorrência de metástases nas suprarrenais esteve associada a uma menor percentagem de casos com VAc face à ausência de metastização deste órgão (27,6% vs. 49,9%; Teste Z, p=0,032) bem como ao observado na população estudada (Teste Z, p=0,006).

ALK

ALK apresentou um total de 114 variantes distribuídas por 109 casos (5,5%; 109/1987)[Anexo IV, Tabela 8]. Destas, 86,0% (98/114) foram VAc as quais estiveram em exclusividade em 8,9% (85/951) dos casos elegíveis a TDM (CeTDM). Em 10 casos (1,1%; 10/951), as fusões de *ALK* ocorreram juntamente com VAc noutros genes.

O gene *EML4* foi o gene-parceiro de *ALK* em 72,9% (70/96) das suas fusões. *EML4*(13)::*ALK*(20) (n=31) e *EML4*(6)::*ALK*(20) (n=29) constituíram as variantes mais comuns quer em *ALK* quer no conjunto de fusões detetadas na população estudada. Em 25,0% (24/96) não foi possível identificar o gene-parceiro e, nestas, o total médio de variantes reportadas (1,67 variantes) foi superior ao observado nas duas fusões mais frequentes (Kruskal-Wallis, p=0,000). Em um caso a fusão ocorreu com o gene DCTN1.

A correlação com o sexo feminino mostrou-se díspar entre as VAc e as VnAc de ALK, com a proporção de mulheres nas primeiras superior em mais do dobro da observada nas VnAc. As ligações de ALK ao ADC mucinoso (Teste Z, p<0.001) e à presença de padrão sólido (Teste Z, p=0.005) permaneceram significativas no conjunto de VAc reportadas (n=1026).

BRAF

BRAF p.(Val600Glu) foi a principal variante de *BRAF* (30,9%, 34/110) e a única representante das variantes da classe I. A sua presença nos CeTDM foi de 3,6% (34/951), contributo superior ao observado em *ROS1* (2,9%; 28/951) através das suas múltiplas fusões [Anexo V, Figura 4]. O seu registo ocorreu sem concomitâncias em 61,8% (21/34) e apenas coexistiu com outra VAc (*skipping* do *MET*) em um caso.

A associação de *BRAF* ao sexo masculino perde significância ao nível desta variante onde as mulheres passam a constituir 38,2%. A proporção superior das variantes de *BRAF* nas amostras de tumores secundários mantém-se significativa [Anexo IV, Tabela 8] com 2,9% das lesões metastáticas portadoras de *BRAF* p.(Val600Glu) (Teste Z, p=0,025).

EGFR

EGFR foi o gene com maior número de variantes reportadas (n=544) e o segundo mais presente nas amostras analisadas (23,3%, 463/1987) [Anexo IV, Tabela 8]. As suas VAc foram detetadas em 91,8% (425/463) das amostras *EGFR* mutadas: em 12 amostras, concorreram com VAc noutros cinco genes (1,3%; 12/951); em 22 amostras, apresentou duas VAc; e, em um caso, *EGFR* constituiu-se o único gene com três alterações acionáveis numa mesma amostra.

No contexto das VAc, uma parte considerável das associações encontradas para EGFR [Anexo IV, Tabela 8] manteve-se significativa. A percentagem de amostras do sexo feminino foi praticamente o dobro da observada na população estudada (68,8%; Teste Z, p<0,001) e superior à constatada nas VnAc de EGFR (54,3%; Teste Z, p=0,009) . O ADC foi o subtipo histológico dominante (96,2%), porém a proporção de VAc em EGFR (44,9%) não distou muito da observada em CCE (45,5%). Ambas foram significativamente superiores à registada em CPNPC, SOE (11,1%; ordenadamente, Testes Z, p=0,009 e p=0,044). Apesar da correlação com os ADC, as variantes de EGFR estiveram totalmente ausentes nos ADC mucinosos (Teste Z, p<0,001). A probabilidade de deteção de VAc em EGFR permaneceu ainda aumentada aquando da expressão de TTF-1/Napsina A (44,3%; Teste Z, p<0,001), em amostras PD-L1<50% (45,8%; Teste Z, p<0,001) e em amostras provenientes de não fumadores (55,8%; Teste Z, p=0,012). À exceção do sexo, nenhuma das associações anteriores diferiu significativamente do observado nas VnAc de EGFR.

As variantes pontuais constituíram o tipo de alteração predominante em *EGFR* (91,9%; 500/544) e as únicas suscetíveis à ação dos TKI (90,0%; 450/500). As substituições *missense* perfizeram 47,6% (214/450) das VAc em *EGFR* e as *Indel* os restantes 52,4% (236/450). A sua distribuição ao longo do gene foi desigual: o exão 19 concentrou 45,8% (206/450) e ficou restrito às *Indel* (100%; 206/206); no exão 21 estiveram alocadas 37,1% (167/450) das VAc e prevaleceram as substituições *missense* (99,4%; 166/167); enquanto que do exão 20 emergiram 12,2% (55/450)

e as proporções de variantes *missense* e *indel* foram equivalentes (50,9% e 49,1%, respetivamente). As demais VAc residiram no exão 18 e 90,9% (20/22) foram *missense*.

As duas principais variantes de *EGFR* reuniram mais de metade da sua casuística e contribuiriam para a eleição de 29,9% (284/951) dos casos para TKI. *EGFR* p.(Leu858Arg) totalizou 29,0% (158/544) das variantes de *EGFR* e esteve associada a uma idade média superior (71,1 ± 10,98 anos) à registada em EGFR (Teste t, p=0,040). A correlação com o consumo de tabaco manteve-se com a superioridade da sua proporção no grupo não fumador (23,1%) face à registada conjuntamente nos grupos "ex-fumador" e "fumador" (7,8%; Teste Z, p=0,033). *EGFR* p.(Glu746_Ala750del) foi a segunda variante mais comum (23,2%; 126/544) e a sua presença foi escassa (2,9%) no total de amostras informativas PD-L1≥50% (Teste Z, p=0,014). Embora reconhecidas como variantes de resistência, *EGFR* p.(Thr790Met) e as inserções do exão 20 são sensíveis a fármacos de terceira geração. Estas corresponderam a 11,1% das VAc de *EGFR* (50/450) e *EGFR* p.(Thr790Met) esteve ainda completamente dissociada do padrão sólido (Teste Z, p=0,042).

HER2

As VAc de *HER2* estiveram presentes em 4,3% (41/951) dos CeTDM [Anexo V, Figura 4]. A sua tradução ocorreu maioritariamente sob a forma de *indels* (65,8%, 27/41), seguidas das substituições *missense* (34,1%; 14/41). A repartição ao longo do gene e o tipo de variante predominante foram dissemelhantes: o exão 20 concentrou 70,7% (29/41), foi hegemonizado pelas *indels* (93,1%; 27/29) e acomodou a variante mais frequente – *HER2* p.(Tyr772_Ala775dup) (n=20); os exões 8 e 19 apenas alocaram substituições *missense* e reuniram 14,6% (6/41) e 12,2% (5/41) das VAc, respetivamente; e no exão 18 somente foi registada uma VAc.

Apesar do peso de 48,8% (20/41) de *HER2* p.(Tyr772_Ala775dup) no conjunto de VAc de *HER2* e da sua associação ao sexo feminino (1,8%; Teste Z, p=0,005), as proporções de homens e de mulheres elegíveis a TDM via *HER2* não diferiu significativamente. O ADC foi o tipo histológico mais prevalente (95,1%; 39/41) e, como em *EGFR*, não houve registo de variantes detetadas nos ADC mucinosos. A presença de padrão acinar na amostra tumoral continuou correlacionada a uma reduzida probabilidade de VAc em *HER2* (Teste Z, p=0,046). A relação de *HER2* com a existência de metástases nos gânglios linfáticos não perpetuou nas suas VAc.

Por fim, as VAc de *HER2* apenas estiveram presentes 4,2% das amostras PD-L1≥50%.

KRAS

KRAS p.(Gly12Cys) constituiu a variante mais frequente em *KRAS* (37,3%; 202/542) mas também no conjunto de VAc identificadas (19,7%; 202/1026) [Anexo V, Figura 4]. Através desta, *KRAS*

teria sido em 20,0% (190/951) o exclusivo responsável pela eleição de casos para TDM e em 1,3% (12/951) essa responsabilidade seria partilhada com um de dois genes: *ALK* ou *MET*.

A única VAc de *KRAS* esteve associada a uma idade média (64,9 ± 9,30 anos) inferior à calculada nas amostras *KRAS* positivas (66,5; Teste t, p=0,017) a qual, por si, já foi inferior à observada na população (67,9; Teste t, p<0,001).

De um modo geral, as associações estabelecidas em *KRAS* e respetiva VAc foram complementares às registadas em *EGFR*. O sexo masculino predominou (74,3%) e KRAS seria o responsável por 34,3% (157/458) dos homens elegíveis a TDM (Teste Z, p<0,001). As proporções de ADC e de CCE acionáveis via *KRAS* seriam, pela ordem, 20,2% (174/859) e 9,5% (2/21). Contudo, nos CPNPC (SOE), a percentagem de *KRAS* p.(Gly12Cys) foi significativamente superior (56,2%, 9/16; Testes Z, p<0,001). *KRAS* mutado esteve ainda ligado à ausência de expressão de TTF-1/Napsina A na amostra tumoral e esta associação manteve-se aquando da restrição da análise a *KRAS* p.(Gly12Cys) cuja proporção nos TTF-1/Napsina A negativos (43,4%) superou os 19,2% nos TTF-1/Napsina A positivos (Teste Z, p<0,001). Das correlações constatadas em *KRAS* [Anexo IV, Tabela 8], prevaleceu ainda em *KRAS* p.(Gly12Cys) a associação ao consumo de tabaco na história (passada e/ou corrente) do doente onde as frequências relativas de amostras portadoras desta variante nos grupos ex-fumador (56,5%) e fumador (47,8%) foram claramente superiores à registada nos não fumadores (2,2%; Testes Z, p<0,001).

MET

MET foi o terceiro gene mais alterado na população estudada (6,4%; 127/1987) [Anexo IV, Tabela 8]. A sua posição no *ranking* manteve-se no grupo de CeTDM e para o qual contribuiu em 12,4% (118/951) [Anexo V, Figura 4].

A sua VAc predominante foi o *skipping* do exão 14 que esteve presente em 81,9% (104/127) das amostras *MET* mutadas. Em 34,6% (36/104), devido às características do painel, foi possível identificar (ao nível do DNA) a variante causal do *skipping*: quatro *indels* e 32 substituições nucleotídicas.

A amplificação de *MET* – conhecida por ser uma alteração de resistência, porém responsiva a capmatinib, crizotinib e tepotinib – foi a terceira variante mais frequente a seguir às variantes causais de *skipping* envolvendo o codão 1010 (15,3%; 20/131). Presente em 7,1% (9/127) dos *MET* positivos, apresentou-se na sua maioria (5/9) como a única variante detetada na amostra. Em 3 amostras, os CNG foram concomitantes com o *skipping* do exão 14. Adicionalmente, as variantes de *MET* foram as únicas VAc detetadas em 11,1% (106/951) dos CeTDM.

Com exceção dos CNG, cuja idade esteve em linha com a observada no respetivo tipo de variante, as VAc de *MET* tiveram idades superiores a 69 anos. Destas sobressai *MET*

p.(Asp1010Asn) – variante causadora de *skipping* – que, com uma frequência de 10 amostras, teve uma idade média de 81,4 ± 9,02 anos a qual é 7,4 anos mais alta que a idade média de *MET* (74,0; Teste t, p=0,029) e 13,5 anos superior à idade média da população estudada (Teste t, p<0,001).

As alterações de *MET* foram detetadas com maior frequência em tumores provenientes de homens no grupo de CeTDM (14,7% vs. 9,3%; Teste, p=0,010). A distribuição pelos diferentes tipos histológicos respeitou as suas proporções no conjunto de amostras admitido a estudo. A dissociação completa das variantes de *MET* da natureza mucinosa do ADC [Anexo IV, Tabela 8], perdeu o seu significado estatístico no contexto das VAc. O mesmo não se verificou no que respeita à metastização hepática a qual, quando presente, foi sinónimo de ausência de variantes em *MET* (Teste Z, p=0,026). *MET* acionável esteve ainda positivamente correlacionado com a expressão de PD-L1, onde residiu em 21,0% das amostras PD-L1≥50% (Teste Z, p=0,012).

RET

As variantes reportadas em *RET* estiveram presentes em 46 amostras (2,3%; 46/1987) e foram na sua maioria fusões génicas (83,0%; 39/47) [Anexo IV, Tabela 8]. Estas foram as responsáveis pelo contributo de *RET* de 4,0% (38/951) para o conjunto de casos acionáveis [Anexo V, Figura 4]. Num total de 6 fusões distintas e 3 genes-parceiros, o ponto de quebra em *RET* ao nível do exão 12 foi quase ubíquo e esteve confirmado em 87,2% (34/39) das fusões. O gene *KIF5B* foi o principal parceiro (56,4%; 22/39) e contou com a variante de maior frequência neste recetor: *KIF5B*(15)::*RET*(12) (42,6%; 20/47). Os demais 43,6% foram o somatório das fusões com *CCDC6* (28,2%; 11/39) e com *NCOA4* (5,1%; 2/39) bem como da quota parte relativa às quatro fusões onde a identificação do gene-parceiro não foi possível. *RET* foi ainda o gene com maior percentagem de amostras em que a sua VAc foi a única variante identificada (78,9%; 30/38).

A percentagem de homens (3,1%) e mulheres (4,4%) com fusões envolvendo *RET* não diferiu significativamente. O ADC acomodou 97,2% (35/36) das VAc de *RET* e a sua associação à existência de padrão micropapilar no tumor prevaleceu ao nível das suas fusões (10,9%, 5/46; p=0,004, Teste Z). De igual forma, a exclusividade de *RET* nas amostras informativas oriundas de não fumadores continuou significativa no âmbito das VAc (Teste Z, p=0,023). As demais correlações estatísticas constatadas em *RET* [Anexo IV, Tabela 8] não se refletiram ao nível dos seus rearranjos.

ROS1

As fusões génicas constituíram o principal tipo de variante registado em *ROS1* (87,2%, 41/47; Teste Z, p<0,001). Estas seriam responsáveis pela sinalização de 2,9% (28/951) dos casos para potencial administração de TKI e tiveram identificados cinco genes-parceiros: *CD74* (56,1%,

23/41); *SLC34A2* (19,5%, 8/41); *EZR* (9,8%, 4/41); *SDC4* (4,9%, 2/41) e *SHM1* (2,4%, 1/41) [Anexo V, Figura 4]. Em três fusões não foi possível reconhecer o gene-parceiro.

Em contraste, com as percentagens de exclusividade das VAc de *ALK* e *RET* nas amostras, as fusões de *ROS1* coexistiram com outras alterações, detetadas pelo painel, em 64,3% (18/28) das suas amostras. Em 13 amostras (72,2%, 13/18) foram detetadas duas fusões envolvendo os mesmos genes, facto que fez de *ROS1* o gene com maior percentagem de amostras em que a segunda VAc ocorre no próprio gene (46,4%; 13/28).

A idade média de *ROS1* foi consideravelmente inferior à da população amostrada (62,4 vs. 67,9; Teste t, p=0,003) bem como à calculada nas fusões (66,0; Teste t, p=0,002). *CD74* (principal gene-parceiro de *ROS1*) e sua fusão mais comum – *CD74*(6)::*ROS1*(34) – estiveram ligados a uma idade média de 55,2 ± 11,43 anos, inferior à própria idade média de *ROS1* (Teste t, p=0,023). No conjunto de VAc reportadas, a distribuição geral das fusões de *ROS1* pelos sexos feminino (4,1%) e masculino (3,9%) foi quase equitativa. O ADC correspondeu a 92,8% (26/28) das amostras acionáveis via *ROS1* e as remanentes foram relativas a um CCE e a um CAE. Os rearranjos de *ROS1*, em particular os envolvendo CD74, foram ainda mais frequentes aquando de marcação positiva de p40 e/ou p63 (20,8% vs. 4,6%; Teste Z, p=0,007) mas também aquando da expressão de PD-L1≥50% (8,1% vs. 2,7%; Teste Z, p=0,023).

Distribuição das variantes não acionáveis na população estudada

As VnAc constituíram metade das variantes reportadas (50,0%; 1028/2054). O seu relato ocorreu em 828 amostras: 27,7% (285/1028) das VnAc coexistiram com VAc em 239 amostras; em 169 amostras, a concomitância aconteceu com outras VnAc; e, em 469 amostras, foram a única variante detetada.

Complementarmente às VAc, as VnAc foram associadas: (1) ao sexo masculino (Teste Z, p<0,001,); (2) a tumores pulmonares que não ADC (Teste Z, p=0,005; (3) ao ADC mucinoso (Teste Z, p=0,001); (4) à ausência de expressão de TTF-1 e/ou Napsina A (Teste Z, p<0,001); (5) à ocorrência de metastização das suprarrenais (Teste Z, p=0,032); bem como (6) à história passada ou corrente de consumo de tabaco (Teste Z, p<0,001).

A coexistência de VAc na amostra altera a significância de algumas das correlações e as VnAc passam a ter maior representatividade nos grupos de amostras relativos a(o): progressões (Teste Z, p=0,044), tumores secundários (Teste Z, p=0,002) e a amostras com padrão papilar referenciado (Teste Z, p=0,011).

As VnAc de *KRAS* mantiveram a liderança com 39,6% (328/828) das amostras, sendo seguidas de *PIK3CA* com 12,4% (103/828). As alterações não acionáveis de *EGFR*, *BRAF* e *CTNNB1* foram

identificadas em 10,6% (88/828), 9,1% (75/828) e 5,6% (46/828), respetivamente. Em *BRAF*, 93,4% das suas VnAc encontram-se afetas a amostras de casos não acionáveis (Teste Z, p=0,000), enquanto que, em *EGFR* e *CTNNB1,* a maioria das suas alterações não acionáveis residem simultaneamente a VAc. As variantes *missense* de *SMO* encontraram-se em 4,3% (36/828) dos positivos com VnAc e a amplificação de *MYC* em 3,6% (30/828)[Anexo VI, Tabela 9].

KRAS (não acionável)

Com exceção de *KRAS* p.(Gly12Cys), todas as variantes de *KRAS* foram VnAc (n=340). Estas estiveram presentes em 62,2% (328/527) das amostras *KRAS* mutadas e ocorreram na sua maioria na ausência de VAc (92,9%, 316/340).

O exão 2 reuniu 82,6% (281/340) de todas as VnAc identificadas em *KRAS*. Neste, o codão 12 foi o que registou maior variedade de alterações e acolheu as três VnAc mais recorrentes: *KRAS* p.(Gly12Val) (20,3%, 107/527), *KRAS* p.(Gly12Asp) (13,7%, 72/527) e *KRAS* p.(Gly12Ala) (5,5%, 29/527). Os codões 13 (exão 2) e 61 (exão 3) foram também localizações frequentemente alteradas. O primeiro agregou 7,8% (41/527) das amostras *KRAS* positivas e teve como variantes mais assíduas duas substituições homologas às registadas no codão 12: *KRAS* p.(Gly13Asp) e *KRAS* p.(Gly13Cys). Ao nível do aminoácido Gln61 foram identificadas 5 substituições diferentes que reuniram 6,8% (36/527) dos *KRAS* positivos.

Os CNG corresponderam a 2,0% (11/542) das variantes de *KRAS* e ocorreram sempre em paralelo com outra(s) variante(s). Em 81,8% (9/11) das amostras, a segunda variante foi registada no próprio *KRAS*.

As frequências relativas das VnAc de *KRAS* variaram de acordo com a histologia tumoral: CCE (5,4%, 2/37) teve uma proporção significativamente inferior à do ADC (33,7%, 300/890; Teste Z, p<0,001) e à do CPNPC, SOE (47,1%, 16/34; Teste Z, p<0,001). Em consonância, a percentagem de *KRAS* não acionável nas amostras p40 e/ou p63 positivas foi consideravelmente menor (Teste Z, p<0,001). As associações de *KRAS* mutado ao ADC mucinoso bem como à presença de hábitos tabágicos permaneceram significativas quando consideradas apenas as suas VnAc (em ambos: Teste Z, p<0,001). Em contraste, *KRAS* p.(Gly12Ala) destacou-se das demais alterações de KRAS ao apresentar uma idade média significativamente superior (71,3 ± 9,32 anos; Teste t, p=0,011).

PIK3CA

No âmbito do cancro do pulmão, as variantes de *PIK3CA* são tidas como não acionáveis. Estas estiveram distribuídas ao longo do gene de forma similar, não tendo havido diferenças significativas quando se compararam amostras com e sem VAc. A maioria das variantes (56,2%, 59/105) concentrou-se num trecho específico do gene, chamado domínio helical (codões 540 a 549; exão 10), sendo que 49,2% (29/59) dessas variantes ocorreram nos casos não acionáveis.

As duas variantes mais comuns – *PIK3CA* p.(Glu545Lys) e *PIK3CA* p.(Glu542Lys) – tiveram frequências equivalentes nos casos não acionáveis *PIK3CA* positivos (22,2% cada). A variante *PIK3CA* p.(Glu542Lys) também foi associada à presença de padrão sólido (Teste Z, p=0,033). O resíduo 1047, localizado no domínio quinase, foi o terceiro aminoácido de *PIK3CA* mais alterado. Este albergou duas substituições diferentes - *PIK3CA* p.(His1047Arg) (n=9) e *PIK3CA* p.(His1047Leu) (n=3) – repartidas de modo quase equitativo pelas amostras com e sem VAc. A amplificação de *PIK3CA* esteve presente em 5,6% (3/54) dos casos não acionáveis *PIK3CA* positivos.

Quanto às coexistências de variantes, as variantes de *PIK3CA* foram encontradas junto com variantes de outros 15 genes. Nove desses genes tiveram variantes coexistentes apenas em casos não acionáveis, incluindo *ALK* e *RET*. Em dois genes – *BRAF* e *EGFR* – as variantes estiveram mais associadas às suas VAc (p=0,044 e p<0,001, respetivamente), enquanto nos demais genes não foram observadas diferenças significativas. *KRAS* liderou as concomitâncias não acionáveis de *PIK3CA* com 35,5% (7/20) das amostras e *ROS1* não compartilhou amostras com *PIK3CA*.

EGFR (não acionável)

As VnAc de *EGFR* correspondem a 17,3% (94/544) do seu total de variantes e estiveram presentes em 88 amostras nas quais foram concomitantes a VAc em 53 amostras.

As variantes pontuais constituíram mais de metade deste grupo (53,2%; 50/94). As *indel* encontraram-se confinadas ao exão 19 e totalizaram 16% (8/50). As substituições *missense* repartiram-se por 7 exões (exões 3, 7, 15 e 18-21) tendo o exão 21 e o exão 18 concentrado, pela ordem, 47,6% (20/42) e 16,7% (7/42). Os CNG foram a terceira variante mais frequente de *EGFR* (7,4%, 40/544). Estes concorreram em 23 casos com VAc no próprio *EGFR* e em 9 amostras foram a única alteração detetada. A deteção da deleção *EGFR* vIII no contexto do cancro do pulmão ocorreu em 0,9% (4/463) dos *EGFR* positivos e as fusões génicas envolvendo *EGFR* não tiveram lugar na população analisada.

Dentre as correlações enumeradas para *EGFR* [Anexo IV, Tabela 8; Anexo VI, Tabela 9], apenas as encontradas para o sexo (χ^2, p=0,000) e para os padrões de crescimento lepídico (χ^2, p=0,005) e acinar (χ^2, p=0,010) é que tiveram sucessão entre as VnAc. Adicionalmente, e no conjunto de VnAc, a presença de padrão sólido foi sinónimo de probabilidade diminuta de deteção de variantes em *EGFR* (Teste t, p=0,039).

BRAF (não acionável)

Sem registo de fusões e CNG, *BRAF* esteve associado a variantes *missense* (Teste Z, p<0,001). As VnAc (69,1%, 76/110) corresponderam em 25,4% (28/110) à classe II e em 32,7% (36/110) à classe III. Em 10,9% (12/110) não se encontrou classe atribuída.

O envolvimento dos 7 exões e dos 15 codões com VnAc não foi homogéneo. O exão 11 reuniu 44,7% (34/76) e ancorou dois dos três codões mais comummente alterados: codão 469 (16,4%, 18/110) e codão 466 (10,0%, 11/110). *BRAF* p.(Gly469Ala) foi a VnAc mais comum (10,0%, 11/110). O exão 15 foi o que teve maior variedade de alterações (13 substituições diferentes) e agrupou 43,4% (33/76) das VnAc de *BRAF*. O codão 594 (12,8%; 14/109) acolheu a terceira variante mais assídua de *BRAF* – *BRAF* p.(Asp594Asn) (7,3%; 8/110) – e a única partilhada com os casos acionáveis.

No conjunto das VnAc foi ainda constatada uma particularidade: *BRAF* p.(Gly464Val), alocada ao P-*loop* do domínio quinase, foi associada a uma idade média significativamente inferior (59,7 ± 2,08 anos) quer à calculada nas variantes pontuais (67,6; Teste t, p=0,022) quer à registada no próprio *BRAF* (67,7; Teste t, p=0,022).

CTNNB1

As alterações de *CTNNB1* estiveram presentes em 2,3% (46/1987) dos casos admitidos a estudo: em 60,9% (28/46), foram concomitantes a VAc; em 15,2% (7/46), concorreram exclusivamente com outras VnAc; e, em 23,9% (11/46) foram a única variante identificada na amostra.

As suas variantes – 46 *missense* e 1 *indel* – encontraram-se todas no exão 3 e seguiram uma distribuição independente das concomitâncias. A maioria comprometeu os sítios de fosforilação intervenientes na sua degradação via ubiquitina (78,2%; 36/46). A serina 37 foi o mais frequentemente alterado e deteve as duas variantes mais assíduas: *CTNNB1* p.(Ser37Cys) (21,7%, 10/46) e *CTNNB1* p.(Ser37Phe) (17,4%, 8/46). As demais variantes repartiram-se pelos codões 32 (n=7), 33 (n=9), 34 (n=3), 41 (n=3) e 45 (n=6). A *indel* detetada – *CTNNB1* p.(Ala39_Leu46delinsVal) – aboliu dois locais de fosforilação (resíduos 41 e 45).

A coexistência de variantes em *EGFR* na amostra ocorreu em 47,8% dos *CTNNB1* positivos (Teste Z, p<0,001). Como em *EGFR*, a percentagem de *CTNNB1* mutados nos PD-L1≥50% (0,9%) foi igualmente reduzida (Teste Z, p<0,001) e a sua associação a amostras provenientes de progressões foi também constatada (Teste Z, p=0,007). *CTNNB1* esteve ainda relacionado com a ocorrência de metástases ósseas (Teste Z, p=0,039).

SMO

As alterações de *SMO* traduziram-se em variantes *missense* distribuídas pelos *loop* extracelulares (16,7%, 6/36) e pelos domínios helicais transmembranares 2 e 7 (83,3%, 30/36). A sua exclusividade na amostra foi de 41,7% (15/36) e em 36,1% (13/36) as concomitâncias não englobaram VAc.

SMO p.(Val270Ile) totalizou 75,0% (27/36) das variantes de *SMO* e, como na generalidade deste gene, foi mais assídua entre homens (Teste Z, p=0,024). A interpretação da sua patogenicidade

tem sido conflituosa e o seu relato tem ocorrido em ambas as versões somática e germinativa (*ClinVar* e *COSMIC*, último acesso a 17/08/2023). Em Dezembro de 2019, foi classificada pela primeira vez como benigna no *ClinVar* e desde então as classificações registadas nesta base de dados têm sido de "significado incerto" (Novembro 2021) e "Benigna" (Junho 2022). No presente estudo, esta variante apresentou uma fração alélica média de 0,50±0,115 a qual é concordante com uma origem germinativa.

A distribuição de *SMO* mutado em função dos dados clínicos e/ou características do tumor não apresentou quaisquer diferenças estatisticamente significativas para além da indicada.

MYC (e MYCN)

A amplificação de *MYC* esteve presente em 1,5% (30/1987) dos casos admitidos a estudo. Em 7 amostras ocorreu em paralelo com VAc (3 *EGFR*, 2 *KRAS*, 1 *MET*, 1 *ALK*) e em 13 constituiu a única variante identificada. Na totalidade dos *MYC* positivos, cinco amostras encontram-se identificadas como oriundas de um diagnostico inicial e três foram relativas a progressões. *MYC* amplificado foi ainda mais frequente em homens (2,0% vs. 0,7%; Teste Z, p=0,034) e teve um total médio de 1,77 variantes detetadas o qual foi superior ao registado na população estudada (Teste t, p=0,004). O ADC foi o tipo histológico predominante (75,0%, 21/28), porém foi nos CCE que a sua proporção foi superior (6,7% vs. 1,2% nos ADC; Teste Z, p=0,002). Relativamente a marcadores IHQ, *MYC* esteve correlacionado com uma marcação neuroendócrina positiva (Fisher, p=0,013) e a expressão de PD-L1≥50% foi registada em 18,2% das amostras informativas. *MYCN* teve o seu número de cópias aumentado numa amostra de ADC e, tal como 36,7% (11/30) das amostras *MYC* positivas, esta ocorreu concomitantemente com uma alteração num gene *RAS*. *KRAS* foi o concomitante principal de *MYC* e *MYCN* (52,9% e 100,0%, respetivamente), todavia foi com as alterações de *NRAS* que a amplificação de *MYC* esteve estatisticamente associada (Teste Z, p=0,027).

Por fim, o número acrescido de cópias deste fator de transcrição esteve numa proporção significativamente superior no grupo de amostras com metástases nos gânglios linfáticos (Teste Z, p=0,019) mas também aquando da análise de amostras de tumores secundários (Teste Z, p=0,043).

Outras VnAc

Nos genes caracterizados pela hegemonia das fusões génicas, as VnAc traduziram-se basicamente em substituições *missense*, afetas na sua maioria/totalidade aos respetivos domínios tirosina quinase. Em duas amostras, *ALK* e *ROS1* registaram ainda uma *indel*. E, em contraste com os rearranjos, as VnAc nestes genes não tiveram um registo recorrente.

Com exceção de ALK p.(Gly1202Arg) e ALK p.(Gly1269Ala), todas as variantes pontuais de ALK foram VnAc. Identificadas ao nível dos exões 11, 21, 23-25 e 29, o domínio quinase abarcou mais de 50% e a concomitância com VAc também superou este ponto médio. Para além das variantes descritas na secção sucedente "Genes/variantes concomitantes a VAc", destacam-se: (1) *ALK* p.(Gly1128Glu) que ocorreu num resíduo previamente associado a resistência *on-target;* e (2) a amplificação de *ALK* (relatada como mecanismo de resistência) constou em apenas uma amostra sem qualquer variante de *ALK* concomitante nem informação quanto ao momento da colheita da amostra analisada.

Em *RET* e *ROS1*, as variantes pontuais emergiram de amostras de ADC e concentraram-se em dois exões codificantes do domínio tirosina quinase. A repartição pelos exões 12 e 15 de *RET* foi equitativa, enquanto que em *ROS1* os exões 36 e 38 reuniram respetivamente 83,3% (5/6) e 16,7% (1/6) das suas variantes. No que concerne a concomitâncias, metade das VnAc de *ROS1* não coexistiu com VAc, ao passo que, em *RET*, somente *RET* p.(Arg886Gln) e *RET* p.(Ser904Cys) é que foram detetadas em amostras de casos acionáveis. Nenhuma das associações tabeladas para *RET* e *ROS1* perpetuou ao nível das suas variantes pontuais.

As VnAc de *HER2* completaram 35,9% (23/64) do total de alterações de *HER2*. Estas traduziram-se maioritariamente em substituições de aminoácidos (65,2%; 15/23) codificados ao longo de 6 exões: exão 25 (21,7%; 5/23) e exões 8 e 19-22 (8,7% cada; 2/23). As três *indels* identificadas ocorreram nos exões 18 (n=1) e 19 (n=2). A amplificação de *HER2* e *HER2* p.(Gly1015Glu) foram as VnAc mais assíduas: 21,7% (5/23) e 17,3% (4/23), respetivamente. Estas foram as únicas partilhadas entre os grupos de amostras com e sem VAc. A maior parte das VnAc de *HER2* residiram em amostras sem alterações acionáveis concomitantes: 30,4% (7/23) em concomitância com VnAc noutros genes e 39,1% (9/23) em exclusivo na amostra. Das associações estabelecidas para *HER2*, apenas permaneceu significativa a relativa à metastização de gânglios linfáticos, a qual quando presente se traduziu numa maior proporção de amostras com VnAc em *HER2* (12,0% vs. 1,3%, p=0,007).

As substituições *missense* de *MET* reuniram 80,0% (8/10) das suas VnAc. Estas repartiram-se decrescentemente pelos exões 11 (40,0%; 4/10), 2 (30,0%; 3/10) e 19 (10%; 1/10) e tiveram idades acima dos 69 anos. Os 20,0% restantes corresponderam a duas deteções da fusão PTPRZ1(1)-*MET*(2). Todas as amostras foram relativas a ADC e, em 60%, a VnAc de *MET* foi a única alteração molecular identificada. *MET* p.(Ile798Thr) foi única VnAc identificada conjuntamente com uma VAc. Nenhum dos cruzamentos com os dados do doente/tumor mantiveram o seu significado estatístico ao nível de *MET* não acionável.

Dentre os genes sem VAc reportadas, alguns genes foram correlacionados com diferentes subtipos histológicos de tumores do pulmão. *CCND1* esteve ligado a CCE em detrimento dos ADC

(Teste Z, p<0,001), facto apoiado pelas suas maiores proporções em amostras TTF-1/Napsina A negativas (Teste Z, p=0,004) e em amostras p40/p63 positivas (Teste Z, p=0,022). De igual forma, a amplificação de *FGFR1* ocorreu mais frequentemente em amostras de CCE (3,3%; Teste Z, p=0,033) e de CPNPC (3,8%; Teste Z, p=0,019) face ao observado no ADC (0,4%). A associação dos CNG de *FGFR1* à expressão de p40 e/ou p63, corrobora o achado anterior (Teste Z, p=0,008). As variantes de *HRAS*, por sua vez, encontraram-se correlacionadas com o CAE (Teste Z, p<0,001). Estas traduziram-se, como nos demais genes *RAS*, em substituições de aminoácidos codificados pelos codões 12 (22,2%, 2/9), 13 (55,6%, 5/9) e 61 (22,2%, 2/9). Ainda no âmbito da histologia tumoral, as variantes em *AKT1* (Teste Z, p=0,024) e em *CDK4* (Teste Z, p=0,039) apresentaram uma probabilidade acrescida de deteção aquando da presença de padrão papilar. Em *AKT1*, as mutações foram todas *missense*, enquanto que *CDK4* traduziu-se num aumento do número de cópias do gene.

Por fim, as substituições de *AKT1* estiveram ainda relacionadas à ocorrência de metástases no fígado (Fisher, p=0,014) e, como em *FGFR3,* foram associadas ao sexo masculino (Testes Z, p=0,036 e p=0,042, respetivamente).

Genes/variantes concomitantes a variantes acionáveis

As VAc foram registadas em concomitância em 30,7% (292/951) das amostras: 6,7% (64/951) ocorreram com uma segunda VAc; 0,4% (4/951) apresentaram três VAc; e em 24,7% (235/951) concorreram com VnAc.

Cerca de 8,5% (81/951) das amostras com VAc apresentaram simultaneamente variantes compatíveis com mecanismos de resistência dependentes do gene-alvo [Anexo V, Figura 4]. Destes, 30 variantes permanecem sem fármacos aprovados. Fora do gene-alvo de inibição, 121 alterações poderiam ser indicadas como responsáveis por uma possível progressão tumoral. Alterações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes em vias de sinalização a jusante constituíram mais de metade destas concomitâncias (54,5%, 66/121). Ativação em paralelo de RTK poderia emergir entre 3,6-4,5% dos casos com VAc em RTK e as variantes ativadoras de *KRAS* poderiam constituir aproximadamente 24,8% (30/121) dos mecanismos de resistência independentes do gene-alvo [Anexo V, Figura 4].

Não obstante dos estudos funcionais e/ou do aumento do número de deteções em situação de progressão tumoral, foram identificadas adicionalmente 37 alterações (prováveis) oncogénicas cujas consequências sobre a atividade da proteína mutante e o respetivo papel que esta desempenha na célula permitem compreendê-las como possíveis vias de resistência a TDM [Anexo V, Figura 4].

Concomitâncias acionáveis

Nos casos com pluralidade de VAc, 63,2% (43/68) apresentaram duas ou mais VAc no mesmo gene e, em 39,7% (27/68), as VAc ocorreram em genes diferentes.

ROS1 e *EGFR* foram os genes com maior proporção de casos cuja segunda VAc ocorreu no próprio gene: 86,7% (13/15) e 66,7% (24/36), respetivamente. Em *ROS1*, esta simultaneidade traduziu-se basicamente na presença de duas fusões génicas envolvendo o mesmo gene-parceiro, mas com um ponto de quebra diferente. *CD74* foi o gene-parceiro que, com maior frequência, esteve nesta situação: cerca de 60,9% (14/23) das suas fusões residiram emparelhadas numa mesma amostra. *EGFR* p.(Thr790Met) foi a variante que concorreu num maior número de amostras com outras variantes no próprio gene: 63,2% (12/19) coexistiram com *indels* acionáveis do exão 19 e 26,3% (5/19) com *EGFR* p.(Leu858Arg). Esta variante de resistência completou inclusive a totalidade das concomitâncias acionáveis de *EGFR* p.(Glu746_Ala750del) observadas no próprio gene. *EGFR* foi ainda o único gene com três VAc detetadas numa mesma amostra. Também no contexto das resistências *on-target*, ALK p.(Gly1202Arg) apresentou-se concomitantemente a ALK EML4(6)-ALK(20) numa amostra apontada como progressão e foi ainda identificada conjuntamente com ALK p.(Gly1269Ala) – variante classificada como provavelmente oncogénica e reconhecida como sendo de resistência a crizotinib.

Relativamente à coexistência de VAc em diferentes genes, *EGFR* e *MET* constituíram os genes que mais comummente se encontraram nesta situação tendo cada um concorrido com outros 5 genes nas suas versões acionáveis. O *skipping* do exão 14 do *MET* e *KRAS* p.(Gly12Cys) foram as variantes mais frequentes entre amostras com este tipo de perfil molecular e perfizeram, respetiva e individualmente, 48,1% (13/27) e 44,4%(12/27), e conjuntamente 25,9% (7/27). *KRAS* p.(Gly12Cys) nunca partilhou amostras com *EGFR* acionável e as fusões de *ALK* de parceiro desconhecido totalizaram os demais casos de simultaneidade com VAc (41,7%; 5/12). Estas fusões foram ainda em *ALK*, as variantes mais habitualmente em concomitância quer esta tivesse sido, ou não, acionável.

Em contraste, *BRAF* foi o gene cuja versão acionável foi a que menos coexistiu com outras VAc: *BRAF* p.(Val600Glu) apenas foi identificada conjuntamente com outra VAc (*Skipping* do *MET*) num único caso.

Concomitâncias não acionáveis

A deteção simultânea de VAc e VnAc numa mesma amostra aconteceu em 24,7% (235/951) dos CeTDM. Nestes, as VnAc ocorreram no mesmo gene portador da(s) VAc em 23,8% (56/235) das amostras. EGFR liderou este grupo (n=50) e a sua amplificação constituiu a VnAc que mais residiu

nesta situação (23/50). As suas principais VAc concomitantes foram *EGFR* p.(Leu858Arg) (n=11) e as deleções do fragmento LRE (n=7). As variantes pontuais não acionáveis (24 *missense* e três *indel*) repartiram-se pelos domínios quinase (19/50), transmembranar (5/50) e extracelular (3/50). *EGFR* p.(Val834Leu) foi a substituição *missense* não acionável mais frequente (n=5) e apenas existiu em concomitância com VAc de *EGFR*. Nas demais 6 amostras, destacam-se: (1) *ALK* p.(Asp1606Tyrfs*8), detetada com uma fusão de *ALK* numa amostra de progressão tumoral; e (2) as duas substituições registadas no resíduo Ala11 de KRAS – KRAS p.(Ala11Gly/Asp) – simultaneamente a KRAS p.(Gly12Cys).

Em 189 amostras (19,9% dos CeTDM), VnAc foram identificadas em genes distintos dos portadores da(s) VAc. *PIK3CA*, *CTNNB1* e *KRAS* presidiram este conjunto de amostras com 25,9% (49/189), 14,8% (28/189) e 10,6% (20/189), respetivamente. As suas variantes corresponderam na sua maioria a substituições *missense* e as suas repartições ao longo do gene parecem não ter sido afetadas pela coexistência de VAc. Contudo, as respetivas concomitâncias acionáveis apresentaram algumas particularidades. Nos CeTDM *PIK3CA* positivos, as VAc distribuíram-se por *EGFR* (61,2%, 30/49), *KRAS* (20,4%, 10/49) e *BRAF* (16,3%, 8/49). As fusões génicas e *EGFR* p.(Thr790Met) encontraram-se excluídas das amostras *PIK3CA* positivas, facto estatisticamente significativo em *ALK* (χ^2, p=0,041) e *ROS1* (Fisher, p=0,034). *CTNNB1* concorreu em 75,0% (21/28) com *EGFR* acionável (χ^2, p<0,001) e apenas não partilhou casos com *BRAF* e *ROS1* acionáveis, enquanto que as principais concorrências acionáveis de KRAS foram: (1) o *skipping* do *MET* (35,0%, 7/20); (2) as fusões de *ALK* de parceiro desconhecido (30,0%, 6/20); e (3), as VAc dos exões 19 e 21 de EGFR (25,0%, 5/20).

Ainda no conjunto de VnAc reportadas nos CeTDM salientam-se as registadas em: (1) RTK como *KIT* (n=8) e *PDGFRA* (n=5); (2) genes ligados à via *PI(3)K/mTOR*, onde as concomitâncias de AKT1 estiveram associadas a *BRAF* p.(Val600Glu) (Fisher, p<0,001); (3) genes da via *RAS*/*MAPK* como *BRAF* (n=5) e *MAP2K1* (n=5); mas também (4) em genes envolvidos na regulação da transcrição e ciclo celular como *MYC* (n=7), *CDK4* (n=7) e *CCND1* (n=5), estes sob a forma de um número acrescido de cópias.

Expressão de PD-L1

PD-L1 encontrou-se expresso em 59% (656/958) das amostras nas quais 27,8% (266/958) tiveram expressão de PD-L1≥50% [Anexo V, Figura 4]. A sua distribuição foi heterogénea pelos diferentes subtipos histológicos porém sem diferenças significativas aquando de PD-L1≥50%. No contexto dos ADC, a expressão de PD-L1 foi menos frequente nos ADC mucinosos: 27,6% vs. 59,6% dos ADC não mucinosos (Teste Z, p=0,001). O padrão sólido quando presente refletiu-se

numa maior proporção de PD-L1≥50% (Teste Z, p<0,001), enquanto que estas proporções acrescidas foram constatadas quando da ausência de referenciação dos padrões lepídico (Teste Z, p<0,001), acinar (Teste Z, p=0,025), papilar (Teste Z, p=0,050) e micropapilar (Teste Z, p=0,019). Em consonância, os tumores mais indiferenciados (G3 e G4) apresentaram um maior número de amostras categorizadas em PD-L1≥50% (Teste Z, p<0,001). As proporções de PD-L1≥50% nos tumores estadiados em T3 (37,5%) e T4 (35,5%) foram ainda superiores às de T1 (12,7%) e T2 (15,6%) (Teste Z, p<0,001).

Em amostras oriundas de progressões, a frequência de PD-L1≥50% (19,6%) foi inferior à observada nos casos de diagnóstico inicial (38,3%; Teste Z, p=0,031).

A proporção de PD-L1≥50% observada no grupo fumador (38,8%) foi superior à observada nos ex-fumador (24,5%) e não fumadores (25,0%) porém sem significado estatístico associado.

Por fim, a repartição das amostras PD-L1≥50% em função da presença/ausência de VAc foi equivalente: 27,3% e 28,1%, respetivamente.

Discussão

Atualmente, em Portugal, estão indicadas para análise molecular somática todas as amostras de CPNPC (subtipos histológicos não escamosos) provenientes de doentes com estadio avançado da doença[50]. Nos doentes com doença limitada candidatos a TDM e/ou com alto risco de progressão, a análise molecular deverá ser considerada aquando do diagnóstico[50]. Da mesma forma que doentes sujeitos a TDM e em progressão devem ser submetidos a nova pesquisa molecular[50]. Neste sentido, os dados do presente estudo deverão ser maioritariamente considerados como caracterizadores dos carcinomas pulmonares de estadios avançados e não como reflexo epidemiológico dos diferentes subtipos histológicos e/ou dados demográficos apesar de puder existir alguma aproximação à realidade.

A distribuição de acordo com o sexo mostrou-se concordante com epidemiologia reportada em estudos de carcinomas pulmonares de estadios avançados, nomeadamente em ADC, realizados em populações europeias[171,172]. O crescimento da proporção de mulheres com cancro do pulmão é notório aquando da comparação com outros estudos feitos na população portuguesa relativos a períodos de há uma/duas décadas atrás, estudos estes enriquecidos em ADC e/ou em estadios avançados[173–175]. Este crescimento, aliado à mudança no perfil de apresentação do cancro do pulmão nos homens (em virtude das modificações dos hábitos e dos produtos tabágicos), tem contribuído para o aumento da incidência do ADC relatado por Casal-Mouriño *et al.* (2021) nas populações europeias[172,176]. Adicionalmente, segundo este autor, a distribuição do cancro do pulmão por sexo bem como a idade média apresentada no momento do diagnóstico são independentes do estadio da doença[172]. Na população analisada, a idade média foi semelhante à de estudos realizados na Europa e díspar das registadas em estudos envolvendo populações do sudeste asiático como a China e a India[171,177,178]. Aqui, as idades médias reportadas têm-se situado entre os 56-62 anos nomeadamente em amostragens enriquecidas em tumores de estadios avançados da doença (>90%)[179,180]. Em contraste com o afirmado por Casal-Mouriño *et al.* (2021), Terrenato *et al.* (2022) demostrou que estadios mais avançados refletiram-se numa idade média inferior à dos doentes de estadios precoces (68 vs. 70 anos, respetivamente) na população japonesa[178]. Adicionalmente, diversos estudos têm correlacionado o tabaco a tumores pulmonares mais agressivos. Na análise efetuada, o grupo de fumadores apresentou uma idade média significativamente inferior (61,6 ± 11,6 anos) à observada nos não fumadores (67,8 ± 9,8 anos) e ex-fumadores (69,7 ± 10,3 anos) (Welch, $p<0,001$) e compreendeu mais de um terço dos casos informativos quanto aos hábitos tabágicos. No contexto da etiologia do cancro do pulmão, 72,4% dos tumores do pulmão informativos quanto aos hábitos tabágicos tiveram ligação ao consumo de tabaco, achado em linha com a

estimativa de 73,2% feita por Forjaz *et al.* (2020) para o ano de 2018[6]. De modo semelhante, a distribuição desigual desta etiologia em função do sexo – 91,2% nos tumores provenientes de homens e 38,2% nos tumores oriundos de mulheres (χ^2, p=0,000) – apresentou-se próxima das estimadas para as regiões norte e centro de Portugal e poderão explicar parte da epidemiologia associada a determinados genes. Cite-se, a título de exemplo, a frequência superior de ADC *EGFR* mutados (25,0%) face aos 14% estimados nos ADC ocidentais e a associação de *EGFR* quer ao sexo feminino quer à ausência de hábitos tabágicos corroboradas no presente estudo. Note-se ainda que a proporção de tumores femininos associada ao tabaco foi inferior à estimada para os cancros do pulmão nas mulheres (47-60%) e que populações caracterizadas por baixos consumos de tabaco entre as mulheres, como a população chinesa, apresentam incidências mais elevadas de ADC do pulmão e prevalências de alterações em *EGFR* de 40-60%[6,23,181,182]. No que respeita aos homens e hábitos tabágicos associados, as suas proporções na amostra poderão estar na base da incidência aumentada de alterações em genes como *MET* (6,4% vs. 3-4% nos CPNPC ocidentais), sem desconsiderar a sobrerrepresentação do ADC na população estudada e do registo aumentado da sua principal variante – *skipping* do exão 14 – nos estadios mais avançados[128,132]. As variantes das classes II e III de *BRAF*, descritas na literatura consultada como mais prevalentes entre homens e aquando de consumo pesado de tabaco, poderão ser outro exemplo do anteriormente exposto. No presente trabalho, o seu peso conjunto na globalidade das variantes de *BRAF* foi praticamente de dois terços e a sua ligação ao sexo masculino e ao consumo ativo de tabaco foi significativa. Contudo, a menor proporção da VAc no contexto das variantes de *BRAF* (30,8% vs. 40-50% anotados na literatura) pode não ser totalmente explicada pelo impacto das proporções de homens e fumadores. À data das análises moleculares contempladas neste trabalho, encontravam-se aprovados, em Portugal, fármacos dirigidos às fusões de *ALK* e *ROS1*, às principais variantes de *EGFR* [deleções do exão 19 e *EGFR* p.(Leu858Arg)] e a *BRAF* p.(Val600Glu). Dentre os casos informativos, as pesquisas moleculares efetuadas na sequência de um tratamento (Progressões) constituíram 22,0%. Nestas, as proporções das fusões de *ALK* e de *BRAF* p.(Val600Glu) foram 2-3 vezes inferiores às registadas no grupo de amostras referenciadas como "Diagnóstico inicial". Em *ROS1*, este decréscimo não foi tão marcado e em *EGFR* observou-se o oposto. O contributo das variantes de resistência como *EGFR* p.(Thr790Met) é passível de confirmação (0,9% vs. 5,3%; Teste Z, p=0,002). No entanto, variantes como *EGFR* p.(Leu858Arg) e *EGFR* p.(Glu746_Ala750del) encontraram-se igualmente aumentadas: 7,9% para 9,3% e 5,8% para 11,9% (p=0,002, Teste Z), respetivamente. Sem significado estatístico devido à dimensão da amostra, parece ainda existir uma tendência dos genes envolvidos na via *PI(3)K*/*mTOR* em se encontrarem mais representados nas amostras oriundas de progressões.

O tipo de alterações identificadas bem como os genes e vias de sinalização acometidas variaram com a histologia do tumor. Apesar das características do painel balizarem o tipo de variantes detetadas bem como o conjunto de genes estudados, as diferenças foram efetivas quer na frequência de determinadas alterações genómicas quer nos genes afetados quer na proporção de amostras sem variantes detetadas. São exemplos disto: (1) a maior frequência de CNG nos CCE comparativamente com outros subtipos histológicos; (2) a constituição dos *top* 3 de genes mais frequentemente alterados no ADC (*KRAS*, 27,0%; *EGFR*, 25,0%; *MET*, 6,5%) e no CCE (*EGFR*, 13,0%; *MET*, 7,6%; *PIK3CA*, 7,6%)[Anexo VII, Tabela 10]; e (3) a menor proporção de amostras sem variantes detetadas (15,6-20,5%) nos tumores cujo acometimento da via de sinalização RTK/*RAS*/*MAPK* é primaz. Nos carcinomas pulmonares mais associados a alterações em genes supressores tumorais, a proporção de amostras com variantes identificadas variou entre 47-53%. Adicionalmente, e com exceção de *BRAF* p.(Val600Glu), as 10 variantes mais comuns no estudo distribuíram-se desproporcionalmente entre os dois subtipos histológicos mais representados. Destas, destacam-se as variantes: *KRAS* p.(Gly12Cys) cuja representação no ADC foi 3 vezes superior à observada em CCE; e *KRAS* p.(Gly12Val) e *KRAS* p.(Gly12Asp) as quais não tiveram qualquer registo nos CCE. O s*kipping* do *MET* e as amplificações de *EGFR* e *MYC* apresentaram frequências nos CCE 2-5 vezes superiores às registadas nos ADC. No contexto do ADC, diferentes variantes histológicas bem como padrões de crescimento também se refletiram em frequências e associações diferentes. Por exemplo, no ADC mucinoso, a prevalência de *KRAS* mutado foi ainda mais notória e abrangeu mais de metade das amostras (51,6%, p<0,001). Os rearranjos de *ALK* e *RET* tiveram uma assiduidade superior em, pela ordem, 2,3 e 1,4 vezes à observada na generalidade dos CPNPC e a exclusão das variantes de *MET* (p=0,032) somou à ausência de variantes em *EGFR* (p<0,001), esta última já reportada noutros estudos. No que respeita aos padrões de crescimento, a molecular subjacente foi na sua maioria concordante com o descrito noutros estudos mas também compatível com associações evidenciadas na análise apresentada. A título de exemplo, refiram-se: (1) a ligação do padrão lepídico a *EGFR* e a duas características estatisticamente associadas a este gene como o sexo feminino e a expressão de PD-L1<50%; (2) a associação dos rearranjos de *RET* ao padrão micropapilar o qual, segundo a classificação revista pela OMS (2021), corresponde a um tumor mais agressivo e indiferenciado e, no presente estudo, esteve associado a um grau de diferenciação G3 (classificação anterior a 2021); e (3), em oposição ao padrão lepídico, a correlação do padrão sólido com a ocorrência de metastização de GLR N3, ao sexo masculino bem como uma expressão de PD-L1≥50%.

Em virtude das características do painel utilizado, a compreensão do real envolvimento da resposta oxidativa, dos reguladores do ciclo celular, de modificadores da cromatina e/ou de fatores de *splicing* na carcinogénese pulmonar não é passível de ser confirmada pelo que

eventuais comparações epidemiológicas deverão ser feitas com cautela. Da mesma forma que a dimensão dos grupos de tumores menos frequentes como CAE, CS e os carcinomas neuroendócrinos poderá ter-se traduzido em exacerbação das frequências relativas de algumas variantes. Contudo, salienta-se que o painel OFA foi aplicado no contexto de gestão clínica do doente e a cobertura das variantes acionáveis foi e mantém-se completa.

À parte da limitação exposta, os principais achados reportados na literatura foram na sua maioria corroborados no estudo. A título de exemplo, mencionem-se as hierarquias assentes nas respetivas frequências dos genes-parceiros dos rearranjos de *ALK*, *RET* e *ROS1*, e das variantes mais assíduas de cada gene. Todavia, alguns desvios foram constatados. Nos genes com inibidores aprovados à data das análises, como *ALK*, *BRAF* e *EGFR*, algumas frequências ficaram aquém do estimado na literatura, é o caso da participação inferior a 90% de *EML4* (72,9%) nas fusões de *ALK* ou da já abordada quota parte inferior de *BRAF* p.(Val600Glu) no conjunto de variantes de *BRAF*. Em *EGFR*, estas diferenças revelaram-se um pouco mais complexas: (1) a frequência conjunta das suas principais variantes (69,1%) – deleções do exão 19 e *EGFR* p.(Leu858Arg) – distou inferiormente 15 a 20 pontos percentuais da referenciada na literatura; (2) a amplificação de *EGFR*, incluída no grupo das variantes menos frequentes de *EGFR*, sagrou-se a terceira alteração mais comum de *EGFR* no presente estudo (7,4%); e (3), sem desconsiderar os 3,7% relativos a *EGFR* p.(Thr790Met), as substituições do resíduo 709 (3,5%) foram quase o dobro do indicado nos artigos consultados.

O impacto da inclusão de amostras de tumores previamente tratados já foi demonstrado e pode explicar alguns desvios até em genes que não os alvo de inibição. Contudo, este argumento não esclarece todas as variações observadas e a amplificação de *MET* é exemplo disso. Estimada em 1-6% dos CPNPC e descrita regularmente como mecanismos de resistência a TKI direcionados a *ALK* e *EGFR* mutados, no presente estudo seria expectado que a sua frequência se situasse pelo menos no intervalo apontado e não abaixo do mesmo (0,5%).

O material biológico disponível para a análise molecular parece também ditar um pouco o total de variantes detetadas na amostra. No presente estudo, a percentagem de células neoplásicas variou quer em função do produto analisado quer em função do resultado e total de variantes identificadas. As biopsias histológicas (81% das amostras informativas) concentraram um maior número de amostras com percentagens inferiores de células neoplásicas (Kruskall-Wallis, $p=0,007$) e casos sem variantes reportadas estiveram ligados a uma média menor neste indicador (29,2% vs. 33.5%; Teste t, $p<0,001$). Adicionalmente, proporções mais pequenas de células tumorais foram associadas a menores totais de variantes detetadas (Kruskall-Wallis, $p<0,001$). Neste sentido, frequências mais reduzidas de certas variantes bem como de amostras positivas num dado grupo poderão ter a sua causa na menor probabilidade de dispor, na amostra

analisada, diferentes clones tumorais aquando de percentagens reduzidas de células neoplásicas.

Na globalidade das amostras acionáveis, *EGFR* (44,5%), *KRAS* (21,1%) e *MET* (12,4%) seriam os principais responsáveis pela eleição de casos para TDM. O ADC sendo o tipo histológico mais representado bem como aquele com maior percentagem de amostras com variantes na via de sinalização RTK/*RAS*/*MAPK* (75,4%), seguiu a repartição registada no total de casos acionáveis. A sua taxa de acionabilidade (50,6%) foi apenas ultrapassada pela do CS (53,8%), porém o número reduzido de amostras no último poderá ter inflacionado a frequência relativa. Ao nível das VAc, CS parece confirmar o que está descrito na literatura no que respeita às alterações de *MET*. Nas histologias que não ADC, o conjunto de genes com VAc não obedeceu propriamente à escala de frequências estabelecida na totalidade das amostras. Em CCE, por exemplo, *MET* foi o segundo gene com maior número de amostras com variantes suscetíveis a fármacos (30%) e a sua proporção aproximou-se da anotada para *EGFR* (40%). Nas amostras cujo diagnóstico não foi além de CPNPC, *KRAS* p.(Gly12Cys) ultrapassou largamente a multiplicidade de VAc de *EGFR* tendo estado presente em 43,8% dos CeTDM. Por sua vez, o CAE acabou por ter as suas quatro amostras com variantes distribuídas pelos genes mais frequentes em ADC e CCE. Salva-se do anterior, as VAc de *MET*. No contexto dos carcinomas neuroendócrinos, a sua oncogénese molecular menos ligada a genes da via RTK/*RAS*/*MAPK* traduziu-se compreensivelmente em menores taxas de acionáveis particularmente no que respeita a CPPC (16,7%).

Tendo em conta a relevância das VnAc concomitantes, provavelmente a análise molecular somática integrará no futuro a pesquisa de variantes que possam conferir resistência (nomeadamente a independente do gene-alvo) à abordagem ditada pelas VAc.

No presente estudo, o painel aplicado permitiu identificar, simultaneamente a VAc, 285 VnAc distribuídas por 239 amostras. Destas, 148-161 amostras apresentaram VnAc compatíveis com mecanismos de resistência das quais 57 ocorreram em genes sem recomendação de análise no contexto do cancro do pulmão. Adicionalmente, a proporção superior de amostras com amplificação de *FGFR2* provenientes de progressões da doença reuniu significado estatístico e as alterações em genes envolvidos na via de sinalização *PI(3)K*/*mTOR* foram tendencialmente mais frequentes no grupo de amostras indicado. Neste grupo foram ainda identificadas duas variantes nos próprios genes-alvo de terapia que poderão ter sido as responsáveis pela resistência do tumor: (1) *ALK* p.(Asp1606Tyrfs*8), cujo término precoce da tradução resulta na eliminação dos locais de ligação dos TKI; e (2) *EGFR* p.(Ala864Val) que foi descrita num estudo num caso de progressão como sendo uma mutação rara[183]. No âmbito das resistências dependentes do gene-alvo, foi também identificada uma variante pontual em *ALK*, concomitantemente a um dos seus rearranjos mais frequentes e sem qualquer informação

associada quanto à existência ou não de tratamento prévio, cujo resíduo afetado interage com alectinib. Dado que *ALK* p.(Arg1253Thr) resulta num aminoácido de um grupo químico diferente (aminoácido básico para um aminoácido polar), a interação da molécula inibidora com o *loop* catalítico de *ALK* poderá estar comprometida.

Com base em resistências descritas e associadas a outras VAc bem como no papel desempenhado na célula, foram identificadas 37 concomitâncias com potencial para conferir agressividade e/ou resistência do tumor à terapia. À parte dos mecanismos de *bypass* e de ativação de vias alternativas, chama-se particularmente à atenção para o eventual papel que a atividade alterada de proteínas como *CTNNB1* e *MYC* poderá ter quer na possível resistência à terapia quer na capacidade de progressão e agressividade tumorais.

No presente trabalho, *CTNNB1* encontrou-se estatisticamente associado a progressões e à coexistência de alterações em *EGFR*. Compreensivelmente, a sua incidência na população asiática tem sido superior e praticamente o dobro da estimada globalmente (2-3%). Como tal, tem sido sugerido que *CTNNB1* poderá desempenhar um papel relevante nos carcinomas *EGFR* mutados, conferindo-lhes um comportamento mais agressivo e uma sobrevida mais curta[184,185]. A associação de *CTNNB1* ao padrão papilar reportada por Montpréville *et al.* (2020) e os achados encontrados para *EGFR* nos resultados expostos, são evidência disso[186]. Adicionalmente, dois estudos recentes mostraram que: (1) as mutações de *CTNNB1*, em particular as do exão 3, conferem às linhas celulares *ALK*, *EGFR* ou *KRAS* comutadas resistência aos respetivos inibidores; e (2) que *CTNNB1* apresenta valor prognóstico no risco de recorrência de ADC *EGFR* mutado[187,188].

No que respeita à amplificação de *MYC,* esta tem apresentado habilidade em potenciar a agressividade do tumor através do crescimento tumoral (via progressão do ciclo celular), de mecanismos de sobrevivência celular (via regulação da apoptose) e de transformação celular. Adicionalmente, a sua prevalência em tumores mais agressivos como CPPC pesou aquando da sua consideração como um eventual oponente à terapia[189,190]. Em linha com os motivos listados, diversos autores têm apontado o número acrescido de cópias de *MYC* como um aceitável mecanismo de resistência farmacológica inclusive a fármacos usados na quimioterapia e a TKI[87,190,191]. Recentemente, Iyer *et al.* (2022) mostraram *in vitro* e *in vivo* que a amplificação de *MYC,* identificada em 19% das resistências de CPNPC-*ROS1* mutados tratados com lorlatinib, contribuiu para a resistência do tumor ao tratamento[192].

A aplicação de painéis multigénicos permite não só uma cobertura alargada dos genes de interesse, mas também o acesso ao *status* mutacional de outros genes. Embora atualmente esta informação não seja relevante para a gestão terapêutica do doente, quando devidamente

tratada e analisada em conjugação com a informação clinicopatológica pode colocar em relevo, e de modo priorizado, pontos de intervenção terapêutica.

No âmbito das VnAc, *KRAS*, *PIK3CA*, *EGFR*, *BRAF*, *CTNNB1* e *MYC* lideraram o *ranking* de genes mais comummente mutados na população estudada. Apesar da taxa de acionabilidade de 82,7% de *EGFR,* as suas VnAc ainda possuem uma quota considerável no estudo realizado. A sua amplificação constituiu a terceira variante mais comum de *EGFR* e, como tal, um alvo terapêutico atrativo. De igual forma, a inibição de *CTNNB1* mutado e *MYC* amplificado constituiria uma mais-valia no tratamento dos carcinomas pulmonares devido não só à incidência observada na análise vigente mas também à capacidade de ambas promoverem a progressão tumoral e incitarem situações de resistência.

Em contraste com EGFR, a capacidade de eleição de doentes para TDM de *KRAS* (37,3%) e *BRAF* (30,9%) ainda reside muito aquém e o impacto da principal variante de cada um dista consideravelmente da frequência observada de 81,9% do *skipping* do exão 14 na casuística de *MET*. Deste modo, ambos perpetuam como alvos terapêuticos de interesse. No caso de *KRAS*, seguindo a mesma estratégia usada para *KRAS* p.(Gly12Cys), a descoberta de uma segunda VAc em *KRAS* poder-se-ia refletir, de acordo com os resultados obtidos, num incremento médio de 9,9% (n=20) e máximo de 34,6% (n=107) no total de casos acionáveis via *KRAS*. Relativamente a *BRAF*, o alargamento da sua acionabilidade às variantes das classes II e III, faria com que 89,1% dos *BRAF* mutados fossem CeTDM, facto traduzido num acréscimo de 6,1% (n=62) ao total de CeTDM. Correntemente, PLX8394 é um inibidor molecular com evidências clínicas e/ou biológicas de atividade antitumoral nos melanomas e/ou nos tumores sólidos portadores não só de variantes das classes II e III mas também das alocadas ao resíduo Val600.

Por fim, RLY-2608 é um inibidor de PI3Kα em estudo com evidências biológicas de boa tolerabilidade e afinidade aumentada aquando das variantes PIK3CA p.(Glu542Lys), PIK3CA p.(Glu545Lys) e PIK3CA p.(His1047Arg)[195,196]. Segundo os dados do presente estudo, a aprovação do seu uso no cancro do pulmão poderia resultar numa diminuição 2,7% dos casos sem VAc e combater aproximadamente 15% das eventuais resistências.

A imunoterapia tem sido amplamente explorada no contexto dos carcinomas pulmonares, concretamente através do uso de ICI. Considerada inicialmente como aplicável a todos os subtipos de tumores independentemente do *status* mutacional da célula tumoral, hoje sabe-se que as alterações moleculares ditam (ainda de modo pouco compreendido) uma quota parte da resposta do tumor à ação dos ICI.

Na análise apresentada, a correlação entre as alterações moleculares e a expressão de PD-L1 ficou patente. Em concordância com os resultados publicados por outros estudos, alterações ao nível de genes como *CTNNB1* e *EGFR* foram associadas a PD-L1<50%, enquanto que variantes

em *KRAS* e *MET* residiram mais comummente em amostras PD-L1≥50%. Adicionalmente, ligações encontradas entre a histologia do tumor e a expressão de PD-L1 podem ser facilmente compreendidas com base na molecular subjacente, achados que fortalecem a ideia de que o perfil molecular pode ditar e/ou ser um fator preditivo de resposta esta terapia. São exemplo disso, a correlação negativa de PD-L1 positivo com (1) as amostras oriundas de progressões (associadas a alterações em *EGFR* e *CTNNB1*); (2) tumores com predomínio de padrão lepídico ou de um grau de diferenciação de G1 (ambos ligados a alterações em *EGFR*); ou com (3) as amostras provenientes de casos com metastização óssea (relacionada com variantes em *CTNNB1*). Em oposição, porém sem significado estatístico devido ao reduzido número de amostras informativas, as amostras PD-L1≥50% foram mais frequentes entre fumadores os quais, por sua vez, estiveram associados a alterações em *KRAS*.

Tumores portadores de rearranjos em oncogenes geralmente caracterizam-se por um baixo TMB e, consequentemente, devido à reduzida expressão de neoantigénios, o microambiente tumoral é menos inflamatório e o infiltrado linfocitário menor[102,110].

No presente estudo, as correlações da expressão de PD-L1<50% com amostras *ALK*, *RET* e *ROS1* rearranjadas não se mostraram significativas. Contudo, a expressão de PD-L1≥50% esteve associada a (1) rearranjos de *ROS1*; (2) à ausência de padrão micropapilar (ligado a amostras com fusões de *RET*); e (3) à presença de padrão sólido na amostra (relacionado com a existência de rearranjos em *ALK*).

Não obstante de algumas das relações anteriores contrastarem com o expectado, e de isso poder também ser uma consequência de uma das limitações deste estudo (a falha ou incompletude da informação facultada pelo clínico), certos estudos têm demonstrado que: (1) as fusões de *ALK*, particularmente as *EML4*::*ALK*, são capazes de regular positivamente a expressão de PD-L1; e (2) que as variantes de um dado gene podem exercer um efeito particular sobre a resposta do tumor aos ICI. São exemplos: (1) as mutações de *HER2* (que não as inserções do exão 20) que apresentaram num estudo OS e PFS significativamente superiores às constantes no grupo portador das ditas inserções; ou (2) *KRAS* p.(Gly12Asp) que melhorou a resistência do tumor a ICI[197,198].

Adicionalmente, e a reforçar a ideia de que a decisão pela imunoterapia terá de passar pela consideração do perfil molecular do tumor na ausência de biomarcadores de valor preditivo superior aos vigentes, os genes concomitantes parecem impor a intensidade da resposta aos ICI. *TP53* e *STK11*, genes frequentemente comutados com *KRAS*, são exemplo do mencionado. Enquanto que alterações em TP53 parecem favorecer a resposta antitumoral aliada aos altos níveis de expressão de PD-L1 e de TMB associados a *KRAS*, a coexistência de mutações em *STK11* acarreta um valor preditivo negativo aos ICI[199–201].

Portanto, perante o exposto, a imunoterapia (via ICI) parece ser uma mais-valia no tratamento dos tumores não portadores de VAc. Embora a quimioterapia potencie a resposta antitumoral através do seu efeito imunogénico, a análise molecular já se impõe como requisito para a eleição de doentes a esta modalidade de tratamento, atenda-se à aprovação desta terapia combinada em CPNPC sem mutações em *EGFR* ou rearranjos envolvendo *ALK*[170]. A sua aplicação a tumores portadores de VAc (inclusive no combate a resistências) ainda carece de entendimento visto que altos níveis de toxicidade têm sido registados em algumas combinações de TKI e ICI, e as células tumorais pós-TKI ficam desprovidas da expressão de PD-L1 não se conhecendo em que medida o seu restauro acontece.

Conclusão

Este estudo evidencia que o cancro do pulmão na população portuguesa, de modo particular norte e centro, apresenta frequências de envolvimento de oncogenes dentro do estimado. Salva-se do disposto, *EGFR* que na população estudada apresentou uma prevalência intermédia às populações ocidentais e asiáticas. A associação do tabaco à carcinogénese pulmonar foi ligeiramente inferior às taxas registadas em países de alto nível de desenvolvimento social e industrial (>80%) devido em parte à reduzida associação do sexo feminino a este hábito pessoal. As TDM podem ser atualmente uma opção para pelo menos metade dos doentes com estadios avançados da doença, podendo esta proporção variar em função do subtipo histológico. Todavia, o tipo de material usado bem como a gestão que antecede a análise molecular são determinantes da probabilidade de deteção de variantes na amostra, inclusive VAc.

Apesar das mais valias da TDM e do uso de ICI, a gestão terapêutica do doente pode revelar-se complexa. A ideia ilusória de que a imunoterapia conjugada com um tratamento imunogénico (ex.: quimioterapia) seria uma opção transversal a todos os tumores pulmonares começa a ser percebida como uma não realidade. As alterações moleculares concomitantes parecem impactar a resposta do tumor à imunoterapia muito além do TMB subjacente e, como tal, a pesquisa de variantes somáticas inicia-se como um passo essencial na eleição de doentes a este tratamento. Adicionalmente, a existência de outros fatores a influenciar resposta à imunoterapia fica também evidente e o ADC mucinoso é prova disso. O cruzamento dos resultados moleculares com a expressão de PD-L1 mostrou que as alterações de KRAS estiveram presentes em mais de metade da casuística do ADC mucinoso e, em contraste com a associação de KRAS mutado a PD-L1≥50%, os níveis de expressão de PD-L1 foram baixos e num reduzido número de amostras. Sem comprometimento das incertezas expostas, a imunoterapia pode efetivamente constituir uma opção terapêutica nas histologias menos propensas a serem portadoras de variantes acionáveis mas também aquando de inibidores moleculares com taxas de resposta mais deficitárias. E ainda, a imunoterapia parece ser uma opção a recorrer aquando de resistências a TDM, porém carece de elucidação quanto ao impacto efetivo dos TKI no microambiente tumoral e de quão a alteração molecular subjacente pode ser determinante e/ou preditiva da resposta tumoral à terapia.

Por fim, fica evidente a ideia de que o futuro da análise somática passará pelo alargamento dos seus propósitos bem como do painel de genes. O recurso a painéis multigénicos permite uma gestão consciente e adequada do material biológico do doente, mas também pode fornecer informação excedente que, quando devidamente tratada e analisada, poderá: (1) reforçar

associações; (2) conceder valor prognóstico a determinadas alterações; e (3) abrir novos horizontes priorizando os focos científicos. Contudo, a padronização da informação facultada bem como constante no relatório de anatomia patológica constitui uma vantagem para estudos de (ou com um certo) carácter epidemiológico.

Referências bibliográficas

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108. doi:10.3322/canjclin.55.2.74

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492

3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660

4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210

5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516

6. Forjaz G, Bastos J, Castro C, et al. Regional differences in tobacco smoking and lung cancer in Portugal in 2018: A population-based analysis using nationwide incidence and mortality data. *BMJ Open*. 2020;10(10):1-8. doi:10.1136/bmjopen-2020-038937

7. RON. *Registo Oncológico Nacional de Todos Os Tumores Na População Residente Em Portugal, Em 2019*. Instituto.; 2022.

8. RON. *Registo Oncológico Nacional 2001*. Instituto. Mediana, S.A:; 2008.

9. ROR C. *Registo Oncológico Nacional - 2005*.; 2009.

10. RORENO. *Registo Oncológico Nacional 2007*. Edição Ins. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil – EPE; 2013.

11. RON. *Registo Oncológico Nacional 2006*. Instituto. Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil - EPE; 2013.

12. Silva M, Pontes L RF. Registo Oncológico Nacional 2008. Published online 2008:145. http://www.roreno.com.pt/pt/publicacoes/publicacoes-nacionais.html

13. RON. *Registo Oncológico Nacional 2009*. Instituto. Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Franscisco Gentil - EPE; 2015.

14. Registo Oncológico Nacional. Registo Oncológico Nacional 2010. *Inst Port Oncol do Porto Fr Gentil - EPE*. Published online 2010:1-144.

15. RON. *Registo Oncológico Nacional de Todos Os Tumores Na População Residente Em Portugal, Em 2018*. Registo On. Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil - E. P. E. Tiragem; 2021.

16. Lahiri A, Maji A, Potdar PD, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Mol Cancer*. 2023;22(1):1-37. doi:10.1186/s12943-023-01740-y

17. Kuhn E, Morbini P, Cancellieri A, Damiani S, Cavazza A, Comin CE. Adenocarcinoma classification: Patterns and prognosis. *Pathologica*. 2018;110(1):5-11.

18. Lazzari C, Karachaliou N, Gregorc V, et al. Second-line therapy of squamous non-small cell lung cancer: an evolving landscape. *Expert Rev Respir Med*. 2017;11(6):469-479. doi:10.1080/17476348.2017.1326822

19. Yang F, Dong Z, Shen Y, et al. Cribriform growth pattern in lung adenocarcinoma: More aggressive and poorer prognosis than acinar growth pattern. *Lung Cancer*. 2020;147:187-192. doi:10.1016/j.lungcan.2020.07.021

20. Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, et al. Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2008;21(8):992-1001. doi:10.1038/modpathol.2008.79

21. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Ann Glob Heal*. 2019;85(1):1-16. doi:10.5334/aogh.2419

22. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(8):1623-1640. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.013

23. WHO Classification of Tumours EB, ed. Thoracic Tumours. In: *WHO Classification of Tumours Editorial Board*. 5th ed. ; 2021:19-149.

24. Baudin E, Caplin M, Garcia-Carbonero R, et al. Lung and thymic carcinoids: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Ann Oncol*. 2021;32(4):439-451. doi:10.1016/j.annonc.2021.01.003

25. Gertych A, Swiderska-Chadaj Z, Ma Z, et al. Convolutional neural networks can accurately distinguish four histologic growth patterns of lung adenocarcinoma in digital slides. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-018-37638-9

26. Kadota K, Yeh YC, D'Angelo SP, et al. Associations between mutations and histologic patterns of mucin in lung adenocarcinoma: Invasive mucinous pattern and extracellular mucin are associated with KRAS mutation. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):1118-1127. doi:10.1097/PAS.0000000000000246

27. Gow CH, Hsieh MS, Liu YN, Lee YH, Shih JY. Clinicopathological features and survival outcomes of primary pulmonary invasive mucinous adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16). doi:10.3390/cancers13164103

28. Padinharayil H, Varghese J, John MC, et al. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Implications on molecular pathology and advances in early diagnostics and therapeutics. *Genes Dis*. 2022;10(3):960-989. doi:10.1016/j.gendis.2022.07.023

29. Niu Z, Jin R, Zhang Y, Li H. Signaling pathways and targeted therapies in lung squamous cell carcinoma: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1). doi:10.1038/s41392-022-01200-x

30. Bruno R, Alì G, Poma AM, Prof GF. Non-small cell lung cancer molecular characterization of advanced disease with focus on sex differences: A narrative review. *Precis Cancer Med*. 2021;4(June):1-16. doi:10.21037/pcm-20-72

31. Travis WD. Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clin Chest Med*. 2020;41(1):67-85. doi:10.1016/j.ccm.2019.11.001

32. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Ann Glob Heal*. 2019;85(1). doi:10.5334/aogh.2419

33. Inamura K. Update on immunohistochemistry for the diagnosis of lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(3):1-15. doi:10.3390/cancers10030072

34. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol*. 2022;17(3):362-387. doi:10.1016/j.jtho.2021.11.003

35. Wang T, Zhou J, Wang Y, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of resectable lung adenosquamous carcinoma: a population-based study of the SEER database. *Jpn J Clin Oncol*. 2022;52(10):1191-1200. doi:10.1093/jjco/hyac096

36. Li X, Wu D, Liu H, Chen J. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: progress, treatment and expectations. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1-19. doi:10.1177/1758835920950207

37. Schrock AB, Li SD, Frampton GM, et al. Pulmonary Sarcomatoid Carcinomas Commonly Harbor Either Potentially Targetable Genomic Alterations or High Tumor Mutational Burden as Observed by Comprehensive Genomic Profiling. *J Thorac Oncol*. 2017;12(6):932-942. doi:10.1016/j.jtho.2017.03.005

38. Nakagomi T, Goto T, Hirotsu Y, et al. New therapeutic targets for pulmonary sarcomatoid carcinomas based on their genomic and phylogenetic profiles. *Oncotarget*. 2018;9(12):10635-10649. doi:10.18632/oncotarget.24365

39. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, Poirier JT, Rudin CM. Unravelling the biology of SCLC: Implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):549-561. doi:10.1038/nrclinonc.2017.71

40. Denninghoff V, Russo A, de Miguel-Pérez D, et al. Small cell lung cancer: State of the art of the molecular and genetic landscape and novel perspective. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1-12. doi:10.3390/cancers13071723

41. Yuan M, Zhao Y, Arkenau HT, Lao T, Chu L, Xu Q. Signal pathways and precision therapy of small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1). doi:10.1038/s41392-022-01013-y

42. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630

43. Yoshimura M, Seki K, Bychkov A, Fukuoka J. Molecular Pathology of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma: Novel Concepts and Treatments. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.671799

44. Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma–like and Non–Small Cell Carcinoma–like Subsets. *Clin Cancer Res*. 2016;22(14):3618-3629. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2946

45. Yoshimura M, Seki K, Bychkov A, Fukuoka J. Molecular Pathology of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma: Novel Concepts and Treatments. *Front Oncol*. 2021;11(April). doi:10.3389/fonc.2021.671799

46. Relli V, Trerotola M, Guerra E, Alberti S. Distinct lung cancer subtypes associate to distinct drivers of tumor progression. *Oncotarget*. 2018;9(85):35528-35540. doi:10.18632/oncotarget.26217

47. Carrot-Zhang J, Yao X, Devarakonda S, et al. Whole-genome characterization of lung adenocarcinomas lacking the RTK/RAS/RAF pathway. *Cell Rep*. 2021;34(5). doi:10.1016/j.celrep.2021.108707

48. Lamberti G, Andrini E, Sisi M, et al. Beyond EGFR, ALK and ROS1: Current evidence and future perspectives on newly targetable oncogenic drivers in lung adenocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;156(August):103119. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.103119

49. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550. doi:10.1038/nature13385

50. Teixeira MR, Oliveira J, Borralho P, Fernandes MGO. Recomendações Portuguesas para a Utilização de Sequenciação de Nova Geração na Prática Clínica em Tumores do Pulmão , Raros e de Origem Primária Desconhecida Portuguese Consensus Recommendations for Next-Generation Sequencing of Lung Cancer , Rare Tumors . Published online 2022.

51. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OUI, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2015;1856(2):189-210. doi:10.1016/j.bbcan.2015.08.002

52. Kashima J, Kitadai R, Okuma Y. Molecular and morphological profiling of lung cancer: A foundation for "next-generation" pathologists and oncologists. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):1-19. doi:10.3390/cancers11050599

53. Kadota K, Yeh Y-C, D'Angelo SP, et al. Associations Between Mutations and Histologic Patterns of Mucin in Lung Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):1118-1127. doi:10.1097/PAS.0000000000000246

54. Ruiz-Cordero R, Devine WP. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. *Surg Pathol Clin*. 2020;13(1):17-33. doi:10.1016/j.path.2019.11.002

55. Li Y, Tan Y, Hu S, et al. Targeted sequencing analysis of predominant histological subtypes in resected Stage I invasive lung adenocarcinoma. *J Cancer*. 2021;12(11):3222-3229. doi:10.7150/jca.51405

56. Hammerman PS, Voet D, Lawrence MS, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-525. doi:10.1038/nature11404

57. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. 2016;48(6):607-616. doi:10.1038/ng.3564

58. Lin G, Li C, Li PS, et al. Genomic origin and EGFR-TKI treatments of pulmonary adenosquamous carcinoma. *Ann Oncol*. 2020;31(4):517-524. doi:10.1016/j.annonc.2020.01.014

59. Wang H, Liu J, Zhu S, et al. Comprehensive analyses of genomic features and mutational signatures in adenosquamous carcinoma of the lung. *Front Oncol*. 2022;12(September):1-10. doi:10.3389/fonc.2022.945843

60. Cheng Y, Zhang Y, Yuan Y, et al. The Comprehensive Analyses of Genomic Variations and Assessment of TMB and PD-L1 Expression in Chinese Lung Adenosquamous Carcinoma. *Front Genet*. 2021;11(February):1-8. doi:10.3389/fgene.2020.609405

61. Vassella E, Langsch S, Dettmer MS, et al. Molecular profiling of lung adenosquamous carcinoma: Hybrid or genuine type? *Oncotarget*. 2015;6(27):23905-23916.

doi:10.18632/oncotarget.4163

62. Terra SBSP, Jang JS, Bi L, et al. Molecular characterization of pulmonary sarcomatoid carcinoma: Analysis of 33 cases. *Mod Pathol*. 2016;29(8):824-831. doi:10.1038/modpathol.2016.89

63. Mansfield AS, Roden AC, Boland JM. Towards a Molecular Classification of Pulmonary Sarcomatoid Carcinomas. *J Thorac Oncol*. 2017;12(6):910-912. doi:10.1016/j.jtho.2017.04.012

64. Yu Y, Zhang Q, Zhang J, Lu S. Prevalence of MET exon 14 skipping mutation in pulmonary sarcomatoid carcinoma patients without common targetable mutations: A single-institute study. *J Cancer Res Ther*. 2019;15(4):909. doi:10.4103/jcrt.JCRT_591_18

65. Babacan NA, Pina IB, Signorelli D, Prelaj A, Garassino MC, Tanvetyanon T. Relationship Between Programmed Death Receptor-Ligand 1 Expression and Response to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy in Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma: A Pooled Analysis. *Clin Lung Cancer*. 2020;21(5):e456-e463. doi:10.1016/j.cllc.2020.02.022

66. Domblides C, Leroy K, Monnet I, et al. Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Sarcomatoid Carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2020;15(5):860-866. doi:10.1016/j.jtho.2020.01.014

67. Metovic J, Barella M, Bianchi F, et al. Morphologic and molecular classification of lung neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch*. 2021;478(1):5-19. doi:10.1007/s00428-020-03015-z

68. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47-53. doi:10.1038/nature14664

69. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2021;7(1). doi:10.1038/s41572-020-00235-0

70. Schwendenwein A, Megyesfalvi Z, Barany N, et al. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: Therapeutic implications. *Mol Ther - Oncolytics*. 2021;20(March):470-483. doi:10.1016/j.omto.2021.02.004

71. Iams WT, Porter J, Horn L. Immunotherapeutic approaches for small-cell lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(5):300-312. doi:10.1038/s41571-019-0316-z

72. George J, Walter V, Peifer M, et al. Integrative genomic profiling of large-cell neuroendocrine carcinomas reveals distinct subtypes of high-grade neuroendocrine lung tumors. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-03099-x

73. Koh G, Degasperi A, Zou X, Momen S, Nik-Zainal S. Mutational signatures: emerging concepts, caveats and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(10):619-637. doi:10.1038/s41568-021-00377-7

74. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-454. doi:10.1038/nature25183

75. Wang WZ, Shulman A, Amann JM, Carbone DP, Tsichlis PN. Small cell lung cancer: Subtypes and therapeutic implications. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(P2):543-554. doi:10.1016/j.semcancer.2022.04.001

76. Chuang C-H, Chen H-L, Chang H-M, et al. Systematic Review and Network Meta-Analysis of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitors for Treatment-Naïve ALK-Positive Lung

Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1966. doi:10.3390/cancers13081966

77. Alsuhaymi N. The Emerging Roles of Histology in the Management of Lung Cancer. *Pakistan J Med Heal Sci*. 2022;16(6):841-844. doi:10.53350/pjmhs22166841

78. Alduais Y, Zhang H, Fan F, Chen J, Chen B. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(8):e32899. doi:10.1097/MD.0000000000032899

79. Król K, Mazur A, Stachyra-Strawa P, Grzybowska-Szatkowska L. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment with Molecularly Targeted Therapy and Concurrent Radiotherapy-A Review. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6). doi:10.3390/ijms24065858

80. Ortega MA, Pekarek L, Navarro F, et al. Updated Views in Targeted Therapy in the Patient with Non-Small Cell Lung Cancer. *J Pers Med*. 2023;13(2). doi:10.3390/jpm13020167

81. Bourreau C, Treps L, Faure S, Fradin D, Clere N. Therapeutic strategies for non-small cell lung cancer: Experimental models and emerging biomarkers to monitor drug efficacies. *Pharmacol Ther*. 2023;242. doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108347

82. Rivera-Concepcion J, Uprety D, Adjei AA. Challenges in the Use of Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res Treat*. 2022;54(2):315-329. doi:10.4143/crt.2022.078

83. Ye Z, Huang Y, Ke J, Zhu X, Leng S, Luo H. Breakthrough in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2021;133(November 2020):111079. doi:10.1016/j.biopha.2020.111079

84. König D, Prince SS, Rothschild SI. Targeted therapy in advanced and metastatic non-small cell lung cancer. An update on treatment of the most important actionable oncogenic driver alterations. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):1-37. doi:10.3390/cancers13040804

85. Zhong L, Li Y, Xiong L, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41392-021-00572-w

86. Ye Z, Huang Y, Ke J, Zhu X, Leng S, Luo H. Breakthrough in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2021;133(December 2020):111079. doi:10.1016/j.biopha.2020.111079

87. Pan Y, Deng C, Qiu Z, Cao C, Wu F. The Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2021;11(October):1-13. doi:10.3389/fonc.2021.713530

88. Wrona A. Management of CNS disease in ALK-positive non-small cell lung cancer: Is whole brain radiotherapy still needed? *Cancer/Radiothérapie*. 2019;23(5):432-438. doi:10.1016/j.canrad.2019.03.009

89. Lei Y, Lei Y, Shi X, Wang J. EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Lett*. 2022;24(2):277. doi:10.3892/ol.2022.13397

90. Gristina V, La Mantia M, Iacono F, Galvano A, Russo A, Bazan V. The Emerging Therapeutic Landscape of ALK Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceuticals*. 2020;13(12):474. doi:10.3390/ph13120474

91. Zhang Z, Guo H, Lu Y, Hao W, Han L. Anaplastic lymphoma kinase inhibitors in non-small cell lung cancer patients with brain metastases: A meta-analysis. *J Thorac Dis*.

2019;11(4):1397-1409. doi:10.21037/jtd.2019.03.76

92. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(21):2018-2029. doi:10.1056/NEJMoa2027187

93. Li Y, Lv Y, Zhang C, Fu B, Liu Y, Hu J. Recent advances in the development of dual ALK/ROS1 inhibitors for non-small cell lung cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2023;257(March):115477. doi:10.1016/j.ejmech.2023.115477

94. Pirker R, Filipits M. From crizotinib to lorlatinib: Continuous improvement in precision treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer. *ESMO Open*. 2019;4(5):1-4. doi:10.1136/esmoopen-2019-000548

95. Tabbò F, Pisano C, Mazieres J, et al. How far we have come targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev*. 2022;103(December 2021). doi:10.1016/j.ctrv.2021.102335

96. Riudavets M, Cascetta P, Planchard D. Targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer: Current status and future directions. *Lung Cancer*. 2022;169(April):102-114. doi:10.1016/j.lungcan.2022.05.014

97. Sforza V, Palumbo G, Cascetta P, et al. BRAF Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19):1-12. doi:10.3390/cancers14194863

98. Zhang L, Zheng L, Yang Q, Sun J. The Evolution of BRAF Activation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2022;12(July):1-12. doi:10.3389/fonc.2022.882940

99. Melosky B, Kambartel K, Häntschel M, et al. Worldwide Prevalence of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Mol Diagnosis Ther*. 2022;26(1):7-18. doi:10.1007/s40291-021-00563-1

100. Subramanian J, Leighl NB, Choi Y La, et al. Usage of epidermal growth factor mutation testing and impact on treatment patterns in non-small cell lung cancer: An international observational study. *Lung Cancer*. 2023;175(November 2022):47-56. doi:10.1016/j.lungcan.2022.11.009

101. Batra U, Biswas B, Prabhash K, Krishna MV. Differential clinicopathological features, treatments and outcomes in patients with Exon 19 deletion and Exon 21 L858R EGFR mutation-positive adenocarcinoma non-small-cell lung cancer. *BMJ Open Respir Res*. 2023;10(1):e001492. doi:10.1136/bmjresp-2022-001492

102. Friedlaender A, Tsantoulis P, Chevallier M, De Vito C, Addeo A. The Impact of Variant Allele Frequency in EGFR Mutated NSCLC Patients on Targeted Therapy. *Front Oncol*. 2021;11(March):1-8. doi:10.3389/fonc.2021.644472

103. Pretelli G, Spagnolo CC, Ciappina G, Santarpia M, Pasello G. Overview on Therapeutic Options in Uncommon EGFR Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): New Lights for an Unmet Medical Need. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10). doi:10.3390/ijms24108878

104. Low JL, Lim SM, Lee JB, Cho BC, Soo RA. Advances in the management of non-small-cell lung cancer harbouring EGFR exon 20 insertion mutations. *Ther Adv Med Oncol*. 2023;15:1-19. doi:10.1177/17588359221146131

105. Zhao C, Jiang T, Li J, et al. The impact of EGFR exon 19 deletion subtypes on clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(4):1149-1158. doi:10.21037/tlcr-19-359

106. Pacini L, Jenks AD, Vyse S, Wilding CP, Arthur A, Huang PH. Tackling drug resistance in EGFR exon 20 insertion mutant lung cancer. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021;14:301-317. doi:10.2147/PGPM.S242045

107. Karlsen EA, Kahler S, Tefay J, Joseph SR, Simpson F. Epidermal growth factor receptor expression and resistance patterns to targeted therapy in non-small cell lung cancer: A review. *Cells*. 2021;10(5). doi:10.3390/cells10051206

108. Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): Where wild things are altered. *FEBS J*. 2013;280(21):5350-5370. doi:10.1111/febs.12393

109. Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: Lung cancer. *ESMO Open*. 2016;1(3):1-9. doi:10.1136/esmoopen-2016-000060

110. Yu Y, Yang Y, Li H, Fan Y. Targeting HER2 alterations in non-small cell lung cancer: Therapeutic breakthrough and challenges. *Cancer Treat Rev*. 2023;114(November 2022):102520. doi:10.1016/j.ctrv.2023.102520

111. Wu HX, Zhuo KQ, Wang K. Efficacy of targeted therapy in patients with HER2-positive non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2022;88(5):2019-2034. doi:10.1111/bcp.15155

112. Zhao J, Xia Y. Targeting HER2 Alterations in Non–Small-Cell Lung Cancer: A Comprehensive Review. *JCO Precis Oncol*. 2020;(4):411-425. doi:10.1200/po.19.00333

113. Han Y, Xiong Y, Lu T, et al. Genomic landscape and efficacy of HER2-targeted therapy in patients with HER2-mutant non-small cell lung cancer. *Front Oncol*. 2023;13(April):1-12. doi:10.3389/fonc.2023.1121708

114. Yu X, Ji X, Su C. HER2-Altered Non-Small Cell Lung Cancer: Biology, Clinicopathologic Features, and Emerging Therapies. *Front Oncol*. 2022;12(March):1-12. doi:10.3389/fonc.2022.860313

115. Vathiotis IA, Bafaloukos D, Syrigos KN, Samonis G. Evolving Treatment Landscape of HER2-mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Trastuzumab Deruxtecan and Beyond. *Cancers (Basel)*. 2023;15(4):1-12. doi:10.3390/cancers15041286

116. Zeng J, Ma W, Young RB, Li T. Targeting HER2 genomic alterations in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Cent*. 2021;1(2):58-73. doi:10.1016/j.jncc.2021.04.001

117. Iwama E, Zenke Y, Sugawara S, et al. Trastuzumab emtansine for patients with non–small cell lung cancer positive for human epidermal growth factor receptor 2 exon-20 insertion mutations. *Eur J Cancer*. 2022;162:99-106. doi:10.1016/j.ejca.2021.11.021

118. Abuhelwa Z, Alloghbi A, Nagasaka M. A comprehensive review on antibody-drug conjugates (ADCs) in the treatment landscape of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev*. 2022;106(January):102393. doi:10.1016/j.ctrv.2022.102393

119. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2018;124(January):53-64. doi:10.1016/j.lungcan.2018.07.013

120. Désage AL, Léonce C, Swalduz A, Ortiz-Cuaran S. Targeting KRAS Mutant in Non-Small Cell Lung Cancer: Novel Insights Into Therapeutic Strategies. *Front Oncol*. 2022;12(February). doi:10.3389/fonc.2022.796832

121. Drosten M, Barbacid M. Targeting KRAS mutant lung cancer: light at the end of the tunnel. *Mol Oncol*. 2022;16(5):1057-1071. doi:10.1002/1878-0261.13168

122. Cucurull M, Notario L, Sanchez-Cespedes M, et al. Targeting KRAS in Lung Cancer Beyond KRAS G12C Inhibitors: The Immune Regulatory Role of KRAS and Novel Therapeutic Strategies. *Front Oncol*. 2022;11(January):1-8. doi:10.3389/fonc.2021.793121

123. Reita D, Pabst L, Pencreach E, et al. Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1321. doi:10.3390/cancers14051321

124. Liu J, Kang R, Tang D. The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance. *Cancer Gene Ther*. 2022;29(7):875-878. doi:10.1038/s41417-021-00383-9

125. Lindsay CR, Garassino MC, Nadal E, Öhrling K, Scheffler M, Mazières J. On target: Rational approaches to KRAS inhibition for treatment of non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2021;160(April):152-165. doi:10.1016/j.lungcan.2021.07.005

126. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation . *N Engl J Med*. 2021;384(25):2371-2381. doi:10.1056/nejmoa2103695

127. Lai GGY, Guo R, Drilon A, Shao Weng Tan D. Refining patient selection of MET-activated non-small cell lung cancer through biomarker precision. *Cancer Treat Rev*. 2022;110(July):102444. doi:10.1016/j.ctrv.2022.102444

128. Hong L, Zhang J, Heymach J V., Le X. Current and future treatment options for MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2021;13:1-16. doi:10.1177/1758835921992976

129. Garon EB, Brodrick P. Targeted Therapy Approaches for MET Abnormalities in Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs*. 2021;81(5):547-554. doi:10.1007/s40265-021-01477-2

130. Cortot A, Le X, Smit E, et al. Safety of MET Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With MET Exon 14 Skipping Non-small Cell Lung Cancer: A Clinical Review. *Clin Lung Cancer*. 2022;23(3):195-207. doi:10.1016/j.cllc.2022.01.003

131. Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in Non–Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations . *N Engl J Med*. 2020;383(10):931-943. doi:10.1056/nejmoa2004407

132. Song Y, Li G, Ju K, et al. Mesenchymal-Epithelial Transition Exon 14 Skipping Mutation and Amplification in 5,008 Patients With Lung Cancer. *Front Oncol*. 2021;11(September):1-9. doi:10.3389/fonc.2021.755031

133. Fernandes M, Jamme P, Cortot AB, Kherrouche Z, Tulasne D. When the MET receptor kicks in to resist targeted therapies. *Oncogene*. 2021;40(24):4061-4078. doi:10.1038/s41388-021-01835-0

134. Azar I, Alkassis S, Fukui J, et al. Spotlight on trastuzumab deruxtecan (Ds-8201, t-dxd) for her2 mutation positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Targets Ther*. 2021;12(June):103-114. doi:10.2147/LCTT.S307324

135. Liu F, Wei Y, Zhang H, Jiang J, Zhang P, Chu Q. NTRK Fusion in Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis, Therapy, and TRK Inhibitor Resistance. *Front Oncol*. 2022;12(March):1-16. doi:10.3389/fonc.2022.864666

136. Haratake N, Seto T. NTRK Fusion-positive Non–small-cell Lung Cancer: The Diagnosis and

Targeted Therapy. *Clin Lung Cancer*. 2021;22(1):1-5. doi:10.1016/j.cllc.2020.10.013

137. Harada G, Santini FC, Wilhelm C, Drilon A. NTRK fusions in lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2021;161(September):108-113. doi:10.1016/j.lungcan.2021.09.005

138. Qin H, Patel MR. The Challenge and Opportunity of NTRK Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6). doi:10.3390/ijms23062916

139. Osta B El, Ramalingam SS. RET Fusion: Joining the Ranks of Targetable Molecular Drivers in NSCLC. *JTO Clin Res Reports*. 2020;1(3):100050. doi:10.1016/j.jtocrr.2020.100050

140. Addeo A, Miranda-Morales E, den Hollander P, et al. RET aberrant cancers and RET inhibitor therapies: Current state-of-the-art and future perspectives. *Pharmacol Ther*. 2023;242:108344. doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108344

141. Drusbosky LM, Rodriguez E, Dawar R, Ikpeazu C V. Therapeutic strategies in RET gene rearranged non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):1-8. doi:10.1186/s13045-021-01063-9

142. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(9):813-824. doi:10.1056/NEJMoa2005653

143. Cascetta P, Sforza V, Manzo A, et al. RET Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17):4415. doi:10.3390/cancers13174415

144. Gazeu A, Aubert M, Pissaloux D, et al. Small-Cell Lung Cancer Transformation as a Mechanism of Resistance to Pralsetinib in RET-Rearranged Lung Adenocarcinoma: A Case Report. *Clin Lung Cancer*. 2023;24(1):72-75. doi:10.1016/j.cllc.2022.10.005

145. Ali F, Neha K, Chauhan G. Pralsetinib: chemical and therapeutic development with FDA authorization for the management of RET fusion-positive non-small-cell lung cancers. *Arch Pharm Res*. 2022;45(5):309-327. doi:10.1007/s12272-022-01385-3

146. Syed YY. Pralsetinib: A Review in Advanced RET Fusion-Positive NSCLC. *Drugs*. 2022;82(7):811-816. doi:10.1007/s40265-022-01720-4

147. Remon J, Pignataro D, Novello S, Passiglia F. Current treatment and future challenges in ROS1- and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev*. 2021;95(February):102178. doi:10.1016/j.ctrv.2021.102178

148. Azelby CM, Sakamoto MR, Bowles DW. ROS1 Targeted Therapies: Current Status. *Curr Oncol Rep*. 2021;23(8):1-9. doi:10.1007/s11912-021-01078-y

149. Gendarme S, Bylicki O, Chouaid C, Guisier F. ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date. *Curr Oncol*. 2022;29(2):641-658. doi:10.3390/curroncol29020057

150. Drilon A, Jenkins C, Iyer S, Schoenfeld A, Keddy C, Davare MA. ROS1-dependent cancers — biology, diagnostics and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(1):35-55. doi:10.1038/s41571-020-0408-9

151. Passaro A, Jänne PA, Mok T, Peters S. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nat Cancer*. 2021;2(4):377-391. doi:10.1038/s43018-021-00195-8

152. Johnson M, Garassino MC, Mok T, Mitsudomi T. Treatment strategies and outcomes for patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitors: Focus on novel therapies. *Lung Cancer*. 2022;170(March):41-51.

doi:10.1016/j.lungcan.2022.05.011

153. Guo R, Offin M, Rose Brannon A, et al. MET Exon 14-altered lung cancers and MET inhibitor resistance. *Clin Cancer Res*. 2021;27(3):799-806. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2861

154. Koulouris A, Tsagkaris C, Corriero AC, Metro G, Mountzios G. Resistance to TKIs in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: From Mechanisms to New Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(14):1-31. doi:10.3390/cancers14143337

155. Liu W juan, Du Y, Wen R, Yang M, Xu J. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther*. 2020;206:107438. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107438

156. Arbour KC, Riely GJ. Systemic therapy for locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer: A review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2019;322(8):764-774. doi:10.1001/jama.2019.11058

157. Stanley R, Flanagan S, Reilly DO, Kearney E, Naidoo J, Dowling CM. Immunotherapy through the Lens of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(11):1-23. doi:10.3390/cancers15112996

158. Yang CY, Yang JCH, Yang PC. Precision Management of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Annu Rev Med*. 2020;71:117-136. doi:10.1146/annurev-med-051718-013524

159. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-135. doi:10.1056/nejmoa1504627

160. Fitzgerald K, Simone CB. Combining Immunotherapy with Radiation Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Surg Clin*. 2020;30(2):221-239. doi:10.1016/j.thorsurg.2020.01.002

161. Pai-Scherf L, Blumenthal GM, Li H, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond. *Oncologist*. 2017;22(11):1392-1399. doi:10.1634/theoncologist.2017-0078

162. Papadimitrakopoulou V, Gadgeel SM, Borghaei H, et al. First-line carboplatin and pemetrexed (CP) with or without pembrolizumab (pembro) for advanced nonsquamous NSCLC: Updated results of KEYNOTE-021 cohort G. *J Clin Oncol*. 2017;35(15_suppl):9094-9094. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9094

163. Pacheco JM. KEYNOTE-407: Changing the way we treat stage IV squamous non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(1):148-153. doi:10.21037/tlcr.2020.01.12

164. Akinboro O, Drezner N, Amatya A, et al. US Food and Drug Administration Approval Summary: Nivolumab Plus Platinum-Doublet Chemotherapy for the Neoadjuvant Treatment of Patients With Resectable Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2023;41(17):3249-3259. doi:10.1200/JCO.22.02509

165. Paz-Ares L, O'Brien MER, Mauer M, et al. VP3-2022: Pembrolizumab (pembro) versus placebo for early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC) following complete resection and adjuvant chemotherapy (chemo) when indicated: Randomized, triple-blind, phase III EORTC-1416-LCG/ETOP 8-15 – PEARLS/KEYNOTE. *Ann Oncol*. 2022;33(4):451-453. doi:10.1016/j.annonc.2022.02.224

166. Lan B, Ma C, Zhang C, et al. Association between PD-L1 expression and driver gene status

in nonsmall- cell lung cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(7):7684-7699. doi:10.18632/oncotarget.23969

167. Jin Y, Xue Q, Shen X, et al. PD-L1 Expression and Comprehensive Molecular Profiling Predict Survival in Nonsmall Cell Lung Cancer: A Real-World Study of a Large Chinese Cohort. *Clin Lung Cancer*. 2022;23(1):43-51. doi:10.1016/j.cllc.2021.08.009

168. Reck M, Ciuleanu T-E, Dols MC, et al. Nivolumab (NIVO) + ipilimumab (IPI) + 2 cycles of platinum-doublet chemotherapy (chemo) vs 4 cycles chemo as first-line (1L) treatment (tx) for stage IV/recurrent non-small cell lung cancer (NSCLC): CheckMate 9LA. *J Clin Oncol*. 2020;38(15_suppl):9501-9501. doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.9501

169. Keam SJ. Tremelimumab: First Approval. *Drugs*. 2023;83(1):93-102. doi:10.1007/s40265-022-01827-8

170. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. Toxicity with small molecule and immunotherapy combinations in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(3):589-595. doi:10.1007/s00262-020-02714-5

171. Colombino M, Paliogiannis P, Cossu A, et al. EGFR, KRAS, BRAF, ALK, and cMET genetic alterations in 1440 Sardinian patients with lung adenocarcinoma. *BMC Pulm Med*. 2019;19(1):209. doi:10.1186/s12890-019-0964-x

172. Casal-Mouriño A, Ruano-Ravina A, Lorenzo-González M, et al. Epidemiology of stage III lung cancer: Frequency, diagnostic characteristics, and survival. *Transl Lung Cancer Res*. 2021;10(1):506-518. doi:10.21037/tlcr.2020.03.40

173. Hespanhol V, Parente B, Araújo A, et al. Lung cancer in Northern Portugal: A hospital-based study. *Rev Port Pneumol (English Ed*. 2013;19(6):245-251. doi:10.1016/j.rppnen.2013.10.002

174. Guerreiro T, Forjaz G, Antunes L, et al. Lung cancer survival and sex-specific patterns in Portugal: A population-based analysis. *Pulmonology*. 2021;000(xxxx). doi:10.1016/j.pulmoe.2021.09.001

175. Aguiar F, Fernandes G, Queiroga H, et al. Overall Survival Analysis and Characterization of an EGFR Mutated Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Population. *Arch Bronconeumol*. 2018;54(1):10-17. doi:10.1016/j.arbres.2017.07.012

176. Mederos N, Friedlaender A, Peters S, Addeo A. Gender-specific aspects of epidemiology, molecular genetics and outcome: Lung cancer. *ESMO Open*. 2020;5:e000796. doi:10.1136/esmoopen-2020-000796

177. Mountzios G, Koumarianou A, Bokas A, et al. A real-world, observational, prospective study to assess the molecular epidemiology of epidermal growth factor receptor (Egfr) mutations upon progression on or after first-line therapy with a first-or second-generation egfr tyrosine kinase inhibitor in eg. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13). doi:10.3390/cancers13133172

178. Terrenato I, Ercolani C, Benedetto A Di, et al. A Real-World Systematic Analysis of Driver Mutations' Prevalence in Early-and Advanced-Stage NSCLC: Implications for Targeted Therapies in the Adjuvant Setting. *Cancers (Basel)*. 2022;14(12). doi:10.3390/cancers14122971

179. Tarigopula A, Ramasubban G, Chandrashekar V, Govindasami P, Chandran C. EGFR mutations and ROS1 and ALK rearrangements in a large series of non-small cell lung cancer in South India. *Cancer Rep*. 2020;3(6):1-8. doi:10.1002/cnr2.1288

180. Yang G, Li J, Xu H, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients: Molecular heterogeneity and treatment outcome from nationwide real-world study. *Lung Cancer*. 2020;145(February):186-194. doi:10.1016/j.lungcan.2020.03.014

181. Lin PC, Peng CY, Pan CH, Lin PID, Wu MT. Gender differences and lung cancer risk in occupational chefs: analyzing more than 350,000 chefs in Taiwan, 1984–2011. *Int Arch Occup Environ Health*. 2019;92(1):101-109. doi:10.1007/s00420-018-1358-8

182. Chen J, Yang H, Teo ASM, et al. Genomic landscape of lung adenocarcinoma in East Asians. *Nat Genet*. 2020;52(2):177-186. doi:10.1038/s41588-019-0569-6

183. Deng W, Chen G, Xiong D, et al. Epidermal growth factor receptor mutation p.A864V in small cell lung cancer and lung squamous cell carcinoma: a case report and review of literature. *Anticancer Drugs*. 2022;33(9):979-982. doi:10.1097/CAD.0000000000001324

184. Kawaguchi T, Koh Y, Ando M, et al. Prospective analysis of oncogenic driver mutations and environmental factors: Japan molecular epidemiology for lung cancer study. *J Clin Oncol*. 2016;34(19):2247-2257. doi:10.1200/JCO.2015.64.2322

185. Zhou C, Li W, Shao J, Zhao J, Chen C. Analysis of the Clinicopathologic Characteristics of Lung Adenocarcinoma With CTNNB1 Mutation. *Front Genet*. 2020;10(February):1-7. doi:10.3389/fgene.2019.01367

186. Thomas de Montpréville V, Lacroix L, Rouleau E, et al. Non-small cell lung carcinomas with CTNNB1 (beta-catenin) mutations: A clinicopathological study of 26 cases. *Ann Diagn Pathol*. 2020;46:151522. doi:10.1016/j.anndiagpath.2020.151522

187. Kim Y, Ahn B, Yoon S, et al. An oncogenic CTNNB1 mutation is predictive of post-operative recurrence-free survival in an EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2023;18(6):e0287256. doi:10.1371/journal.pone.0287256

188. Majumder A, Meyer BS, Hicks JK, Boyle TA, Haura EB. Abstract 1101: CTNNB1 mutation can mediate resistance to EGFR, ALK and KRAS targeted therapies. *Cancer Res*. 2022;82(12_Supplement):1101-1101. doi:10.1158/1538-7445.AM2022-1101

189. Chanvorachote P, Sriratanasak N, Nonpanya N. C-myc contributes to malignancy of lung cancer: A potential anticancer drug target. *Anticancer Res*. 2020;40(2):609-618. doi:10.21873/anticanres.13990

190. Eftekhari Kenzerki M, Ahmadi M, Mousavi P, Ghafouri-Fard S. MYC and non-small cell lung cancer: A comprehensive review. *Hum Gene*. 2023;37(July 2022):201185. doi:10.1016/j.humgen.2023.201185

191. Massó-Vallés D, Beaulieu ME, Soucek L. MYC, MYCL, and MYCN as therapeutic targets in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2020;24(2):101-114. doi:10.1080/14728222.2020.1723548

192. Iyer SR, Odintsov I, Schoenfeld AJ, et al. MYC Promotes Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in ROS1-Fusion-Positive Lung Cancer. *Mol Cancer Res*. 2022;20(5):722-734. doi:10.1158/1541-7786.MCR-22-0025

193. Kato S, Okamura R, Mareboina M, et al. Revisiting Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplification as a Target for Anti-EGFR Therapy: Analysis of Cell-Free Circulating Tumor DNA in Patients With Advanced Malignancies . *JCO Precis Oncol*. 2019;(3):1-14. doi:10.1200/po.18.00180

194. French PJ, Eoli M, Sepulveda JM, et al. Defining EGFR amplification status for clinical trial inclusion. *Neuro Oncol*. 2019;21(10):1263-1272. doi:10.1093/neuonc/noz096

195. Pazolli E, Kipp R, Boezio A, et al. Abstract P251: Discovery and characterization of RLY-2608: The first allosteric, mutant, and isoform-selective inhibitor of PI3Kα. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(12_Supplement):P251-P251. doi:10.1158/1535-7163.TARG-21-P251

196. Pazolli E, Kipp R, Boezio A, et al. Abstract P5-16-10: RLY-2608: The first allosteric mutant- and isoform-selective inhibitor of PI3Kα, is efficacious as a single agent and drives regressions in combination with standard of care therapies in PIK3CA mutant breast cancer models. *Cancer Res*. 2022;82(4_Supplement):P5-16-10-P5-16-10. doi:10.1158/1538-7445.SABCS21-P5-16-10

197. Tu HY, Yin K, Zhao X, et al. Genomic and immune characteristics of HER2-mutated non-small-cell lung cancer and response to immune checkpoint inhibitor-based therapy. *Mol Oncol*. Published online 2023:1-14. doi:10.1002/1878-0261.13439

198. Liu C, Zheng S, Wang Z, et al. KRAS-G12D mutation drives immune suppression and the primary resistance of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Commun*. 2022;42(9):828-847. doi:10.1002/cac2.12327

199. Chen JA, Riess JW. Optimal Management of Patients with Advanced NSCLC Harboring High PD-L1 Expression and Driver Mutations. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(7):60. doi:10.1007/s11864-020-00750-y

200. Cai R, Zhu H, Liu Y, et al. To be, or not to be: the dilemma of immunotherapy for non-small cell lung cancer harboring various driver mutations. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;(0123456789). doi:10.1007/s00432-023-04919-4

201. Seegobin K, Majeed U, Wiest N, Manochakian R, Lou Y, Zhao Y. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer With Actionable Mutations Other Than EGFR. *Front Oncol*. 2021;11(December):1-13. doi:10.3389/fonc.2021.750657

202. Gonzalvez F, Vincent S, Baker TE, et al. Mobocertinib (Tak-788): A targeted inhibitor of egfr exon 20 insertion mutants in non–small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2021;11(7):1672-1687. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1683

203. Koga T, Suda K, Fujino T, et al. KRAS Secondary Mutations That Confer Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitors, Sotorasib and Adagrasib, and Overcoming Strategies: Insights From In Vitro Experiments. *J Thorac Oncol*. 2021;16(8):1321-1332. doi:10.1016/j.jtho.2021.04.015

204. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):1-20. doi:10.1038/s41392-021-00780-4

205. Rogers C, Morrissette JJD, Sussman RT. NTRK point mutations and their functional consequences. *Cancer Genet*. 2022;262-263:5-15. doi:10.1016/j.cancergen.2021.12.002

Anexos

Anexo I Fármacos dirigidos a alvos moleculares aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*)

*Tabela 5 – Variantes somáticas com fármacos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) no tratamento do cancro do pulmão*

Gene alterado	Variante(s) somática(s)	Frequência relativa da variante no cancro do pulmão	Ensaio(s) clínico(s) de aprovação	Especificações	Fármaco aprovado pela FDA (ano de aprovação)	Resistências ao fármaco	
						Dependentes do gene-alvo	**Independentes do gene-alvo**
ALK **[ref.** [87,90,155]**]**	Rearranjos de *ALK*	3-7% dos CPNPC	-	CPNPC avançados ou metastáticos	Crizotinib (2011)	Mutações secundárias: • *ALK* p.(Phe1174Val) • *ALK* p.(Gly1128Ala) • *ALK* p.(Ile1151Thr) • *ALK* p.(Leu1152Pro/Arg) • *ALK* p.(Cys1156Tyr) • *ALK* p.(Ile1171Thr/Asn/Ser) • *ALK* p.(Val1180Leu) • *ALK* p.(Leu1196Met) • *ALK* p.(Gly1202Arg) • *ALK* p.(Ser1206Cys/Tyr) • *ALK* p.(Glu1210Lys) • *ALK* p.(Gly1269Ala) Amplificação de *ALK*	• Expressão aumentada de *EGFR* • Ativação de *IGF-1R*
			ASCEND-4 (2017)	CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento, 2017)	Ceritinib (2014)	• *ALK* p.(Thr1151Lys/Arg/Tyrins) • *ALK* p.(Leu1152Pro/Arg) • *ALK* p.(Cys1156Tyr/Thr) • *ALK* p.(Phe1174Cys/Leu/Val) • *ALK* p.(Gly1202Arg/del)	• Amplificação de *MET* • Mutações ativadoras de *MEK* • Mutações em *PIK3CA*
			ALEX (2017)	CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento, 2017)	Alectinib (2015)	• *ALK* p.(Ile1171Thr/Asn/Ser) • *ALK* p.(Val1180Leu) • *ALK* p.(Leu1196Met) • *ALK* p.(Gly1202Arg)	• Amplificação de *MET* • Mutações em *PIK3CA*
			ALTA Trial (2017) ALTA 1L trial (2020)	CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento, 2020)	Brigatinib (2017)	• *ALK* p.(Gly1202Arg) • *ALK* p.(Asp1203Asn) • *ALK* p.(Glu1210Lys) • *ALK* p.(Glu1210Lys) + *ALK* p.(Asp1203Asn) • *ALK* p.(Glu1210Lys) + *ALK* p.(Ser1206Cys)	-
			B7461001 (2018) CROWN trial (2021)	CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento, 2021)	Lorlatinib (2018)	• *ALK* p.(Cys1156Tyr) + *ALK* p.(Gly1269Ala) • *ALK* p.(Phe1174Leu) + *ALK* p.(Gly1202Arg) • *ALK* p.(Leu1196Met) + *ALK* p.(Asp1203Asn) • *ALK* p.(Leu1198Phe) + *ALK* p.(Cys1156Tyr)	• Mutações com perda de função em *NF2*
	ALK p.(Ile1151Thrins)				Alectinib	(ver acima)	(ver acima)

Gene alterado	Variante(s) somática(s)	Frequência relativa da variante no cancro do pulmão	Ensaio(s) clínico(s) de aprovação	Especificações	Fármaco aprovado pela FDA (ano de aprovação)	Resistências ao fármaco	
						Dependentes do gene-alvo	Independentes do gene-alvo
	ALK p.(Leu1152Arg) *ALK* p.(Cys1156Tyr), *ALK* p.(Phe1174Leu)						
	ALK p.(Ile1171Thr), *ALK* p.(Ser1206Tyr)				Ceritinib	(ver acima)	(ver acima)
	ALK p.(Leu1196Arg)				Ceritinib, Alectinib, Brigatinib, Lorlatinib	(ver acima)	(ver acima)
	ALK p.(Leu1196Met), *ALK* p.(Gly1269Ala)				Ceritinib, Alectinib	(ver acima)	(ver acima)
	ALK p.(Gly1202Arg)				Lorlatinib	(ver acima)	(ver acima)
BRAF **[ref.** [95,155]**]**	*BRAF* p.(Val600Glu)	1,5-3,5% dos CPNPC		CPNPC avançados ou metastáticos com quimioterapia prévia	Dabrafenib + Trametinib (2017)	Variantes do tipo *splice-site* Amplificação do gene	Variantes de ganho-de-função em genes a montante ou a jusante de *BRAF* na via de sinalização: • Mutações em *KRAS*/*NRAS* • Mutações em MEK1/MEK2 Ativação de vias de sinalização alternativas como *PI(3)K*/*mTOR*
EGFR **[ref.** [104–107,152,154,202]**]**	Deleções *in-frame* do exão 19	44-47% das mutações de *EGFR* nos CPNPC		CPNPC localmente avançados ou metastáticos que se encontrem em progressão após outros tratamentos os quais tenham incluído pelo menos um regime de quimioterapia	Erlotinib (2004)	• *EGFR* p.(Thr790Met) • Inserções *in-frame* do exão 20 [exceto *EGFR* p.(Ala763_Tyr764insPheGlnGluAla)] Mutações de novo: • *EGFR* p.(Leu474Pro) • *EGFR* p.(Gly724Ser)	Ativação das vias de sinalização a jusante • Mutações em *KRAS*, *BRAF* e MEK • Mutações em *PIK3CA*, *PTEN* E *AKT1* Ativação de vias de sinalização alternativas • Amplificação de *MET* • Mutações em *FGFR1* • Amplificação e mutações ativadoras de *HER2* • Rearranjos em *ALK*, *BRAF*, *FGFR3* e *RET* Alterações genómicas em genes do ciclo celular • Amplificação de *CCND1*/2 • Amplificação de *CDK4*/6 • Deleções *frameshift* em *CDKN2A* Transformação histológica Transição epitélio-mesenquimal Desregulação de mecanismos epigenéticos associados à transcrição
	EGFR p.(Leu858Arg)	41% das mutações de *EGFR* nos CPNPC		CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento)	Gefitinib (2015)		
				CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento) CPNPC escamosos que tenham progredido após quimioterapia baseada em platina (2016)	Afatinib (2013)	• *EGFR* p.(Thr790Met) • Inserções *in-frame* do exão 20	
			ARCHER 1050	CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento)	Dacomitinib (2018)		
			- FLAURA (2018) ADAURA (2020)	CPNPC metastáticos e que tenham progredido após terapia com TKI CPNPC metastáticos (1ª linha de tratamento; 2018) CPNPC de estadios precoces após recessão cirúrgica com intuito curativo (terapia adjuvante; 2020)	Osimertinib (2015)	• *EGFR* p.(Cys797-) • *EGFR* p.(Gly796Arg/Ser/Asn) • *EGFR* p.(Leu718Gln) • *EGFR* p.(Leu747Ser/Pro) • *EGFR* p.(Leu792-) • *EGFR* p.(Thr854Ala)	
	EGFR p.(Thr790Met)	Cerca de 50-60% das resistências a TKI de 1ª geração			Osimertinib		

Gene alterado	Variante(s) somática(s)	Frequência relativa da variante no cancro do pulmão	Ensaio(s) clínico(s) de aprovação	Especificações	Fármaco aprovado pela FDA (ano de aprovação)	Resistências ao fármaco	
						Dependentes do gene-alvo	**Independentes do gene-alvo**
	Mutações não clássicas: *EGFR* p.(Leu861Gln), *EGFR* p.(Gly719-), *EGFR* p.(Ser768Ile)				Afatinib (2018)	(Ver acima)	
	Inserções *in-frame* do exão 20	0,1-2% dos CPNPC	CHRYSALIS	CPNPC localmente avançados ou metastáticos que tenham progredido durante ou após a quimioterapia baseada em platina	Amivantamab (2021)	Os mecanismos de resistência permanecem pouco claros.	Os mecanismos de resistência permanecem pouco claros.
				CPNPC localmente avançados ou metastáticos que tenham progredido durante ou após a quimioterapia baseada em platina	Mobocertinib (2021)	Mecanismos expectados: • Substituições no resíduo Cys797 (resíduo de ligação de mobocertinib)	Os mecanismos de resistência permanecem pouco claros.
HER2 **[ref.** [116]**]**	Mutações ativadoras de *HER2* (excluí amplificação de *HER2*)	1-4% dos CPNPC	DESTINY-Lung02	CPNPC metastáticos ou irressecáveis e que tenham recebido pelo menos uma terapia sistémica anteriormente	Trastuzumab Deruxtecan (2022)	Mecanismos expectados: • Transformação estrutural de *HER2* • Redução da internalização de *HER2*	Baseados nos achados do cancro da mama: • Aumento do pH lisossomal • Redução da atividade das enzimas lisossomais • Alterações nas proteínas envolvidas nas vias de sinalização • Reativação da via *RAS*/*MAPK* • Ativação da via *PI(3)K*/*mTOR* (incluindo mutações em *TP53* e perda de *PTEN*)
KRAS **[ref.** [123,124,203,204]**]**	*KRAS* p.(Gly12Cys)	11-13% dos CPNPC		CPNPC localmente avançados ou metastáticos portadores e que tenham recebido pelo menos uma terapia sistémica anteriormente	Sotorasib (2021)	Mutações secundárias: • *KRAS* p.(Gly12Asp/Arg/Val/Trp), • *KRAS* p.(Gly13Asp), • *KRAS* p.(Ala59Ser/Tyr), • *KRAS* p.(Gln61His), • *KRAS* p.(Arg68Ser/*MET*), • *KRAS* p.(His95Asp/Gln/Arg), • *KRAS* p.(Tyr96Cys/Asp/Ser) Amplificação do alelo *KRAS* p.(Gly12Cys)	• Mecanismos adquiridos de *bypass*: ○ Amplificação de *MET* • Mutações ativadoras em *NRAS*, *BRAF, MAP2K1* e *RET* • Fusões oncogénicas envolvendo *ALK*, *RET*, *BRAF, RAF1* e *FGFR3* • Mutações de perda-de-função em genes supressores tumorais como *PTEN* e *NF1*
MET **[ref.**[127,129,133]**]**	Mutações condutoras ao *skipping* do exão 14	3-4% dos CPNPC	GEOMETRY mono-1	CPNPC metastáticos (1ª linha ou subsequentes independentemente do tratamento prévio)	Capmatinib (2020)	• *MET* p.(Asp1228Asn) • *MET* p.(Tyr1230Cys/His) • *MET* p.(Asp1246His/Asn • *MET* p.(Tyr1248His/Asn/Ser/Cys) Amplificação de *MET*	• Alterações em *TP53* e em *EGFR* • Alterações nos genes das vias *RAS/MAPK* • Alterações nos genes da via *PI(3)K/mTOR/mTOR* • Amplificação de *CDK4*
			VISION	CPNPC metastáticos (1ª linha ou subsequentes independentemente do tratamento prévio)	Tepotinib (2021)		
NTRK **[ref.** [135,138,205]**]**	Fusões de *NTRK* (*NTRK1*/2/3)	0,1-0,3% dos CPNPC		Tumores sólidos metastáticos, irressecáveis ou que progrediram pós-tratamento e que sejam portadores de fusões nos genes *NTRK* na ausência de mutações de resistência conhecidas	Larotrectinib (2018)	• *NTRK1* p.(Phe589Leu) • *NTRK1* p.(Gly667Ser) • *NTRK1* p.(Gly595Arg) • *NTRK3* p.(Gly696Ala)	• Mutações ativadoras de outros recetores • Amplificação de *MET* • Mutações ativadoras da via *RAS*/*MAPK*

Gene alterado	Variante(s) somática(s)	Frequência relativa da variante no cancro do pulmão	Ensaio(s) clínico(s) de aprovação	Especificações	Fármaco aprovado pela FDA (ano de aprovação)	Resistências ao fármaco	
						Dependentes do gene-alvo	**Independentes do gene-alvo**
						• *NTRK3* p.(Gly623Arg) • *NTRK3* p.(Phe617Leu)	
			STARTRK-2 STARTRK-1 *ALK*A-372-001 STARTRK-NG	Tumores sólidos metastáticos, irressecáveis ou que progrediram pós-tratamento e que sejam portadores de fusões nos genes *NTRK* na ausência de mutações de resistência conhecidas CPNPC metastáticos	Entrectenib (2019)	• *NTRK1* p.(Gly595Arg) • *NTRK1* p.(Gly667Cys) • *NTRK3* p.(Gly623Arg)	
RET **[ref.** [143,146]**]**	Rearranjos de *RET* Mutações ativadoras de *RET* Mutações de resistência adquirida previstas	1-2% dos CPNPC	LIBRETTO-001	CPNPC metastáticos	Selpercatinib (2020)	• *RET* p.(Gly810Cys/Ser)	Ativação secundária das vias de sinalização • Amplificação de *MET* Ativação das vias de sinalização a jusante • Amplificação de *KRAS* • *BRAF* p.(Val600Glu)
			ARROW	CPNPC metastáticos	Pralsetinib (2020)	-	
ROS1 **[ref.** [90,93,147,148,150,192]**]**	Rearranjos de *ROS1*	1-2% dos CPNPC	-	CPNPC avançados (metastáticos)	Crizotinib (2016)	• *ROS1* p.(Glu1935Gly) • *ROS1* p.(Leu1947Arg) • *ROS1* p.(Leu1951Arg) • *ROS1* p.(Gly1971Glu) • *ROS1* p.(Leu1982Phe) • *ROS1* p.(Ser1986Phe/Tyr) • *ROS1* p.(Leu2026Met) • *ROS1* p.(Gly2032Arg) • *ROS1* p.(Asp2033Asn) • *ROS1* p.(Cys2060Gly)	• Amplificação de *MYC* • Mutações oncogénicas em *CTNNB1* Ativação secundária das vias de sinalização • Alterações ativadoras em *EGFR, HER2*, *MET* e *KIT*; Ativação das vias de sinalização a jusante • Mutações oncogénicas em *KRAS*, *NRAS*, *BRAF,* MEK e *PIK3CA* Transição epitélio-mesenquimal
			STARTRK-2 STARTRK-1 *ALK*A-372-001 STARTRK-NG	(ver acima)	Entrectinib (2019)	• *ROS1* p.(Phe2004Cys/Ile) • *ROS1* p.(Gly2032Arg)	-

Anexo II Amostras biológicas estudadas molecularmente

Tabela 6 – Distribuição da proveniência (Região de Portugal) dos casos admitidos a estudo

	Frequência relativa
Região Norte	59,73%
Região Centro	7,49%
Região de Lisboa e Vale do Tejo	32,53%
Região do Algarve	0,05%
Não identificada	0,20%

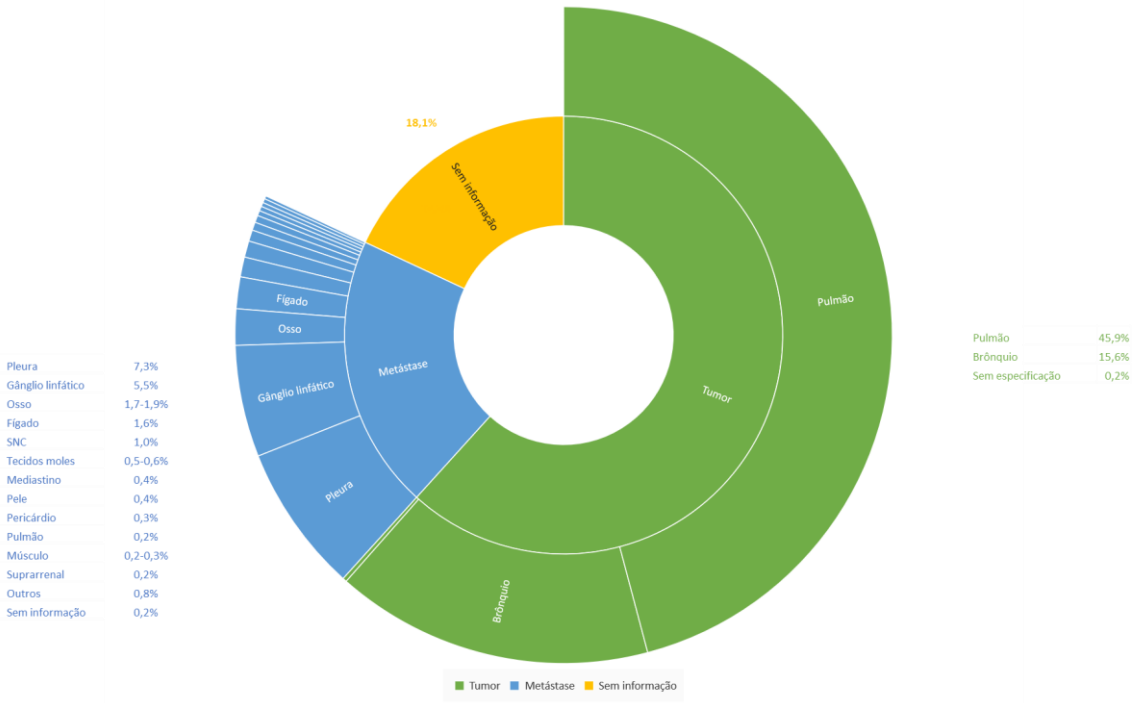


Figura 3 – Distribuição das frequências relativas das amostras biológicas dos casos admitidos a estudo

Anexo III Painel *Oncomine Focus Assay*

Tabela 7 – Lista de genes cobertos pelo painel Oncomine Focus Assay e respetivos NM

Gene	Genes *hotspot* (35 genes)	Amplificações (19 genes)	Fusões (23 genes)	NM
ABL1			*ABL1*	NM_005157.4
AKT1	*AKT1*			NM_001014431.1
AKT3			*AKT3*	NM_005465.4
ALK	*ALK*	*ALK*	*ALK*	NM_004304.4
AR	*AR*	*AR*		NM_000044.4
AXL			*AXL*	NM_021913.4
BRAF	*BRAF*	*BRAF*	*BRAF*	NM_004333.4
CCND1		*CCND1*		NM_053056.2
CDK4	*CDK4*	*CDK4*		NM_000075.3
CDK6		CDK6		NM_001145306.1
CTNNB1	*CTNNB1*			NM_001904.3
DDR2	*DDR2*			NM_006182.2
EGFR	*EGFR*	*EGFR*	*EGFR*	NM_005228.4
ERG			*ERG*	NM_004449.4
ESR1	*ESR1*			NM_001122740.1
ETV1			*ETV1*	NM_004956.4
ETV4			*ETV4*	NM_001079675.2
ETV5			*ETV5*	NM_004454.2
FGFR1		*FGFR1*	*FGFR1*	NM_023110.2
FGFR2	*FGFR2*	*FGFR2*	*FGFR2*	NM_000141.4
FGFR3	*FGFR3*	*FGFR3*	*FGFR3*	NM_000142.4
FGFR4		*FGFR4*		NM_213647.2
GNA11	*GNA11*			NM_002067.4
GNAQ	*GNAQ*			NM_002072.4
HER2	*HER2*	*HER2*	*HER2*	NM_004448.3
HER3	*HER3*			NM_001982.3

Gene	Genes *hotspot* (35 genes)	Amplificações (19 genes)	Fusões (23 genes)	NM
HER4	*HER4*			NM_005235.2
HRAS	*HRAS*			NM_001130442.2
IDH1	*IDH1*			NM_005896.3
IDH2	*IDH2*			NM_002168.3
JAK1	*JAK1*			NM_002227.3
JAK2	*JAK2*			NM_004972.3
JAK3	*JAK3*			NM_000215.3
KIT	*KIT*	*KIT*		NM_000222.2
KRAS	*KRAS*	*KRAS*		NM_033360.3
MAP2K1	*MAP2K1*			NM_002755.3
MAP2K2	*MAP2K2*			NM_030662.3
MET	*MET*	*MET*	*MET*	NM_000245.4
mTOR	*mTOR*			NM_004958.3
MYC		*MYC*		NM_002467.4
MYCN		*MYCN*		NM_005378.4
NRAS	*NRAS*			NM_002524.4
NTRK1			*NTRK1*	NM_001012331.1
NTRK2			*NTRK2*	NM_001018065.2
NTRK3			*NTRK3*	NM_002530.3
PDGFRA	*PDGFRA*	*PDGFRA*	*PDGFRA*	NM_006206.5
PIK3CA	*PIK3CA*	*PIK3CA*		NM_006218.3
PPARG			*PPARG*	NM_138711.3
RAF1	*RAF1*		*RAF1*	NM_002880.3
RET	*RET*		*RET*	NM_020975.4
ROS1	*ROS1*		*ROS1*	NM_002944.2
SMO	*SMO*			NM_005631.4

Anexo IV Amostras tumorais com variantes nos genes acionáveis

Tabela 8 – Distribuição das amostras tumorais com variantes nos genes acionáveis em função dos dados demográficos e clinicopatológicos

		Todas as amostras estudadas		*ALK* mutadas			*BRAF* mutadas			*EGFR* mutadas			*HER2* mutadas			*KRAS* mutadas			*MET* mutadas			*RET* mutadas			*ROS1* mutadas		
		n = 1987	%	n = 109	%	p α=0,05	n = 109	%	p α =0,05	n = 463	%	p α =0,05	n = 62	%	p α =0,05	n = 527	%	p α =0,05	n = 127	%	p α =0,05	n = 46	%	p α =0,05	n = 33	%	p α =0,05
Idade n=1968	**Média ± Desvio-padrão**	67,9 ± 10,7		66,1 ± 11,6		0,080	67,7 ± 9,5		0,896	69,3 ± 11,2		**0,002**	66,7 ± 10,8		0,395	66,5 ± 9,5		**<0,001**	74,0 ± 10,5		**<0,001**	67,6 ± 15,5		0,869	62,4 ± 13,2		**0,003**
	[intervalo de idades]	[28-99]		[34-89]			[45-89]			[38-94]			[42-86]			[35-99]			[44-96]			[44-87]			[44-89]		
Sexo n=1977	**Feminino**	729	36,9	54	7,4	**0,006**	27	3,7	**0,010**	303	41,6	**<0,001**	31	4,3	**0,033**	135	18,5	**<0,001**	49	6,7	0,704	25	3,4	**0,014**	16	2,2	0,202
	Masculino	1248	63,1	55	4,4		81	6,5		157	12,6		31	2,5		390	31,3		78	6,3		21	1,7		17	1,4	
Hábitos tabágicos N=213	**Não fumador**	59	27,7	4	6,8	0,516	3	5,1	0,370	26	44,1	**<0,001**	1	1,7	0,097	4	6,8	**<0,001**	5	8,5	0,489	5	8,5	**0,001**	3	5,1	0,098
	Ex-fumador	77	36,2	4	5,2		2	2,6		6	7,8		6	7,8		23	29,9		4	5,2		0	0,0		1	1,3	
	Fumador	77	36,2	2	2,6		6	7,8		9	11,7		1	1,3		30	39,0		3	3,9		0	0,0		0	0,0	
Tipo de neoplasia pulmonar n=1900	**ADC**	1697	89,3	98	5,8		98	5,8		424	25,0		58	3,4		459	27,0		110	6,5		41	2,4		31	1,8	
	CCE	92	4,8	2	2,2		3	3,3		12	13,0		1	1,1		4	4,3		7	7,6		0	0,0		1	1,1	
	CAE	14	0,7	1	7,1		0	0,0		2	14,3		0	0,0		2	14,3		0	0,0		0	0,0		1	7,1	
	CPNPC, SOE	65	3,4	2	3,1		2	3,1		2	3,1		1	1,5		25	38,5		3	4,6		1	1,5		0	0,0	
	CS	13	0,7	1	7,7		1	7,7		1	7,7		1	7,7		5	38,5		2	15,4		0	0,0		0	0,0	
	Tumor tipo glândula salivar *(Carc. mucoepidermóide)*	1	0,1	0	0,0	0,537	0	0,0	0,767	0	0,0	**<0,001**	0	0,0	0,479	0	0,0	**<0,001**	0	0,0	0,617	0	0,0	0,788	0	0,0	0,542
	Carc. neuroendócrino	17	0,9	0	0,0		0	0,0		2	11,8		1	5,9		3	17,6		0	0,0		0	0,0		0	0,0	
	CNGC	*6*			*0,0*		*0*	*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*	
	CPPC	*11*			*0,0*		*0*	*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*			*0,0*	
	Tumor neuroendócrino *(Tumor carcinóide)*	1	0,1	0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0	
ADC (natureza mucinosa) n=1414	**ADC mucinoso**	62	4,4	8	12,9	**0,023**	4	6,5	0,773	0	0,0	**<0,001**	0	0,0	0,166	32	51,6	**<0,001**	0	0,0	**0,031**	2	3,2	0,382	0	0,0	0,628
	ADC não mucinoso	1352	95,6	74	5,5		74	5,5		342	25,3		52	3,8		362	26,8		93	6,9		28	2,1		27	2,0	
Padrão de crescimento histológico n=658	**Lepídico**	150	22,8	7	4,7	0,557	6	4,0	0,673	48	32,0	**0,032**	6	4,0	0,405*	44	29,3	1,000	12	8,0	0,453	2	1,3	1,000	2	1,3	1,000
	Acinar	449	68,2	26	5,8	0,859	19	4,2	0,428	124	27,6	**0,042**	10	2,2	0,138	129	28,7	0,580	28	6,2	0,734	11	2,4	0,116	7	1,6	1,000
	Cribriforme	20	3,0	3	15,0	0,110	2	10,0	0,260	3	15,0	0,317	0	0,0	1,000	9	45,0	0,137	2	10,0	0,635	0	0,0	1,000	1	5,0	0,268
	Papilar	106	16,1	4	3,8	0,375	4	3,8	0,640	30	28,3	0,463	4	3,8	0,529	29	27,4	0,643	6	5,7	0,832	1	0,9	0,701	1	0,9	1,000

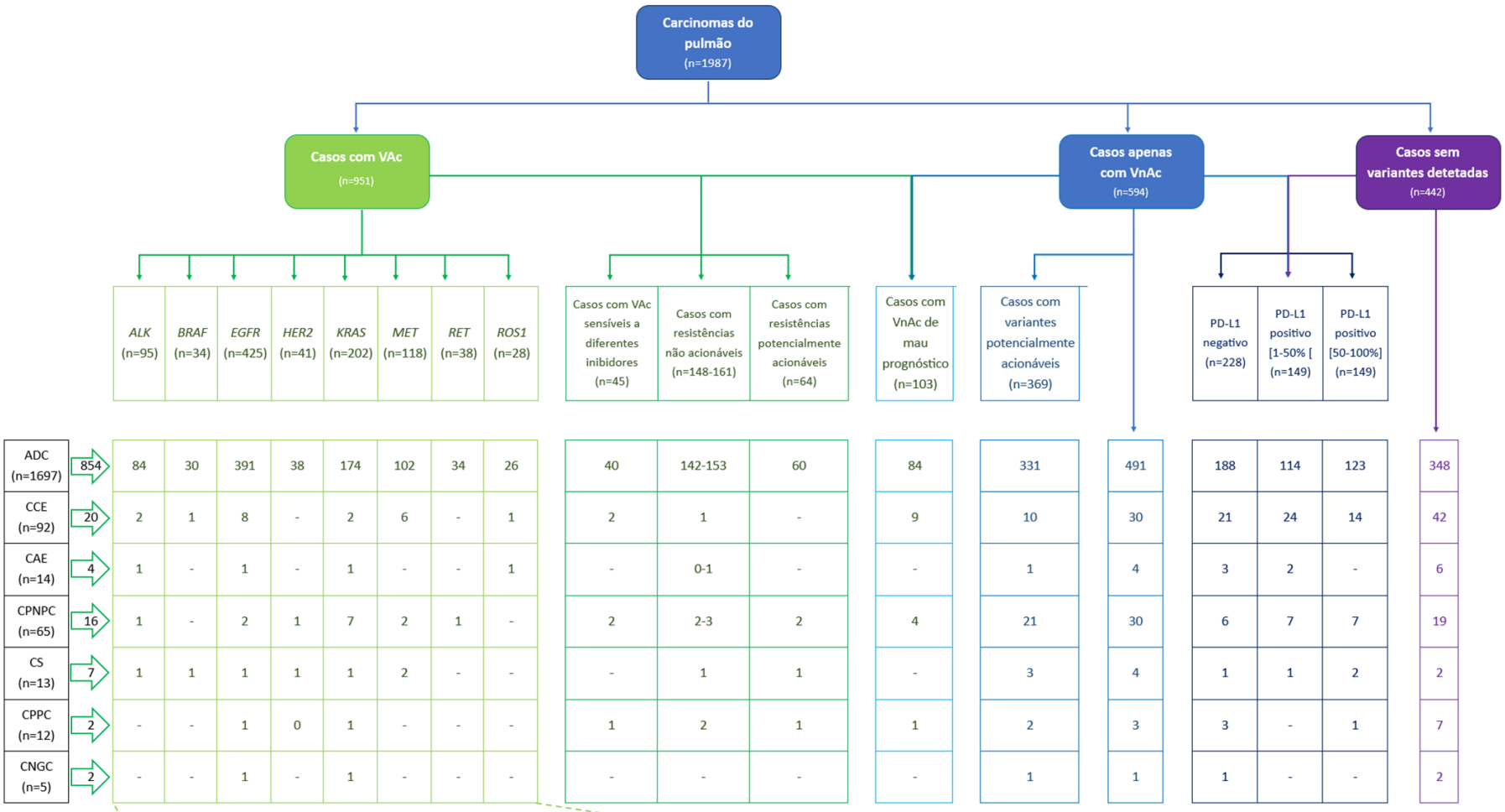
		Todas as amostras estudadas		*ALK* mutadas			*BRAF* mutadas			*EGFR* mutadas			*HER2* mutadas			*KRAS* mutadas			*MET* mutadas			*RET* mutadas			*ROS1* mutadas		
		n = 1987	%	n = 109	%	p α=0,05	n = 109	%	p α =0,05	n = 463	%	p α =0,05	n = 62	%	p α =0,05	n = 527	%	p α =0,05	n = 127	%	p α =0,05	n = 46	%	p α =0,05	n = 33	%	p α =0,05
	Micropapilar	82	12,5	6	7,3	0,615	6	7,3	0,261	21	25,6	0,893	1	1,2	0,494	23	28,0	0,597	4	4,9	0,638	5	6,1	**0,011**	1	1,2	1,000
	Sólido	229	34,8	21	9,2	**0,015**	13	5,7	0,442	49	21,4	0,109	5	2,2	0,476	59	25,8	0,150	15	6,6	1,000	3	1,3	0,556	5	2,2	0,331
Marcadores IHQ n=1317/651/200	**TTF-1/Napsina A (+)**	1077	81,8	63	5,8	0,393	57	5,3	0,323	271	25,2	**<0,001**	41	3,8	0,953	287	26,6	0,412	75	7,0	0,075	26	2,4	0,07	18	1,7	**0,019**
	p40/p63 (+)	88	13,0	5	5,7	0,351	2	2,3	0,647	10	11,4	0,283	3	3,4	0,608	4	4,5	**<0,001**	5	5,7	0,617	0	0,0	0,461	3	3,4	0,598
	CD56/Cromogranina/ Sinaptofisina (+)	25	12,5	0	0,0	1,000	0	0,0	0,465	4	16,0	1,000	1	4,0	1,000	3	12,0	0,408	1	4,0	0,608	0	0,0	1,000	0	0,0	1,000
Estadiamento n=642	**Estadios I**	6	0,9	0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0		3	50,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0	
	Estadio II	4	0,6	0	0,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0		2	50,0		0	0,0		0	0,0		0	0,0	
						0,795			0,804			0,577			1,000			0,251			0,229			1,000			0,084
	Estadio III	19	3,0	0	0,0		0	0,0		4	21,1		0	0,0		4	21,1		3	15,8		0	0,0		2	10,5	
	Estadio IV	613	95,5	38	6,2		40	6,5		144	23,5		19	3,1		155	25,3		35	5,7		16	2,6		9	1,5	
Tamanho do tumor n=407	**T1**	192	47,2	10	5,2		14	7,3		46	24,0		6	3,1		54	28,1		11	5,7		3	1,6		2	1,0	
	T2	103	25,3	10	9,7		4	3,9		33	32,0		3	2,9		29	28,2		4	3,9		4	3,9		2	1,9	
						0,425			0,387			**0,049**			0,925			0,81			0,377			**0,042**			0,550
	T3	67	16,5	3	4,5		4	6,0		12	17,9		3	4,5		22	32,8		7	10,4		1	1,5		2	3,0	
	T4	45	11,1	3	6,7		5	11,1		6	13,3		1	2,2		11	24,4		3	6,7		0	0,0		0	0,0	
Gânglios linfáticos regionais n=259	**N0**	68	26,3	4	5,9		2	2,9		22	32,4		1	1,5		15	22,1		2	2,9		0	0,0		0	0,0	
	N1	22	8,5	2	9,1		3	13,6		4	18,2		0	0,0		6	27,3		1	4,5		1	4,5		1	4,5	
						0,808			0,167			**0,035**			**0,041**			0,148			0,266			0,190			0,040
	N2	118	45,6	5	4,2		12	10,2		20	16,9		2	1,7		32	27,1		7	5,9		6	5,1		2	1,7	
	N3	51	19,7	2	3,9		3	5,9		17	33,3		5	9,8		6	11,8		6	11,8		1	2,0		3	5,9	
Metástases n=507	**M0**	15	3,0	0	0,0		0	0,0		3	20,0	0,899	0	0,0		7	46,7		1	6,7		0	0,0		0	0,0	
	M1a	218	43,0	14	6,4		17	7,8		54	24,8		8	3,7		43	19,7		15	6,9		6	2,8		4	1,8	
						0,801			0,311						0,974			**0,037**			0,76			0,578			0,631
	M1b	180	35,5	11	6,1		7	3,9		41	22,8		7	3,9		51	28,3		10	5,6		3	1,7		3	1,7	
	M1c	94	18,5	7	7,4		7	7,4		25	26,6		4	4,3		21	22,3		4	4,3		4	4,3		0	0,0	
Grau de diferenciação (g) n=238	**g1**	22	9,2	1	4,5		1	4,5		8	36,4		2	9,1		5	22,7		2	9,1		0	0,0		0	0,0	
	g2	91	38,2	2	2,2		4	4,4		22	24,2		4	4,4		25	27,5		4	4,4		0	0,0		2	2,2	
						0,394			0,806			0,095			0,208			0,918			0,286			0,626			1,000
	g3	116	48,7	8	6,9		9	7,8		18	15,5		3	2,6		33	28,4		13	11,2		2	1,7		2	1,7	
	g4	9	3,8	0	0,0		0	0,0		1	11,1		1	11,1		3	33,3		0	0,0		0	0,0		0	0,0	

		Todas as amostras estudadas		*ALK* mutadas			*BRAF* mutadas			*EGFR* mutadas			*HER2* mutadas			*KRAS* mutadas			*MET* mutadas			*RET* mutadas			*ROS1* mutadas		
		n = 1987	%	n = 109	%	p α=0,05	n = 109	%	p α =0,05	n = 463	%	p α =0,05	n = 62	%	p α =0,05	n = 527	%	p α =0,05	n = 127	%	p α =0,05	n = 46	%	p α =0,05	n = 33	%	p α =0,05
Metastização à distância n=635	**Ausente**	15	2,4	0	0,0	0,616	0	0,0	0,616	3	20,0	1,000	0	0,0	1,000	7	46,7	0,070	1	6,7	0,598	0	0,0	1,000	0	0,0	1,000
	Presente	620	97,6	39	6,3		39	6,3		153	24,7		23	3,7		154	24,8		36	5,8		16	2,6		9	1,5	
Órgão metastizado n=432	**Fígado**	58	12,0	7	12,1	0,089	1	1,7	0,157	18	31,0	0,259	3	5,2	0,489	14	24,1	1,000	0	0,0	**0,037**	2	3,4	0,63	0	0,0	1,000
	Osso	99	20,5	3	3,0	0,118	3	3,0	0,118	30	30,3	0,192	4	4,0	1,000	21	21,2	0,596	4	4,0	0,479	4	4,0	0,248	1	1,0	1,000
	Pleura	186	38,6	12	6,5	1,000	0	0,0	0,092	48	25,8	0,746	6	3,2	0,634	38	20,4	0,226	13	7,0	0,426	3	1,6	0,542	2	1,1	1,000
	Pulmão	51	10,6	5	9,8	0,366	3	5,9	1,000	13	25,5	1	1	2,0	0,708	12	23,5	1,000	2	3,9	0,756	2	3,9	0,328	1	2,0	0,491
	SNC	94	19,5	8	8,5	0,487	5	5,3	0,567	20	21,3	0,366	2	2,1	0,552	24	25,5	0,685	4	4,3	0,626	3	3,2	0,7	1	1,1	0,860
	Suprarrenal	23	4,8	3	13,0	0,190	3	13,0	0,190	4	17,4	0,469	2	8,7	0,228	8	34,8	0,211	2	8,7	0,636	1	4,3	0,419	1	4,3	0,255
Produto analisado n=1628	**Tumor**	1226	75,3	68	5,5	0,610	58	4,7	**0,017**	271	22,1	0,218	40	3,3	0,434	343	28,0	**0,013**	76	6,2	0,483	24	2,0	0,838	20	1,6	0,659
	Metástase	402	24,7	19	4,7		32	8,0		101	25,1		17	4,2		87	21,6		29	7,2		7	1,7		8	2,0	
PD-L1 n=958	**Negativo**	393	41,0	14	3,6		21	5,3		89	22,6		21	5,3		97	24,7		16	4,1		7	1,8		4	1,0	
	Positivo (1-49%)	299	31,2	15	5,0	0,633	15	5,0	0,404	73	24,4	**0,002**	9	3,0	0,248	69	23,1	**0,005**	25	8,4	**0,014**	7	2,3	0,556	5	1,7	0,410
	Positivo (50-100%)	266	27,8	11	4,1		20	7,5		35	13,2		9	3,4		91	34,2		25	9,4		3	1,1		6	2,3	

Notas:

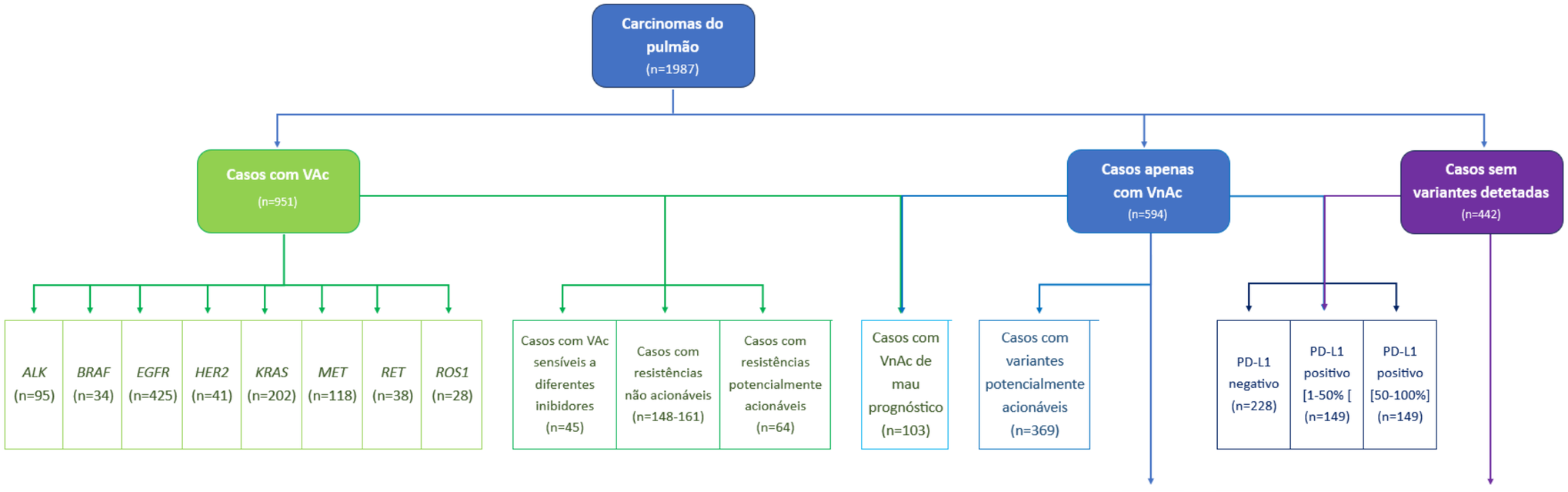
1. Os "n" associados a cada categoria são relativos ao total de casos informativos
2. As frequências relativas reportadas são referentes às amostras mutadas na categoria horizontal
3. Na categoria "Padrão de crescimento", a frequência associada diz respeito à quantidade de amostras em que o padrão identificado se encontra referenciado e não a denominação do ADC de acordo com WHO 2021.
4. O grau de diferenciação encontra-se segundo WHO 2015
5. A diferença no número de casos entre as categorias M1(a/b/c) e "Metastização à distância" presente deve-se apenas ao facto da informação disponível não permitir categorizar com segurança M de TNM.
6. Na categoria "Órgão metastizado" apenas se apresentam os órgãos/sistemas cuja frequência absoluta foi superior a 20
7. Os valores-p apresentados para a idade provêm do Teste t (amostras independentes – presença/ausência de variantes no gene supraidentificado); os resultados foram semelhantes aquando da aplicação do teste t para o valor de 67,9 (idade média da população estudada).
8. Para as variáveis categóricas os valores-p apresentados são relativos ao teste χ^2 ou ao Teste exato de Fisher (aquando de 20% ou mais das células com contagens esperadas inferiores a 5)
9. n.a. (não aplicável)

Anexo V Distribuição das amostras com e sem variantes acionáveis



Resistências dependentes do gene-alvo	▪ *ALK* p.(Gly1202Arg) (n=1) ▪ *ALK* p.(Gly1202Arg) + *ALK* p.(Gly1269Ala) (n=1)	-	▪ *EGFR* p.(Thr790Met) (n=20) ▪ *EGFR* inserções *in-frame* exão 20 (n=26) ▪ *EGFR* p.(Cys797Ser) (n=2) ▪ *EGFR* p.(Leu719Gly) (n=1) ▪ *EGFR* CNG (n=26)	-	▪ *KRAS* CNG (n=1)	▪ *MET* CNG (n=3)	-	-
Resistências independentes do gene-alvo	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *EGFR* (mutações, n=3) ▪ *FGFR4* (CNG, n=1) ▪ *MET* (*skipping*, n=1) ▪ *RET* (fusões, n=1) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de ALK: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=10)	Ativação de vias de sinalização alternativas *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=7) ▪ *AKT1* (n=2)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *FGFR1* (CNG, n=1), ▪ *FGFR2* (CNG, n=1), ▪ *FGFR3* (mutação, N=1), ▪ *HER2* (mutações e CNG, n=4), ▪ *MET* (*skipping*, n=4), ▪ *RET* (fusões, n=2), ▪ *ROS1* (fusões, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de *EGFR*: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=4) ▪ *NRAS* (mutações, n=1) Via *PI(3)K/mTOR* ▪ *PIK3CA* (n=27) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CCND1* (CNG, n=2), ▪ *CDK4* (n=3)	Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de *HER2*: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=2) Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=1)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* (mutação, n=1) ▪ *EGFR* (mutação, n=3) ▪ *FGFR1* (CNG, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de KRAS: ▪ *BRAF* (mutações, n=2)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* (fusões, n=1) ▪ *EGFR* (mutações, n=7) ▪ *HER2* (mutações, n=1) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de MET: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=13), ▪ *BRAF* (mutação, n=2) ▪ *MAP2K1* (mutação, n=1) Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=1)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* (fusões, n=1) ▪ *EGFR* (mutações, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de *RET*: Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *mTOR* (n=1)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *EGFR* (mutações, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de ROS1: Via RAS/MAPK: ▪ *KRAS* (mutações, n=1) Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ Mutações em *CTNNB1* (n=1)
Variantes concomitantes a VAc potencialmente conferidoras de resistência	▪ *ALK* p.(Asp1606Tyrfs*8) detetada num caso de progressão ▪ *ALK* p.(Arg1253Thr) afeta um resíduo do *loop* catalítico com o qual alectinib interage Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=2) ▪ *MYC* (CNG, n=1)	Ativação de vias de sinalização alternativas *PI(3)K/mTOR*: ▪ *MET* (n=1) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CCND1* (CNG, n=1)	▪ *EGFR* p.(Ala864Val) detetada num caso de progressão simultaneamente a CTNNB1; mutação rara associada a progressão Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* p.(Arg1214His) (n=1) Progressão; resíduo envolvido nas pontes de hidrogénio estabelecidas entre o estado ativo e inativo. Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=2) ▪ *MYC* (CNG, n=3) ▪ *IDH2* (mutações, n=2)	-	Ativação de vias de sinalização alternativas Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=8) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CCND1* (CNG, n=1) ▪ *CDK4* (CNG, n=1) Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=4) ▪ *MYC* (CNG, n=1)	Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=1) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CDK4* (CNG, n=2) ▪ *MYC* (CNG, n=1)	Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=1)	Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *IDH2* (mutações, n=1)

Figura 4 – Distribuição das variantes acionáveis (VAc), das potenciais resistências e da expressão de PD-L1 em função da histologia do tumor. (1) Classificação das variantes de acordo com a informação disponível em *OncoKB™* (a 01-07-2023); (2) A coluna "Casos com VAc sensíveis a diferentes inibidores" diz respeito às amostras em que foram detetadas mais do que uma VAc com sensibilidades díspares em termos de fármacos de alvo molecular; inclui variantes descritas como sendo de resistência desde que suscetíveis a algum inibidor molecular; o número de casos indicados não corresponde necessariamente à totalidade de amostras portadoras de mais do que uma VAc; são casos cuja abordagem terapêutica poderá ser mais complexa; (3) O intervalo de valores relativos aos casos com resistências não acionáveis advém da consideração, ou não, das evidências clínicas e/ou biológicas de resposta de uma dada variantes a um certo fármaco ainda não aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*); (4) Foram tidas como variantes/resistências potencialmente acionáveis aquelas que apresentaram registo, em *OncoKB™*, de evidências clínicas e/ou biológicas de suscetibilidade a algum fármaco não aprovado pela FDA nem recomendado por painéis de especialistas como NCCN®; (5) Como variantes de mau prognóstico foram consideradas as alterações descritas em mais do que uma publicação científica como estando associadas a um comportamento tumoral mais agressivo e/ou cuja evolução da doença é mais galopante. A título de exemplo, amplificação de MYC, CCND1, CDK4, CDK6 e as mutações de CTNNB1; (6) As variantes concomitantes de VAc tidas como potenciais causadoras de uma eventual resistência são aquelas cuja consequência na atividade da proteína codificada pelo respetivo gene mutado se traduz em sustento de algum dos pilares-chave da progressão tumoral e que, até à data, ainda não foram descritas de forma explicita como sendo um mecanismo de resistência observado para um certo inibidor molecular; (7) o número constante no interior das setas verdes corresponde ao número de amostras do respetivo tipo histológico em que foram identificadas variantes acionáveis. Abreviaturas: ADC (Adenocarcinoma); CCE (Carcinoma de Células Escamosas); CAE (Carcinoma Adenoescamoso); CPNPC (Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células, sem outra especificação); CS (Carcinoma Sarcomatóide); CPPC (Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células); CNGC (Carcinoma Neuroendócrino de Grandes Células); CNG [do inglês, *Copy Number Gain*]; RTK [do inglês, *Receptor tyrosine kinase*].
(imagem desdobrada a abaixo)



ADC (n=1697)	854	84	30	391	38	174	102	34	26	40	142-153	60	84	331	491	188	114	123	348
CCE (n=92)	20	2	1	8	-	2	6	-	1	2	1	-	9	10	30	21	24	14	42
CAE (n=14)	4	1	-	1	-	1	-	-	1	-	0-1	-	-	1	4	3	2	-	6
CPNPC (n=65)	16	1	-	2	1	7	2	1	-	2	2-3	2	4	21	30	6	7	7	19
CS (n=13)	7	1	1	1	1	1	2	-	-	-	1	1	-	3	4	1	1	2	2
CPPC (n=12)	2	-	-	1	0	1	-	-	-	1	2	1	1	2	3	3	-	1	7
CNGC (n=5)	2	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	2

	(ALK)	*(BRAF)*	*(EGFR)*	*(HER2)*	*(KRAS)*	*(MET)*	*(RET)*	*(ROS1)*
Resistências dependentes do gene-alvo	▪ *ALK* p.(Gly1202Arg) (n=1) ▪ *ALK* p.(Gly1202Arg) + *ALK* p.(Gly1269Ala) (n=1)	-	▪ *EGFR* p.(Thr790Met) (n=20) ▪ *EGFR* inserções *in-frame* exão 20 (n=26) ▪ *EGFR* p.(Cys797Ser) (n=2) ▪ *EGFR* p.(Leu719Gly) (n=1) ▪ *EGFR* CNG (n=26)	-	▪ *KRAS* CNG (n=1)	▪ *MET* CNG (n=3)	-	-
Resistências independentes do gene-alvo	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *EGFR* (mutações, n=3) ▪ *FGFR4* (CNG, n=1) ▪ *MET* (*skipping*, n=1) ▪ *RET* (fusões, n=1) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de ALK: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=10)	Ativação de vias de sinalização alternativas *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=7) ▪ *AKT1* (n=2)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *FGFR1* (CNG, n=1), ▪ *FGFR2* (CNG, n=1), ▪ *FGFR3* (mutação, N=1), ▪ *HER2* (mutações e CNG, n=4), ▪ *MET* (*skipping*, n=4), ▪ *RET* (fusões, n=2), ▪ *ROS1* (fusões, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de *EGFR*: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=4) ▪ *NRAS* (mutações, n=1) Via *PI(3)K/mTOR* ▪ *PIK3CA* (n=27) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CCND1* (CNG, n=2), ▪ *CDK4* (n=3)	Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de *HER2*: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=2) Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=1)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* (mutação, n=1) ▪ *EGFR* (mutação, n=3) ▪ *FGFR1* (CNG, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de KRAS: ▪ *BRAF* (mutações, n=2)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* (fusões, n=1) ▪ *EGFR* (mutações, n=7) ▪ *HER2* (mutações, n=1) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de MET: Via *RAS/MAPK*: ▪ *KRAS* (mutações, n=13), ▪ *BRAF* (mutação, n=2) ▪ *MAP2K1* (mutação, n=1) Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=1)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* (fusões, n=1) ▪ *EGFR* (mutações, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de *RET*: Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *mTOR* (n=1)	Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *EGFR* (mutações, n=2) Mutações de ganho-de-função em genes codificadores de proteínas intervenientes nas vias a jusante de ROS1: Via RAS/MAPK: ▪ *KRAS* (mutações, n=1) Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ Mutações em *CTNNB1* (n=1)
Variantes concomitantes a VAc potencialmente conferidoras de resistência	▪ *ALK* p.(Asp1606Tyrfs*8) detetada num caso de progressão ▪ *ALK* p.(Arg1253Thr) afeta um resíduo do *loop* catalítico com o qual alectinib interage Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: • *CTNNB1* (mutações, n=2) • *MYC* (CNG, n=1)	Ativação de vias de sinalização alternativas *PI(3)K/mTOR*: ▪ *MET* (n=1) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CCND1* (CNG, n=1)	▪ *EGFR* p.(Ala864Val) detetada num caso de progressão simultaneamente a CTNNB1; mutação rara associada a progressão Alterações de ganho-de-função em RTK: ▪ *ALK* p.(Arg1214His) (n=1) Progressão; resíduo envolvido nas pontes de hidrogénio estabelecidas entre o estado ativo e inativo. Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=2) ▪ *MYC* (CNG, n=3) ▪ *IDH2* (mutações, n=2)	-	Ativação de vias de sinalização alternativas Via *PI(3)K/mTOR*: ▪ *PIK3CA* (n=8) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CCND1* (CNG, n=1) ▪ *CDK4* (CNG, n=1) Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=4) ▪ *MYC* (CNG, n=1)	Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=1) Alterações promotoras de atividade aumentada de proteínas intervenientes no ciclo celular: ▪ *CDK4* (CNG, n=2) ▪ *MYC* (CNG, n=1)	Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *CTNNB1* (mutações, n=1)	Ativação de outras vias de sinalização que sustentem a progressão tumoral: ▪ *IDH2* (mutações, n=1)

Anexo VI Distribuição das variantes não acionáveis em função da concomitância a variantes acionáveis

Tabela 9 – Distribuição das variantes não acionáveis (VnAc) em função da presença/ausência de variantes acionáveis (VAc) na amostra

Gene	VnAc	Casos acionáveis		Casos não acionáveis		
	Frequência absoluta	Frequência absoluta	Percentagem nos casos acionáveis (n=951)	Frequência absoluta	Percentagem nos casos não acionáveis (n=1036)	Percentagem de casos não acionáveis no gene
AKT1	10	5	0,5%	5	0,5%	50,0%
ALK	18	10	1,1%	8	0,8%	44,4%
AR	1	1	0,1%	0	0,0%	0,0%
BRAF	76	4	0,4%	71	6,9%	94,7%
CCND1	12	5	0,5%	7	0,7%	58,3%
CDK4	11	7	0,7%	3	0,3%	30,0%
CDK6	2	0	0,0%	2	0,2%	100,0%
CTNNB1	47	28	2,9%	18	1,7%	39,1%
DDR2	2	1	0,1%	1	0,1%	50,0%
EGFR	94	53	5,6%	35	3,4%	39,8%
ERG	4	2	0,2%	1	0,1%	33,3%
ESR1	5	3	0,3%	2	0,2%	40,0%
FGFR1	13	3	0,3%	10	1,0%	76,9%
FGFR2	8	4	0,4%	4	0,4%	50,0%
FGFR3	20	4	0,4%	14	1,4%	77,8%
FGFR4	2	1	0,1%	1	0,1%	50,0%
GNA11	4	1	0,1%	3	0,3%	75,0%
GNAQ	5	2	0,2%	3	0,3%	60,0%
HER2	23	8	0,8%	15	1,4%	65,2%
HER3	9	4	0,4%	5	0,5%	55,6%
HER4	2	0	0,0%	2	0,2%	100,0%
HRAS	9	1	0,1%	8	0,8%	88,9%
IDH1	12	5	0,5%	7	0,7%	58,3%
IDH2	4	3	0,3%	1	0,1%	25,0%
JAK1	9	3	0,3%	6	0,6%	66,7%
JAK2	4	2	0,2%	2	0,2%	50,0%
JAK3	0	1	0,1%	2	0,2%	66,7%
KIT	15	8	0,8%	6	0,6%	42,9%
KRAS	340	23	2,4%	305	29,4%	93,0%
MAP2K1	18	5	0,5%	13	1,3%	72,2%
MET	10	1	0,1%	9	0,9%	90,0%
mTOR	9	3	0,3%	6	0,6%	66,7%

Gene	VnAc	Casos acionáveis		Casos não acionáveis		
	Frequência absoluta	Frequência absoluta	Percentagem nos casos acionáveis (n=951)	Frequência absoluta	Percentagem nos casos não acionáveis (n=1036)	Percentagem de casos não acionáveis no gene
MYC	30	7	0,7%	23	2,2%	76,7%
MYCN	2	0	0,0%	2	0,2%	100,0%
NRAS	20	1	0,1%	19	1,8%	95,0%
PDGFRA	13	5	0,5%	8	0,8%	61,5%
PIK3CA	105	49	5,2%	54	5,2%	52,4%
RAF1	9	0	0,0%	9	0,9%	100,0%
RET	8	2	0,2%	6	0,6%	75,0%
ROS1	6	3	0,3%	2	0,2%	40,0%
SMO	36	15	1,6%	21	2,0%	58,3%
Total	**1028**	**239**	25,1%	**594**	57,3%	-

Anexo VII Distribuição das amostras de acordo com o gene alterado e a histologia do tumor

Tabela 10 – Repartição das amostras com variantes identificadas nos genes listados em função da classificação histológica do tumor

Gene	Adenocarcinoma		Carcinoma adenoescamoso		Carcinoma de células escamosas		CPNPC, SOE*		Carcinoma sarcomatóide		Tumor tipo glândula salivar		Subtotal (CPNPC*)		Carcinomas neuroendócrino		Valor-p (χ^2)	Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
AKT1	9	0,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	0,5	0	0,0	1,000	9
ALK	98	5,8	1	7,1	2	2,2	2	3,1	1	7,7	0	0,0	104	5,5	0	0,0	0,537	104
AR	1	0,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1	0	0,0	1,000	1
BRAF	98	5,8	0	0,0	3	3,3	2	3,1	1	7,7	0	0,0	104	5,5	0	0,0	0,767	104
CCND1	8	0,5	0	0,0	4	4,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	12	0,6	0	0,0	0,030	12
CDK4	10	0,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	10	0,5	0	0,0	1,000	10
CDK6	2	0,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,1	0	0,0	1,000	2
CTNNB1	42	2,5	0	0,0	0	0,0	2	3,1	0	0,0	0	0,0	44	2,3	1	5,9	0,442	45
DDR2	2	0,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,1	0	0,0	1,000	2
EGFR	424	25,0	2	14,3	12	13,0	2	3,1	1	7,7	0	0,0	441	23,4	2	11,8	<0,001	443
ERG	3	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,2	0	0,0	1,000	3
ESR1	5	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	0,3	0	0,0	1,000	5
FGFR1	8	0,5	0	0,0	2	2,2	2	3,1	1	7,7	0	0,0	13	0,7	0	0,0	0,014	13
FGFR2	7	0,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	7	0,4	0	0,0	1,000	7
FGFR3	16	0,9	0	0,0	2	2,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	18	1,0	0	0,0	0,569	18
FGFR4	2	0,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,1	0	0,0	1,000	2
GNA11	4	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	0,2	0	0,0	1,000	4
GNAQ	5	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	0,3	0	0,0	1,000	5

Gene	Adenocarcinoma		Carcinoma adenoescamoso		Carcinoma de células escamosas		CPNPC, SOE*		Carcinoma sarcomatóide		Tumor tipo glândula salivar		Subtotal (CPNPC*)		Carcinomas neuroendócrino		Valor-p (χ^2)	Total
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**		
HER2	58	3,4	0	0,0	1	1,1	1	1,5	1	7,7	0	0,0	61	3,2	1	5,9	0,479	62
HER3	9	0,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	0,5	0	0,0	1,000	9
HER4	2	0,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,1	0	0,0	1,000	2
HRAS	6	0,4	2	14,3	1	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	0,5	0	0,0	0,008	9
IDH1	12	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	12	0,6	0	0,0	1,000	12
IDH2	4	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	0,2	0	0,0	1,000	4
JAK1	8	0,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	9	0,5	0	0,0	0,035	9
JAK2	4	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	0,2	0	0,0	1,000	4
JAK3	3	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,2	0	0,0	1,000	3
KIT	12	0,7	1	7,1	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	14	0,7	0	0,0	0,183	14
KRAS	459	27,0	2	14,3	4	4,3	25	38,5	5	38,5	0	0,0	495	26,3	3	17,6	<0,001	498
MAP2K1	16	0,9	0	0,0	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	17	0,9	0	0,0	0,720	17
MET	110	6,5	0	0,0	7	7,6	2	3,1	2	15,4	0	0,0	121	6,4	0	0,0	0,617	121
mTOR	6	0,4	0	0,0	1	1,1	1	1,5	0	0,0	0	0,0	8	0,4	0	0,0	0,295	8
MYC	21	1,2	0	0,0	4	4,3	2	3,1	0	0,0	0	0,0	27	1,4	1	5,9	0,075	28
MYCN	1	0,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1	0	0,0	1,000	1
NRAS	16	0,9	0	0,0	0	0,0	2	3,1	0	0,0	0	0,0	19	1,0	0	0,0	0,537	19
PDGFRA	13	0,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	0,7	0	0,0	1,000	13
PIK3CA	83	4,9	0	0,0	7	7,6	2	3,1	1	7,7	0	0,0	93	4,9	3	17,6	0,219	96
RAF1	9	0,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	0,5	0	0,0	1,000	9

Gene	Adenocarcinoma		Carcinoma adenoescamoso		Carcinoma de células escamosas		CPNPC, SOE*		Carcinoma sarcomatóide		Tumor tipo glândula salivar		Subtotal (CPNPC*)		Carcinomas neuroendócrino		Valor-p (χ^2)	Total
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**		
RET	41	2,4	0	0,0	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	42	2,2	0	0,0	0,788	42
ROS1	31	1,8	1	7,1	1	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	33	1,8	0	0,0	0,542	33
SMO	26	1,5	0	0,0	3	3,3	3	4,6	0	0,0	0	0,0	32	1,7	1	5,9	0,147	33
Total	1697	100,0	14	100,0	92	100,0	65	100,0	13	100,0	1	100,0	1882	100,0	17	100,0		1900

** CPNPC- Carcinomas Pulmonares de Não Pequenas Células; CPNPC, SOE – Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células, Sem Outra Especificação*

FACULDADE DE **MEDICINA**