

***Guia Atualizado de Testes Moleculares Para a Seleção de Pacientes Com Câncer de Pulmão Para Tratamento com Inibidores Alvo de Tirosina-Quinase**

Diretrizes do Colégio Americano de Patologistas, da Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão e da Associação de Patologia Molecular

Neal I. Lindeman, MD; Philip T. Cagle, MD; Dara L. Aisner, MD, PhD; Maria E. Arcila, MD; Mary Beth Beasley, MD; Eric H. Bernicker, MD; Carol Colasacco, MLIS, SCT(ASCP); Sanja Dacic, MD, PhD; Fred R. Hirsch, MD, PhD; Keith Kerr, MB, ChB; David J. Kwiatkowski, MD, PhD; Marc Ladanyi, MD; Jan A. Nowak, MD, PhD; Lynette Sholl, MD; Robyn Temple-Smolkin, PhD; Benjamin Solomon, MBBS, PhD; Lesley H. Souter, PhD; Erik Thunnissen, MD, PhD; Ming S. Tsao, MD; Christina B. Ventura, MPH, MT(ASCP); Murry W. Wynes, PhD; Yasushi Yatabe, MD, PhD

Citação do Artigo:

Neal I. Lindeman, Philip T. Cagle, Dara L. Aisner, Maria E. Arcila, Mary Beth Beasley, Eric H. Bernicker, Carol Colasacco, Sanja Dacic, Fred R. Hirsch, Keith Kerr, David J. Kwiatkowski, Marc Ladanyi, Jan A. Nowak, Lynette Sholl, Robyn Temple-Smolkin, Benjamin Solomon, Lesley H. Souter, Erik Thunnissen, Ming S. Tsao, Christina B. Ventura, Murry W. Wynes, and Yasushi Yatabe (2018). Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology.

J Thorac Oncol. 2018 Mar;13(3):323-358. doi: 10.1016/j.jtho.2017.12.001

***Tradução para Língua Portuguesa (Brasil) por Marileila Varella-Garcia, PhD e Fabio Tavora, MD**

Aceito em 29 de novembro de 2017; Publicado em 22 de janeiro de 2018.

Dados suplementares e Figuras

Para acessar as figuras e o material suplementar que acompanha este artigo, visite a versão online do *Journal of Thoracic Oncology* em www.jto.org e em <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.12.001>

Dos Departamentos de Patologia (Drs Lindeman and Sholl) e Medicina (Dr Kwiatkowski), Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts; do Cancer Center (Dr Bernicker) e do Departamento de Patologia e Medicina Genômica, Houston Methodist Hospital, Houston, Texas (Dr Cagle); do Departamento de Patologia, University of Colorado School of Medicine, Denver (Dr Aisner); do Laboratório de Patologia Molecular e Diagnóstica (Dr Arcila) e do Serviço de Diagnóstico Molecular (Dr Ladanyi), Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, New York; do Departamento de Patologia e Medicina Pulmonar, Cuidados Críticos e Medicina do Sono, New York, New York (Dr Beasley); do Centro de Patologia e Qualidade Laboratorial, Colégio Americano de Patologistas, Northfield, Illinois (Mss Colasacco and Ventura); do Departamento de Patologia, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania (Dr Dacic); do Departamento de Medicina e Patologia, University of Colorado, Denver (Dr Hirsch); do Departamento de Patologia, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland (Dr Kerr); do Departamento de Patologia Molecular, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York (Dr Nowak); da Divisão de Assuntos Clínicos e Científicos, Association for Molecular Pathology, Bethesda, Maryland (Dr Temple-Smolkin); do Laboratório de Terapêutica e Biomarcadores Moleculares, Peter MacCallum Cancer Center, Melbourne, Australia (Dr Solomon); do Departamento de Patologia, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands (Dr

Thunnissen); do Departamento de Medicina Laboratorial e Patobiologia, Princess Margaret Cancer Center, Toronto, Ontario, Canada (Dr Tsao); dos Assuntos Científicos, Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão, Aurora, Colorado (Dr Wynes); e do Departamento de Patologia e Diagnóstico Molecular, Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan (Dr Yatabe). Dr Souter está em prática privada em Wellanport, Ontario, Canada.

Este guia foi desenvolvido através de colaboração entre o Colégio Americano de Patologistas, a Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão e a Associação de Patologia Molecular e foi publicado conjuntamente por convite e consentimento nas revistas *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *Journal of Thoracic Oncology* e *Journal of Molecular Diagnostics*. Copyright 2018 Colégio Americano de Patologistas, Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão, Associação para Patologia Molecular e Sociedade Americana para Patologia Investigativa.

As divulgações de potenciais conflitos de interesses dos autores e as suas contribuições encontram-se no Apêndice ao final deste artigo. As declarações de conflito de interesse dos autores estão disponíveis na versão em inglês do manuscrito..

Cópias: Neal I. Lindeman, MD, Hospital Brigham and Women, Departamento de Patologia, 75 Francis St, Shapiro 5, Sala 020, Boston, MA 02115 (e-mail: nlindeman@partners.org).

Contexto. - Em 2013, uma diretriz baseada em evidências foi publicada pelo Colégio Americano de Patologistas, pela Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão e pela Associação de Patologia Molecular para estabelecer padrões para a análise molecular do câncer de pulmão com objetivo de orientar as decisões de tratamento com drogas-alvo. Novas evidências levaram à avaliação de novos genes-alvo, tecnologias laboratoriais, populações de pacientes e tipos de tumores para testes.

Objetivo. - Revisar e atualizar sistematicamente a diretriz de 2013 para confirmar sua validade; avaliar as evidências de novas descobertas genéticas, tecnologias e terapias; e emitir uma atualização baseada em evidências.

Design. - O Colégio Americano de Patologistas, a Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão e a Associação de Patologia Molecular reuniram um painel de especialistas para desenvolver uma diretriz baseada em evidências para ajudar a definir as principais questões e termos de pesquisa bibliográfica, rever resumos e artigos completos, e elaborar recomendações.

Resultados. - Dezoito novas recomendações foram elaboradas. O painel também atualizou 3 recomendações da diretriz de 2013.

Conclusões. - A diretriz de 2013 foi amplamente reafirmada com recomendações atualizadas para permitir o teste de amostras de citologia, exigir melhor sensibilidade dos testes e recomendar contra o uso de imuno-histoquímica para testes de *EGFR*. Novas recomendações importantes incluem o teste de *ROS1* para todos os pacientes com adenocarcinoma; a inclusão de genes adicionais (*ERBB2*, *MET*, *BRAF*, *KRAS* e *RET*) para laboratórios que executam painéis de sequenciamento de última geração; imuno-histoquímica como alternativa à hibridização *in situ* por fluorescência para o teste de *ALK* e/ou *ROS1*; uso de ensaios com 5% de sensibilidade para mutações T790M no *EGFR* em pacientes com resistência secundária a inibidores de *EGFR*; e uso de DNA circulante livre de células para “aceitar” mutações direcionáveis quando o tecido for limitado ou difícil de obter.

Pacientes com câncer de pulmão avançado tem prognóstico ruim, com sobrevida média de um ano. No entanto, para muitos pacientes cujos tumores apresentam certas alterações moleculares específicas (por exemplo, alterações ativadoras nos genes *EGFR*, *ALK* e *ROS1*), particularmente no adenocarcinoma de pulmão, a terapia alvo inibidora de tirosina quinase (TKI) proporciona melhora significativa na

sobrevida e na qualidade de vida. Conseqüentemente, pacientes com os tipos de câncer de pulmão avançado nos quais essas alterações moleculares normalmente ocorrem devem receber o teste molecular necessário para identificá-las e, assim, receber tratamentos direcionados apropriados. É importante ressaltar que esses testes devem se estender além das alterações moleculares para as quais terapias-alvo são aprovadas por agências reguladoras como a “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA, para incluir alterações moleculares para as quais existem evidências convincentes em ensaios clínicos publicados de terapias-alvo investigacionais eficazes (e, mais recentemente, imunoterapias).

Em 2010, três sociedades profissionais - o Colégio Americano de Patologistas (CAP), a Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão (IASLC) e a Associação de Patologia Molecular (AMP) - recrutaram especialistas em biologia e no diagnóstico e no tratamento de câncer de pulmão para formar um grupo de trabalho conjunto visando avaliar sistematicamente as evidências que sustentam a utilidade clínica da análise molecular de amostras de câncer de pulmão. Em 2013, esse grupo de trabalho publicou uma diretriz baseada em evidências¹⁻³ para a prática clínica padronizada com que pacientes e amostras de câncer de pulmão deveriam ser testados, quais genes deveriam ser testados, e como esses testes deveriam ser programados, validados e executados. Essa diretriz foi subsequentemente endossada pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica,⁴ e foi citada em diretrizes desenvolvidas por numerosas sociedades profissionais em todo o mundo.⁵⁻²⁶ Entretanto, o campo continuou avançando rapidamente, com o surgimento de novas descobertas genéticas, novas terapias e novas tecnologias, de modo que essas três organizações convocaram um segundo grupo de trabalho para avaliar sistematicamente novas evidências, e com base nelas, publicar uma revisão da diretriz sobre a prática da patologia molecular em câncer de pulmão.

A revisão concentra-se em novas recomendações em cinco áreas específicas de conteúdo: (1) Quais novos genes devem ser rotineiramente testados para alterações em câncer de pulmão? (2) Quais métodos são apropriados para os testes de câncer de pulmão, com ênfase especial ao uso de imunohistoquímica (IHQ) e sequenciamento de última geração (NGS)? (3) Existe a necessidade de testar pacientes com câncer de pulmão de células escamosas, de pequenas células, ou outros cânceres de pulmão que não sejam adenocarcinoma? (4) Quais testes devem ser realizados em pacientes com uma alteração acionável que tenham progredido após uma resposta inicial à terapia-alvo adequada? (5) Qual é o papel do teste de DNA circulante livre de células (cfDNA) no tratamento de pacientes com câncer de pulmão? Além disso, novas evidências apoiando a diretriz original de 2013 foram revisadas e usadas para modificar ou alterar completamente a magnitude dessas recomendações. Finalmente, durante o processo de revisão surgiu uma sexta questão referente ao suporte diagnóstico para o papel das terapias imunomoduladoras (por exemplo, a relacionada a molécula ligante de morte programada-1 ou PD-L1). Embora este tópico não tenha sido submetido à revisão sistemática de evidências, o painel de especialistas decidiu emitir uma declaração de opinião abordando essa questão, ciente de que outros esforços estão atualmente em andamento para desenvolver recomendações baseadas em evidências sobre o uso de biomarcadores para selecionar pacientes para terapias imunomoduladoras.

Um desafio específico para essa revisão da diretriz baseada em evidências foi o rápido ritmo das descobertas nesta área. Durante o período entre a revisão da literatura e a redação da diretriz, novas descobertas significativas foram publicadas e o tratamento avançou para cânceres de pulmão mutantes para o gene *BRAF* e para o uso de imunoterapias. Esperamos que numerosos avanços adicionais surjam em um curto prazo nos campos da terapia-alvo, dos diagnósticos baseados em cfDNA e das imunoterapias. Embora tenhamos feito fortes recomendações para os biomarcadores moleculares para os quais havia boa evidência na época em que conduzimos nossa análise, também reconhecemos plenamente a importância dos biomarcadores emergentes que permitem que pacientes com câncer de pulmão sejam elegíveis para estudos clínicos de terapias investigativas. Assim, estratificamos os biomarcadores nesta diretriz em três categorias, ao invés de duas. Na primeira categoria estão os biomarcadores “obrigatórios”, que devem ser

a norma de teste para todos os pacientes com câncer de pulmão avançado que tenham um componente de adenocarcinoma e que estão sendo considerados para uma terapia-alvo já aprovada. Na segunda categoria estão os biomarcadores que “devem ser testados”, usados para direcionar pacientes para estudos clínicos e que devem ser incluídos em painéis de sequenciamento abrangente propostos para pacientes com câncer de pulmão, mas que não são requeridos para laboratórios que realizam apenas ensaios para genes individuais. Todos os biomarcadores candidatos restantes são investigacionais e não são apropriados para uso clínico neste momento.

COMPOSIÇÃO DO PAINEL

O CAP, a IASLC e a AMP convocaram um painel de especialistas constituído por patologistas e oncologistas em prática ativa, com conhecimento e experiência em carcinoma de pulmão. O CAP, o IASLC e a AMP aprovaram a nomeação dos coordenadores associados do projeto e dos membros do painel de especialistas. Além disso, um especialista em revisão sistemática e desenvolvimento de diretrizes assessorou o painel durante todo o projeto.

POLÍTICA DE CONFLITO DE INTERESSES

Antes da aceitação para o painel de especialistas, os candidatos a membro completaram um processo de divulgação conjunta de conflito de interesses, cuja política e forma exigiram a divulgação de interesse financeiro material ou benefício potencial de valor significativo decorrente do desenvolvimento da diretriz ou das suas recomendações. Os candidatos a membro preencheram o formulário de divulgação de conflito de interesses, listando qualquer relacionamento que pudesse ser interpretado como constituindo um conflito real, potencial ou aparente. Os conflitos em potencial foram gerenciados pelos coordenadores associados. Todos os membros do painel de especialistas e consultores foram solicitados a divulgar os conflitos antes do início e continuamente ao longo do cronograma do projeto. Os conflitos divulgados pelos membros do painel de especialistas estão listados no Apêndice. O CAP, a IASLC e a AMP forneceram o financiamento para a administração do projeto; nenhum financiamento de indústria foi usado no desenvolvimento da diretriz. Todos os membros do painel voluntariaram seu tempo e não foram compensados por seu envolvimento. Consulte o conteúdo digital suplementar (SDC) em www.archivesofpathology.org no índice de março de 2018 para detalhes completos sobre a política de conflito de interesses.

OBJETIVO

O painel de especialistas foi encarregado da revisão e atualização da diretriz da CAP-IASLC-AMP para os testes moleculares para seleção de pacientes com câncer de pulmão aos inibidores da tirosina quinase do *EGFR* e do *ALK*. O painel revisou todos os novos estudos que poderiam mudar ou refutar as declarações da diretriz de 2013. Além disso, o painel também abordou questões-chave adicionais:

1. Quais novos genes devem ser testados para pacientes com câncer de pulmão?
2. Quais métodos devem ser usados para realizar testes moleculares?
3. Os testes moleculares são apropriados para câncer de pulmão que não possui um componente histológico de adenocarcinoma?
4. Quais testes são indicados para pacientes com mutações-alvo que recaíram em terapia-alvo?

5. Qual é a importância do teste em DNA circulante livre de células para pacientes com câncer de pulmão?

As questões-chave 1 a 3 referem-se a pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de células não-pequenas do tipo não-escamoso (NSCLC) em todos os estágios. As questões-chave são incluídas detalhadamente no SDC.

MÉTODOS

Um relatório detalhado dos métodos usados para criar essa diretriz pode ser encontrado na SDC, incluindo as perguntas de escopo adicionais.

Revisão e Análise Sistemática da Literatura

Uma revisão sistemática da literatura foi concluída com duas pesquisas abrangentes. A primeira pesquisa foi projetada para avaliar as declarações da diretriz de 2013 e foi baseada na estratégia da pesquisa original. Incluiu cabeçalhos de assuntos médicos e palavras-chave para abordar os conceitos de *câncer de pulmão*, *biomarcadores tumorais* e *testes laboratoriais*, e foi realizado no Ovid MEDLINE (Ovid Technologies, Inc, Nova York, Nova York) em 17 de maio de 2015 para localizar estudos publicados em inglês com datas de publicação entre 1º de janeiro de 2012 e 17 de maio de 2015. Foram aplicados filtros de publicação para identificar diretrizes, revisões sistemáticas, metanálises (MAs) e ensaios clínicos randomizados. A pesquisa foi repetida em 27 de junho de 2016 para identificar nova literatura relevante publicada a partir de 17 de maio de 2015.

A segunda pesquisa foi baseada em novas questões-chave que se concentraram em biomarcadores extras que não foram incluídos na diretriz de 2013, com estratégias de busca específicas programadas para cada questão-chave. Todas as pesquisas foram realizadas em Ovid MEDLINE e PubMed (Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA, Bethesda, Maryland) (28 de junho de 2015) e foram limitadas a estudos em língua inglesa. Pesquisas suplementares foram realizadas no Scopus (Amsterdã, Holanda) (25 de junho de 2015) para identificar publicações relevantes que não estavam indexadas no MEDLINE. Uma pesquisa sobre estudos clínicos relevantes foi realizada no site *clinicaltrials.gov*, e pesquisas focalizadas foram realizadas em sites de repositórios de diretrizes (por exemplo, *guideline.gov*, *g-i-n.net*) e websites de organizações para identificar publicações relevantes. Maiores detalhes sobre a busca sistemática da literatura, incluindo as seqüências de busca em Ovid, podem ser encontrados na SDC.

Planos dos Estudos Elegíveis

Os estudos clínicos considerados não se limitaram a ensaios clínicos randomizados, mas também incluíram outros tipos de estudos de coorte, séries de casos, estudos de avaliação e estudos comparativos. Foram excluídos a priori cartas, comentários, editoriais, revisões narrativas, relatos de casos, estudos em modelos animais, estudos in vitro, documentos de consenso, resumos e artigos publicados em língua diferente do inglês.

Critérios de Inclusão

As publicações foram selecionadas para inclusão na revisão sistemática de evidências se fossem artigos de texto completo revisados por pares e que atendessem os seguintes critérios:

1. A população do estudo consistiu de pacientes com adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas e não-escamosas, carcinoma pulmonar de pequenas células ou câncer de pulmão de células escamosas em qualquer estágio.

2. O estudo avaliou, prospectiva ou retrospectivamente, sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo ou valor preditivo positivo dos testes em *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *BRAF* ou *ERBB2 (HER2)* para detecção de mutação específica, rearranjo, translocação, amplificação, superexpressão, ou resposta a uma terapia específica para o gene alvo.
3. O estudo examinou potenciais algoritmos para os testes moleculares em NSCLC.
4. O estudo examinou a correlação do status de *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *BRAF* ou *ERBB2 (HER2)* em tumores primários ou metastáticos dos mesmos pacientes.
5. O estudo incluiu resultados primários como precisão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de testes e a concordância entre plataformas para determinar o estado dos genes *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *BRAF* ou *ERBB2 (HER2)* ou resposta ao tratamento, isoladamente ou em combinação.

Avaliação de Qualidade

Uma avaliação da qualidade das evidências foi realizada em todos os estudos mantidos após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Usando este método, estudos considerados de baixa qualidade não foram excluídos da revisão sistemática, mas foram mantidos e suas forças e fraquezas metodológicas discutidas, quando relevantes. Cada declaração da diretriz inclui a classificação da magnitude da evidência, conforme descrito na Tabela 1 (também na Tabela 1 do SDC). O processo usado para avaliar a qualidade da base de evidências é detalhado na SDC.

Tabela 1. Graus de Magnitude da Evidência		
Designação	Descrição	Qualidade da Evidência
Convincente	Alto nível de confiança de que a evidência disponível reflita um efeito verdadeiro. É improvável que pesquisas futuras alterem a confiança na estimativa do efeito.	Qualidade de evidência é alta/intermediária.
Adequada	Confiança moderada de que a evidência disponível reflita um efeito verdadeiro. Pesquisas adicionais provavelmente terão um impacto importante na confiança da estimativa do efeito e podem alterar a estimativa.	Qualidade de evidência é intermediária/baixa.
Inadequada	Pouca confiança de que a evidência disponível reflita um efeito verdadeiro. É muito provável que pesquisas adicionais tenham um impacto importante na confiança na estimativa do efeito e é provável que alterem a estimativa.	A evidência é baixa/insuficiente e o painel de especialistas usa o processo formal de consenso para formar a recomendação.
Insuficiente	A evidência é insuficiente para discernir o efeito final. Qualquer estimativa de efeito é muito incerta.	A evidência é insuficiente e o painel de especialistas usa o processo formal de consenso para formar a recomendação.

^aAdaptado de *J Clin Epidemiol*. 2011; 64 (4): 401-406, Balshem H et al. GRADE guidelines. 3. Rating the quality of evidence, copyright 2011, com permissão da Elsevier²⁶²

Avaliando a Força das Recomendações

Para articular recomendações que fossem claramente escritas e fáceis de implementar, o painel de especialistas usou a metodologia GLIDES (Guidelines into Decision Support) e o software BridgeWiz (Yale University, New Haven, Connecticut).²⁷ Essa metodologia prioriza o uso da linguagem ativa. Contudo, em algumas situações, o responsável por assegurar que a orientação seja implementada depende da organização da clínica e/ou do laboratório. Para garantir clareza da orientação nessas situações, o painel de especialistas usou a linguagem de voz passiva para enfatizar a ação recomendada. O desenvolvimento das recomendações exigiu que o painel revisasse as evidências identificadas e fizesse uma série de julgamentos-chave (usando os procedimentos descritos na SDC). Essa diretriz usa um sistema de três níveis para classificar a força das recomendações, bem como uma categoria de “sem recomendação” quando não há evidências suficientes para apoiar uma recomendação. A Tabela 2 (e também a Tabela 2 do SDC) resume a força da evidência e os possíveis prejuízos e benefícios, assim como a linguagem obrigatória que foi usada para cada um dos tipos de recomendação.

Tabela 2. Magnitude das Recomendações		
Designação	Recomendação	Fundamentação
Recomendação forte	Recomenda a favor ou contra a prática de um teste molecular específico em câncer de pulmão (pode incluir <i>deve</i> ou <i>deveria</i>)	Apoiada por uma qualidade de evidência convincente (alta) ou adequada (intermediária) e benefícios claros que superem quaisquer danos.
Recomendação	Recomenda a favor ou contra a prática de um teste molecular específico em câncer de pulmão (pode incluir <i>deveria</i> ou <i>poderia</i>).	Há algumas limitações na qualidade da evidência (adequada [intermediária] ou inadequada [baixa]), e no equilíbrio de benefícios e danos, valores, ou custos, mas o painel conclui que há evidência suficiente para formar uma recomendação.
Opinião consensual dos especialistas	Recomenda a favor ou contra a prática de um teste molecular específico em câncer de pulmão (pode incluir <i>deveria</i> ou <i>poderia</i>).	Há limitações sérias na qualidade da evidência (inadequada [baixa, muito baixa] ou insuficiente), e no equilíbrio de benefícios e danos, valores, ou custos, mas o consenso do painel é de que uma manifestação é necessária.
Sem recomendação	Sem recomendação a favor ou contra a prática de um teste molecular específico em câncer de pulmão.	Há insuficiente evidência, confiança ou concordância para fornecer uma recomendação.

*Dados derivados de Andrews et al.²⁶³

Revisão da Diretriz

Essa diretriz será revisada a cada 4 anos, ou antes disso, no caso de publicação de evidências substanciais e de alta qualidade que possam alterar as declarações originais da diretriz. Se necessário, o painel se reunirá para discutir possíveis mudanças e, se indicado, recomendará a revisão da diretriz para o CAP, a IASLC e a AMP.

Aviso Legal

As diretrizes de prática e as declarações de consenso refletem a melhor evidência disponível e o consenso dos especialistas apoiado na prática. Destinam-se a auxiliar médicos e pacientes na tomada de decisões clínicas e a identificar questões e cenários para futuras pesquisas. Com o rápido fluxo de informações científicas, novas evidências podem surgir entre o momento em que uma diretriz prática ou uma declaração de consenso é desenvolvida e quando esta é publicada ou lida. Diretrizes e declarações não são atualizadas continuamente e podem não refletir as evidências mais recentes. Diretrizes e declarações abordam apenas os tópicos especificamente identificados e não são aplicáveis a diferentes intervenções, doenças ou estágios de doenças. Além disso, as declarações da diretriz e dos consensos não podem considerar a variação individual entre os pacientes e não podem ser considerados como inclusivos de todos os métodos de cuidado adequados ou exclusivos de outros tratamentos. O médico ou outro profissional de saúde que esteja tratando um paciente é responsável por determinar o melhor curso de tratamento para o paciente, com base na sua experiência e conhecimento independentes. Conseqüentemente, a adesão a qualquer diretriz prática ou declaração de consenso é voluntária, com a determinação final quanto à sua aplicação a ser feita pelo médico à luz das circunstâncias e preferências individuais de cada paciente. O CAP, a IASLC e a AMP não oferecem garantias, expressas ou implícitas, em relação a diretrizes e declarações e excluem especificamente quaisquer garantias de comercialização e adequação a um uso ou propósito específico. O CAP, a IASLC e a AMP não assumem qualquer responsabilidade por dano a pessoas ou a bens decorrentes ou relacionados ao uso desta declaração ou por quaisquer erros ou omissões.

RESULTADOS

Para a reafirmação das recomendações da diretriz de 2013, um total de 610 estudos atendeu aos requisitos do termo de pesquisa. Após uma revisão dos 610 resumos, os textos completos de 77 estudos que atenderam aos critérios de inclusão e provavelmente refutariam ou alterariam as recomendações de 2013 foram revisados. Um total de 21 artigos foi incluído para extração de dados. Os artigos excluídos estão disponibilizados como referências para discussão ou base de conhecimento.

Para as novas questões-chave, 1654 artigos atenderam aos requisitos dos termos de pesquisa. Com base na revisão dos seus resumos, 488 artigos preencheram os critérios de inclusão e foram encaminhados para a revisão completa do texto. Os artigos que abordaram algumas das novas questões-chave foram transferidos para uma segunda fase de revisão completa de texto. Um total de 118 artigos foram incluídos para extração de dados. Os artigos excluídos estão disponibilizados como referências para discussão ou base de conhecimento.

O painel reuniu-se 5 vezes (3 vezes por teleconferência e 2 vezes em reuniões presenciais) para delimitar o plano de aplicação, elaborar as recomendações, revisar e responder ao feedback solicitado e avaliar a qualidade das evidências que apoiam as recomendações finais. Uma técnica de grupo nominal foi usada pelo painel para a tomada de decisão consensual para incentivar contribuições individuais com participação equilibrada entre os membros do grupo. Um período foi aberto para comentários públicos entre 28 de junho e 2 de agosto de 2016, durante o qual as declarações da diretriz de 2013 e a versão preliminar das novas recomendações e declarações foram postadas para comentários. O período para comentários públicos foi anunciado no site da AMP em www.amp.org. Todas as recomendações da diretriz de 2013 receberam forte concordância (95% –99%) dos participantes que contribuíram com comentários. Das declarações preliminares, 20 receberam forte suporte dos participantes, entre 86% a 97% (consulte Resultados na SDC para detalhes completos). Os membros do painel de especialistas foram designados para revisar os comentários públicos em pequenos grupos. O painel modificou as declarações preliminares e recomendou a exclusão de uma opinião consensual dos especialistas e uma declaração de sem recomendação baseada no feedback durante o processo de avaliação. As recomendações finais foram

aprovadas pelo painel de especialistas por votação. O painel considerou benefícios e danos, recursos necessários, e viabilidade e aceitabilidade ao longo de todo o processo, embora nenhuma análise de custo ou custo-efetividade tenha sido realizada. Uma descrição dos benefícios e danos da implementação das declarações da diretriz está incluída no SDC (Tabela 3 do SDC).

Cada uma das organizações instituiu um processo de revisão para aprovar a diretriz. Para o CAP, um painel revisor independente representando o Conselho de Assuntos Científicos foi montado para rever e aprovar a diretriz. Esse painel independente não foi identificado ao painel de especialistas e passou pelo processo de conflito de interesses. O processo de aprovação no IASLC exigiu revisão e aprovação pelo Conselho de Diretores da IASLC. O processo de aprovação da AMP exigiu a revisão do conteúdo por um painel independente de especialistas no assunto, liderado pelo presidente de Publicações e Comunicações, com representação do Comitê de Prática Clínica e da liderança da Subdivisão de Tumores Sólidos, e a aprovação pelo Comitê Executivo da AMP.

DECLARAÇÕES DA DIRETRIZ

Reafirmação das Recomendações de 2013

A diretriz de 2013 recomendou o teste universal de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado com componente histológico de adenocarcinoma, usando diagnóstico molecular para identificar mutações ativadoras em pontos-chave (*hot-spots*) nos exons 18 a 21 de *EGFR* com pelo menos 1% de prevalência (ou seja, nos códons 709 e 719, deleção 768 no exon 19, e inserções 790, 858 e 861 no exon 20), e usando hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para rearranjos envolvendo *ALK*. Foi considerada aceitável qualquer metodologia ou algoritmo de teste com sensibilidade analítica adequada (capacidade de detectar mutações em amostras fixadas em formol com 50% ou mais de células malignas) e tempo de resposta (10 dias entre o recebimento da amostra e o relatório de todos os resultados), com validação e implantação apropriadas sob a regulamentação do CLIA (Clinical Laboratory Improvement Act) de 1988.

A diretriz de 2013 teve recomendação contrária ao uso de parâmetros clínicos (exposição ao tabaco, idade, sexo, etnia) para selecionar pacientes para o teste, bem como foi contra outros fatores como testar carcinomas escamosos puros, usar a negatividade no gene *KRAS* como um determinante da terapia anti-*EGFR*, usar IHQ para testar *EGFR* ou *ALK*, ou usar FISH para testar *EGFR*.

A diretriz de 2013 deixou várias decisões abertas às instituições para definir políticas, como testar ou não pacientes em estágio inicial, usar ou não os preditores clínicos para selecionar pacientes com biópsias de carcinomas escamosos minimamente amostrados, de modo que um carcinoma adenoescamoso misto não pudesse ser excluído, e usar ou não uma abordagem de testes simultâneos ou sequenciais. Destes, a questão relativa ao teste em estágio inicial da doença permanece em aberto e aguarda dados de mais ensaios clínicos antes que uma recomendação baseada em evidências possa ser feita. Embora o Comitê de Diretrizes Clínicas da Sociedade Americana de Oncologia Clínica tenha destacado o exame molecular para pacientes com câncer de pulmão em estágio inicial,⁴ nossa opinião é que cada instituição deve estabelecer sua própria política para testar pacientes com doença em estágio inicial, equilibrando o benefício de ter resultados obtidos ao testar uma amostra de ressecção de alta qualidade para alterações que provavelmente se tornarão necessárias em um momento de progressão futura quando uma amostra de alta qualidade pode ser difícil de obter, contra o custo de testar pacientes dos quais um subconjunto será curado cirurgicamente e nunca precisará do resultado do teste. Assim, os testes recomendados abaixo se aplicam a pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado (estágios IIIB e IV).

Após a revisão da literatura publicada desde 2013, as recomendações originais foram amplamente reafirmadas. Várias declarações ganharam força com a publicação de evidências adicionais de apoio

(Tabelas 4a, 4b e 5 do SDC). Algumas recomendações foram completamente reavaliadas nesta revisão, o que aparecerá subsequente (Tabela 3); estas incluem o uso de IHQ para *ALK*, o uso de painéis multigênicos de NGS, e a questão de testar amostras de não-adenocarcinoma.

Tabela 3. Resumo das Declarações Atualizadas com a Magnitude das Recomendações^a	
Declaração de 2013	Declaração de 2018
Opinião consensual dos especialistas: As amostras citológicas também são adequadas para testes de <i>EGFR</i> e <i>ALK</i> , sendo preferidos os blocos de células (“cell block”) em relação às preparações de esfregaços.	Recomendação: Os patologistas podem usar blocos celulares ou outras preparações citológicas como amostras adequadas para testes moleculares de biomarcadores de câncer de pulmão.
Opinião consensual dos especialistas: Os laboratórios devem testar para <i>EGFR</i> usando métodos capazes de detectar mutações em amostras com pelo menos 50% de conteúdo de células cancerígenas, embora sejam fortemente encorajados a usar (ou ter disponível em um laboratório de referência externo) testes mais sensíveis que detectem mutações em espécimes com apenas 10% de células cancerígenas.	Opinião consensual dos especialistas: Os laboratórios devem usar, ou ter disponíveis em um laboratório de referência externo, ensaios clínicos de testes moleculares de biomarcadores de câncer de pulmão que sejam capazes de detectar alterações moleculares em espécimes com apenas 20% de células cancerígenas.
Recomendação: A imunohistoquímica para o <i>EGFR</i> global não é recomendada para a seleção da terapia com EGK TKI.	Recomendação forte: Os laboratórios não devem usar a expressão total de EGFR pelo teste IHQ para selecionar pacientes para tratamento com TKI direcionado a EGFR.

Abreviaturas: IHC, imuno-histoquímica; TKI, inibidor de tirosina quinase.

Das recomendações de 2013 restantes, são feitas as seguintes alterações:

1. Pode-se testar qualquer amostra de citologia com adequada celularidade e preservação. -

A recomendação original deu preferência aos blocos de células sobre os esfregaços. Uma recente revisão sistemática²⁸ identificada pela pesquisa bibliográfica indicou que numerosos estudos foram publicados demonstrando excelente desempenho das preparações de esfregaços citológicos, de modo que essa preferência não é mais adequada. Cabe aos laboratórios que testam espécimes de citopatologia realizar estudos de validação adequados para usar este material como um tipo de amostra, diferente de tecido ou amostras de sangue.

2. Os métodos analíticos devem ser capazes de detectar mutação em uma amostra com 20% ou mais de conteúdo celular maligno. - Embora os estudos originais demonstrando resposta de câncer de pulmão com mutação no *EGFR* ao tratamento com inibidores de *EGFR* tenham usado sequenciamento Sanger não-modificado com um limite de sensibilidade de 50% de celularidade tumoral, isso na prática é insuficiente porque muitas amostras de câncer de pulmão são pequenas e compostas majoritariamente por células estromais benignas. A maioria dos ensaios clínicos de fase III com grande número de pacientes, que confirmaram a utilidade clínica do teste de mutação de *EGFR*, utilizou métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) que foram mais sensíveis do que o sequenciamento Sanger não-modificado. Dada a disponibilidade generalizada de tecnologia capaz de detectar com segurança eventos mutacionais de baixa frequência em pequenas amostras, não é mais adequado oferecer um teste de baixa sensibilidade que não pode testar tumores com 20% a 50% de tumor e requerem que os pacientes sejam

submetidos a mais procedimentos e a procedimentos potencialmente mais invasivos, apenas para obter uma amostra de tecido com alto conteúdo tumoral.

3. Não é apropriado usar IHQ para testar mutação de *EGFR*. - Não existe suporte para usar IHQ para detectar a expressão proteica total do *EGFR* como um determinante do tratamento com um inibidor da quinase do *EGFR*. As mutações acionáveis levam à ativação da quinase citoplasmática desta proteína transmembrana, mas isso não tem relação com o nível da expressão na superfície celular que é detectado pela imunomarcação total do *EGFR*. Embora a expressão de *EGFR* por IHQ tenha sido usada em alguns dos primeiros estudos sobre inibidores de quinase de *EGFR* no início deste século, foram observadas respostas clínicas em pacientes que tinham mutações, mas ausência/fraca expressão de IHQ, e respostas fracas em pacientes com forte expressão proteica por IHQ, mas sem mutações.

Após a descoberta das mutações de *EGFR*, foram desenvolvidos anticorpos para IHQ dirigidos às formas proteicas mutantes mais comuns, especialmente a substituição L858R e a deleção ELREA de 746 a 750. A diretriz original permitia o uso de IHQ com anticorpos contra mutantes-específicos do *EGFR* em situações com material extremamente limitado. Embora a evidência publicada para esses anticorpos mostre boa acurácia para a mutação ativadora L858R e algumas das deleções no exon 19, esses anticorpos têm sensibilidade fraca para outras deleções no exon 19, não detectam mutações menos comuns (por exemplo, mutações no códon 719) e dão resultados falso-positivos para as inserções do exon 20.²⁹ No geral, o desempenho é subótimo para a detecção confiável das mutações do *EGFR*. Dado que os avanços na tecnologia de diagnóstico molecular agora permitem a análise de amostras muito pequenas, e de DNA tumoral circulante (ver abaixo), correntemente não há suporte para o uso rotineiro de IHQ para mutantes específicos do *EGFR* na seleção de pacientes com câncer de pulmão para tratamento com anti-*EGFR*.

Tabela 4. Resumo das Declarações da Diretriz de 2018	
Declarações da Diretriz	Magnitude da Recomendação
<p>Questão Chave 1: Quais novos genes deveriam ser testados em pacientes com câncer de pulmão?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. O teste de <i>ROS1</i> deve ser realizado em todos os pacientes com adenocarcinoma pulmonar, independentemente das características clínicas. 2. A IHQ de <i>ROS1</i> pode ser usada como um teste de triagem em pacientes com adenocarcinoma de pulmão; entretanto, os resultados positivos da IHQ de <i>ROS1</i> devem ser confirmados por um método molecular ou citogenético. 3. O teste molecular de <i>BRAF</i> atualmente não é indicado na prática de rotina como um teste isolado fora do contexto de estudos clínicos. É apropriado incluir o <i>BRAF</i> como parte de painel abrangente testado inicialmente ou quando os testes de rotina de <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> e <i>ROS1</i> são negativos. 4. O teste molecular de <i>RET</i> não é recomendado na prática de rotina como um teste isolado fora do contexto de estudos clínicos. É apropriado incluir o <i>RET</i> como parte de painel abrangente testado inicialmente ou quando os testes de rotina de <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> e <i>ROS1</i> são negativos. 5. O teste molecular de <i>ERBB2</i> (<i>HER2</i>) não é indicado na prática de rotina como um teste isolado fora do contexto de estudos clínicos. É apropriado incluir a análise de mutação <i>ERBB2</i> (<i>HER2</i>) como parte de painel abrangente testado inicialmente ou quando os testes de rotina de <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> e <i>ROS1</i> são negativos. 6. O teste molecular de <i>KRAS</i> não é indicado na prática de rotina como um teste isolado como um único determinante da terapia-alvo. É apropriado incluir o <i>KRAS</i> como parte de painel abrangente testado inicialmente ou quando os testes de rotina <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> e <i>ROS1</i> são negativos. 	<p>Recomendação forte</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p>

<p>7. O teste molecular de <i>MET</i> não é indicado na prática de rotina como um teste isolado fora do contexto de estudos clínicos. É apropriado incluir o <i>MET</i> como parte de painel abrangente testado inicialmente ou quando os testes de rotina de <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> e <i>ROSI</i> são negativos.</p>	<p>Opinião consensual dos especialistas</p>
<p>Questão Chave 2: Que métodos devem ser usados para realizar testes moleculares?</p> <p>8. A IHQ é uma alternativa equivalente ao FISH para testes de <i>ALK</i>.</p> <p>9. Painéis multiplex de seqüenciamento genético são preferidos sobre múltiplos testes de genes individuais para identificar outras opções de tratamento além do <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> e <i>ROSI</i>.</p> <p>10. Os laboratórios devem garantir que os resultados dos testes que são inesperados, discordantes, ambíguos ou de baixa confiança por outras razões sejam confirmados ou resolvidos usando um método ou amostra alternativa</p>	<p>Recomendação</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p>
<p>Questão Chave 3: O teste molecular é apropriado para cânceres de pulmão que não possuem um componente de adenocarcinoma?</p> <p>11. Os médicos podem usar testes de biomarcadores moleculares em tumores com outras histologias além de adenocarcinoma, quando os aspectos clínicos indicam uma probabilidade maior de um fator oncogênico.</p>	<p>Opinião consensual dos especialistas</p>
<p>Questão Chave 4: Que testes são indicados para pacientes com mutações acionáveis que recorreram enquanto em terapia-alvo?</p> <p>12. Em pacientes com adenocarcinoma de pulmão que abrigam mutações sensibilizadoras de <i>EGFR</i> e que progrediram após tratamento com um inibidor de tirosina quinase direcionado ao <i>EGFR</i>, os médicos devem testar para a mutação T790M do <i>EGFR</i> ao selecionar pacientes para a terapia direcionada ao <i>EGFR</i> de terceira geração.</p> <p>13. Os laboratórios que testam para a mutação T790M do <i>EGFR</i> em pacientes com resistência clínica secundária a inibidores da tirosina quinase do <i>EGFR</i> devem utilizar ensaios capazes de detectar as mutações T790M do <i>EGFR</i> quando há pelo menos 5% de células viáveis.</p> <p>14. Atualmente, não há evidências suficientes para apoiar uma recomendação a favor ou contra o teste de rotina para o status mutacional do <i>ALK</i> em pacientes com adenocarcinoma de pulmão com mutações sensibilizadoras no <i>ALK</i> que progrediram após o tratamento com um inibidor de tirosina quinase direcionado a <i>ALK</i>.</p>	<p>Recomendação forte</p> <p>Recomendação</p> <p>Sem recomendação</p>
<p>Questão Chave 5: Qual é o papel do teste em DNA circulante livre de células para pacientes com câncer de pulmão?</p> <p>15. Atualmente, há evidências insuficientes para apoiar o uso de métodos moleculares de DNA plasmático em células circulantes para o diagnóstico primário de adenocarcinoma pulmonar.</p> <p>16. Em algumas situações clínicas nas quais o tecido é limitado e/ou insuficiente para testes moleculares, os médicos podem usar um ensaio de DNA plasmático livre de células para identificar as mutações do <i>EGFR</i>.</p> <p>17. Os médicos podem usar métodos de DNA de plasma livre de células para identificar mutações T790M do <i>EGFR</i> em pacientes com adenocarcinoma de pulmão com progressão ou resistência clínica secundária a inibidores de tirosina quinase direcionados a <i>EGFR</i>; recomenda-se o teste da amostra tumoral se o resultado do plasma for negativo.</p> <p>18. Atualmente, há evidências insuficientes para apoiar o uso de análise molecular de células tumorais circulantes para o diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, para a identificação de mutações no <i>EGFR</i> ou em outros genes, ou para a identificação de mutações T790M do <i>EGFR</i> no momento do aparecimento de resistência ao inibidor de tirosina-quinase do <i>EGFR</i>.</p>	<p>Sem recomendação</p> <p>Recomendação</p> <p>Opinião consensual dos especialistas</p> <p>Sem recomendação</p>

Abreviações: FISH, hibridização in situ por fluorescência; IHQ, imuno-histoquímica; TKI inibidor de tirosina quinase.

Tabela 5. Marcadores Emergentes para Testes Moleculares em Câncer de Pulmão

Proteína quinase 1 ativada por mitógeno (<i>MEK1/MAP2K1</i>)
Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 1–4 (<i>FGFR1–4</i>)
Receptor de tirosina-quinase neurotrófica tipo 1–3 (<i>NTRK1–3</i>)
Neuroregulina 1 (<i>NRG1</i>)
Semelhante ao <i>Ras</i> sem CAAX 1 (<i>RITI</i>)
Neurofibromina 1 (<i>NF1</i>)
Subunidade catalítica alfa da 3-quinase fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (<i>PIK3CA</i>)
Serina/treonina quinase AKT 1 (<i>AKT1</i>)
Proto-oncogene NRAS, GTPase (<i>NRAS</i>)
Alvo mecanístico da rapamicina (<i>MTOR</i>)
Esclerose tuberosa 1 (<i>TSC1</i>)
Esclerose tuberosa 2 (<i>TSC2</i>)
Receptor tirosina-quinase do proto-oncogene KIT (<i>KIT</i>)
Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>PDGFRA</i>) alfa
Receptor tirosina-quinase 2 do domínio discoidina (<i>DDR2</i>)

Novas Recomendações

Pergunta 1: Quais novos genes devem ser testados em pacientes com câncer de pulmão? - Na diretriz de 2013, os genes foram classificados em duas categorias: o teste é necessário (*EGFR*, *ALK*) ou o teste é investigacional. Um gene, *KRAS*, foi considerado condicionalmente necessário no contexto de algoritmos de testes sequenciais devido à sua facilidade de análise e exclusividade mútua com *EGFR* e *ALK*. Em 2018, contudo, acreditamos que existam três categorias nas quais os genes devem ser colocados. Um conjunto de genes deve ser oferecido como um mínimo absoluto por todos os laboratórios que testam o câncer de pulmão: *EGFR*, *ALK* e *ROS1*. Um segundo grupo de genes deveria ser incluído nos painéis expandidos que sejam oferecidos para pacientes com câncer de pulmão: *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2* (*HER2*) e *KRAS*, se houver material adequado disponível. O teste do *KRAS* também pode ser oferecido como um teste individual para excluir pacientes do teste de painel expandido. Todos os outros genes são considerados investigacionais no momento desta publicação.

Neste contexto, as instituições que atendem pacientes com câncer de pulmão têm que fazer uma escolha: (1) oferecer um painel oncológico abrangente que inclua todos os genes das duas primeiras categorias (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *ERBB2* [*HER2*]), *KRAS*, *RET*) para todos os pacientes apropriados, ou (2) oferecer testes direcionados para os genes na categoria de teste obrigatório (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*) para todos os pacientes apropriados e oferecer, como segundo teste, um painel expandido contendo os genes da segunda categoria (*BRAF*, *MET*, *ERBB2* [*HER2*] e *RET*) para pacientes potencialmente candidatos a ensaios clínicos, possivelmente após a realização do teste de *KRAS* para excluir do teste de painel expandido os pacientes com câncer *KRAS*-mutante. A Tabela 4 inclui uma lista das declarações de recomendação com a magnitude das recomendações.

1. Recomendação Forte - O teste de *ROS1* deve ser realizado em todos os pacientes com adenocarcinoma pulmonar em estágio avançado, independentemente das características clínicas.

A força da evidência foi convincente para apoiar o uso de teste molecular para *ROS1* (ou seja, PCR de transcrição reversa [RT-PCR] ou seqüenciamento) ou teste citogenético (ou seja, FISH ou outro tipo

de hibridização *in situ*) para identificar rearranjos em *ROS1*. A força da evidência apoiando o uso de características clínicas para identificar pacientes que deveriam receber o teste *ROS1* foi adequada. Esta recomendação é baseada em evidências e apoiada por 9 estudos,³⁰⁻³⁸ 6 dos quais informaram sobre a associação entre o rearranjo de *ROS1* e as características do paciente ou do tumor^{30,31,34-37} e consistiram em um estudo de coorte prospectivo (PCS),³⁵ um estudo de coorte prospectivo-retrospectivo (PRCS),³¹ e 4 estudos de coorte retrospectivos (RCS).^{30,34,36,37} Os 3 estudos restantes avaliaram os resultados clínicos de pacientes tratados com crizotinib, uma terapia-alvo para *ROS1*^{32,33,38} e incluíram um ensaio clínico não-randomizado³³ e 3 RCSs.^{32,38} Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e nenhum deles apresentou falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (Tabela 6 do SDC). Consulte a Tabela 7 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso de testes moleculares ou citogenéticos de *ROS1* para a seleção de pacientes para terapia-alvo ao *ROS1*.

Embora relativamente raros, representando menos de 2% dos carcinomas pulmonares de células não-pequenas^{30,31,34} e 2% a 3% dos adenocarcinomas pulmonares,^{30,34,35} os rearranjos estruturais envolvendo o gene *ROS1* geram uma fusão oncogênica que pode ser tratada com sucesso por drogas-alvo. Um ensaio clínico de fase I de 50 pacientes com NSCLC demonstrou que a presença de um rearranjo de *ROS1* por FISH ou RT-PCR prediz resposta à inibição alvo do crizotinib, com uma taxa de resposta de 72% e sobrevida mediana livre de progressão de 19,2 meses.³³ Baseado neste estudo, em 2016 o FDA aprovou o uso expandido de crizotinib em pacientes com NSCLC com *ROS1*. Um estudo retrospectivo multi-institucional europeu de 32 pacientes com NSCLC com rearranjo no *ROS1* tratados com crizotinib demonstrou uma taxa de resposta de 80% e sobrevida livre de progressão da doença de 9,1 meses.³² A sobrevida global para pacientes com tumores com rearranjo no *ROS1*, independentemente do uso de terapia-alvo, parece ser maior do que a de pacientes com outras alterações moleculares que foram submetidos a terapia-alvo.^{38,39}

Tal como acontece com o *ALK*, a ativação de *ROS1* é induzida por variantes estruturais, com múltiplos genes parceiros diferentes fundindo-se à porção C-terminal de *ROS1* que contem a tirosina quinase citoplasmática e dirigindo a sinalização através das vias *MAPK*, *JAK/STAT* e *PI3K*. Os parceiros comuns de fusão incluem, entre outros, os genes *SLC34A2*, *CD74* e *TPM3*. O papel do alelo selvagem de *ROS1* ainda está sendo elucidado; ele tem semelhanças estruturais com o *ALK*, mas também tem diferenças significativas, notadamente a ausência de um domínio de dimerização, um domínio extracelular com alguma semelhança com moléculas de adesão celular, e nenhum ligante conhecido.

Assim como as mutações do *EGFR* e os rearranjos no *ALK*, um histórico de não-fumante ou fumante leve foi associado a um aumento na incidência de rearranjos de *ROS1* em pacientes com adenocarcinoma de pulmão.^{30,37} Entretanto, essa associação não foi consistentemente observada nos estudos.³⁴ Outras características clínicas, como idade mais jovem, sexo feminino e etnia não asiática, têm sido associados com o rearranjo do *ROS1* apenas em estudos isolados.^{30,31,35} Portanto, as características clínicas não devem ser usadas para selecionar ou excluir pacientes de serem testados para rearranjos de *ROS1*. Os rearranjos de *ROS1* ocorrem de maneira mutuamente excludente com outras alterações oncogênicas (como *EGFR*, *KRAS* e rearranjo de *ALK*). Em reconhecimento à raridade do rearranjo de *ROS1*, pode ser razoável realizar testes sequenciais de *EGFR* e *ALK*, seguido do teste de *ROS1*. De fato, a frequência de rearranjos de *ROS1* é enriquecida em 5% a 10% em adenocarcinomas de pulmão negativos para outras mutações ativadoras (por exemplo, *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *BRAF*).^{31,37}

É digno de nota que, em 2016, nos Estados Unidos, a terapia com crizotinib em tumores rearranjados para *ROS1* não requeria o uso de teste diagnóstico acompanhante aprovado pelo FDA. Os métodos publicados que estabeleceram a utilidade clínica dos testes de *ROS1* a fim de escolher a terapia-alvo a *ROS1* basearam-se principalmente em FISH e RT-PCR. Fora dos Estados Unidos, um teste de diagnóstico usando RT-PCR foi utilizado para um ensaio clínico internacional de fase II,⁴⁰ envolvendo principalmente países do Leste Asiático, para seleção de tumores com rearranjo de *ROS1*. Este ensaio foi

aprovado como um diagnóstico *in vitro* na Europa e na China e pode ser reconhecido como um teste de diagnóstico acompanhante em alguns países. Embora ensaios de RT-PCR direcionados possam ser difíceis devido à variação nos pontos de quebra em *ROS1* (tipicamente nos introns³¹⁻³⁵) e nos genes parceiros podem ser usadas estratégias de sequenciamento baseadas em captura para RNA ou DNA, desde que sejam devidamente validadas em amostras positivas conhecidas. Nos Estados Unidos, os métodos de FISH foram publicados com maior frequência. O teste de hibridização *in situ* por fluorescência deve ser realizado com um desenho de sonda de separação de sinais (*break-apart*), dados os múltiplos genes parceiros de fusão, e a definição do rearranjo é definida como sinais separados por pelo menos o diâmetro de um sinal, em 15% ou mais das células tumorais.⁴¹

2. *Opinião Consensual dos Especialistas* - A IHQ de *ROS1* pode ser usada como teste de triagem em pacientes com adenocarcinoma pulmonar em estágio avançado; entretanto, os resultados positivos da IHQ do *ROS1* devem ser confirmados por um método molecular ou citogenético.

A força da evidência é inadequada para apoiar o uso de IHQ como um ensaio de triagem para testes moleculares de *ROS1*. Esta afirmação é baseada em evidências e apoiada por 6 estudos,⁴²⁻⁴⁷ consistindo de dois PCSs,^{43,44} um PRCS,⁴² e 3 RCSs.⁴⁵⁻⁴⁷ Cinco estudos compararam a IHQ de *ROS1* com um teste de referência por FISH^{42-45,47} e um estudo comparou a IHQ de *ROS1* com um teste de referência por RT-PCR.⁴⁶ Usando dados relatados como verdadeiro-positivo, falso-positivo, verdadeiro-negativo e falso-negativo nos estudos comparando IHQ com FISH, uma MA foi conduzida para determinar a estimativa combinada de sensibilidade e especificidade para IHQ de *ROS1* (Figura 1). Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas levantando suspeitas sobre os resultados (SDC Tabela 8). Consulte a Tabela 9 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso de IHQ como um ensaio de triagem para o teste molecular de *ROS1*.

À luz da relativa raridade da ocorrência do rearranjo de *ROS1* em NSCLC, em alguns cenários a triagem por IHQ pode ser preferível ao FISH ou a técnicas moleculares. No entanto, a interpretação da IHQ do *ROS1* é um desafio porque a expressão pode ser vista com um padrão irregular, tipicamente de intensidade fraca, em até um terço dos tumores que não têm um rearranjo subjacente.^{44,45,48} Embora alguns estudos sugeriram que a expressão do *ROS1* na ausência de um rearranjo possa ter significância prognóstica,⁴⁸ a expressão focal ou fragmentada em células tumorais raramente é associada a um rearranjo de *ROS1* e, portanto, é improvável que preveja resposta à terapia-alvo ao *ROS1*. Além disso, o padrão de coloração pode variar entre os tipos de fusão, incluindo coloração granular a globular nas fusões *CD74-ROS1*, coloração membranosa fraca nas fusões *EZR-ROS1* e coloração da localização vesicular nas fusões *GOPC-ROS1*.⁴⁵

Nos estudos publicados até o momento foi utilizado um único clone de anticorpo comercialmente disponível (D4D6, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). A maioria dos estudos retrospectivos de IHQ de *ROS1* usando o anticorpo D4D6 demonstra uma sensibilidade de 100% em relação ao FISH ou a RT-PCR.^{35,42-47} Os tumores sem expressão de *ROS1* podem ser interpretados com segurança como não tendo uma fusão *ROS1*. No entanto, a especificidade do IHQ do *ROS1* é mais inconstante, variando de 92% a 100% por diferentes métodos e pontos de corte interpretativos.^{35,42-47} Uma meta-análise de 5 estudos identificados pela pesquisa da literatura determinou uma sensibilidade combinada de 96% (95% IC, 71% – 99%) e especificidade de 94% (95% CI, 89% – 96%) para IHQ em comparação com FISH, utilizando o anticorpo D4D6 com uma intensidade de coloração de pelo menos 2+ (conforme definido no estudo) (Figura 1). Diversos pontos de corte foram propostos usando apenas a intensidade de coloração ou o escore H (intensidade de coloração × porcentagem das células tumorais coradas). Na maioria dos estudos, os tumores com rearranjo no *ROS1* diagnosticados por FISH ou confirmados molecularmente têm expressão de proteína *ROS1* de intensidade moderada, mas as evidências publicadas são insuficientes para recomendar um sistema específico de corte ou pontuação,^{42,45}

e cada laboratório deve validar seu próprio corte interpretativo baseado em amostras positivas e negativas conhecidas.

Devido à especificidade imprecisa e aos desafios relacionados à interpretação da expressão inespecífica, recomendamos que todos os resultados positivos do IHQ de *ROSI* sejam confirmados por FISH ou por um método molecular (por exemplo, RT-PCR, NGS) antes de considerar um paciente para terapia-alvo a *ROSI*. No entanto, dada a elevada sensibilidade da IHQ, os tumores que claramente não apresentam coloração de *ROSI* podem ser interpretados como negativos para a fusão de *ROSI*.

Genes Adicionais

Dos genes recém-incluídos nesta diretriz, apenas o teste de *ROSI* deve ser oferecido a todos os pacientes com câncer de pulmão apropriados. Testes para os outros genes listados abaixo devem ser incluídos em painel multigênico abrangente proposto para pacientes com câncer de pulmão, que seja ou não oferecido para todos os pacientes com câncer de pulmão, ou em painel reservado como teste de segunda linha para os pacientes com genótipo não-mutante para *EGFR/ALK/ROSI* que procuram estudos clínicos.

3. Opinião Consensual dos Especialistas - O teste molecular do *BRAF* atualmente não é indicado de rotina como um ensaio independente fora do contexto de um ensaio clínico. É apropriado incluir o *BRAF* como parte de painéis de testes aplicados inicialmente ou quando os testes de rotina para *EGFR*, *ALK* e *ROSI* forem negativos.

A força da evidência foi inadequada para apoiar o uso de testes moleculares do *BRAF*. Esta declaração foi baseada em evidências e apoiada por 9 estudos: 4 PCSs⁴⁹⁻⁵² e 3 RCSs,⁵³⁻⁵⁵ todos informando sobre a associação entre a mutação *BRAF* e as características do paciente ou do tumor,⁴⁹⁻⁵⁵ e dois ensaios clínicos adicionais não randomizados que avaliaram a atividade de um inibidor de *BRAF* em pacientes com mutação p.V600E.^{56,57} Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre seus resultados (SDC Tabela 10). Consulte a Tabela 11 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso de testes moleculares do *BRAF*.

Mutações ativadoras no *BRAF*, especialmente a p.V600E, levam à sinalização oncogênica através do *MAPK* e são alterações recorrentes raras no adenocarcinoma pulmonar, observadas em 0,5% a 4,9% dos tumores.^{49-52,54} Em câncer de pulmão, dados de um ensaio clínico de fase II de braço único publicado em 2016⁵⁶ mostrou que (1) o dabrafenib administrado como agente único em segunda linha de tratamento para pacientes com NSCLC em estágio IV portadores de *BRAF* p.V600E teve uma taxa de resposta parcial de 33% e uma taxa de controle da doença de 58% e (2) a combinação de dabrafenib com trametinib em segunda linha de tratamento para pacientes com adenocarcinoma do pulmão em estágio IV portadores de *BRAF* p.V600E teve uma taxa de resposta parcial de 63% e uma taxa de controle da doença de 75%.

Com base nesses dados, a agência americana FDA conferiu a designação de terapia inovadora para o tratamento combinado em NSCLC positivo para *BRAF* p.V600E, e concedeu a aprovação para este tratamento em 2017. Portanto, essa foi a mais controversa de todas as recomendações entre os membros deste grupo de trabalho. Embora tenha havido uma forte opinião no grupo de que a análise da mutação *BRAF* deva ser realizada no momento do teste molecular inicial no adenocarcinoma de pulmão, as evidências publicadas que estavam disponíveis no momento desta publicação não incluíam ensaios prospectivos controlados e, portanto, não tinham a magnitude necessária para garantir recomendação internacional para o teste individual do *BRAF* para todos os pacientes com adenocarcinoma pulmonar. Antecipamos a publicação de evidências mais fortes que apoiem a utilidade da inibição do *BRAF* no câncer de pulmão mutante para *BRAF*, e nossa opinião é de que testar para *BRAF* será comprovado como

necessário. Esperamos que a próxima revisão desta diretriz inclua uma recomendação para testar *BRAF* individualmente, em conjunto com *EGFR*, *ALK* e *ROS1*, mas não podemos fazer essa recomendação na primavera de 2017 (Nota do Tradutor: março de 2017). Apesar de que o teste individual para *BRAF* não é atualmente recomendado, ele deve ser incluído se for usada uma estratégia de teste em painel, inicialmente ou para pacientes com genótipo selvagem para *EGFR*, *ALK* e *ROS1*.

Tal como acontece com as mutações de *EGFR* e *KRAS*, certas mutações em pontos-chave (hot-spots) no *BRAF* exercem um efeito oncogênico. O gene homólogo b de sarcoma murino V-raf (*BRAF*) codifica uma serina-treonina quinase não-receptora na via de sinalização de *MAPK* quinase, entre *RAS* e *MEK*. A mutação no *BRAF* mais comum em NSCLC é a mutação pontual c.1799T> A (p.V600E), que é a mutação predominante em muitos outros tipos de câncer, incluindo melanoma, câncer papilar de tireoide, câncer colorretal, leucemia de células pilosas e ganglioglioma. No entanto, em contraste com os outros cânceres com mutações no *BRAF*, os cânceres de pulmão frequentemente têm mutações diferentes da *BRAF* p.V600E, incluindo mutações no codon 600 (por exemplo, p.V600K) e em códons próximos no exon 15, e substituições nos códons 466 e 469 no exon 11.

Como muitos outros oncogenes-alvo no câncer de pulmão, as mutações no *BRAF* são mais frequentes em adenocarcinomas do que em carcinomas de células escamosas. A mutação *BRAF* p.V600E é mais frequente em mulheres^{52,54} e não-fumantes⁵⁴ em alguns estudos, mas vários estudos não conseguiram mostrar essas associações.^{49,50,53,58} Uma distinção entre mutações no *BRAF* e em outros oncogenes-alvo é que as mutações *BRAF* não-p.V600E (particularmente as mutações do exon 11) podem coexistir com mutações no *KRAS*,^{49,52,53,59} enquanto as mutações p.V600E são mutuamente exclusivas com as alterações em *KRAS*, *EGFR* ou *ALK*.

Ensaio individuais para *BRAF* são amplamente utilizados em outros tipos de câncer, particularmente em pacientes com melanoma considerados para terapia-alvo, mas a maioria desses métodos não consegue detectar as mutações do exon 11 que são vistas no câncer de pulmão. Embora a evidência que apoia a utilidade do teste *BRAF* seja restrita às mutações p.V600E, nossa opinião é de que o teste para *BRAF*, feito como parte de um painel abrangente ou para inscrição em ensaios clínicos, deve usar um método que avalie no mínimo os exons 11 e 15.

O mesmo problema existe em relação aos testes de IHQ específicos, usando anticorpos contra a proteína mutante p.V600E (VE1), que têm sido amplamente utilizados no diagnóstico do melanoma. Dados relatados em pequeno número de casos de câncer de pulmão^{58,60} demonstram que o clone VE1 pode corar entre 90% e 100% dos adenocarcinomas com mutação pV600E. Em um desses estudos, todos os casos com mutações não-pV600E foram negativos no teste IHQ,⁶¹ enquanto que em outro estudo, entre 21 casos com mutações não-p.V600, um único caso que tinha uma mutação de inserção T em 599 apresentou coloração positiva. Atualmente, não há evidências suficientes para apoiar uma recomendação a favor ou contra o teste de IHQ para *BRAF* p.V600E (VE1) em NSCLC.

4. Opinião Consensual dos Especialistas - O teste molecular do *RET* não é recomendado como um ensaio independente de rotina fora do contexto de um ensaio clínico. É apropriado incluir o *RET* como parte de painéis de testes mais abrangentes executados inicialmente ou quando os testes de rotina de *EGFR*, *ALK* e *ROS1* forem negativos.

A força da evidência para apoiar o uso do teste molecular do *RET* foi inadequada. Esta afirmação é baseada em evidências e apoiada por 3 estudos,^{37,62,63} consistindo de um PCS⁶² e dois RCSs.^{37,63} Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas levantando suspeitas sobre os seus resultados (Tabela 12 do SDC). Consulte a Tabela 13 do SDC para um resumo dos resultados de estudos que apoiam o uso de testes moleculares para *RET*.

As variantes estruturais que causam as fusões do *RET* são raras, sendo encontradas em 0,6% a 0,9% dos NSCLCs e em 1,2% a 2% dos adenocarcinomas.^{62,64-67} O potencial para o tratamento de cânceres pulmonares *RET*-positivos com inibidores da *RET* quinase está sendo explorado em ensaios clínicos de fase II,^{68,69} embora pequenas séries e relatos de caso tenham se mostrado promissores.^{70,71} Dada a raridade dos rearranjos *RET* e a evidência limitada de benefício terapêutico, o teste para alterações no *RET* não é recomendado como um teste independente para todos os pacientes com adenocarcinoma pulmonar. No entanto, painéis multigênicos desenvolvidos para pacientes com câncer de pulmão, seja para a investigação inicial ou para pacientes que tem genótipo selvagem para *EGFR*, *ALK* e *ROS1*, devem incluir o *RET*.

Assim como nos rearranjos dos genes *ALK* e *ROS1*, o *RET* é ativado por rearranjos que fundem o seu domínio tirosina quinase com domínios de dimerização em espiral de um dos vários genes parceiros recorrentes, incluindo o *KIF5B* (o mais comum, em 90%),^{64,72,73} *CCDC6*,^{65,74} *NCOA*,^{4,62} e *TRIM33*.⁷² O rearranjo do *RET* em câncer de pulmão é mutuamente exclusivo com aberrações nos genes *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *HER2* e *BRAF*.^{62,64,65}

A fusão do *RET* ocorre mais frequentemente em pacientes que nunca fumaram do que em fumantes.^{37,62,64,66,72} Pacientes com tumores portadores da fusão do *RET* são geralmente mais jovens que pacientes com mutação no *EGFR* e têm uma distribuição equilibrada de sexo.⁶⁷ Proteínas originadas por fusão do *RET* foram detectadas em adenocarcinoma^{37,62,64} e em carcinoma adenoescamoso.⁶² Os subtipos histológicos nos adenocarcinomas incluem os com células mucinosas /em anel de sinete e os com padrão de crescimento cribriforme^{37,62,65} ou sólido^{3,7,62}. No entanto, não há características clínicas ou histológicas que devam ser usadas para selecionar pacientes para o teste do *RET* (além de excluir do teste os casos puros de histologia de células escamosas).

Múltiplos métodos tem sido usados para a análise de *RET*, incluindo FISH com separação de sinais,⁷⁵ IHQ,³⁷ RT-PCR,⁷⁵ e NGS.³⁷ O teste de *RET* por FISH é particularmente desafiador, no entanto, devido ao estreito espaçamento entre os sinais da sonda dividida que ocorre nos tipos comuns de fusão, e um padrão de sinais *RET* divididos que sejam separados por apenas uma distância igual ao diâmetro de um sinal é interpretado como positivo.³⁷ Semelhante ao teste de rearranjo no *ALK* por FISH, o limite para a positividade de rearranjo no *RET* por FISH é a presença de 15% de células com sinais divididos ou sinais isolados da sonda *RET* 3'. Em outro estudo, foi utilizado um ensaio *RET* FISH de 4 cores⁶²; as amostras foram consideradas positivas para o rearranjo *RET* ou para fusão *KIF5B-RET* se mais de 20% das células tumorais exibissem, respectivamente, sinais vermelhos e verdes separados ou sinais verde-amarelos fundidos.

Um estudo retrospectivo recente utilizou o teste *RET* por IHQ (anticorpo anti-*RET* ab134100, Abcam, Cambridge, Reino Unido), mostrando coloração citoplasmática granular difusa e, ocasionalmente, coloração membranosa ou perinuclear, com intensidade moderada a forte. Uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 88% foram relatadas,³⁷ embora a evidência corroborativa não seja forte o suficiente para justificar uma recomendação.

Embora um painel multiplex de RT-PCR possa ser bom para as fusões comuns envolvendo *KIF5B-RET* e *CCDC6-RET*,⁷⁵ a RT-PCR direcionada por si é insuficiente para detectar fusões com novos parceiros ou isoformas, como acontece também com *ALK* e *ROS1*. É importante notar que a diversidade de rearranjos tratáveis em *ALK* e *ROS1* amadureceu suficientemente durante anos de testes e ensaios clínicos, de modo que os ensaios de RT-PCR direcionados para esses genes podem ser programados com sensibilidade clínica adequada, enquanto que a diversidade dos rearranjos de *RET* tratáveis ainda esta em estágio precoce de evolução. Uma abordagem de sequenciamento baseada em captura, envolvendo DNA ou RNA, pode ser mais sensível e mais facilmente integrada em um amplo painel multigênico.

5. *Opinião Consensual dos Especialistas* - O teste molecular de *ERBB2 (HER2)* não é indicado como um ensaio independente de rotina fora do contexto de um estudo clínico. É apropriado incluir a análise de mutação *ERBB2 (HER2)* como parte de um painel de testes mais amplo realizado inicialmente ou quando os testes de rotina de *EGFR, ALK* e *ROS1* são negativos.

A força da evidência foi inadequada para apoiar o uso do teste molecular de *ERBB2 (HER2)*. Esta recomendação foi baseada em evidências e apoiada por 10 estudos, 9 que relataram a associação entre *ERBB2 (HER2)* e características do paciente ou do tumor^{49,77-84} e um que avaliou o uso de terapia-alvo para *ERBB2* (dacomitinib)⁸⁵ em pacientes com mutações e ampliações do *ERBB2 (HER2)*. Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e nenhum apresentou falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Tabela 14). Consulte a Tabela 15 do SDC para um resumo dos resultados de estudos que apoiam o uso do teste molecular do *ERBB2 (HER2)*.

Alterações no gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2, ERBB2*) surgiram como fatores oncogênicos e como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão^{81,83,84,86}. Nesse cenário, aparecem tanto alterações na sequência como amplificação gênica, que constituem aproximadamente entre 2% a 3% e entre 2% a 5% das anomalias recorrentes relatadas, respectivamente. A terapia-alvo para *HER2* (o produto proteico do gene *ERBB2*) continua uma área de investigação ativa neste momento. Estudos clínicos concluídos que selecionaram pacientes com base na expressão proteica por IHQ ou na amplificação do *ERBB2* por FISH não demonstraram um benefício claro.^{87,88} Um outro estudo de fase II usando mutações e ampliações do *ERBB2* para seleção de pacientes demonstrou respostas duráveis ao dacomitinib, mas apenas em pacientes com mutações específicas do *HER2*.⁸⁵

As inserções *in-frame* no exon 20 e as substituições em S310 são as mutações mais comumente encontradas, e de modo geral são mutuamente exclusivas com outras alterações recorrentes, incluindo mutações em *EGFR, KRAS* e *BRAF*, bem como rearranjos envolvendo *ALK* e *ROS1*. As inserções no exon 20 são variáveis, na maioria consistindo na duplicação de 12 pares de bases dos códons 775-778 que codificam os aminoácidos YVMA,⁸¹ e são mais comumente observadas em pacientes mais jovens e em pacientes sem história de tabagismo. A amplificação de novo do *ERBB2* pode ocorrer com ou sem mutação no *ERBB2*,^{82,84,86} com taxas de co-ocorrência altamente variáveis, relatadas entre 0% e 87%.^{81,84,86} Embora diferenças nos métodos e critérios que definem os níveis de amplificação possam ser responsáveis pelas discrepâncias observadas e uma padronização seja necessária, a maior prevalência de amplificação do *ERBB2* independente da mutação do *ERBB2* sugere que mutação e amplificação possam representar marcadores e alvos terapêuticos distintos no câncer de pulmão.⁸⁹ A amplificação do *ERBB2* também foi relatada raramente como um evento secundário em pacientes com mutações ativadoras do *EGFR* e como um potencial mecanismo de resistência após tratamento com inibidores de *EGFR*.

Neste contexto e com as evidências atuais, testes independentes para detectar mutações do *ERBB2* não são indicados como rotina fora de um estudo clínico. No entanto, quando painéis abrangentes são usados em ensaio multiplex ou NGS, é apropriado incluir o *ERBB2* como parte do teste, pois ele pode identificar pacientes a serem direcionados para ensaios clínicos - neste caso, testando para alterações de sequência no *ERBB2*, particularmente inserções/duplicações no exon 20, que foram associadas à resposta ao tratamento com drogas-alvo ao *ERBB2* em relatos de casos e pequenas séries.^{85,91}

6. *Opinião Consensual dos Especialistas* - O teste molecular do *KRAS* não é indicado como um ensaio independente de rotina como único determinante de terapia-alvo. É apropriado incluir o teste molecular do *KRAS* como parte de painéis abrangentes de testes executados inicialmente ou quando os testes de rotina para *EGFR, ALK* e *ROS1* forem negativos.

A força da evidência foi adequada para apoiar o uso do teste molecular *KRAS* na seleção de pacientes para terapia-alvo. A força da evidência que apoia o uso de características clínicas para identificar pacientes que devem ser testados para *KRAS* foi inadequada. Esta afirmação é baseada em evidências e

apoiada por 7 estudos,^{49,51,52,92-95} compreendendo 2 MAs,^{93,94} 4 PCSs,^{49,51,52,92} e um RCS.⁹⁵ Cinco estudos tentaram identificar associações entre características do paciente ou do tumor e estado mutacional do *KRAS*.^{49,52,92,93,95} Dois MAs^{93,94} relataram sobrevida global e as taxas de resposta ao inibidor de *EGFR* quando os pacientes positivos para mutação do *KRAS* foram tratados com tratamento padrão. Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Tabela 16). Consulte a Tabela 17 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso de testes moleculares do *KRAS*.

Mutações no *KRAS* são descritas em 20% a 30% dos adenocarcinomas pulmonares. As mutações do *KRAS* são encontradas com maior frequência em pessoas com exposição ao tabaco, mas foram relatadas em 5% dos pacientes com câncer de pulmão que nunca usaram tabaco. A maioria dos estudos indica um aumento da incidência em homens e em pessoas de ascendência branca ou africana, em comparação com mulheres e pessoas de ascendência asiática. As mutações do *KRAS* ocorrem com maior frequência nos códons 12 e 13, são muito menos comuns no códon 61, e aparecem raramente no códon 146. Podem ser rapidamente detectadas por testes programados para interrogar esses códons (ou seja, PCR em tempo real, PCR digital por gota ou pirosequenciamento), bem como serem incorporadas em testes com painéis multigênicos. De modo geral, elas são mutuamente exclusivas com outras mutações-chaves, como mutações de *EGFR* e rearranjos de *ALK*.^{49,51,92,93,95-101}

As terapias-alvo contra o *KRAS* mutante não se mostraram clinicamente eficazes. Por exemplo, embora tenham sido obtidos resultados promissores (37% de taxa de resposta objetiva) em um estudo de fase II com selumetinib, um inibidor de MEK1 (abaixo de *KRAS*) e docetaxel,¹⁰² em câncer de pulmão avançado com mutação no *KRAS*, essa combinação não conseguiu demonstrar um desfecho benéfico no estudo clínico de fase III SELECT-1 (Selumetinib Evaluation as Combination Therapy-1),¹⁰³ e um estudo de fase II com selumetinib + erlotinib em câncer de pulmão com mutação no *KRAS* não mostrou resposta ao selumetinib independente do erlotinib.¹⁰⁴ Por isso, a investigação de estratégias terapêuticas contra essa mutação comum continua, e é apropriado incluir o *KRAS* em um painel de testes usado para direcionar pacientes a terapias investigativas.

Outra aplicação do teste de mutação no *KRAS* está em um algoritmo de teste sequencial, com um resultado positivo diminuindo muito a probabilidade de ocorrência de outra alteração oncogênica acionável. No entanto, se o teste *KRAS* for realizado antes dos testes de *EGFR*, *ALK* ou *ROS1*, o laboratório deve garantir que haja tumor suficiente disponível para os testes *EGFR*, *ALK* e *ROS1* dentro do prazo recomendado, particularmente no caso de um resultado negativo para *KRAS*. Da mesma forma, a presença de uma mutação no *KRAS* torna improvável a ocorrência de mutações em outros oncogenes recomendados para painéis abrangentes, como *RET*, *ERBB2 (HER2)* e *BRAF*. Neste contexto, um ensaio rápido e direcionado para o *KRAS* pode ser relevante para ajudar a determinar se um paciente com genótipo selvagem de *EGFR/ALK/ROS1* se beneficiaria de um teste de painel abrangente, sendo menos provável que testar com o painel possa beneficiar pacientes com tumor *KRAS*-mutante. Esse modelo pode, no entanto, mudar à medida que a tecnologia evolui, já que novos métodos ultrasensíveis tem mostrado ocorrência de oncogenes-chave, incluindo o *KRAS*, em subpopulações intra-tumorais que anteriormente não haviam sido detectadas por métodos menos sensíveis.^{105,106}

7. Opinião Consensual dos Especialistas - O teste molecular do *MET* não é indicado como um ensaio independente de rotina fora do contexto de um estudo clínico. É apropriado incluir o *MET* como parte de painéis de testados inicialmente ou quando os testes de rotina de *EGFR*, *ALK* e *ROS1* forem negativos.

A força da evidência apoiando o uso do teste molecular do *MET* é inadequada. Esta declaração foi baseada em evidências e apoiada por 7 estudos,¹⁰⁷⁻¹¹³ compreendendo um MA,¹⁰⁷ um ensaio clínico randomizado de fase II,¹⁰⁹ um PCS,¹¹⁰ e 4 RCSs.^{108,111-113} Todos os estudos incluídos foram avaliados

quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Tabela 18). Consulte a Tabela 19 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso de testes moleculares do *MET*.

Inicialmente relatado como um mecanismo de resistência secundária à terapia com inibidores da tirosina quinase do *EGFR* em câncer de pulmão com mutação no *EGFR*,^{114,115} tanto a compreensão do mecanismo de ativação do *MET* como a utilidade do teste do *MET* no câncer de pulmão passaram por várias fases. O ganho no número de cópias do *MET* foi inicialmente reconhecido em associação com a resistência secundária aos inibidores de *EGFR*,¹¹⁴ sugerindo o desenvolvimento de terapias-alvo que mostraram resultados decepcionantes.¹¹⁶ Mais recentemente, o interesse em inibir o *MET* foi reavivado pela descoberta de mutações ativadoras que podem responder à inibição alvo.

O gene *MET* codifica o receptor para fator de crescimento de hepatócitos (HGFR), e sua ativação tem funções pleotrópicas na promoção da sobrevivência, proliferação, motilidade, e invasão celular e da transição epitélio-mesenquimal.¹¹⁷⁻¹²⁰ *MET* pode ser ativado e levar à oncogênese por vários mecanismos diferentes, incluindo (1) amplificação resultante em alta expressão do receptor,^{121,122} (2) mutações no domínio da tirosina quinase resultantes em ativação constitutiva do receptor,¹²³ e (3) mutações de recomposição (*splicing*) resultando num salto sobre o exon 14 e na perda de Y1003, o sítio de ligação do proto-oncogene Casitas de linfoma de linhagem B (CBL) requerido para a degradação da proteína mediada pela ubiquitina.¹²⁴ Embora a maioria das mutações por salto sobre o exon envolva sítios de processamento canônicos, algumas estão localizados na sequência intrônica, fazendo com que sua interpretação seja difícil ou que possam passar despercebidas em testes que examinam apenas exons e os sítios receptores e doadores 5' e 3' imediatamente adjacentes.

A ativação das alterações do *MET* é inibida pelo crizotinib, um tratamento para câncer de pulmão com rearranjos em *ALK* e *ROSI*. Apesar da associação descrita de amplificação do gene *MET* e de alta expressão protéica como marcadores de mau prognóstico^{107,125} e de relatos recentes de que pacientes com amplificação ou mutação do exon 14 do *MET* são sensíveis ao crizotinib em alguns casos, ainda não há terapia-alvo aprovada para tratar pacientes cujo tumor exiba essas aberrações genômicas do *MET*.¹²⁶⁻¹³⁰ Nesse contexto, um teste de rotina independente para essas aberrações genômicas do *MET* ou para o nível da proteína HGFR não é indicado fora de um estudo clínico. No entanto, quando um teste multiplex para mutações oncogênicas-chaves potenciais é aplicado a pacientes com câncer de pulmão, seja inicialmente ao testar o *EGFR/ALK/ROSI* ou depois desses serem achados negativos, essas aberrações do gene *MET* devem ser incluídas nos testes do painel.

Até o momento, foram descritas mais de 100 alterações somáticas no local da junção que resultam no salto sobre o exon 14 do *MET*. As mutações exibem uma composição de sequências altamente diversificada, englobando pequenas inserções, deleções, mutações por inserção/deleção (*indels*) complexas e variantes de nucleotídeos únicos, que estão localizados principalmente em locais doadores e receptores do processamento. Em frequência mais baixa foram encontradas mutações pontuais mais profundas nos introns, até 25 pares de bases adentro das regiões intrônicas não-codificadoras, adjacentes aos locais receptores do processamento, embora caiba destacar que muitos estudos não tenham interrogado esta região. Em geral, a incidência global e o efeito dessas mutações menos comuns no processamento do exon não foram definidos.

Dada a grande variabilidade e complexidade das mutações que afetam o exon 14 do *MET*, o desenvolvimento de testes diagnósticos abrangentes pode ser difícil dependendo do método utilizado. Para fins de triagem são preferidos os testes de NGS que interrogam *MET* como parte de um painel genético amplo. A formulação dos testes baseados em DNA deve permitir o sequenciamento completo e exato do exon 14 e de seus introns flanqueantes. Novas mutações, particularmente aquelas que afetam regiões adjacentes aos locais de processamento, mas localizam-se mais profundamente nos introns, podem

requerer um ensaio baseado em RNA para a confirmação do salto do exon 14. Alternativamente, também podem ser inicialmente usados testes baseados em RNA que interrogam *MET* como parte de um painel genético amplo projetado para a avaliação abrangente de variantes estruturais ou expressão gênica.

A hibridação *in situ* por fluorescência tem sido tradicionalmente utilizada para detecção de amplificação gênica na prática clínica. Atualmente, não há diretrizes para o limiar de corte da positividade do *MET* em espécimes de câncer de pulmão. Usando a proporção *MET*:CEP7, a amplificação do *MET* tem sido classificada como baixa (≥ 1.8 a ≤ 2.2), intermediária (> 2.2 a < 5) e alta (≥ 5).¹³¹ Outros exemplos de critérios positivos para testar *MET* por FISH incluem 5 ou mais cópias de sinais *MET* por célula¹³² e uma proporção *MET*:CEP7 igual ou superior a 2 (PathVysion, Abbott Park, Illinois). Os níveis de amplificação de *MET* baixo e intermediário podem ocorrer em sincronia com outras mutações oncogênicas e rearranjos gênicos (*KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *ERBB2* [*HER2*], *ALK*, *ROS1*, *RET*) em até 63% dos carcinomas pulmonares.¹³³ No entanto, essa sobreposição não foi observada em tumores com níveis de amplificação alta de *MET* (proporção *MET*:CEP7 ≥ 5), sugerindo que a amplificação do *MET* é provavelmente um verdadeiro fator oncogênico.¹³³ Esse grupo de tumores com amplificação de nível alto demonstrou resposta ao crizotinib, enquanto nenhuma resposta foi observada em tumores com amplificação de nível baixo ou intermediário. É importante ressaltar que cerca de 20% dos adenocarcinomas de pulmão com mutações de salto no exon 14 do *MET* apresentam simultaneamente uma amplificação do *MET* de alto nível, confundindo a interpretação de cada um deles.^{125,126,129} Com relação à significância da amplificação isolada, relatos de casos mostraram resposta ao crizotinib.^{134,135}

Os mesmos desafios que existem para definir um limiar de corte de positividade da amplificação de *MET* clinicamente válido também existem no cenário da resistência adquirida aos inibidores tirosina quinase do *EGFR*. Um estudo de fase II recente mostrou uma taxa de resposta de 40% em pacientes com resistência adquirida a inibidor do *EGFR* e um número de cópias de *MET* de igual ou maior do que 5 quando submetidos a tratamento com combinação de gefitinib e capmatinib; não foi observada resposta no grupo com um número de cópias de *MET* inferior a 5.¹³⁶

A imuno-histoquímica para a expressão da proteína *MET* realizada em amostras de tecido fixadas em formol e incluídas em parafina tem sido o método mais frequentemente utilizado em amostras de câncer do pulmão. Há numerosos anticorpos monoclonais e policlonais comercialmente disponíveis dirigidos contra vários epítopos de *MET*, com diferentes sensibilidades e especificidades tanto para *MET* total e como para *MET* fosforilado. Os procedimentos de imuno-histoquímica e os critérios para avaliação do *MET* não foram padronizados. Como resultado, a superexpressão da proteína *MET* em casos não selecionados de NSCLC variou de 20% a 70%.^{137,138} Uma MA concluiu que a expressão do *MET* por IHQ é um fator prognóstico negativo em pacientes com NSCLC retirado cirurgicamente. Um anticorpo comercial frequentemente utilizado, particularmente em ensaios clínicos, é o anticorpo monoclonal primário de coelho anti-*MET* total CONFIRM (SP44, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) dirigido contra um epítipo membranoso e citoplasmático do *MET*.¹⁰⁹ No momento desta publicação, ainda não está claro se é a superexpressão total da proteína *MET* ou do *MET* fosforilado que representa um indicador confiável da ativação do *MET*. Nem o teste de IHQ nem o de FISH para *MET* são preditivos da eficácia do onartuzumab combinado ao erlotinib em pacientes com NSCLC avançado.¹¹⁶

Outros Genes - O espectro das alterações recorrentes no câncer de pulmão continua a evoluir, e diversas alterações promissoras que foram relatadas não foram incluídas nesta recomendação. Isso inclui as fusões envolvendo genes das famílias NTRK e FGFR, ambas as quais têm drogas-alvo experimentais com suporte de estudos *in vitro* e relatos de casos. As diretrizes não conseguem ser completamente atualizadas, e os profissionais que cuidam de pacientes com câncer de pulmão são aconselhados a manter-se a par destes e de outros desenvolvimentos. A Tabela 5 inclui uma lista de biomarcadores emergentes para testes moleculares em câncer de pulmão.

Pergunta 2: Quais métodos devem ser usados para realizar testes moleculares?

8. *Recomendação* - A imuno-histoquímica é uma alternativa equivalente ao FISH para o teste de *ALK*.

A força da evidência apoiando o uso da IHQ para testes de *ALK* foi adequada. Esta recomendação é baseada em evidências e foi apoiada por 20 estudos,^{61,111,139-156} compreendendo 6 PCSs,^{61,139,141-143,154} 3 PRCSS,^{140,146,155} e 11 RCSs.^{111, 144, 145, 147-153, 156} Dos 20 estudos, 19 usaram FISH como padrão de referência ao avaliar o potencial diagnóstico de IHQ.^{111,145,147-153,156} O outro estudo utilizou IHQ como padrão de referência e FISH como um índice.¹⁴⁴ Considerando os dados relatados como verdadeiro-positivos, falso-positivos, verdadeiro-negativos e falso-negativos em 14 estudos que usaram FISH como padrão de referência, uma MA foi feita para determinar a estimativa combinada de sensibilidade e especificidade para o teste *ALK* IHQ (Figura 2). Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Tabela 20). Consulte a Tabela 21 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso do ensaio IHC para o teste de *ALK*.

Quando a diretriz original foi elaborada, o único teste que tinha evidência de utilidade clínica em estudos prospectivos para selecionar pacientes para terapia com crizotinib era o teste de FISH de separação de sinais (*break-apart*) para *ALK*, que é interpretado como positivo se pelo menos 15% das células tumorais mostrarem sinais separados por uma distância de pelo menos dois diâmetros de um dos sinais ou mostrarem sinais isolados da sonda 3' (com perda da sonda 5'). O teste de *ALK* FISH pode ser tecnicamente difícil, particularmente em tumores que apresentem frequência de sinais positivos perto do ponto de corte de 15%. Os testes de FISH em geral são limitados pelo alto custo, pela necessidade de pessoal especializado para interpretação e pela disponibilidade reduzida de equipamento, espaço e pessoal treinado. No entanto, o teste de IHQ para *ALK* também pode mostrar variação na coloração entre anticorpos, protocolos e interpretação.

Por todas estas razões, diferentes tipos de ensaio foram propostos para a identificação de rearranjos no *ALK* em carcinomas de pulmão. Muitos estudos se concentraram na IHQ como um ensaio de triagem amplamente disponível e de custo eficiente. Em 2013, o teste de IHQ havia se mostrado comparável ao FISH em alguns estudos, mas variações significativas entre os anticorpos e métodos e a disponibilidade limitada de mercado de alguns dos anticorpos mais precisos impediram uma recomendação baseada em evidências naquele momento.

Em 2016, no entanto, numerosas publicações^{61,111,139-156} haviam estabelecido o desempenho técnico de vários ensaios de IHC para *ALK* e sua correlação com os resultados do FISH para *ALK*. Uma observação inicial importante foi de que a quantidade de expressão da proteína de fusão *ALK* em NSCLC era menor do que a encontrada no linfoma anaplásico de células grandes, do qual o gene recebeu seu nome e para o qual os primeiros anticorpos de IHQ foram desenvolvidos.¹⁵⁷ O anticorpo *ALK1* (monoclonal de camundongo anti-humano CD246, clone *ALK1*) normalmente usado para diagnosticar linfoma anaplásico de células grandes não identificou um número significativo de NSCLCs com *ALK* rearranjado usando técnicas padrão.^{140,158-161} Para superar esse problema, várias etapas técnicas foram introduzidas, como a amplificação por tiramida e os sistemas aprimorados de detecção baseados em polímeros. Apesar desses avanços e mesmo com o anticorpo *ALK1* tendo boa especificidade (91% -99%), a sensibilidade do teste ainda ficou baixa, variando de 67% a 100%, e em consequência o anticorpo *ALK1* não é recomendado para triagem de arranjos no *ALK* em carcinoma de pulmão.

Posteriormente, dois clones comercialmente disponíveis, o anticorpo monoclonal de camundongo 5A4 (Novocastra, Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois) e o anticorpo monoclonal de coelho D5F3 (Ventana), apresentaram sensibilidades e especificidades clinicamente aceitáveis quando comparados com os resultados do FISH para *ALK*, variando de 95% a 100%.^{61,111,139,141-156} Estudos também mostraram que

a expressão positiva da proteína *ALK* no teste IHQ se correlaciona com a resposta do tumor aos inibidores de *ALK* mesmo em casos negativos do FISH para *ALK*.¹⁶² Nos Estados Unidos, um ensaio usando o anticorpo D5F3 (Ventana) já foi aprovado pelo FDA para a seleção de pacientes com câncer de pulmão que devem receber tratamento com crizotinib.

Com base nas evidências publicadas com os anticorpos monoclonais 5A4 e D5F3, os ensaios de IHQ devidamente validados são uma alternativa equivalente ao FISH para *ALK*. Uma meta-análise que reuniu 14 estudos usando FISH como padrão de referência determinou uma sensibilidade combinada de 97% (IC 95%, 93% -98%) e uma especificidade combinada de 99% (IC 95%, 97%-100%) para o teste de IHQ para *ALK* tanto para o anticorpo 5A4 como para o D5F3 (Figura 2). O laboratório pode escolher qual anticorpo usar com base na precisão analítica, na sensibilidade clínica e na especificidade clínica de acordo com os padrões publicados. O teste de IHQ para *ALK* é uma alternativa aceitável ao FISH e as decisões de tratamento podem ser tomadas quando os resultados de IHQ são claramente positivos, como manifestada pela forte coloração citoplasmática granular com/sem acentuação da membrana, ou negativos. No entanto, a coloração fraca pode ser difícil de interpretar, e a especificidade da coloração fraca em relação ao FISH deve ser determinada em cada laboratório durante a validação. Casos esporádicos podem ser difíceis de interpretar devido à fixação/preservação heterogênea e/ou artefatos de coloração não específica, tais como coloração citoplasmática leve em macrófagos alveolares, células neurais, mucina extracelular, necrose e epitélio glandular. Nessas circunstâncias, os casos também devem ser testados por outro método validado (por exemplo, *ALK* FISH, RT-PCR, NGS).^{141,146}

Resultados discordantes entre os ensaios de FISH e IHQ para *ALK* foram descritos em raros casos. Casos *ALK* -negativos por IHQ foram relatados em associação com resultados *ALK*-positivos por FISH que tinham uma porcentagem baixa de células tumorais com rearranjo (15% -20%). Em casos com porcentagem baixa de núcleos positivos para rearranjo, os erros técnicos não podem ser excluídos com segurança. Estudos recentes sugerem que o padrão de FISH com deleção da sonda 5' pode mais comumente representar um resultado falso-positivo com resultados de IHQ discrepantes do que os casos com os sinais do FISH separados.¹⁶³⁻¹⁶⁵ É importante notar, entretanto, que os resultados clínicos em pacientes com resultados discrepantes de FISH e IHQ não mostraram um padrão consistente de superioridade de um método sobre o outro.^{156,166}

Embora no momento da redação desta diretriz os testes de RT-PCR e NGS não tenham sido aprovados pela agência FDA dos Estados Unidos como métodos de primeira linha para determinar o status de *ALK* na seleção de pacientes para terapia-alvo contra *ALK*, essas abordagens mostraram desempenho comparável com a IHQ¹⁶³⁻¹⁶⁵ quando programadas para detectar a maioria das fusões, e são prática padrão em muitos outros países.^{163-165,167} Esses métodos são altamente específicos para a maioria das fusões^{97,168,169} e pacientes com resultados positivos devem ser tratados com um inibidor do *ALK*, embora casos com resultados negativos possam se beneficiar de um método mais sensível para excluir a possibilidade de uma fusão variante. Da mesma forma, os ensaios de NGS com DNA baseados em amplicon também podem falhar na detecção de toda a gama das variantes de fusão e, portanto, uma abordagem de DNA ou RNA baseada em captura é preferida para detectar fusões em *ALK* por NGS. Os dados atuais ainda são muito limitados para desenvolver uma recomendação específica a favor ou contra o uso de NGS para detectar fusões de *ALK* como o único determinante de terapia com inibidor da tirosina quinase do *ALK*.

Sequenciamento de Última Geração.

9. *Opinião Consensual dos Especialistas* - Painéis de sequenciamento genético em multiplex são preferidos sobre vários testes com genes individuais além do *EGFR*, *ALK* e *ROS1* para identificar outras opções de tratamento,

A força da evidência é inadequada para apoiar o uso de painéis de sequenciamento genético multiplexados em comparação com testes de genes individuais. A declaração é baseada em evidências e

apoiada por 5 estudos,¹⁶⁹⁻¹⁷³ compreendendo um PCS,¹⁷² dois PRCs,^{171,173} e dois RCSs.^{169,170} Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (Tabela 22 do SDC). Consulte a Tabela 23 do SDC para um resumo das descobertas de estudos que apoiam o uso de painéis de sequenciamento genético multiplexados.

O rápido surgimento nos últimos tempos da chamada NGS, ou sequenciamento maciçamente paralelo, modificou consideravelmente a prática de diagnósticos moleculares no câncer de pulmão e em outros contextos. Essa tecnologia envolve a separação espacial de moléculas de DNA individuais de uma amostra, amplificação por PCR (com ou sem uma etapa precedente de captura por hibridização) de regiões pre-determinadas do genoma, e sequenciamento paralelo por síntese de cada uma das moléculas amplificadas de DNA em escala maciça, seguido pelo processamento de dados computacionais para recombinar e identificar as sequências e fornecer uma exibição digital das características genômicas de cada amostra. Essa tecnologia permite a avaliação sensível e específica de múltiplas regiões genômicas simultaneamente, até mesmo incluindo todo o genoma. Os recursos necessários para a implementação clínica do NGS são substanciais e os testes são complexos na formulação, desempenho e interpretação. Conseqüentemente, essa tecnologia não está implantada universalmente. No entanto, várias instituições acadêmicas e empresas privadas tem usado em grande escala essa tecnologia, que fornece um método relativamente eficiente em termos de DNA e de custo para a avaliação de mutações genéticas do câncer em comparação com as análises múltiplas de genes individuais. Na primeira diretriz, essa tecnologia era nova e não comprovada, mas agora está bem estabelecida. No início de 2017, foram publicadas diretrizes de prática profissional com relação à validação¹⁷⁴ e interpretação/relatório¹⁷ dos ensaios de NGS para câncer.

O NGS possibilita a avaliação simultânea dos três genes “obrigatórios” no câncer de pulmão - *EGFR*, *ALK*, *ROS1* - assim como de cada um dos genes sugeridos para inclusão em painéis abrangentes - *BRAF*, *RET*, *ERBB2 (HER2)*, *KRAS*, *MET* - e das centenas ou milhares de outros genes que podem ter papéis potenciais no desenvolvimento do câncer. Além das mutações pequenas, os ensaios de NGS são capazes de detectar fusões/rearranjos e alterações no número de cópias nos genes-alvo, se formulados com detectar essas alterações.

Numerosos estudos¹⁶⁹⁻¹⁷³ demonstraram excelente sensibilidade dos métodos de NGS em relação aos ensaios direcionados a gene individuais, particularmente nos casos de mutações por substituição de um único nucleotídeo. Os métodos NGS normalmente requerem menos DNA na entrada e podem acomodar amostras menores com concentrações mais baixas de células malignas e, embora normalmente sejam mais demorados do que um ensaio de gene único, muitas vezes podem ser realizados mais rapidamente em comparação a múltiplos ensaios seqüenciais de genes individuais.^{175,176} A redução da necessidade de repetir a biópsia é um benefício adicional do teste com painel.

Dois modelos básicos de ensaios NGS são usados em oncologia molecular: um baseado em amplicon e outro baseado em captura híbrida. Ambos os modelos geram uma “biblioteca” de moléculas de DNA amplificado que são seqüenciadas como moléculas individuais, usando uma das várias plataformas de sequenciamento. O sequenciamento por amplificação usa múltiplas reações de PCR para gerar a biblioteca, o que geralmente é mais fácil, mais rápido e capaz de detectar mutações em frequências alélicas mais baixas (isto é, populações subclonais). No entanto, é mais adequado para ensaios mais simples com menos genes, e normalmente é usado para análise de pontos-chave oncogênicos ou de pequenas regiões selecionadas em determinados genes de interesse. Em sua forma básica, não pode detectar fusões ou variações no número de cópias de maneira confiável. A maior sensibilidade analítica deste método o torna adequado para amostras muito pequenas ou heterogêneas. Métodos baseados em captura, ao contrário, usam a hibridação para gerar a biblioteca e são mais complexos e envolvem mais etapas, resultando em um tempo de conclusão mais longo, mas são melhores para analisar um conjunto

maior de genes ou regiões genômicas; apesar de que esses métodos geralmente são menos sensíveis em amostras pequenas ou altamente heterogêneas. Em geral, os métodos baseados em captura podem ser preferíveis para testes iniciais de amostras de câncer de pulmão, a fim de detectar rearranjos, como nos genes *ALK* e *ROS1*, bem como uma gama mais ampla de marcadores genéticos potenciais. Para monitorar a resistência clínica secundária (por exemplo, no *EGFR*), quando se necessita testar uma gama menor de mutações e pode-se preferir amostras menores ou mais heterogêneas, o sequenciamento do amplicon pode ser preferido. No entanto, qualquer um dos métodos pode ser projetado e executado com êxito para qualquer uma das aplicações.

10. Opinião Consensual dos Especialistas - Os laboratórios devem garantir que resultados dos testes que são inesperados, discordantes, ambíguos ou de baixa confiança sejam confirmados ou resolvidos usando um método ou uma amostra alternativa.

A força da evidência que apoia o uso rotineiro de métodos ortogonais para confirmar resultados para qualquer um dos marcadores moleculares é insuficiente. No entanto, nossa opinião é de que a boa prática laboratorial para alterações somáticas seja realizar testes confirmatórios para resultados incomuns, sub-ótimos ou inconsistentes com outros achados laboratoriais ou informações clínicas.

Todos os ensaios devem ser devidamente validados antes de serem oferecidos para uso clínico. Isso normalmente inclui uma avaliação de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, além de outras características de desempenho, conforme exigido pela maioria das autoridades responsáveis por certificação de laboratórios. As características de desempenho dos ensaios baseados em sequenciamento podem ser prontamente determinadas para as alterações mais comuns. A confiabilidade de mutações encontradas raramente ou de categorias específicas de alterações cromossômicas pode ser mais desafiadora para documentar, e laboratórios que usam essas tecnologias devem ter procedimentos para verificar quaisquer resultados que sejam inesperados, discordantes com outros resultados, ou que tragam dúvidas ou comprometimento da confiança, a fim de fornecer um resultado ideal para o tratamento do paciente e para entender melhor as limitações intrínsecas do ensaio. A corroboração dos resultados questionáveis pode ser obtida pela avaliação de outro espécime da mesma lesão, por teste confirmatório em outro laboratório, ou por avaliação utilizando uma metodologia ortogonal.

Pergunta 3: O Teste Molecular é Adequado para Cânceres Pulmonares Que Não Têm um Componente de Adenocarcinoma?

11. Opinião Consensual dos Especialistas - Os médicos podem usar testes de biomarcadores moleculares em tumores com outras histologias além do adenocarcinoma, quando os aspectos clínicos indicarem uma maior probabilidade de ocorrência de oncogenes-chave.

A força da evidência que apoia o uso de testes de biomarcadores moleculares em câncer de pulmão que não possuem um componente de adenocarcinoma é insuficiente. Esta declaração é baseada na opinião consensual de especialistas.

Após uma revisão sistemática, nenhuma evidência nova apoiou o uso de teste molecular de rotina envolvendo quaisquer genes para casos de carcinoma espinocelular típico, carcinoma de pequenas células ou outros tumores de pulmão neuroendócrinos. Embora pequenos estudos tenham relatado mutações raras do *EGFR* em biópsias de carcinoma espinocelular, estas podem ter representado uma amostragem parcial de cânceres adenoescamosos e não foram verificadas em amostras cirúrgicas com histologia escamosa confirmada.¹⁷⁷ Evidências de estudos bem controlados e com forte poder de conclusão (*well-powered*), apoiando a utilidade clínica do teste molecular de câncer de pulmão para a seleção de terapias-alvo, permanecem confinadas a carcinomas pulmonares de células não-pequenas e não-escamosas, predominantemente adenocarcinomas ou cânceres mistos com um componente de adenocarcinoma. No entanto, a dependência estrita da histologia de adenocarcinoma pode ocasionalmente excluir alguns

pacientes que não têm diagnóstico definitivo de adenocarcinoma (por exemplo, carcinoma pulmonar de células não-pequenas sem outra especificação) e poderiam se beneficiar de terapia-alvo, particularmente nos casos de pequenas biópsias que só amostram parcialmente um tumor maior. Embora mutações acionáveis tenham sido relatadas em biópsias com histologia de não-adenocarcinoma e não-pequenas células, a frequência de tais achados é baixa o suficiente para que não seja recomendado testar todas as pequenas amostras de biópsia com histologia de não-adenocarcinoma. Nesse contexto, o teste molecular é apropriado para o câncer de pulmão com histologia de células não-pequenas além do adenocarcinoma quando as características clínicas são atípicas e/ou consistentes com uma maior probabilidade de mutação-alvo.

Entre os fatores clínicos que podem indicar uma maior probabilidade de um fator oncogênico acionável no contexto de uma histologia de não-adenocarcinoma, os mais relevantes são a idade jovem e a ausência de exposição ao tabaco. Nas histologias de células não-pequenas e não-adenocarcinoma, o achado de alterações de *EGFR*, *ALK* ou *ROS1* tem sido mais comumente relatado em situações em que os pacientes não tinham qualquer história ou tinham uma história mínima de exposição ao tabaco (1 a 10 maços por ano).^{30,159-161,178-214} Assim, no espectro dos carcinomas pulmonares, a exposição leve ou ausente ao tabaco deve ser uma justificativa suficiente para suportar a realização do teste, independentemente da metodologia de amostragem ou da exaustividade de exclusão de componente com adenocarcinoma.

Da mesma forma, alguns estudos sugeriram associações entre a presença de alterações em *ALK* ou *ROS1* e a idade mais jovem do paciente.^{30,35,181,215,216} Embora outros estudos tenham indicado que esses achados podem refletir um viés de teste,²¹⁷ a documentação de uma associação entre a idade mais jovem do paciente e um biomarcador acionável é outra consideração na seleção de pacientes para teste. O limite de idade entre jovens e não-jovens, no entanto, não está bem definido, e um ponto de corte claro baseado em evidências não pode ser estabelecido para essa diretriz. A revisão sistemática da diretriz original (2013) demonstrou que pacientes com adenocarcinoma com mutações do *EGFR* tinham uma média de idade significativamente menor do que pacientes sem mutações (56 versus 63, $P = 0,03$), embora a diferença na média de idade para pacientes com e sem fusões não tenha sido significativa (60 versus 66), nem a diferença nas idades médias dos pacientes com e sem fusões de *ROS1* desta revisão (65 versus 62). Além disso, a diferença nas médias não captura completamente a distribuição das idades e, conseqüentemente, a sensibilidade e especificidade de qualquer limite específico de idade. Na ausência de publicação de evidências, nossa opinião é que uma estratégia razoável seria testar os pacientes com histologia de não-adenocarcinoma com menos de 50 anos.

É importante ressaltar que os algoritmos de teste reflexivos iniciados e/ou gerenciados por patologistas precisam acomodar os meandros do manejo clínico, o que pode ser um desafio, já que frequentemente não há suficientes informações clínicas disponíveis para os patologistas incorporarem em sua avaliação. O estabelecimento de um programa para o teste molecular reflexivo de amostras de câncer de pulmão deve ser uma decisão institucional e deve incluir um diálogo aberto entre patologistas e a equipe de oncologia, a fim de implementar uma estratégia ideal. Uma vez que essas práticas sejam estabelecidas pela equipe, é razoável que o teste reflexivo seja iniciado pelo patologista.

Por fim, no contexto do uso crescente de testes baseados em painéis/NGS, pode se tornar desnecessário identificar os analitos de interesse específicos em situações clínicas específicas. Ao invés, poderia ser melhor identificar as situações clínicas nas quais os testes baseados em painel gênico seriam benéficos.

Pergunta 4: Quais Testes São Indicados para Pacientes Com Mutações-Alvo Que Sofreram Recaída em Terapia-Alvo?

12. *Recomendação Forte* - Em pacientes com adenocarcinoma de pulmão que apresentam mutações sensibilizadoras do *EGFR*, e que progrediram após tratamento com um inibidor da tirosina-quinase (TKI) direcionado ao *EGFR*, deve ser usado o teste para mutação T790M no *EGFR* para guiar a seleção de tratamento com inibidores de *EGFR* de terceira geração.

A força da evidência foi adequada para apoiar o uso do teste para mutação T790M no *EGFR* ao selecionar pacientes para a terapia de terceira geração dirigida ao *EGFR*. Esta recomendação é baseada em evidências e apoiada por 5 estudos,²¹⁸⁻²²² incluindo uma MA,²²² dois ensaios clínicos não randomizados de fase I de braço único,^{220,221} um PCS,²¹⁹ e um RCS.²¹⁸ Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Tabela 24). Consulte a Tabela 25 do SDC para um resumo dos resultados dos estudos que apoiam o uso do teste para mutação T790M no *EGFR* ao selecionar pacientes para a terapia-alvo ao *EGFR* de terceira geração.

13. *Recomendação* - Os laboratórios que testam a mutação T790M no *EGFR* em pacientes com resistência clínica secundária aos inibidores da quinase do *EGFR* devem empregar ensaios capazes de detectar essas mutações quando presentes em pelo menos 5% dos alelos do *EGFR*.

A força da evidência que apoia esta recomendação é insuficiente. Esta recomendação baseia-se na sensibilidade analítica do ensaio de PCR em tempo real para o alelo específico que foi utilizado nos ensaios clínicos que estabeleceram a utilidade dos inibidores de *EGFR* de terceira geração que tinham como alvo a proteína mutante T790M.

O principal mecanismo de resistência clínica secundária à primeira geração de TKIs do *EGFR*, erlotinib e gefitinib, é o desenvolvimento da mutação T790M no mesmo alelo do *EGFR* que abriga a mutação original de sensibilização, o que bloqueia a inibição da proteína mutante por esses TKIs. A detecção da mutação T790M no *EGFR* neste cenário se tornou clinicamente necessária devido ao desenvolvimento de TKIs de terceira geração contra o *EGFR*, como o osimertinib, que são ativos na presença dessa mutação.^{223,224} No entanto, apesar de respostas raras terem sido descritas aos inibidores de terceira geração em pacientes negativos para a mutação T790M no *EGFR*,²²⁵ esses casos podem apresentar outros mecanismos de resistência, como a amplificação de *MET* ou *ERBB2*^{90,114,226}, que podem ser mais eficazmente visados por outros agentes. Portanto, para determinar a terapia apropriada no contexto de resistência clínica secundária a um inibidor de *EGFR* é necessário saber se a mutação T790M está presente ou ausente.

É importante ressaltar que os mecanismos genéticos da resistência clínica secundária surgem de forma subclonal porque conferem resistência à subpopulação de células nas quais estão presentes, e esse subclone se expande gradualmente sob a pressão seletiva do *EGFR* TKI. Estudos experimentais mostraram que a presença da mutação T790M no *EGFR* em pequena proporção (apenas 5%) de uma população de células tumorais volumosa, muitas vezes indetectável pelo sequenciamento de Sanger, pode levar ao aumento do crescimento tumoral apesar do tratamento com *EGFR* TKI.^{225,227} A detecção torna-se ainda mais difícil quando as biópsias contêm uma alta proporção de células não-tumorais. Essas considerações nos levam a recomendar que os laboratórios tenham disponível um teste de alta sensibilidade para a detecção da mutação T790M no *EGFR* em biópsias pós-tratamento de pacientes que demonstram progressão ou recidiva após uma resposta inicial ao *EGFR* TKI.

Os ensaios clínicos^{221,228-230} que estabeleceram a utilidade clínica do teste T790M na previsão da resposta ao osimertinib usaram um ensaio comercial de PCR em tempo real específico para o alelo, com um limite inferior de detecção de 5% do alelo mutante.²³¹ Vários estudos^{232,233} mostraram sensibilidade analítica comparável, ou até superior, com a técnica de PCR digital por gota, e os métodos de NGS^{234,235} também podem fornecer esse nível de sensibilidade, se formulados apropriadamente. É importante, no entanto, reconhecer que o sequenciamento Sanger não-modificado, que era um método aceitável na

diretriz original de 2013,¹ não fornece sensibilidade adequada para essa aplicação. Independentemente do método escolhido, uma validação cuidadosa deve ser realizada para estabelecer a sensibilidade apropriada.

Finalmente, deve-se notar que há estudos em andamento para avaliar a importância desses inibidores de *EGFR* de terceira geração como tratamento de primeira linha do adenocarcinoma de pulmão com mutação no *EGFR*.^{220,221,236} Estão surgindo dados²³⁷ mostrando que uma segunda mutação de resistência adquirida, a C797S, pode aparecer em tumores que progrediram após o tratamento com osimertinib para a doença de T790M, contudo estes casos até agora são raros e esta mutação é pouco estudada e não é atualmente tratável, portanto o teste para C797S não é recomendado para tratamento de rotina neste momento.

14. Sem Recomendação - Atualmente, não há evidências suficientes para apoiar uma recomendação a favor ou contra o teste de rotina para o status mutacional da *ALK* em pacientes com adenocarcinoma pulmonar com mutações sensitivas do *ALK* que progrediram após o tratamento com um TKI direcionado para *ALK*.

As evidências foram insuficientes para formar uma recomendação sobre a associação entre a descoberta de resistência secundária ao *ALK* no pré-tratamento ou re-biópsia e as respostas clínicas.

Vários grupos relataram um conjunto diverso de mutações secundárias no *ALK* que conferem resistência adquirida ao crizotinib (por exemplo, L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, L1198P, D1203N e G1269A).²³⁸ Outras mutações adquiridas também foram descritas para inibidores de segunda linha do *ALK* (G1202R, G1202del, V1180L, S1206Y, E1201K).

No entanto, embora alguns estudos²³⁸ tenham sugerido que diferentes mutações secundárias do *ALK* podem mostrar sensibilidade ou resistência aos diferentes inibidores do *ALK*, esses dados ainda são limitados e insuficientes para orientar a seleção do tratamento no contexto de resistência adquirida. Além disso, os inibidores do *ALK* de segunda geração também mostram atividade em NSCLC sem mutações de resistência ao *ALK*, sugerindo que uma proporção significativa dos carcinomas pulmonares com *ALK* rearranjado torna-se resistente ao crizotinib devido à supressão inadequada do *ALK*. Assim, a prática atual é administrar um dos vários inibidores de *ALK* de segunda geração (ceritinib, brigatinib, lorlatinib e alectinib) que receberam aprovação do FDA para o tratamento de NSCLC com rearranjo no *ALK* que seja refratário ao crizotinib, sem testar para mutações secundárias de *ALK*. À medida que mais pacientes experimentam resistência e recebem inibidores de segunda geração, antecipamos a maturação dos dados para fortalecer a associação entre mutação secundária e sensibilidade/resistência aos diferentes inibidores.

Contudo, por enquanto, acreditamos que não há utilidade clínica suficiente para justificar testes de rotina para mutações secundárias do *ALK* em pacientes que progrediram após a resposta inicial a um inibidor do *ALK*.

Questão 5: Qual é a Importância do Teste em DNA Circulante (cfDNA, *cell free DNA*) para Pacientes com Câncer de Pulmão?

Vários estudos recentes demonstraram que as células de câncer de pulmão liberam seu DNA na circulação em níveis detectáveis por várias tecnologias modernas, como a técnica de PCR digital por gota, PCR para alelo específico e NGS. Este evento permite testar, pelo menos em alguns casos, o cfDNA em plasma obtido a partir de amostras de sangue periférico como uma alternativa a uma amostra de biópsia, para identificar mutações que ocorrem no câncer de pulmão, tanto ao diagnóstico como durante o curso da doença.

Uma vantagem teórica destes ensaios é a derivação do DNA tumoral circulante a partir de múltiplos locais de doença e, assim, ele pode representar uma avaliação integrada de todos os locais de doença. Embora não seja formalmente comprovada, esta vantagem potencial do cfDNA é particularmente

importante no cenário de resistência clínica secundária,²³⁶ por permitir a amostragem ampla de diferentes subclones tumorais.^{232,240,241}

Os métodos analíticos para DNA circulante têm alta especificidade analítica, com taxas de falso-positivos muito baixas (<5% -20%),^{232,234,235,242,243} de modo que a demonstração de uma mutação no contexto clínico adequado pode ser usada para guiar o tratamento com um inibidor-alvo. No entanto, a sensibilidade da análise de cfDNA é menor (60% -70%),^{232,234,235,242,243} de forma que a ausência do achado de mutação não exclui a possibilidade de que exista uma mutação.

Também é importante entender que, apesar da promessa proporcionada por esta tecnologia, pouco ainda é conhecido sobre a dinâmica da liberação de DNA das células cancerígenas. Fatores que aumentam ou diminuem a liberação de DNA das células, sua meia-vida em circulação e os mecanismos de eliminação, são pouco compreendidos.²⁴⁴⁻²⁴⁶ Há, no entanto, uma correlação global entre a carga da doença (volume e número de locais metastáticos) e a prevalência de mutações no cfDNA.

Finalmente, outros métodos de análise podem ser aplicados às amostras de sangue. Células tumorais circulantes podem ser isoladas do sangue, assim como exossomos portadores de DNA que foram liberados pelas células cancerígenas. A análise desses dois últimos tipos de amostras é mais desafiadora tecnicamente, e não foi suficientemente estudada no câncer de pulmão para justificar a consideração nesta diretriz. Da mesma forma, estão surgindo dados em relação à análise do cfDNA em outros fluidos corporais, particularmente na urina, mas esses são igualmente insuficientes para justificar uma recomendação no momento. A maioria dos dados gerados até agora e o tema dos comentários que se seguem aplicam-se ao cfDNA de plasma.

15. Sem Recomendação - Atualmente, não há evidências suficientes para apoiar o uso de métodos moleculares no cfDNA circulante plasmáticos para estabelecer um diagnóstico primário de adenocarcinoma pulmonar.

A evidência foi insuficiente para formar uma recomendação sobre o uso de cfDNA para o diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar primário.

Em teoria, como as mutações de sensibilização no *EGFR* são alterações características e específicas nos cânceres de pulmão, pode-se questionar se a combinação de um resultado de cfDNA mostrando tal mutação em um contexto clínico apropriado, com evidência radiográfica de lesão pulmonar, poderia permitir o diagnóstico de câncer de pulmão com *EGFR*-mutante sem a necessidade de diagnóstico anatomo-patológico. Entretanto, nenhum estudo na literatura médica avaliou rigorosamente essa abordagem de maneira prospectiva.

16. Recomendação - Em algumas situações clínicas nas quais o tecido é limitado e/ou insuficiente para testes moleculares, os médicos podem usar um ensaio em cfDNA para identificar as mutações do *EGFR*.

A força da evidência que apoia o uso de cfDNA para determinar o status de mutação do *EGFR* em situações onde o tecido é limitado ou insuficiente é adequada. Esta recomendação é baseada em evidências e apoiada por 6 estudos,^{232, 234, 235, 242, 243, 247} compreendendo dois MAs,^{243,247} dois PCSs,^{235,242} e dois PRCSs.^{232,234} Os estudos identificados usaram vários métodos de detecção do *EGFR*, mas todos verificaram os resultados do cfDNA com resultados de tecido tumoral. Usando dados classificados como verdadeiro-positivos, falso-positivos, verdadeiro-negativos e falso-negativos relatados em 4 estudos, uma metanálise foi conduzida para determinar a estimativa combinada de sensibilidade e especificidade para detecção de mutação do *EGFR* em cfDNA (Figura 3). Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Tabela 26). Consulte a Tabela 27 do SDC para um resumo das descobertas nos

estudos que apoiam o uso do cfDNA para determinar o status mutacional do *EGFR* em situações em que o tecido é limitado ou insuficiente.

A análise do cfDNA para mutações do *EGFR* no adenocarcinoma de pulmão tem sensibilidade intermediária (66,4%; IC95%, 62,7% - 69,9%) e alta especificidade (95,6%; IC95%, 83,3% - 99,0%) (Figura 3). Em algumas situações clínicas nas quais o material de biópsia do tecido não está disponível ou é insuficiente e a re-aquisição do tecido não é viável, de modo que uma análise do *EGFR* baseada em tecido não pode ser realizada, então um teste para uma mutação ativadora do *EGFR* pode ser conduzido no cfDNA como um procedimento alternativo de diagnóstico molecular. Como a sensibilidade deste ensaio é inferior a 80% em todos os relatos, deve-se reconhecer que nem todos os pacientes com adenocarcinoma pulmonar que sejam positivos para mutação de *EGFR* terão a mutação detectada em seu cfDNA, de modo que um resultado negativo da análise cfDNA não é evidência confiável de que não haja uma mutação do *EGFR* no câncer de um determinado paciente. Nesse contexto, os médicos devem renovar esforços para obter uma amostra de tecido adequada para análise.

17. Opinião Consensual de Especialistas - Os médicos podem usar métodos plasmáticos de cfDNA para identificar as mutações T790M no *EGFR* em pacientes com adenocarcinoma pulmonar com progressão ou resistência clínica secundária aos TKIs direcionados ao *EGFR*. Recomenda-se testar amostras tumorais se o resultado no plasma for negativo.

A força da evidência que apoia o uso de métodos em cfDNA para identificar a mutação T790M no *EGFR* é inadequada. Esta declaração é baseada em evidências e apoiada por 4 estudos,^{233,236,248,249} compreendendo dois PCSs^{233,236} e dois RCSs.^{248,249} Todos os estudos incluídos foram avaliados quanto à qualidade e em nenhum foram encontradas falhas metodológicas que levantassem suspeitas sobre os seus resultados (SDC Table 28). Consulte a Tabela 29 do SDC para um resumo dos resultados de estudos que apoiam o uso de métodos cfDNA para identificar a mutação T790M do *EGFR*.

O teste molecular para mutação T790M no *EGFR* deve ser realizado em pacientes com adenocarcinoma de pulmão com mutações de *EGFR* sensibilizadoras cuja doença progrida ou que mostrem resistência clínica secundária aos TKIs do *EGFR*. Esse teste é particularmente apropriado porque os inibidores do *EGFR* de terceira geração (por exemplo, osimertinib) têm um benefício significativo para os cânceres com a mutação T790M²²¹ e foram aprovados para essa indicação pelas autoridades de saúde em todo o mundo. A análise do cfDNA ou a análise de uma nova biópsia de tecido é apropriada para a detecção do T790M no *EGFR*. O DNA circulante pode ser preferido para pacientes que não querem ou não podem se submeter a uma biópsia no momento da progressão. Além disso, como a progressão pode representar processos subclonais, o teste no cfDNA pode representar uma amostragem mais global da doença em comparação com uma biópsia tecidual. No entanto, a análise de cfDNA para T790M no *EGFR* possui sensibilidade intermediária (0,40–0,78) e especificidade alta.^{233,236,248,249} Assim, um resultado negativo não descarta a possibilidade de que a mutação T790M no *EGFR* seja o mecanismo de resistência à terapia com TKI e uma nova biópsia de tecido um local de doença progressiva deve ser considerada se o resultado do cfDNA for negativo.

Observe que as mutações T790M adquiridas são frequentemente subclonais, e uma amostra de cfDNA pode apresentar a mutação sensível de *EGFR* original (por exemplo, L858R) mas ter um resultado falso-negativo para a T790M, exigindo uma amostra de tecido ou citologia para confirmação. Implícito nisso é o benefício de incluir no ensaio a mutação de sensibilização original (por exemplo, deleção do exon 19, L858R) para confirmar que o DNA do tumor está sendo liberado na circulação, embora isso possa não ser prático para mutações de sensibilização menos comuns. Por outro lado, devido à alta especificidade do cfDNA, um achado positivo de T790M em cfDNA é equivalente a um achado de biópsia tecidual de T790M,²³⁶ e pode ser usado para guiar a terapia com osimertinib.

18. *Sem Recomendação* - Atualmente, não há evidências suficientes para apoiar o uso de análise molecular em células tumorais circulantes para o diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar primário, para a identificação de mutações no *EGFR* ou outras, ou para a identificação de mutações T790M no *EGFR* no momento da resistência ao TKI do *EGFR*.

A evidência foi insuficiente para formar uma recomendação sobre o uso de células tumorais circulantes para o diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar primário.

Qual é a Importância de Testar Pacientes a Serem Selecionados para Tratamento com Terapias Imunomoduladoras?

Opinião - Deve-se preservar tecido para permitir testes para terapias imunomoduladoras.

Evidência – Será assunto de futura diretriz.

A imunoterapia no câncer de pulmão evoluiu rapidamente desde a publicação da última diretriz e se tornou parte do padrão de tratamento para muitos pacientes com NSCLC avançado. Estudos recentes²⁵⁰⁻²⁵⁴ mostraram benefícios significativos em um subgrupo de pacientes com câncer de pulmão avançado quando tratados com esses agentes. Agências reguladoras governamentais aprovaram terapias imunomoduladoras como agentes de segunda linha para pacientes com câncer de pulmão avançado,²⁵⁵⁻²⁵⁷ bem como terapia de primeira linha para pacientes com alto nível de expressão de PD-L1 e ausência de mutações sensibilizadoras no *EGFR* ou rearranjos no *ALK*. Para alguns desses agentes, a seleção de pacientes com diagnóstico molecular acompanhante é necessária,²⁵⁸ para outros, um diagnóstico complementar é recomendado,²⁵⁹⁻²⁶¹ e, para alguns, não há indicação de biomarcador. Os possíveis biomarcadores para prever a resposta a esses agentes e os métodos usados para avaliá-los são variados e ainda não foram padronizados.

O fundamento das terapias imunomoduladoras apoia-se na sua capacidade de interromper a sinalização inibidora entre as células tumorais e as células imunológicas (tipicamente as células T), que ocorre quando as células tumorais expressam proteínas que induzem tolerância imunológica e impedem o sistema imunológico de atacar o tumor. Normalmente, esse mecanismo é usado para controlar a resposta imune e prevenir as doenças autoimunes. Existem vários desses processos de sinalização inibitória, embora o maior progresso na terapia clínica no câncer de pulmão envolva a interação entre o PD-L1 nas células tumorais e o receptor de morte programada-1 (PD-1) nas células T. Essa interação efetivamente silencia a resposta das células T a um tumor. Ao bloquear a PD-1 com os chamados inibidores do ponto de verificação (*checkpoint*) imunológico, as células T tornam-se capazes de reconhecer e responder aos antígenos estranhos apresentados nas células cancerosas.

Como a maioria das células de câncer de pulmão contém numerosas mutações além de seus fatores oncogênicos, elas normalmente expressam um grande número de proteínas mutantes, algumas das quais podem ser reconhecidas na superfície celular por moléculas de antígeno leucocitário humano como neoantígenos “estranhos”. Quanto mais mutações existirem em uma célula, provavelmente mais neoantígenos serão expressos, e é mais provável que o sistema imunológico destrua essas células, desde que os mecanismos de tolerância como PD-L1/PD-1 não estejam ativados. A expressão de PD-L1 por células tumorais (ou macrófagos locais), a expressão de PD-1 por linfócitos infiltrantes de tumor, o número de mutações e de neoantígenos e a evidência de um infiltrado imunológico (“tumor inflamado”) são todos marcadores candidatos a prever uma resposta a esses tratamentos. Outras vias de sinalização inibitória também podem estar envolvidas, como a interação entre a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e CD80/86, que é o alvo do ipilimumab, um agente imunomodulador tipicamente administrado a pacientes com melanoma.

Os resultados do tratamento com esses agentes tem sido impressionantes,²⁵⁰⁻²⁵⁴ com alguns pacientes apresentando respostas duráveis por anos. No entanto, ao contrário das terapias-alvo, a

frequência com que os pacientes respondem, mesmo em populações selecionadas por biomarcadores, está ao redor de 20% a 30% na segunda linha e de 50% na primeira linha (contra 80% nas terapias-alvo),²⁵²⁻²⁵⁴ embora a resposta radiográfica possa não ser o melhor indicador de eficácia de uma terapia imunomoduladora devido ao impacto da inflamação ativa no tamanho de um tumor, conforme avaliado por exames padrões de imagem. Nesse aspecto, são necessários melhores biomarcadores, pois os biomarcadores diagnósticos acompanhantes não atendem plenamente à necessidade clínica de determinar, com sensibilidade e especificidade, quem deveria receber esses medicamentos. Complicando ainda mais o cenário, há uma multiplicidade de diferentes biomarcadores, com diferentes metodologias desenvolvidas em paralelo por empresas concorrentes para drogas concorrentes, de tal forma que não existe uma mensagem clara, baseada em evidências, de quais biomarcadores devem ser testados ou como testá-los. Há estudos em andamento para comparar uma variedade de marcadores candidatos e para tentar harmonizar diferentes ensaios visando cada biomarcador (por exemplo, diferentes métodos de IHQ para PD-L1).

Devido à falta de evidências fortes que apoiem metodologias ou agentes específicos, nesta diretriz não podemos fazer recomendações baseadas em evidências sobre os testes para essas drogas. Uma diretriz prática subsequente está sendo planejada para focar especificamente na avaliação baseada em evidências dos métodos para selecionar os pacientes para receber terapias imunomoduladoras.

Apesar da exclusão desta questão da nossa revisão sistemática da literatura, é nossa opinião que as amostras devem ser preservadas para avaliação de biomarcadores que prevejam resposta a terapias imunomoduladoras, de acordo com os requisitos de aprovação dos medicamentos em consideração. Importante, muitas vezes a área ideal de um tumor para esta aplicação é diferente da área ideal do tumor requerida para o teste molecular. Para o teste molecular, especialmente para o sequenciamento, uma amostra ideal de câncer é quase “toda câncer”, com pouco estroma ou inflamação adjacente ou dentro do tumor. A avaliação de biomarcadores para terapias imunomoduladoras, teoricamente, deve ser realizada em uma seção de tumor contendo estroma adjacente e intratumoral, particularmente se rico em células T infiltrantes. No entanto, não há recomendações de diretrizes e isso não foi estudado prospectivamente. Foi demonstrado que a resposta a alguns fármacos²⁵⁰ associa-se mais à natureza das células inflamatórias dentro de um tumor do que às próprias células do tumor. É essencial que os patologistas cirúrgicos e os laboratórios de histologia entendam essa distinção, com as implicações operacionais de precisar, potencialmente, identificar e cortar duas áreas de cada tumor (uma para testes moleculares, e outra para a avaliação por IHQ das moléculas imuno-reguladoras).

Na maioria das aplicações a análise necessária é IHQ para PD-L1, embora os anticorpos específicos, os protocolos de coloração utilizados, e os critérios interpretativos variem para diferentes tratamentos. Outros candidatos a biomarcadores de IHQ podem ser necessários, no entanto, bem como a caracterização de populações de células reativas dentro de um tumor. A validade e a utilidade potencial dos cálculos de carga mutacional (mutações/par de bases da sequência genômica total) avaliada pelos painéis NGS estão sendo exploradas como um biomarcador investigacional, assim como algoritmos de predição de neoantígenos derivados de dados de sequenciamento de todo o exoma.

CONCLUSÕES

A importância do diagnóstico molecular para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão continua a aumentar em ritmo acelerado. Muitas das recomendações da diretriz para a prática clínica que foram publicadas em 2013 já tinham sido objetos de reconsideração em 2015. Da mesma forma, essa diretriz provavelmente precisará de revisão em um período de tempo relativamente curto. Quando se apoia em estudos prospectivos publicados como base para recomendações práticas, se estará sempre atrasado em relação às descobertas mais recentes e ao avanço do tratamento, que estão sendo apresentados nas

reuniões das sociedades profissionais. Os profissionais correntemente em prática, e os que fazem as recomendações como nós, enfrentam o difícil desafio de equilibrar a oncologia de precisão, a noção de que cada paciente tem uma combinação única de fatores que devem ser incorporados na determinação de planos de tratamento individuais, com a medicina baseada em evidências, a noção de que as decisões de tratamento adequadas devem ser baseadas em estudos de intervenção volumosos em pacientes que por outro lado tem as mesmas características. Acrescentando a isso, os tamanhos das populações submetidas análises genômicas em grande escala são hoje cada vez menores, o que torna excepcionalmente difícil o planejamento de estudos de grande porte que sejam controlados e efetivos. Quando uma resposta clínica dramática é encontrada em 0,5% dos pacientes com uma condição - até mesmo uma condição comum como o câncer de pulmão - como vamos recrutar pacientes em número suficiente para estudar e provar que a resposta dramática é uma verdade geral que deve mudar a prática, e como decidimos que todos pacientes no mundo deveriam fazer um teste que pode determinar se eles estão incluídos nesses 0,5%?

Atualizamos as recomendações de 2013 para reconhecer as mudanças que ultrapassaram esse limite - a importância de testar para *ROSI*, o valor do teste de IHQ para *ALK* e a importância de testar as mutações T790M em pacientes que progridem com terapia anti-*EGFR*. Além disso, apresentamos as alterações moleculares emergentes e promissoras que estão “um passo abaixo” – as alterações em *BRAF*, *MET*, *ERBB2 (HER2)* e *RET* - que antecipamos ultrapassarão este nível em pouco tempo, e que acreditamos devem ser incluídos nas análises mais detalhadas que são possíveis devido ao surgimento da tecnologia NGS. Também vemos a promessa e os resultados obtidos com terapias imunomoduladoras e aguardamos a revisão sistemática que será realizada para identificar e recomendar as melhores práticas para selecionar pacientes para essas terapias. Esperamos ansiosos a evolução contínua no diagnóstico e cuidados com os pacientes com câncer de pulmão à medida que a tecnologia, a compreensão científica e a prática clínica evoluam.

Os autores agradecem aos seguintes membros do painel consultivo: Timothy Craig Allen, MD, JD, Julia A. Ponte, MD, Lukas Bubendorf, MD, Paul Bunn, MD, Federico Cappuzzo, MD, Edmund S. Cibas, MD, Dhananjay A. Chitale, MD, Marileila Varella Garcia, PhD, A. John Iafrate, MD, PhD, Pasi A. Janne, MD, PhD, Mark G. Kris, MD, Antonio Marchetti, MD, PhD, Tetsuya Mitsudomi, MD, PhD, Tony. Mok, MD Marina Nikiforova, MD Suresh Ramalingam, MD Natasha Rekhtman, MD, PhD, Charles Powell, MD Juan-Sebastian Saldivar, MD . Yi-Long Wu, MD David Yankelevitz, MD, aos defensora dos pacientes, Bonnie J Addario e Kim Norris, BA, pela revisão das principais perguntas, recomendações e rascunhos do manuscrito; e Lisa A. Fatheree, SCT (ASCP), Pia Hirsch, Mrudula Pullambhatla, MS, e Mary Steele Williams, MNA, MT (ASCP) SM, CAE, pelo apoio durante todo o processo de desenvolvimento da diretriz.

Referências

Legendas das Figuras

Figura 1 - Gráfico de sensibilidade e especificidade para a determinação imuno-histoquímica (IHQ) da positividade do rearranjo de *ROSI* comparada com a hibridização in situ por fluorescência. Estimativa combinada de sensibilidade e especificidade com base na análise bivariada dos estudos incluídos. Todos os estudos incluídos utilizaram uma intensidade de coloração IHQ de pelo menos 2+ com anticorpo D4D6 para definir a positividade do rearranjo de *ROSI*. Abreviações: FN, falso-negativo; FP, falso-positivo; TN, verdadeiro-negativo; TP, verdadeiro-positivo.

Figura 2. Gráfico de sensibilidade e especificidade para determinação baseada em imuno-histoquímica da positividade da rearranjo de *ALK* em comparação com a hibridização in situ por fluorescência.

Estimativa combinada de sensibilidade e especificidade com base na análise bivariada dos estudos incluídos. Os estudos incluídos avaliaram os anticorpos 5A4, D5F3, ou uma combinação de 5A4 e D5F3, com pontos de corte de positividade baseados na presença de qualquer coloração ou intensidade de coloração. Abreviações: FN, falso-negativo; FP, falso-positivo; neg, negativo; pos, positivo; TN, verdadeiro-negativo; TP, verdadeiro-positivo.

Figura 3. Gráfico de sensibilidade e especificidade para vários ensaios que determinam a positividade da mutação do *EGFR* no DNA livre de células em comparação com o tecido tumoral. Estimativa combinada de sensibilidade e especificidade com base na análise bivariada dos estudos incluídos. Quatro estudos incluídos compararam amostras de tecido tumoral com amostras de plasma utilizando o mesmo sistema de detecção,^{234,235,242,243} e um quinto estudo²³² obteve amostras de plasma de pacientes com mutações tumorais conhecidas, como em *EGFR* e *KRAS*. Abreviações: ARMs, sistema de mutação refratária a amplificação; ddPCR, PCR digital em gota; FN, falso-negativo; FP, falso-positivo; PCR, reação em cadeia da polimerase; PNA/LNA, peptídeo ácido nucleico bloqueado por ácido nucleico; TN, verdadeiro-negativo; TP, verdadeiro-positivo.