

AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR
Diretoria de Normas e Habilitação de Produtos
Gerência Geral de Regulação Assistencial
Gerência de Assistência à Saúde

**Painel de Sequenciamento de Nova Geração do
DNA circulante tumoral**

**Indicação: Diagnóstico dos pacientes com Câncer de
Pulmão do tipo adenocarcinoma metastático
(estágio IV) quando o material tecidual é
insuficiente para a detecção das variantes
oncogênicas**

Elaborado por: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Porto Alegre/RS

Maior/2020

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

1. APRESENTAÇÃO.....	7
2. RESUMO EXECUTIVO.....	7
3. CONDIÇÃO CLÍNICA.....	10
3.1. ASPECTOS CLÍNICOS, ASSISTENCIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS	10
3.2. ASPECTOS GENÉTICOS.....	12
3.3. TRATAMENTO RECOMENDADO.....	14
4. PERGUNTA DE PESQUISA (“QUESTÃO PICO”).....	16
5. POPULAÇÃO.....	16
6. TECNOLOGIA	16
7. TECNOLOGIAS COMPARADORAS.....	17
8. DESFECHOS.....	17
9. METODOLOGIA PARA BUSCA E ANÁLISE DE EVIDÊNCIAS	17
9.1. BUSCA.....	17
9.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	19
9.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	19
9.4. FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DAS EVIDÊNCIAS.....	19
10. RESULTADOS.....	20
10.1. RESULTADOS DA BUSCA	20
10.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ESTUDOS INCLUÍDOS	20

10.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS..	34
10.4. SÍNTESE DE RESULTADOS E QUALIDADE GERAL DA EVIDÊNCIA POR DESECHO (GRADE)	34
11. SITUAÇÃO DA TECNOLOGIA NO BRASIL E NO MUNDO	40
12. ANÁLISE DA AVALIAÇÃO ECONÔMICA	40
13. ANÁLISE DA AVALIAÇÃO DE IMPACTO ORÇAMENTÁRIO	46
14. ASPECTOS DE IMPLEMENTAÇÃO	54
15. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES	55
16. REFERÊNCIAS.....	59
16.1. REFERÊNCIAS TEXTO	59
16.2. REFERÊNCIAS TABELA A- PACIENTES ELEGÍVEIS AO DIAGNÓSTICO COM O PAINEL DE NGS DE ctDNA.	63
16.3. REFERÊNCIAS TABELA C- PARÂMETROS DE CUSTO E FONTES DE DADOS ...	64
16.4. REFERÊNCIAS TABELA ANVISA	64
16.5. REFERÊNCIAS TABELA AGÊNCIAS INTERNACIONAIS	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

AD - Adenocarcinoma

AIO – Avaliação de impacto orçamentário

ALK - *ALK* receptor tyrosine kinase gene

AMP - Ampola

AMSTAR 2 - *A Measurement Tool to Assess systematic Reviews v2*

ANS – Agência Nacional de Saúde

ANS – Agência Nacional de Saúde Suplementar

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARMS – Sistema de amplificação refratário de mutação

AUC – Área sob a curva

BL - Baseline

BRAF – *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase* gene

CADTH - *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health* (Canada)

CBHPM - Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos

cfDNA – DNA celular livre

CMED - Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos

CNV – Variação no número de cópias

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS

CPNPC – Câncer de pulmão de não pequenas células

CPS - Cápsulas

ctDNA - DNA circulante tumoral

CtNt – Custo total do novo tratamento

CttA – Custo total do tratamento atual

CX - Caixas

ddPCR – droplet digital PCR

DOR – Razão de chances diagnóstica

DUT – Diretriz de utilização

EGFR - *Epidermal growth factor receptor* gene

EMA – *European Medicines Agency* (Europa)

EU – União Européia

FA – Frequência alélica

FDA – *Food and Drug Administration* (USA)

FFEP - Tecido tumoral de ressecção fixados em formalina e embebidos em parafina

FISH - hibridização fluorescente *in situ*

FN – Falso Negativo

FP – Falso Positivo

GRADE - *Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluations*

HER2 - *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2* gene

IASLC- *International Association for the Study of Lung Cancer*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC 95% - Intervalo de confiança de 95%

IHC - Imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (Portugal)

KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* gene

MS – Ministério da Saúde

N – Número de amostras

NA – Não acessado

ND – Não determinado

NGS – Sequenciamento de nova geração

NICE – *National Institute for Health and Care Excellence* (Reino Unido)

NiNt – Número de indivíduos utilizando o novo tratamento

NtA – Número de indivíduos utilizando o tratamento atual

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PD – Progressão da doença

qPCR – PCR em tempo real

qRT-PCR – PCR da transcriptase reversa em tempo real

QT – Quimioterapia

QUADAS-2 - *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies v.2*

QWiG - *The independent Institute for Quality and Efficiency in Health Care* (Alemanha)

RCEI - Razão custo-efetividade incremental

ROC - *Receiver operating characteristic*

ROS1 - *ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase* gene

RR – Risco relativo

SG – Sobrevida global

SLD – Sobrevida livre de doença

SLP – Sobrevida Livre de Progressão

SNV – Variação única de nucleotídeos

SSS – Sistema de Saúde Suplementar

SUS – Sistema Único de Saúde

TGA - *Therapeutic Goods Administration* (Austrália)

TKI – Inibidores de tirosina-kinase

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

VN – Verdadeiro Negativo

VP – Verdadeiro Positivo

Lista de Figuras

Figura 1. Terminologia para Câncer de Pulmão, segundo a OMS 2015.	12
Figura 2. Modelo de Markov utilizado, com os seus estados de transição.	41
Figura 3. Diagrama de tornado	44
Figura 4. Análise de sensibilidade probabilística (desfecho SLD)	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização dos estudos selecionados.	20
Tabela 2. Caracterização dos estudos Revisão Sistemática com Metanálise selecionados	30
Tabela 3. Síntese das características do sequenciamento de nova geração em biópsia líquida e comparadores utilizados nos estudos selecionados.	32
Tabela 4. Avaliação dos desfechos dos estudos incluídos pelo sistema GRADE, para os desfechos de interesse.	39
Tabela 5. Resultados de custo-efetividade: painel NGS ctDNA vs. <i>EGFR</i> ctDNA (tratamento com terapias <i>EGFR</i> e <i>ALK</i> do rol ANS).	43
Tabela 6. Pacientes elegíveis ao diagnóstico com o painel de NGS de ctDNA.	49
Tabela 7. Projeção da população elegível.	49
Tabela 8. Parâmetros de custo e fontes de dados	50
Tabela 9. Impacto orçamentário total em reais	51
Tabela 10. Impacto orçamentário incremental em reais	51
Tabela 11. Impacto orçamentário incremental em reais, considerando-se eventos adversos estimados pelo proponente	51
Tabela 12. Impacto orçamentário incremental em reais, considerando-se eventos adversos estimados pelo proponente e recidiva em 25% daqueles que não receberam tratamento específico para variante, quando teriam indicação	52

Lista de Anexos

Anexo 1. Estratégias de busca na literatura

Quadro 01. Estratégia de busca e resultados para revisões sistemáticas/ metanálises.

Quadro 02. Estratégia de busca e resultados para estudos primários.

Anexo 2. Figura 2. Fluxograma de seleção das evidências

Anexo 3. Lista de referências excluídas

Anexo 4. Lista de referências incluídas

Anexo 5. Caracterização dos estudos incluídos

Quadro 03. Características dos estudos incluídos (revisões sistemáticas).

Quadro 04. Características dos estudos primários incluídos (estudos de acurácia).

Anexo 6. Avaliação dos estudos de revisão sistemática com metanálise (AMSTAR2).

Anexo 7. Avaliação dos estudos de acurácia (QUADAS2).

Anexo 8. Situação regulatória nas agências internacionais

Anexo 8.1 Tecnologias baseadas em ácidos nucleicos triados ou aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a avaliação de alterações nas vias genéticas relacionadas ao Adenocarcinoma de pulmão nos Estados Unidos.

Anexo 8.2 Opções de manejo para pessoas com câncer de pulmão não escamoso e de não pequenas células baseados em caracterização molecular, segundo o *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE), do Reino Unido.

Anexo 8.3 Tecnologias baseadas em ácidos nucleicos triados ou aprovados pela *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health* (CADTH) para a avaliação de alterações nas vias genéticas relacionadas ao adenocarcinoma de pulmão no Canadá.

Anexo 8.4 Tecnologias baseadas em ácidos nucleicos triados ou aprovados pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED) para a avaliação de alterações nas vias genéticas relacionadas ao adenocarcinoma de pulmão em Portugal.

Anexo 8.5 – Consulta ao *The independent Institute for Quality and Efficiency in Health Care* (IQWiG), da Alemanha.

Anexo 8.6 Consulta ao *Therapeutics Goods Administration* (TGA), da Austrália.

Anexo 8.7 Consulta ao *European Medicines Agency* (EMA), da União Europeia.

Anexo 9. Situação regulatória no âmbito nacional: testes para análises genéticas aprovadas pela ANVISA

Anexo 10. Material suplementar sobre a situação regulatória das terapias-alvo e testes genéticos para adenocarcinoma metastático de pulmão no âmbito nacional.

Anexo 10.1 Medicamentos aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no tratamento de variantes relacionadas ao CPNPC.

Anexo 10.2 Medicamentos aprovadas pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) no tratamento de variantes relacionadas ao CPNPC.

Anexo 10.3 Medicamentos aprovadas pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) no tratamento de variantes relacionadas ao CPNPC.

Anexo 10.4 Procedimentos aprovados no Rol 2018 pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) no âmbito do diagnóstico molecular que podem ser aplicadas ao NGS e diretrizes correspondentes

Anexo 10.4.1 Quadro de diretrizes de uso da tecnologia (DUT) da tabela anterior.

Anexo 11. Planilhas AIO ANS

1. Apresentação

Esse PTC se refere à proposta de atualização do Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde – Ciclo 2019/2020, apresentada à Agência Nacional de Saúde Suplementar por meio do FormRol. Trata de aspectos relativos à eficácia, à efetividade, à segurança, ao custo-efetividade e ao impacto orçamentário do Pannel de Sequenciamento de Nova Geração do DNA circulante tumoral (ctDNA) incluindo os genes *EGFR*, *ROS1*, *BRAF* e *ALK*, para diagnóstico dos pacientes com Câncer de Pulmão do tipo adenocarcinoma metastático (estágio IV) quando o material tecidual é insuficiente para a detecção das variantes oncogênicas, visando a avaliar sua INCORPORAÇÃO no Rol.

2. Resumo Executivo

Tecnologia: Pannel de Sequenciamento de Nova Geração do DNA circulante tumoral (ctDNA) incluindo os genes *EGFR*, *ROS1*, *BRAF* e *ALK*. **Indicação:** Diagnóstico de pacientes com Câncer de Pulmão do tipo adenocarcinoma metastático (estágio IV) quando o material tecidual é insuficiente para a detecção das variantes oncogênicas. **Introdução:** O adenocarcinoma de pulmão é um dos tipos mais frequentes de câncer de pulmão no Brasil, sendo o tipo mais frequente de câncer de pulmão de não-pequenas células (CPNPC). Cerca de 50% dos casos são diagnosticados já quando metastáticos. A presença/ausência de determinadas variantes em genes envolvidos na rota fisiopatogênica deste câncer, principalmente em *EGFR*, é utilizada para direcionar a escolha do tratamento mais apropriado para cada paciente (medicina personalizada). O indicado é que esta análise seja feita no tecido tumoral biopsiado. Outra fonte de DNA tumoral que pode ser utilizada é o ctDNA, liberado para a circulação sanguínea principalmente nos casos de câncer mais avançado (HOLDENRIEDER, 2016). A análise comparativa de amostras de tecido tumoral e de ctDNA obtidas concomitantemente, do mesmo paciente, mostra uma boa concordância (a análise de ctDNA é menos sensível) (SCILLA; ROLFO, 2019). O uso de ctDNA dispensa a realização de nova biópsia de tecido pulmonar quando a primeira não está disponível ou o material é insuficiente para análise genética (JIANG; LO, 2016). Dentre as várias metodologias disponíveis para a detecção dessas variantes, tanto a partir de DNA extraído de tecido tumoral quanto de ctDNA, a mais comumente utilizada (PCR e correlatos) permite a análise de variantes específicas de um gene (usualmente *EGFR*). Entretanto, tecnologias como o sequenciamento de nova geração (NGS) permitem a investigação concomitante de vários genes. A Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) disponibiliza testagem para os genes *ALK*, *BRAF* e *EGFR*, mas a ANVISA, para biópsia líquida, tem produtos registrados que analisam somente *EGFR*. **Pergunta:** “Um pannel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK*, aplicado à amostra de ctDNA obtida a partir do plasma de pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso, apresenta acurácia semelhante ao PCR em tempo real realizado em amostra de biópsia líquida (*EGFR* e *BRAF*) ou de tecido tumoral (*ALK* e *ROS1*), para variantes oncogênicas nestes mesmos genes quando o material tumoral é insuficiente para a realização de análises genéticas?” e “A análise genética do câncer de pulmão por meio de um pannel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK*, aplicado à amostra de ctDNA obtida a partir de plasma de pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso, melhora desfechos clínicos relevantes em relação à prática atual (pesquisa somente de *EGFR*) em ctDNA?”

Evidências científicas: 363 artigos foram triados e 10 estudos primários e 3 revisões sistemáticas com metanálises (RS) foram incluídos na revisão. Os estudos primários apresentaram alta heterogeneidade quanto ao tipo de CPNPC analisado (em média, 77% dos pacientes apresentavam adenocarcinoma), ao estágio tumoral (aproximadamente 63,7% dos pacientes estavam em estágio IV), às plataformas e comparadores utilizados, bem como aos regimes de tratamento a que os pacientes foram submetidos previamente à testagem genética. A qualidade dos estudos variou, sendo, para as RS, criticamente baixa (n=1), baixa (n=1) e moderada (n=1), e, para os artigos originais, baixa (n=7) ou moderada (n=3). Cinco estudos primários analisaram em ctDNA a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia do NGS para detecção de variantes em *EGFR* em relação ao qPCR, e os valores foram, em média, de 94,5%, 46,5% e 86,2%, respectivamente. Não foram encontradas evidências para o gene *BRAF*. Quatro estudos originais analisaram a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia em ctDNA do NGS para detecção de variantes em *ALK* em relação à FISH/IHC em tumor, e os valores foram, em média, 74,3%, 99,4% e 88,9%, respectivamente. Um artigo original analisou em ctDNA a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia do NGS para detecção de variantes em *ROS1* em relação à FISH/IHC em tumor, atingindo 100% para todos os parâmetros. Somente três artigos avaliaram benefícios clínicos (*ALK*=1, medicamento: crizotinibe; *EGFR*=2, medicamentos: *EGFR*-TKIs e osimertinibe), e em dois deles não foi constatada diferença estatisticamente significativa. Um dos estudos demonstrou mediana superior para SLP (12,6 vs. 6,7 meses, $p<0,001$) e SG (35,6 vs. 23,8), associadas ao uso de *EGFR*-TKI em pacientes com alteração de *EGFR* em DNA tumoral e ctDNA em relação àqueles com alteração somente em DNA tumoral.

Avaliação econômica: O proponente utilizou um caso-base genérico, representativo da saúde suplementar como um todo. Realizou uma avaliação do tipo custo-efetividade. Como resultado da avaliação econômica executada, o proponente encontrou uma razão de custo efetividade incremental (RCEI) de R\$- 2315,08 (redução) por pessoa por ciclo de tratamento. Não fica claro qual o painel está se propondo incorporar. Em relação aos custos dos testes, o proponente incluiu somente o custo do painel de NGS de ctDNA. Nessa análise não foi considerado o custo com o procedimento de detecção da variante de *EGFR* por ctDNA. A análise econômica do demandante não considerou que a sensibilidade dos testes em ctDNA é menor que no tecido tumoral.

Avaliação de impacto orçamentário (AIO): O modelo de avaliação foi do tipo estático. A perspectiva adotada foi da Saúde Suplementar. Utilizou-se de um caso-base genérico, representativo da SS como um todo. Foram dois cenários: sem o teste e pós incorporação do teste. Utilizou-se uma estimativa de *market-share* progressiva ao longo de 5 anos. De acordo com estes o custo incremental no primeiro ano seria de R\$ 238.592,57, com impacto em cinco anos de R\$ 3.646.820,16 com a incorporação. O demandante computou o valor do novo teste, sem considerar a parte dos pacientes que submetidos ao novo procedimento utilizariam o tratamento específico, dirigido à variante identificada, com imunobiológicos. A avaliação econômica e de impacto orçamentário sugerem que o uso do teste de NGS de ctDNA possibilita o melhor direcionamento das terapias oncológicas em CPNPC não escamoso, metastático levando a um aumento da sobrevida livre de progressão e uma redução nos custos com a primeira linha de tratamento.

Experiência internacional: A maioria dos países cujas agências reguladoras foram consultadas disponibilizam a pesquisa de variações oncogênicas em *EGFR* por qPCR. Poucos painéis de NGS são “aprovados” internacionalmente, mas incluem mais genes do que aqueles de interesse, e são para utilização em tecido tumoral.

Considerações finais: A capacidade de detecção de cada variante depende da técnica utilizada. Os termos qPCR e NGS são termos genéricos, não refletindo a qualidade da análise realizada. Dizer que variantes em *EGFR* são pesquisadas por qPCR é insuficiente, uma vez que não explicita quais variantes estão sendo pesquisadas

nem o limite de detecção e sensibilidade do teste utilizado. O mesmo acontece com o NGS, uma vez que podem ser pesquisados todos os éxons de um gene, ou somente alguns. Sem que o demandante apresente detalhes dos kits utilizados, *primers*, cobertura e profundidade, é impossível a obtenção de resultados verdadeiramente confiáveis de custo-efetividade. Partindo do princípio que o NGS poderia detectar variantes adicionais e investigar os 4 genes ao mesmo tempo, a técnica seria vantajosa em relação ao qPCR. Contudo, nossa análise mostra que o impacto econômico da sua implantação é grande. No caso de adenocarcinoma de pulmão metastático, a estratégia teoricamente mais efetiva para a implementação de medicina personalizada seria o incentivo para a realização de investigação genética no tecido tumoral, quase que concomitantemente à investigação histológica. Isto, inclusive, reduziria o tempo para o início do tratamento. No caso de realização de biópsia líquida, a pesquisa por NGS incluindo pelo menos os genes *EGFR* e *ALK* estaria recomendada com as seguintes ressalvas: 1) elaboração de critérios estritos para solicitação deste exame, e de estratégia de disseminação dos mesmos entre os oncologistas; 2) avaliação das características do painel de NGS a ser incluído, o qual deve ter cobertura e profundidade adequadas, e possibilitar (no mínimo) a detecção das principais alterações genéticas de cada um dos genes de interesse.

3. Condição Clínica

3.1. Aspectos Clínicos, Assistenciais e Epidemiológicos

O câncer de pulmão é um dos tipos de câncer mais frequentes no mundo, e também um dos que apresenta maiores taxas de mortalidade. No Brasil, cerca de 13% de todos os novos casos de câncer são de pulmão (INCA, 2018). A incidência de casos novos de câncer de pulmão, segundo a última estimativa mundial, foi de 2,09 milhões, representando 11,6% de todos os novos casos de câncer, e 1,7 milhão de óbitos (18,4%) para o ano de 2018 (FERLAY *et al.*, 2019).

A última estimativa mundial apontou **incidência** de 1,8 milhão de casos novos, sendo 1,36 milhão em homens e 725 mil em mulheres (WHO, 2019). A taxa de incidência vem diminuindo desde meados da década de 1980 entre homens, e, desde meados dos anos 2000, entre as mulheres. Essa diferença deve-se aos diferentes padrões de adesão e cessação ao tabagismo entre os sexos. Na maioria das populações, o tabagismo e a exposição passiva ao tabaco são importantes fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão, sendo que em cerca de 85% dos casos diagnosticados há associação com o consumo de derivados de tabaco. As mais altas taxas de incidência deste tipo de câncer são observadas na Europa e na Ásia com 22,4% e 58,5% dos casos novos, respectivamente (INCA, 2018; WHO, 2019).

O Brasil tem um prejuízo anual de R\$ 56,9 bilhões associado ao tabagismo. Desse total, R\$ 39,4 bilhões são gastos com despesas médicas e R\$ 17,5 bilhões com custos indiretos ligados à perda de produtividade, causada por incapacitação de trabalhadores ou morte prematura. O controle do tabaco permanece sendo a principal forma de redução da ocorrência desse tipo de neoplasia, uma vez que o tabagismo é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da mesma. No mundo, a taxa de **mortalidade** de 2011 para 2015 diminuiu 3,8% e 2,3% ao ano, em homens e mulheres, respectivamente, devido à redução na prevalência do tabagismo. No Brasil, em 2015, a doença foi responsável por 26.498 mortes (Masc =15.514; Fem= 10.978). Já em 2017, este número aumentou para 27.931 óbitos (Masc= 16.139; Fem= 11.792) (INCA, 2018). Ainda, estimam-se 17.760 casos novos de câncer de pulmão entre indivíduos do sexo masculino, e de 12.440 no sexo feminino, para o ano de 2020, totalizando 30.200 novos casos para o período (INCA, 2020). Esses valores correspondem a um risco estimado de 18,16 casos novos/100 mil indivíduos do sexo masculino, e de 11,81/100 mil indivíduos do sexo feminino. É importante destacar

que, apesar do Instituto Nacional do Câncer (INCA) explicitar estes valores e descrevê-los como estimativas para câncer de pulmão no texto dedicado à doença, encontramos os mesmos números representando uma estatística agrupada, correspondente aos cânceres de Traqueia, Brônquio e Pulmão (INCA, 2018). Segundo o INCA, quando se exclui o câncer de pele não-melanoma, as neoplasias envolvendo o sistema respiratório (Traqueia, Brônquio e Pulmão) são o segundo tipo mais comum em ambos sexos no Brasil. Por região, são o segundo mais frequente no sexo masculino nas Regiões Sul (36,27/100 mil) e Centro-Oeste (16,98/100 mil), e o terceiro mais frequente nas Regiões Sudeste (19,22/100 mil), Nordeste (10,37/100 mil) e Norte (9,03/100 mil). No sexo feminino, são o terceiro mais frequente nas Regiões Sul (20,59/100 mil) e Sudeste (12,72/100 mil) e o quarto mais frequente nas Regiões Centro-Oeste (11,52/100 mil), Nordeste (7,82/100 mil) e Norte (5,83/100 mil).

O câncer de pulmão é um dos tipos de câncer mais agressivos, possuindo uma **razão M/I** de, aproximadamente, 0,87. Em razão da sua alta letalidade, o perfil geográfico da incidência pode ser observado pela mortalidade, principalmente em lugares onde não existe informação sobre casos novos (incidência). A sobrevida em cinco anos é baixa na maioria das populações do mundo, em média de 10% a 15%. Somente três países apresentaram sobrevida acima de 20%: Japão (30%); Israel (24%); e República de Maurício (37%) (STEWART; WILD, 2014). Apenas 16% dos cânceres são diagnosticados em estágio inicial (câncer localizado), para o qual a taxa de sobrevida de cinco anos é de 56%.

No ano de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou a classificação dos tipos histológicos de câncer de pulmão, reforçando o uso da IHC. Além disso, foi enfatizada a importância dos estudos genéticos para a personalização de estratégias de tratamento em pacientes com câncer de pulmão avançado (TRAVIS *et al.*, 2015). Haja vista que alguns tratamentos são recomendados para histologias específicas, há a necessidade cada vez maior de que a classificação do subtipo histológico seja exata.

Em uma visão geral, o câncer de pulmão é classificado em dois grupos: carcinoma de células pequenas (Carcinoma de Células Pequenas), responsável por cerca de 15% dos casos de câncer de pulmão, e Carcinoma de Não-Pequenas Células (CPNPC), o qual corresponde a cerca de 85% dos casos. Entre os tipos de CPNPC, a maior parte dos casos (70%) corresponde aos adenocarcinomas (GRIDELLI *et al.*, 2015). Uma simplificação desta classificação pode ser encontrada na Figura 1.

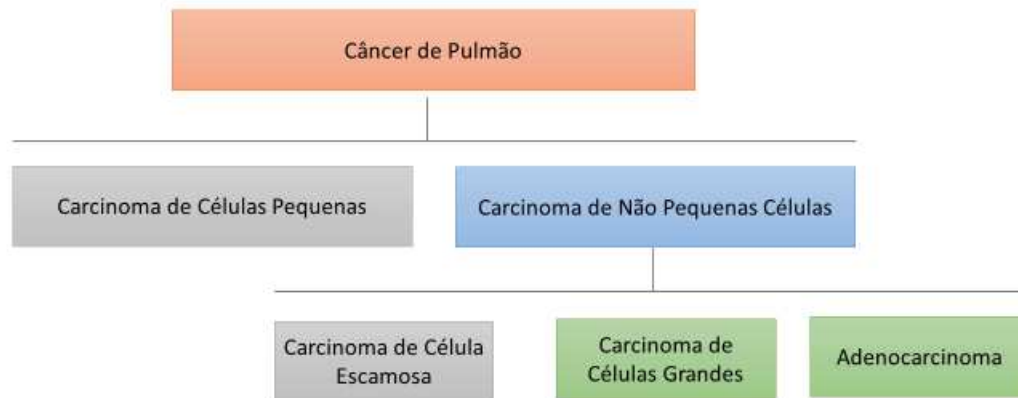


Figura 1. Terminologia para Câncer de Pulmão, segundo a OMS 2015. Baseado em TRAVIS *et al.*, 2015.

O estadiamento do câncer de pulmão é baseado em parâmetros pré-estabelecidos quanto ao tamanho (T), acometimento de linfonodos próximos (N) e presença de metástase a distância (M). O agrupamento destes três fatores (agrupamento TNM) levará ao estadiamento em diferentes níveis, variando entre os estágios I a IV, sendo o estágio IV o mais avançado. No estágio IV sempre há presença de metástase a distância, podendo ser M1a (nódulos separados em lobo contralateral, derrame pleural ou pericárdico) ou M1b (metástases à distância - outros órgãos) (AGUIAR *et al.*, 2017; INCA 2018).

Este parecer trata do tipo celular adenocarcinoma, doravante denominado tipo não-escamoso, estágio IV. O adenocarcinoma de pulmão é o tipo mais comum de neoplasia pulmonar encontrado em indivíduos não-fumantes, sendo também mais frequente no sexo feminino, mais propenso a ocorrer em pessoas mais jovens, e frequentemente diagnosticado em estágio avançado.

3.2. Aspectos Genéticos

A descoberta inicial de que variantes do gene *EGFR* e de que rearranjos no gene *ALK* são alvos efetivos para os inibidores de tirosina-quinase (TKI) em pacientes com câncer avançado do tipo adenocarcinoma modificou não só o tratamento como também a prática clínica e a sobrevida dos pacientes. Atualmente, por causa das implicações

terapêuticas, a identificação de variantes oncogênicas do *EGFR* e rearranjos de *ALK* são recomendadas por múltiplas sociedades de clínicos e patologistas, tanto em tumores classificados como adenocarcinoma quanto em casos em que o componente adenocarcinoma não pode ser excluído (TRAVIS *et al.*, 2015).

Neste sentido, estudos indicam que existem fatores demográficos (asiáticos, sexo feminino, não-tabagistas) que conferem maior risco para a ocorrência de variantes no gene *EGFR* (MITSUDOMI; YATABE, 2007; SHI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2012), embora alguns estudos retrospectivos não tenham encontrado diferença entre os sexos e a frequência mutacional no gene em questão (SUN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2008). No Brasil, os dados sugerem que a frequência de variantes do gene *EGFR* é em torno de 25%, menor que na Ásia (cerca de 50%), mas maior do que em populações brancas na América do Norte e Europa. A frequência de translocações no gene *ALK* em tecido tumoral de pacientes com câncer de pulmão é descrita como sendo de 3% a 4%, e quase sempre são mutuamente exclusivas com variantes do gene *EGFR* e *KRAS* (LOPES; BACCHI, 2012). Para explorar melhor esses pontos, foram iniciados dois estudos multicêntricos, liderados pela Rede Nacional de Pesquisa Clínica em Câncer e pelo *Latin American Cooperative Oncology Group*. Esses consórcios são apoiados pela indústria farmacêutica, bem como por sociedades norte-americanas, tais como a *American Society of Clinical Oncology* e a *American Association for Cancer Research* (ARAUJO *et al.*, 2018).

A prevalência de alterações patogênicas no gene *EGFR* no Brasil varia (25-30%), mas os dados sobre as alterações encontradas na população brasileira ainda são escassos. Um dos estudos mais abrangentes, em termos de variantes analisadas, compreendeu amostras de 290 pacientes com adenocarcinoma analisados retrospectivamente (30-89 anos; 67,9% fumantes ou com histórico de tabagismo; 51,7% homens; 57,6% metastáticos). Alterações no gene *EGFR* apresentaram uma prevalência de 32,7%; translocações no gene *ALK* estiveram presentes em 4% dos pacientes; enquanto que variantes no gene *KRAS*, *BRAF*, *HER2* e *ROS1* estiveram presentes em 20%, 11,8%, 14,3% e 9% dos pacientes, respectivamente (GOMES *et al.*, 2015).

O maior estudo foi financiado pela indústria, contou com 3.364 amostras e foi realizado entre 2011 e 2013. Destas, 857 (25,5%) foram positivas para variantes no gene *EGFR*, sendo que 54% foram deleções no éxon 19. Variantes de ponto no éxon 21, éxon 20 e éxon 18 corresponderam a, respectivamente, 28%, 9,7% e 8,3% das variantes

encontradas. Neste estudo, histologia correspondente a adenocarcinoma (89%), e sexo feminino, foram identificados como preditores para presença de variantes (PONTES *et al.*, 2014). No Nordeste brasileiro, este perfil parece ser diferente, com cerca de 22% de variantes do gene *EGFR* nos adenocarcinomas; a variante p.L858R (éxon 21) e as deleções do éxon 19 foram as mais comuns, representando 45,5% e 36,6% das variantes encontradas, respectivamente. As variantes p.G719X no éxon 18 (9,1%), inserções no éxon 20 (6,1%) e no éxon 18 (3,0%) também foram avaliadas. Na população descrita pelo estudo, ausência de variantes no gene *EGFR* estava relacionada à adenocarcinoma de subtipo predominantemente sólido, e a expressão (avaliada por IHC) de PD-L1 não estava relacionada à expressão de *ALK* ou a variantes do gene *EGFR*. A expressão positiva do *ALK* foi maior do que as do demais biomarcadores, caracterizando um perfil diferente do restante do país (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Uma vez que a classificação histológica é de suma importância, grande parte da testagem genética é realizada em tecido tumoral de ressecção fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP). Entretanto, algumas vezes o material é insuficiente para ambas classificações (histológica e genética). Nestes casos, a biópsia líquida é uma alternativa simplificada e menos invasiva para a obtenção de DNA circulante tumoral.

3.3. Tratamento Recomendado

Atualmente, a caracterização genética das variantes envolvidas no adenocarcinoma de pulmão é de importância ímpar na escolha das linhas de tratamento e para a sobrevivência dos pacientes. Existem três principais “perfis genéticos” que possuem tratamento específico com melhores desfechos que os encontrados para quimioterapia citotóxica. As variantes em *EGFR* são as mais comuns; e segundo a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), pacientes com estas alterações devem receber um tratamento de primeira linha com anti-*EGFR* TKI, como erlotinibe, gefitinibe ou afatinibe (todos cobertos pela ANS), os quais levam à uma melhor taxa de resposta, sobrevivência e qualidade de vida, em comparação aos quimioterápicos tradicionais (BESSE *et al.*, 2014, MONTELLA *et al.*, 2017). Além das variantes previamente citadas, a p.T790M (gene *EGFR*) está relacionada com resistência à terapia e normalmente é identificada quando o paciente deixa de responder ao tratamento com anti-*EGFR* TKI de primeira e segunda linha, havendo progressão da doença. Pacientes positivos para essa variante devem ser tratados com osimertinibe (também coberto pela ANS), medicamento de terceira geração anti-*EGFR*

TKI (MONTELLA et al., 2017). As outras duas variantes-chaves são as fusões do *ALK* e a variantes no gene *ROS1*, identificadas, comumente, em populações jovens e sem histórico de tabagismo. Ambas as alterações devem ser tratadas com crizotinibe (BERGETHON et al., 2012; DE SÁ et al., 2016; SHAW; SOLOMON, 2011; BESSE et al., 2014), também coberto pela ANS.

O tratamento de primeira linha do adenocarcinoma para pacientes sem o teste genético seria a imunoterapia com pembrolizumabe combinada com quimioterapia, segundo diretriz da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (MONTELLA et al., 2017). Ainda, segundo essa diretriz, para uma escolha terapêutica adequada, efeitos colaterais relacionados a cada esquema alternativo, performance (PS) do paciente e suas comorbidades devem ser considerados. Entretanto, como a combinação de cisplatina com pemetrexede apresenta perfil de tolerabilidade melhor do que a combinação de cisplatina com gencitabina, o uso de pemetrexede associado à platina passou a ser um dos esquemas de tratamento preferenciais para pacientes com câncer de pulmão metastático com perfil genético desconhecido ou negativos. Entretanto, pacientes com variantes em *EGFR* ou *ALK* seriam respondedores pobres, devendo o tratamento ser iniciado, respectivamente, com gefinitibe, afatinibe ou erlotinibe (inibidores de tirosina quinase do *EGFR*), ou crizotinibe (inibidor de tirosina quinase anti-reatranjos de *ALK*). Portanto, o diagnóstico genético é de suma importância na definição da terapia escolhida como primeira linha de tratamento para os pacientes com adenocarcinoma pulmonar.

A presença de variantes em *EGFR* (mais frequentemente localizadas nos éxons 19 e 21) e *ALK* interfere na escolha do medicamento de primeira linha no contexto do Sistema de Saúde Suplementar (SSS). Uma vez que a escolha do melhor tratamento é pautada em dados genéticos, faz-se necessário falar sobre o acesso aos testes genéticos no Brasil. O acesso a esses testes ainda é limitado no país, o que se reflete na escassez dos dados sobre a frequência das variantes clinicamente úteis para pacientes brasileiros com câncer de pulmão. Segundo ARAÚJO et al. (2018), em 2014, menos da metade da população foi testada para variantes em *EGFR*, sendo que dois terços dos testes foram realizados por instituições privadas. O autor também estimou que para o gene *ALK* este número poderia ser ainda mais reduzido. Em 2016, segundo pesquisa realizada online com pelo instituto Oncoguia, de um total de 66 participantes, 36,4% afirmaram que algum teste genético havia sido realizado em tumor (25,8% afirmaram não saber e 37,9% afirmaram não ter sido realizado nenhum teste genético). Segundo esta mesma pesquisa, quando realizados, os

testes foram para mutações em *EGFR* ou realizados pelo Foundation One (<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/projeto-sobre-cancer-de-pulmao/10192/1093/>).

Os anexos 8 e 10 resumizam a situação da regulação, nacional e internacional, das terapias-alvo para o tratamento do CPNPC.

4. Pergunta de Pesquisa (“Questão Pico”)

Duas perguntas principais deverão ser respondidas neste parecer:

Acurácia: “Um painel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK*, aplicado à amostra de ctDNA obtida a partir do plasma de pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso, apresenta acurácia semelhante ao PCR em tempo real (qPCR) realizado em amostra de biópsia líquida (*EGFR* e *BRAF*) ou de tecido tumoral (*ALK* e *ROS1*), para variantes oncogênicas nestes mesmos genes quando o material tumoral é insuficiente para a realização de análises genéticas?”

Para os genes *ALK* e *ROS1* foram adicionados como comparadores análises realizadas em tecido tumoral, uma vez que as variantes encontradas nestes genes são tipicamente originadas de fusões e caracterizadas no tecido por FISH e IHC, técnicas estas não aplicáveis em plasma.

Benefício clínico: “A análise genética do câncer de pulmão por meio de um painel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK*, aplicado à amostra de ctDNA obtida a partir de plasma de pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso, melhora desfechos clínicos relevantes em relação à prática atual (pesquisa somente de *EGFR*) em ctDNA?”

5. População

Pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso com material tumoral insuficiente para a realização de análises genéticas.

6. Tecnologia

Painel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *ALK*, *BRAF* e *ROS1* aplicado à amostra plasmática de ctDNA.

7. Tecnologias Comparadoras

Deteção de variantes oncogênicas em *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK* pelo método qPCR em amostra plasmática de ctDNA. Caso não sejam encontrados estudos que preencham estes critérios para *ROS1* e *ALK*, serão considerados como comparadores os métodos de qPCR, FISH e/ou imuno-histoquímica em tecido tumoral.

8. Desfechos

Acurácia do NGS para a detecção de variantes em *EGFR*; *ALK*; *BRAF*; e *ROS1* em relação ao ct qPCR em plasma (*EGFR* e *BRAF*) ou técnica específica em tumor (*ALK* e *ROS1*).

Sensibilidade do NGS para a detecção de variantes em *EGFR*; *ALK*; *BRAF*; e *ROS1* em relação ao ct qPCR em plasma (*EGFR* e *BRAF*) ou técnica específica em tumor (*ALK* e *ROS1*).

Especificidade do NGS para a detecção de variantes em *EGFR*; *ALK*; *BRAF*; e *ROS1* em relação ao ct qPCR em plasma (*EGFR* e *BRAF*) ou técnica específica em tumor (*ALK* e *ROS1*).

Sobrevida livre de progressão (SLP) da doença associada a detecção de variantes por NGS em *EGFR*; *ALK*; *BRAF*; e *ROS1* em relação ao qPCR em plasma (*EGFR* e *BRAF*) ou técnica específica em tumor (*ALK* e *ROS1*).

Sobrevida global (SG) associada a detecção de variantes por NGS em *EGFR*; *ALK*; *BRAF*; e *ROS1* em relação ao qPCR em plasma (*EGFR* e *BRAF*) ou técnica específica em tumor (*ALK* e *ROS1*).

Eventos adversos associados a detecção de variantes por NGS em *EGFR*; *ALK*; *BRAF*; e *ROS1* em relação ao qPCR em plasma (*EGFR* e *BRAF*) ou técnica específica em tumor (*ALK* e *ROS1*).

9. Metodologia para Busca e Análise de Evidências

9.1. Busca

Realizaram-se buscas nas bases de dados MEDLINE (via PubMed), Embase e LILACS, sem restrições para idioma, tipo de publicação ou data do estudo. Adicionalmente, a base de dados Cochrane foi consultada para potenciais estudos de interesse. Nesta revisão sistemática, são reportados os estudos disponíveis nos bancos de dados consultados até o dia 15/01/2020, com as estratégias abaixo delimitadas:

a) PUBMED/ Medline

Estratégia 1: (("carcinoma, non-small-cell lung"[MeSH Terms] OR ("carcinoma"[All Fields] AND "non-small-cell"[All Fields] AND "lung"[All Fields]) OR "non-small-cell lung carcinoma"[All Fields] OR ("non"[All Fields] AND "small"[All Fields] AND "cell"[All Fields] AND "lung"[All Fields] AND "cancer"[All Fields]) OR "non small cell lung cancer"[All Fields]) AND (("circulating tumor dna"[MeSH Terms] OR ("circulating"[All Fields] AND "tumor"[All Fields] AND "dna"[All Fields]) OR "circulating tumor dna"[All Fields] OR "ctdna"[All Fields]) OR ("cell-free nucleic acids"[MeSH Terms] OR ("cell-free"[All Fields] AND "nucleic"[All Fields] AND "acids"[All Fields]) OR "cell-free nucleic acids"[All Fields] OR "cfdna"[All Fields])) AND (("high-throughput nucleotide sequencing"[MeSH Terms] OR ("high-throughput"[All Fields] AND "nucleotide"[All Fields] AND "sequencing"[All Fields]) OR "high-throughput nucleotide sequencing"[All Fields]) OR (("next"[All Fields] AND "generation"[All Fields] AND "sequencing"[All Fields]) OR "next generation sequencing"[All Fields]) OR ("real-time polymerase chain reaction"[MeSH Terms] OR ("real-time"[All Fields] AND "polymerase"[All Fields] AND "chain"[All Fields] AND "reaction"[All Fields]) OR "real-time polymerase chain reaction"[All Fields] OR ("real"[All Fields] AND "time"[All Fields] AND "pcr"[All Fields]) OR "real time pcr"[All Fields]))) AND "humans"[MeSH Terms]

b) EMBASE

Estratégia 1: ('non small cell lung cancer'/exp AND 'next generation sequencing'/exp AND 'real time polymerase chain reaction'/exp)

c) LILACs

Estratégia 1: tw:((tw:(non small cell lung cancer)) AND (tw:(next generation sequencing))) AND (tw:(real time polymerase chain reaction)))

Em relação aos aspectos regulatórios dos testes para identificação de variações oncogênicas em *EGFR*, *ROS1*, *BRAF* e *ALK*, e para terapias-alvo para adenocarcinoma metastático de pulmão, foram consultadas as bases de dados de agências nacionais (ANVISA, ANS e CONITEC) e internacionais (FDA, NICE, CADTH, TGA e INFARMED). Foi realizado contato por email com a QWiG (The independent Institute for Quality and Efficiency in Health Care) e EMA.

9.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídos estudos que apresentavam as seguintes características:

- Pacientes com carcinoma de pulmão metastático/avançado do tipo celular não-escamoso;
- Estudos clínicos (revisão sistemática com ou sem metanálise, ensaios clínicos, ensaios clínicos randomizados, estudos de acurácia) que respondessem a pergunta PICO.
- Estudos em que pelo menos um dos tecidos avaliados era biópsia líquida (plasma);
- Intervenção: ou NGS ou qPCR, ou ambos, incluindo pelo menos um dos genes de interesse (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*);
- Desfechos: acurácia E/OU sensibilidade E/OU especificidade E/OU SLP E/OU SG E/OU eventos adversos.

9.3. Critérios de Exclusão

Foram excluídos estudos que apresentavam as seguintes características:

- Qualquer língua que não inglês, português ou espanhol;
- Métodos de aferição não padronizados;
- Tempo de seguimento insuficiente para avaliar resposta ao tratamento (inferior a 12 semanas);
- Estudos *in-vitro* ou envolvendo modelos animais.

9.4. Ferramentas para Avaliação das Evidências

A qualidade dos estudos de acurácia e revisões sistemáticas com metanálise foi avaliada através do uso das ferramentas QUADAS-2 (WHITING *et al.*, 2011) e AMSTAR 2 (SHEA *et al.*, 2017), respectivamente. Estudos com qualidade criticamente baixa quando avaliadas segundo o AMSTAR 2 não foram classificados pelo sistema GRADE. Para avaliar a qualidade da evidência referentes aos desfechos, foi utilizado o sistema GRADE, o qual foi adaptado aos estudos de acurácia quando pertinente (SCHÜNNEMANN *et al.*, 2008). Considerou-se como risco de viés a avaliação obtida com a aplicação do QUADAS-2 ou AMSTAR 2, conforme o tipo de estudo avaliado. Adicionalmente, utilizou-se a ferramenta RevMan 5 (<https://community.cochrane.org/help/tools-and-software/revman-5>) para o cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia a partir dos dados primários extraídos dos estudos incluídos.

10. Resultados

10.1. Resultados da Busca

Os resultados da busca podem ser encontrados de forma detalhada nos anexos (Anexos 1, 2, 3 e 4). Não foram encontrados estudos de interesse na base de revisões sistemáticas da Cochrane. As buscas nas bases de dados retornaram 360 estudos, dos quais 34 estavam duplicados. Adicionalmente, foram encontrados mais 3 artigos em buscas secundárias (ex. referências de referências). Após a exclusão dos estudos duplicados, 329 artigos foram triados e 36 estudos foram considerados elegíveis segundo os critérios de inclusão e exclusão. Estes 36 artigos foram lidos de forma completa, e 23 foram excluídos por: caracterização insuficiente da amostra ($n=8$); comparador que não o de interesse ($n=9$); ausência de intervenção de interesse ($n=3$); outros delineamentos que não os de interesse ($n=3$).

10.2. Caracterização dos Estudos Incluídos

Dos 13 artigos incluídos, três são revisões sistemáticas com metanálise e 10 são estudos primários (5 estudos transversais e 5 do tipo coorte). A caracterização detalhada de cada um dos estudos incluídos na revisão sistemática pode ser encontrada de forma resumida nas tabelas 1, 2 e 3, bem como no Anexo 5.

Tabela 1 - Caracterização dos estudos selecionados

Estudo	Objetivos	Amostra	Intervenção/ Metodologia	Comparador	Resultados	Observações e Limitações
1) Cui et al., 2017 Estudo de coorte. Para a avaliação do efeito do Crizotinibe, foi realizado um “quase-experimento” Unicêntrico China 17 meses	<u>-Objetivo 1:</u> Estimar frequências de fusões de <i>ALK</i> em ctDNA por meio de NGS em pacientes com CPNPC. <u>-Objetivo 2:</u> Avaliar SLP em pacientes <i>ALK+</i> no tumor tratados com Crizotinibe, e verificar se existe diferença em relação ao status <i>ALK</i> no plasma.	<u>Para obj. 1:</u> -39 pacientes com CPNPC (AD=94,8%; est IIIb/IV=82%) -24 com fusão identificada em <i>ALK</i> em tecido tumoral (AD=24, est IIIb/IV=22); 15 sem mutação identificada em <i>ALK</i> em tecido tumoral (AD=13, est IIIb/IV=10) <u>Para obj. 2:</u> -15/24 pacientes com fusão em <i>ALK</i> em tecido tumoral.	<u>Para obj. 1:</u> NGS Illumina (painel comercial Lung Plasm, Burning Rock Biotech Ltd, Guangzhou China). <u>Para obj. 2:</u> Crizotinibe.	<u>Para obj. 1:</u> Variantes encontradas no tecido tumoral pelas técnicas FISH e/ou ICH. <u>Para obj. 2:</u> Pacientes divididos em <i>ALK</i> positivo em plasma e tumor (n=9; AD=9; IV=9) vs. <i>ALK</i> negativo em plasma e positivo no tumor (n=6; AD=6; IIIb=3; IV=3).	<u>Para obj. 1:</u> NGS identificou 13/24 fusões, a maioria do tipo EML4- <i>ALK</i> -NGS em ctDNA vs FISH/ICH no tumor (n=39): Sensibilidade: 54,2%; Especificidade: 100%; Acurácia: 71,8%. Sem diferença significativa na comparação entre pacientes com e sem metástase a distância. <u>Para obj. 2:</u> SLP: plasma e tumor <i>ALK+</i> 8,35 meses (4,07–12,62) vs. plasma <i>ALK-</i> , tumor <i>ALK+</i> 9,93 meses (6,97–12,90). A diferença foi não significativa.	-A avaliação do efeito do Crizotinibe não foi feita por meio de ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado. Todos os pacientes incluídos receberam o medicamento e eram <i>ALK+</i> no tecido tumoral. -Não é possível definir com exatidão o início do tratamento. Não fica claro se a biópsia líquida foi coletada antes ou depois do início do tratamento. -Estudo não define objetivo primário e secundário.
2) Liu et al., 2018 Estudo transversal China	Avaliar a performance de uma plataforma de NGS para detectar quatro tipos de variantes (SNVs, indels, rearranjos e CNVs) em ctDNA de pacientes com CPNPC avançado, usando amostras pareadas de DNA tumoral e ctDNA.	-72 Pacientes com CPNPC (AD=87,5%; est IV=48,6%) -46/72 com amostras pareadas de tumor e plasma -26/72 com amostras somente de plasma.	-ctDNA avaliado por NGS Ion painel (de 145 genes, contém <i>ALK</i> , <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> e <i>ROS1</i>) em 72 pacientes -ctDNA avaliado por ARMS qPCR em 26/72 pacientes -10 casos negativos em ct, mas positivos no tecido para SNVs ou indels, foram	No tecido tumoral: -Genotipagem por NGS (n=46) -FISH para o gene <i>ALK</i> (n=64). -ARMS qPCR para <i>EGFR</i> e <i>KRAS</i> (n=26).	-25/46 concordantes em ctDNA e tumor -21/46 amostras discordantes pelas alterações adicionais encontradas em tumor. -Alterações mais comuns em tumor: <i>EGFR</i> (17), <i>KRAS</i> (9), <i>ALK</i> (5) -Considerando todas as alterações relevantes: Sensibilidade: 53,2% Especificidade: 75,0% Acurácia geral: 54,9%	-Não é claro se o estudo é multicêntrico ou não. -As amostras de tumor e de plasma foram coletadas antes do início do tratamento. -Para as amostras pareadas concordantes, a FA do tecido tumoral foi > do que em plasma (26,9% vs. 7,4%). - Em um caso FN, a amostra foi positiva no ddPCR (p.L858R, FA=0,49%). LoD do NGS para SNV e indels FA=1%.

reavaliados por
ddPCR.

Acurácia em pacientes
metastáticos: 65% (n=19).

-EGFR - p.L858R:

Sensibilidade: 76,2%

Especificidade: 100%

Acurácia: 93,1%

-EGFR - Deleções éxon 19:

Sensibilidade: 58,8%

Especificidade: 100%

Acurácia: 90,3%

-Fusão ALK: Sensibilidade:

64%; Especificidade: 98,3%;

Acurácia: 95%

-p.G12X (n=65):

Sensibilidade: 75%;

Especificidade: 100%;

Acurácia: 96,9%.

-A concordância foi maior em
pacientes com estágio M1 (M1
vs. M0).

-Houve falha de detecção de
CNVs pelo NGS em plasma.

- Não houve validação de todos
os resultados discordantes (casos
sem amostra suficiente). Não é
possível estratificar os dados
para a população de interesse ou
conforme o comparador
utilizado.

3) Mao et al., 2017
Estudo transversal
Unicêntrico
China

-Objetivo 1:

Detectar e quantificar, por
meio de um painel de
NGS, alterações genéticas
em amostras pareadas de
plasma e tecido tumoral
em pacientes com
CPNPC.

-Objetivo 2:

Comparar a acurácia de
um painel de NGS para
detecção de variantes no
gene *EGFR* com o teste
padrão.

-Objetivo 3:

Comparar a acurácia de
um painel de NGS para
detecção de variantes no
gene *ALK* com o teste
padrão.

-Objetivo 4:

Comparar a acurácia de
um painel de NGS para
detecção de variante do

40 pacientes com CPNPC
(AD=62,5%;
IV=67,5%).

est

Para obj. 1:

ctDNA avaliado por
NGS Illumina
(painel próprio de
168 genes, contém
ALK, *EGFR*, *BRAF* e
ROS1).

Para obj. 1:

Painel de NGS próprio
em tumor

Para obj. 2:

ARMS qPCR para o
gene *EGFR* (éxon 19
del, p.L858R,
p.T790M) em tumor

Para obj. 3:

FISH para o gene *ALK*
em tumor

Para obj. 4:

RTqPCR para o gene
ROS1 em tumor.

Para obj. 1:

Sensibilidade

-Geral (todos os genes e
variantes): >99%;

-Geral por variante (sem
CNV): 87,2%;

- Para os genes *EGFR*, *ALK*,
ROS1, *RET*, *ERBB2*, *BRAF*,
KRAS: 96,2%;

-Por paciente: 97,4%; SNV:
84,1%; Indel: 95,7%; Fusões:
100%; CNVs: 44,4%;

Especificidade por variante e
gene: <99%

Para obj. 2:

Acurácia *EGFR*: 100%

Para obj. 3:

Acurácia *ALK*: 97,3%

Para obj. 4:

Acurácia *ROS1*: 100%

-Utiliza amostras pareadas.

-Descreve concordância por
classe de alteração genética (com
CNV e sem CNV).

-A população celular subclonal
com mutações driver são mais
propensas a liberar DNA do que
subclones sem mutações driver.

-Limitações: Desfechos não são
específicos para a população de
interesse.

gene *ROS1* com o teste padrão.

4) Sim et al., 2018 Estudo transversal Unicêntrico Singapura	<u>-Objetivo 1:</u> Avaliar a detecção, por NGS, de variantes em ctDNA pacientes com CPNPC. <u>-Objetivo exploratório:</u> Avaliar em pacientes progressivos a acurácia do NGS em identificar a mutação p.T790M no plasma.	<u>Para obj. 1:</u> -50 pacientes com CPNPC (AD=82%; est. IV=98%) -Pacientes divididos em a) 35 sem tto. prévio (22 com amostras pareadas plasma e tumor) e b) 15 resistentes à primeira e segunda linha de tratamento com TKI (4 amostras pareadas plasma e tumor) <u>Para obj. exploratório:</u> -13/15 pacientes resistentes	<u>Para obj. 1 e exploratório:</u> -ctDNA avaliado por NGS Mi-Seq (painel comercial QIAseq Targeted DNA Panel for lung cancer, de 7 genes).	<u>Para obj. 1:</u> -qPCR (cobas) ou sequenciamento (Sanger) aplicado em tecido tumoral para o gene <i>EGFR</i> . <u>Para obj. exploratório:</u> -ddPCR em plasma para a mutação p.T790M do gene <i>EGFR</i> .	<u>Para obj. 1</u> -Pacientes sem tto. prévio e com amostras pareadas: acurácia: 86% -Pacientes progressivos com amostras pareadas: acurácia: 50% <u>Para obj. exploratório:</u> Acurácia: 92%.	-Limitações: Validação por ddPCR só para a coorte 2 (13/15). -Há uma amostra estágio III e outros subtipos histológicos de CPNPC na amostra. -Desfecho é misto para a população.
5) Wang et al., 2016 Estudo de coorte Unicêntrico China 10 meses	<u>-Objetivo 1:</u> Avaliar viabilidade e o desempenho do NGS em ctDNA para detectar e quantificar rearranjos de <i>ALK</i> . <u>-Objetivo 2:</u> Avaliar a taxa de detecção das variantes em <i>ALK</i> após tratamento.	<u>-Obj. 1:</u> 24 pacientes com CPNPC positivos para o gene <i>ALK</i> em tumor (AD=100%; est. IV=91,7%) - Baseline: 20/24 amostras sem tto, pareadas com tecido tumoral - 36 amostras <i>ALK</i> - e tumor. <u>-Obj. 2:</u> Amostras longitudinais de plasma de 7 pacientes após tto (3 pemetrexed+cis ou carboplatina; 1 pemetrexed+cisplatina com troca para crizotinibe pós PD; 3 crizotinibe).	<u>Para obj. 1 e 2:</u> -ctDNA avaliado por NGS Illumina (painel comercial de 168 genes, Burning Rock Biotech Ltd, contendo os genes <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>ALK</i> e <i>ROS1</i>).	<u>Para obj. 1 e 2:</u> Biópsia tecidual avaliada pelas técnicas IHC e FISH para o gene <i>ALK</i> .	<u>Para obj. 1:</u> Amostras sem tto. no baseline (n=19/24 <i>ALK</i> +): Sensibilidade: 79,2% (57,9 - 92,9%); Especificidade: 100%; Acurácia: 91,7%. VPP= 100%; VPN= 87,8%; <u>Para obj. 2</u> -Sensibilidade: 69,2% (9/13). -Detecção <i>ALK</i> p.L1152R, p.L1171T e p.L1196M (resistência ao tratamento) em um paciente após Crizotinibe.	-A concentração de ctDNA foi associado com o status tumoral através da análise longitudinal (bom biomarcador para monitoramento). -Limitações: O momento da coleta da amostra de biópsia líquida não é claro, principalmente na avaliação da taxa de rearranjo pós terapia. - Desfechos não são específicos para os pacientes com estágio IV do tumor.

6) Xu et al., 2017
Estudo transversal
Unicêntrico
China

-Objetivo 1:

Comparar o desempenho de quatro técnicas em plasma com biópsia tumoral quanto a detecção de variantes clinicamente relevantes do gene *EGFR* (p.L858R, éxon 19 del, p.T790M e p.G719X)

-Objetivo exploratórios:

Em plasma, comparar a acurácia do NGS em comparação com outras técnicas padrão.

-20 pacientes com CPNPC (AD=90%; est. IV=35% na biópsia tumoral e 85% na biópsia líquida).
-14/20 pacientes em terapia sistêmica.

Para obj. 1 e 2:

ctDNA avaliado por NGS Hi-Seq Illumina (painel comercial de 61 genes, Accu-Act Pan Center, Acuragen, contendo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ALK* e *ROS1*).

- ADx-ARMS qPCR;
- Cobas-ARMS qPCR;
- ddPCR.

Para obj. 1:

Biópsia tumoral avaliada pelas técnicas qPCR
-ADx-ARMS (n=20)
-NGS padrão (n=18).

Para obj. exploratórios:

Biópsia líquida avaliada pelas técnicas:
-a) NGS
- b) ADx-ARMS qPCR,
- c) Cobas-ARMS qPCR
- d) ddPCR.

Para obj. 1:

-Resultado dos comparadores apresentado no formato a/b/c/d:

-Sensibilidade (%): p.T790M: 0/0/0/0; p.L858R: 37,5/12,5/25/25;

Éxon 19 del: 66,7/50/83,3/83,3;

p.G719X: 100/0/100/100
Especificidade (%): p.T790M: 80/85/90/90

p.L858R: 100/100/100/100
Éxon 19 del: 100/100/93,3/100

p.G719X: 100/100/100/100
Acurácia (%)

-p.T790M: 76,2/81/85,7/85,7;

p.L858R: 76,2/66,7/71,4/71,4;

éxon 19 del: 90,5/85,7/90,5/95,2;

p.G719X: 100/95,2/100/100;

-Considerando todas as técnicas e as variantes: p.L858R, del 19 e p.G719X):

Sensibilidade: 26,7% - 53,3%
Especificidade: 100%

Taxa de coincidência: 45-65%.

Para obj. exploratórios:

- Comparador b:

Sensibilidade: 88% (47% - 100%)

Especificidade: 67% (38% - 88%)

Acurácia: 74%

- Comparador c:

Sensibilidade: 90% (55% - 100%)

Especificidade: 77% (46% - 95%)

-17 pacientes estágio IV na coleta de sangue foram estudados para 21 ocorrências de variantes.

-Amostras pareadas: 13 amostras com mais de um ano entre as coletas, em 8/13 maior que três anos. Sete pacientes tiveram as amostras de tumor e plasma coletadas com diferença de até um ano de diferença.

-A mutação p.T790M apresenta a menor especificidade (80-90%) do que a p.L858R (100%) e éxon 19 del (93,3%-100%).

-Limitações: Na comparação com o tecido tumoral, qPCR e NGS são utilizados como referência (algumas amostras foram coletadas em tempos e de tumores diferentes, diferindo no resultado entre as técnicas). Houve evolução do estágio tumoral entre a coleta de tecido e plasma. Concordância entre as técnicas realizadas em tecido para pacientes com mutações foi de 93,3% (14/15). O qPCR identificou uma variante não identificada pelo NGS (éxon 19 del).

Acurácia: 83%
- Comparador d:
Sensibilidade: 100% (66% - 100%)
Especificidade: 79% (49% - 95%)
Acurácia: 87%.

7) Yang et al., 2016

Estudo de coorte
Unicêntrico
China
52 meses (Mediana= 23,8; 4,3-52,8).

-Objetivo 1:

Estimar a taxa de detecção de variantes em *EGFR* por ddPCR

-Objetivo 2:

Comparar a taxa de sobrevida pós-tratamento de acordo com a presença/ausência de variantes, e com a quantidade de variantes, em ct *EGFR* obtido de amostras de plasma pré e pós-tratamento

-Objetivos exploratórios:

a) Avaliar a existência de outros mecanismos de resistência ao tratamento por NGS em ctDNA obtido de plasma pré e pós-tratamento.
b) Comparar a performance de ddPCR e NGS.

-73 pacientes com CPNPC metastático

-73/73 com variantes em *EGFR* em tecido tumoral
-Todos tratados com *EGFR*-TKI (37 como primeira linha), 67 com amostras de plasma pré-tto. e pós PD com tto.

-No último follow-up: 67/73 com progressão da doença; 38/73 evoluíram para óbito

-Para objetivos

exploratórios: 12/67 pacientes randomicamente selecionados, e que tinham amostras pré e pós PD com tto. (total= 27 amostras).

Para obj. 1:

-ddPCR para éxon 19 (del, p.L858R, p. T790M) de *EGFR* em 73/73 pacientes

Para obj.2:

EGFR-TKI como tratamento de primeira linha (n=37)
EGFR-TKI como tratamento de segunda linha ou posterior (n=36)

Para obj. exploratórios:

-NGS Hi-Seq da Illumina, incluindo *EGFR*, em 12/73 pacientes que já haviam sido avaliados por ddPCR.

Para obj. 1:

Variantes encontradas por DHPLC em tumor (éxon 19 gene *EGFR*)

Para obj. 2:

Pacientes sem variantes em *EGFR* em plasma

Para obj. exploratórios:

ddPCR para éxon 19 (del, p.L858R, p. T790M) de *EGFR*.

Para obj. 1:

- Concordância ddPCR em plasma vs DHPLC em tumor= 54/73 (74%).

-Quantidade relativa de alelos mutantes em plasma pré por ddPCR (n=54): a) alta > 5.15% (n=27); b) baixa ≤ 5.15% (n=27)

-Abundância de variantes de *EGFR* pós- tto (n= 67 pt), por ddPCR: menor (29/67) ou igual (38/67)

Para obj.2:

-Taxa de resposta e de controle da doença não diferiram entre pacientes com alelos variantes e selvagem em *EGFR*.

-SLP e SG> em pacientes com variantes em tumor e ctDNA do que em pacientes somente com variantes em tumor (12,6 vs. 6,7 meses, e 35,6 vs. 23,8 meses, respectivamente);

-SLP > para grupos com alta e baixa quantidade (pré-tto.) de alelos mutantes em plasma relação aos sem variante 15,4 vs. 11,1 vs. 6,7 meses respectivamente (P < 0.001).

-Pacientes com diminuição da qt. de alelos mutantes pós tto. apresentaram >SLP e SG (12,7 vs. 7,1 meses, e

- Dados de desfecho clínico são para ddPCR em plasma vs. DHPLC em biópsia tecidual.

-O número de locais metástases não alterou o nível de ctDNA (p=0,373).

-O status de variantes de *EGFR* permaneceram como um fator de predição de SLP independente de tratamento com *EGFR*-TKI.

28,3 vs. 14,9 meses, respectivamente)

Para obj. exploratórios:

-NGS detectou variantes em *TP53*, *PTEN*, *MLL2*, *CREBBP*.

Também detectou outras variantes em *EGFR*.

-Limite de detecção de alelos: ddPCR (0,04%), NGS (5%)

- Comparações NGS vs ddPCR se qt de alelos mutantes baixa: Sensibilidade: 89%, Especificidade: 100%; Se alta: Sensibilidade: 100%; Especificidade: 100%.

-A quantificação de alelos variantes por NGS e ddPCR apresenta excelente concordância ($R^2 = 0,953$; $p < 0,001$).

8) Dono et al., 2019

Estudo de coorte
Unicêntrico
Itália

-Objetivo 1:

Avaliar a detecção de variantes do *EGFR* em plasma por NGS comercial e qPCR

-Objetivo 2:

Comparar a taxa de sobrevida livre de progressão e sobrevida global pós-tratamento com Osimertinibe de acordo com a presença/ausência da variante p.T790M em ct *EGFR* obtido de amostras de plasma

-Objetivo 3: Desenvolver algoritmo diagnóstico para a p.T790M em plasma.

-Obj. 1:

Pacientes com CPNPC (n = 42; 40 com dados clínicos)

AD=40, est.IV=40

-Pacientes com

PD em tratamento com *EGFR*-TKI de primeira ou segunda geração= 42

-Obj. 2:

Pacientes tratados com Osimertinibe com p.T790M NGS positivo (n=17).

Para obj. 1

-NGS Ion em ctDNA
- qPCR em ctDNA (n=42)

-qPCR no tecido (baseline)

-qPCR no tecido pós-tto com Osimertinibe (n=15)

Para obj. 2

Pacientes divididos em dois grupos com base nos resultados de Qpcr.

Para obj. 1:

Mutações sensíveis originais

-qPCR em tecido após tto com TKI

Para obj. 2:

a) variante detectada por qPCR (n=8); b)

Variante não detectada por qPCR (n=9).

-Obj. 1:

O NGS e o qPCR no plasma dos pacientes na PD apresentou 100% de especificidade e sensibilidade para a mutação sensível original

-O NGS em plasma e o qPCR em tecido após tto apresentaram sensibilidade, especificidade e concordância de 80%. A concordância com a variante original foi de 93,3%.

- Para o NGS e qPCR em plasma a sensibilidade é 100% (90% - 100%), e a especificidade: 21% (8% - 41%), resultando em acurácia de 65%.

-Genotipagem em ctDNA por dois tipos de qPCR. Origem dos dados para mutações sensíveis originais não fica clara e não é possível determinar a abrangência de alterações da cobertura dos testes do qPCR, o que poderia explicar o número de FP quando se compara o NGS utilizando o qPCR como referência (n=22).

-A validação ortogonal (ddPCR, p.T790M) confirmou 13 casos positivos e 10 negativos por NGS. 3 amostras com insuficiência de ctDNA para a análise por ddPCR.

-Pacientes sem p.T790M por qPCR (n=8), mas positivos por NGS, evoluíram para resposta parcial (n=3) ou SD (n=5,

-Casos discordantes entre qPCR e NGS com VAFs menores que os concordantes (6/10 p.L858R).

-Para obj. 2:
Não houve diferença estatística quanto à SLP e SG nos grupos qPCR + e qPCR-: SLP: 12,2 vs. 8,6 meses (p=0,177), respectivamente SG: 19,2 vs. 11,6 meses (p=0,143), respectivamente

-Para obj. 3:
Iniciar a testagem por qPCR. Se qPCR for negativo, testagem por NGS. Se negativo por NGS, nova coleta de sangue e molecular em 2-4 semanas. Caso haja condições clínicas, nova biópsia é recomendada à repetição do teste. p.T790M detectada por qPCR não necessita de verificação por NGS.

RECIST 1.1), após tratamento com Osimertinibe.

-Limitações: Não é claro o momento das coletas de biópsia, tumoral e líquida, nem o intervalo entre ambas. O trabalho utiliza amostras pré- e pós-tratamento, mas as informações são insuficientes para determinar por quanto tempo esse tratamento ocorreu. Inexistem dados clínicos de 2 pacientes.

9) Hanibuchi et al., 2019 Estudo transversal Unicêntrico Japão	<u>-Objetivo 1:</u> Avaliar a utilidade clínica de ctDNA para diagnóstico, para os dados gerais e para mutações específicas por técnicas distintas. <u>-Objetivo 2:</u> Avaliar a taxa de detecção de da p.T790M em pacientes tratados e não tratados previamente com EGFR-TKI. <u>-Objetivo 3:</u> Avaliar a concordância entre as técnicas para a detecção de mutações de ativação em EGFR.	<u>-Objetivo 1:</u> Pacientes com CPNPC (n = 45); AD=97.8%, est. IV=86.7% 36 pacientes com sobras de amostras histológicas, 29 biópsias primárias, 8 re-biópsias. <u>-Objetivo 2:</u> Pacientes sem terapia prévia com EGFR-TKI (n=18/45). -Pacientes com terapia prévia com 1 ou mais tipos de EGFR-TKI ("resistentes", n=27/45).	<u>Para obj. 1:</u> -ctDNA avaliado por NGS Ion. -qPCR no ctDNA. -ddPCR no ctDNA. <u>-Objetivo 2:</u> -F-PHFA. -NGS. -ddPCR. -qPCR. <u>Para obj. expl.:</u> -ctDNA avaliado por NGS Ion <u>Para obj. expl.:</u> -ctDNA avaliado por NGS Ion -qPCR.	<u>Para obj. 1:</u> -PNA-LNA PCR clamp no tecido tumoral. <u>Para obj. 2:</u> -Taxa de detecção de cada um dos métodos avaliados para os dois grupos definidos. <u>Para obj. expl. a e b:</u> -qPCR Therascreen EGFR em tecido tumoral.	<u>Para obj. 1:</u> Quando o PNA-LNA PCR no tecido tumoral foi utilizado para referência, o NGS em plasma obteve a sens. geral de 67%, esp. 98 % e concordância de 64%, melhor que as outras técnicas (sens. 56-63%, esp. 100%, conc. 56-60%). -Para del do éxon 19: sens. 80%, espec. 96% e acurácia: 89%. - Para p.L858R: sens. 57%, esp. 100% e acurácia: 78%. <u>Para obj. 2:</u> -Taxa de detecção da p.T790M em pacientes	- Concordância entre ctDNA NGS e ctDNA qPCR: p.T790M: 86 % (37/43); éxon 19 del: 100 % (43/43); p.L858R: 95 % (41/43) - Concordância entre ctDNA NGS e ctDNA ddPCR: p.T790M: 84 % (37/44); éxon 19 del: 96 % (42/44); p.L858R: 91 % (40/44) -Para o objetivo 1, há divergência no n utilizado nos testes (41-45). Nem todas as amostras foram testadas para todas as técnicas. -Nenhum paciente foi detectado com a p.T790M em tecido tumoral de biópsia inicial.
--	--	---	--	--	--	--

-Objetivos exploratórios:

- a) Avaliar a detecção de p.L858R, éxon 19 del, p.G719X do ctDNA de plasma em comparação a biópsia do tumor inicial;
- b) Avaliar a detecção de p.L858R, éxon 19 del e p.T790M do ctDNA de plasma em comparação ao tecido de re-biópsia.

-ddPCR.

resistentes/tx detecção em pacientes sem tto prévio:

F-PHFA= 44/0%;

NGS=41/11%;

ddPCR=37/0%;

qPCR=46/6%.

Para obj. exp. a:

Em comparação a biópsia do tumor inicial avaliada por qPCR, a esp. do NGS foi menor que a do qPCR para a p.T790M (97 vs. 100%), mas maior que do que a F-PHFA (69%).

-Para del éxon 19 e p.G719X, a sens., esp. e acurácia do qPCR e do NGS foi de 100%. Para o F-PHFA, a sens., esp. e acurácia foram menores para del. éxon 19 (90, 95 e 93%, respectivamente), enquanto para a p.G719X foi de 100% para todos os desfechos avaliados.

-Para p.L858R a sens. do NGS foi melhor que a do qPCR e F-PHFA (100 vs. 94% e 76%). A esp. para todas as técnicas foi 100%.

Para obj. exp. b

-Para a p.T790M, a sens. do ddPCR foi menor que a do NGS e qPCR (25 vs. 50%), mas a esp. foi maior (75 vs. 50%). Para F-PHFA, a sens. foi 75% e esp. 50%. A acurácia foi de 50% para todas as técnicas.

- Para deleções do éxon 19 a sens. foi de 80%, a esp. de 100% e a acurácia de 88% para ddPCR, qPCR e NGS. O F-

Limitações: biópsia tumoral avaliada com dois tipos de qPCR (29 por PNA-LNA e 08 pelo Therascreen). Tempo de comparação entre tumor e plasma não fica claro. Resultado conjunto, inclui estágio IIIB (n=1), recorrência(n=5) e adenoescamoso (n=1).

PHFA teve sens. e esp. de 100%.
-Para a p.L858R a sens. foi de 33 %, a esp. de 100% e a acurácia de 75% para ddPCR, qPCR e NGS. O F-PHFA falhou em detectar todas as mostras (sens. 0%), e obteve esp. de 100%.

10) Marchetti et al. 2015 Estudo de coorte Multicêntrico Itália 2 meses	<u>-Objetivo 1:</u> Comparar a quantificação em ctDNA de variantes em <i>EGFR</i> para a predição de resposta à terapia com TKI. <u>-Objetivo 2:</u> Avaliar a acurácia do NGS em ctDNA para detecção de variantes do gene <i>EGFR</i> em comparação com qPCR padrão. <u>-Objetivo exploratório:</u> Comparar a acurácia do NGS em ctDNA quando comparado com a biópsia tecidual.	-69 pacientes com CPNPC (203 amostras de plasma) -21 controles. <u>Objetivo 1:</u> -27 pacientes com estágio IIIb-IV (prospectivo) <u>Objetivo 2 e exploratório:</u> -42 pacientes com estágio localmente avançado ou metastático (retrospectivo) + controles.	<u>Para obj. 1:</u> -ctDNA avaliado por NGS 454 LifeSciences, gene <i>EGFR</i> .	<u>Para obj. 1:</u> -ctDNA avaliado por NGS 454 LifeSciences, gene <i>EGFR</i> . <u>Para obj. 2:</u> -(1) qPCR Cobas aplicado em amostra de biópsia líquida. <u>Para obj. exploratório:</u> -Sequenciamento de Sanger ou outro (não especificado) +seq. aplicado a biópsia tecidual.	<u>Para obj. 1:</u> -Após o início do tratamento com TKI, a percentagem de alelos mutados (índice SQI) do gene <i>EGFR</i> em plasma apresentou diminuição em 95% das amostras. Ao 4º dia de tratamento a diminuição média foi de 13.5%, ao 8º dia de 41.6% e ao 14º dia de 63.5%. -13/15 amostras se tornaram negativas para a mutação pesquisada em plasma por NGS entre 8º e 60º dia após o início do tratamento <u>Para obj. 2:</u> -Acurácia 94% (30/31). <u>Para obj. exploratório:</u> Sensibilidade 74% Especificidade 100%.	-O tempo de seguimento do braço retrospectivo foi de 12 meses (Trigger trial - NCT01378962). -Dos 42 casos, o qPCR falhou em detectar 12 e o NGS falhou em 11 casos. -Demonstra que a quantificação de mutações em <i>EGFR</i> com o NGS em plasma pode ser útil para predição precoce da resposta clínica do paciente (respondedores rápidos versus lentos). -O qPCR (Cobas) quando comparado ao DNA tumoral apresentou sensibilidade de 72% e especificidade de 100%. -Limitações: Não descreve a histopatologia da amostra e o estágio tumoral é determinado apenas para uma parte dos pacientes.
--	--	---	---	---	---	--

Obj.= objetivo; CPNPC= câncer de pulmão de não-pequenas células; AD= adenocarcinoma, NGS= sequenciamento de nova geração, qPCR= PCR em tempo real, RT-qPCR= PCR em tempo real utilizando transcriptase reversa, ddPCR= digital droplet PCR; ctDNA= DNA de célula tumoral em plasma; TKI= inibidor de tirosina quinase SNV= variação de nucleotídeo único, CNV= variação no número de cópias, FA= frequência alélica; VAF= frequência alélica da variante; tto= tratamento; Conc.= concordância; SLP= Sobrevida livre de progressão; SG= Sobrevida global; PD, progressão da doença;SD= doença estável; ctDNA= DNA tumoral circulante; Sens.= Sensibilidade; Esp.= Especificidade; VPP= Valor preditivo positivo; VPN= Valor preditivo negativo; IC= Intervalo de confiança; ND= não determinado. FISH=hibridização fluorescente in situ; ICH= imuno-histoquímica; FN= falso negativo, LoD= limite de detecção.

Tabela 2 - Caracterização das Revisões Sistemáticas com metanálise selecionadas

Autores	Objetivos	Crítérios de Inclusão dos estudos na RS	Metodologia	Número de estudos identificados e número de incluídos	Desfechos metanalisados e resultados (IC95%)	Conclusões, observações e limitações
1) Passiglia et al., 2018	-Avaliar a associação entre a localização do sítio metastático (intratorácico, M1a vs extratorácico, M1b) e a sensibilidade da análise do ctDNA para detectar variantes em <i>EGFR</i> em pacientes com CPNPC avançado.	-Pacientes com diagnóstico histológico de CPNPC avançado; -Estudos em inglês; -Pesquisa por variantes em <i>EGFR</i> em amostras pareadas de tumor e plasma; -Sensibilidade da análise de variantes em <i>EGFR</i> em ctDNA em relação a localização do sítio metastático intra- (M1a) e extratorácico (M1b).	-Buscas realizadas nas bases de dados Medline, Embase e Cochrane, e Clinical Trials.gov. -Período de busca: até maio de 2017. -Extração de dados e cálculo de OR para sensibilidade utilizando modelo de efeito randômico -Heterogeneidade: Teste Q	-A busca resultou em 93 artigos. -Nove estudos foram incluídos.	-Sensibilidade de M1b vs. M1a= OR: 5,09 (2,93-8,84); -Teste Q= P< 0.0001-OR ajustada para técnica utilizada e viés de publicação: 3,19 (1,73-5,88) -A localização da metástase interfere na acurácia diagnóstica quando se utiliza ctDNA para a p.L858R, p.T790M e del éxon 19. A presença de metástase extra torácica aumenta a acurácia diagnóstica.	-A localização da metástase interfere na acurácia diagnóstica quando se utiliza ctDNA para a p.L858R, p.T790M e del éxon 19. -Não há subanálise para o subtipo histopatológico de CPNPC, bem como a intervenção NGS não é avaliada pelos autores.
2) Mlika et al., 2018	-Avaliar a acurácia da análise genética em ctDNA para determinar o perfil das variantes associadas ao CPNPC em comparação a biópsia tecidual.	-Pacientes com câncer de pulmão que tivessem realizado análise genética em tecido tumoral; -Estudos em inglês ou francês; -Análise do ctDNA em plasma, soro ou sangue; -Informação sobre VP, VN, FP e FN.	-Buscas realizadas nas bases de dados PubMed, Embase e Cochrane. -Período de busca: até junho de 2017. -Extração de dados, cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, DOR, e curvas ROC.	-A busca resultou em 839 artigos. -Trinta e três estudos foram incluídos.	-Sensibilidade: 0,63 (0,61-0,65); -Especificidade: 0,92 (0,91-0,93); -VPP: 8,123 (5,13-12,84); -VPN: 0,456 (0,383-0,543); -DOR: 20,50 (12,61-33,30); ROC: AUC 0,82. Para os estudos que utilizaram NGS (ctDNA vs tumor): -Sensibilidade: 0,75 (0,71-0,801); -Especificidade: 0,82 (0,77-0,87).	-Dos estudos que os autores indicam como utilizando NGS: -Weber et. al., 2014 e Mok et. al., 2015 utilizaram cobas2 (qPCR), não há utilização da técnica de NGS. -Santos et. al., 2016: é um resumo de congresso. -Cui et. al., 2017 e Rachiglio et. al., 2016: utilizaram NGS de fato. -Estudo foi classificado pelo AMSTAR 2 como tendo qualidade criticamente baixa.
3) Qiu et al., 2015	-Avaliar a acurácia da análise genética em ctDNA para determinar o perfil das variantes associadas ao CPNPC em comparação a biópsia tecidual.	-Pacientes com diagnóstico histopatológico ou citológico de CPNPC. -Variantes em <i>EGFR</i> teriam de ter sido detectadas em ctDNA e tecido tumoral.	-Buscas realizadas nas bases de dados PubMed, Embase, Cochrane e ISI Web of Knowledge. -Período de busca: até setembro de 2014. -Cálculos de sensibilidade,	-A busca resultou em 976 artigos. -Vinte e seis estudos foram incluídos.	-Especificidade: 0,959 (0,929 - 0,977); -Sensibilidade: 0,620 (0,513 - 0,716); -VPP: 79%; -VPN: 9%; -AUC: 0,91 (0,89 - 0,94);	-Análise de ctDNA é um método efetivo para detectar variantes em <i>EGFR</i> em pacientes com CPNPC. -A sensibilidade varia consideravelmente

-Possibilitaram a extração dos dados de VP, VN, FP e FN.	a especificidade, VPP, VPN, DOR e curva ROC com IC de 95%.	-DOR: 38,270 (21,090 - 69,444); -Heterogeneidade: Modelo bivariado 98.54% (IC 95% 97.88–99.21).	-dependendo da plataforma e do método de detecção. -Os estudos incluídos não utilizaram a técnica de NGS.
--	--	--	--

Sens.= Sensibilidade; Esp.= Especificidade; VPP= Valor preditivo positivo; VPN= Valor preditivo negativo; DOR= Razão de chances diagnóstica (OD diagnóstica); ROC= Receiver operator characteristic curve; OD= Razão de chances; IC= Intervalo de confiança; VP= verdadeiro positivo; VN= verdadeiro negativo; FP= falso positivo; FN= falso negativo ND= não determinado.

Tabela 3. Síntese das características do sequenciamento de nova geração em biópsia líquida e comparadores utilizados nos estudos selecionados.

Estudo	País, Ano	Plataforma de NGS utilizada no ctDNA	Painel utilizado, fabricante (número total de genes no painel)	Genes de interesse avaliados nos resultados	Profundidade média de leitura	Limite de detecção do NGS (FA das variantes)	Comparador de interesse	Limite de detecção do comparador
Donno et al	Itália, 2019	Ion S5	Oncomine Lung cfDNA Assay (11) ¹	<i>EGFR</i>	>2.500x por base; >25.000x por amplicon	0,1%	qPCR Easy <i>EGFR</i> Real Time PCR (Diatech Pharmacogenetics), PANAMutyper R <i>EGFR</i> (Panagene) ² ddPCR	qPCR: Diatech: 0,5% Panagene: < 0,1% ddPCR: > 0,5%*
Hanibuchi et al	Japão, 2019	Ion Torrent PGM	Análise de gene	<i>EGFR</i>	> 100.000 por amplicon	0.05%	qPCR BNA Real-time PCR Mutation Detection Kit <i>EGFR</i> (Riken Genesis) ddPCR	0,05% ³
Liu et al	China, 2018	Ion Proton Sequencer	Painel próprio (145)	<i>ALK</i> (intron 19, exons, 19 e 20)	938x	1% FA SNV e indel, 10% FA CNV e rearranjo	FISH Teste comercial não especificado (Abbott)	ND
Sim et al	Singapura, 2018	Mi-Seq Illumina	QIAseq Targeted DNA Panel for lung cancer, Qiagen (07)	<i>EGFR</i>	644,2x (mínimo de 136x)	1-5%	ddPCR	< 1%
Cui et al	China, 2017	NextSeq 500 Illumina	Lung Plasm, Burning Rock Biotech (168)	<i>ALK</i>	ND	ND	FISH (ND) ICH Ventana <i>ALK</i> (D5F3)	ND
Mao et al	China, 2017	Nextseq 500 Illumina	Painel não especificado (168)	<i>ALK, ROS1</i>	2.3881x (mínimo de 100x)	NA	FISH Teste comercial não especificado (Abbott-Vysis), RT-qPCR <i>ROS1</i> fusion gene detection kit (Amoy Dx)	ND
Xu et al	China, 2017	Hi-Seq 2500 Illumina	Accu-Act Pan Center, Acuragen (61)	<i>EGFR</i> (p.T790M, p.L858R, p.G719X)	7.000x (mínimo de 500x)	0,02%	qPCR AmoyDx <i>EGFR</i> 29 Mutations, Cobas <i>EGFR</i> Mutation Test v2 ddPCR	ND
Wang et al	China, 2016	NextSeq 500 Illumina	Painel commercial não especificado Burning Rock Biotech (168)	<i>ALK</i>	2.2708x	ND	FISH LSI <i>ALK</i> Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Abbott-Vysis) ICH Ventana <i>ALK</i> (D5F3)	ND
Yang et al	China, 2016	Hi-Seq 2500 Illumina	Agilent SureSelect customizado (483)	<i>EGFR</i>	609 ×	5%	ddPCR	0,04%

Marchetti et al	Itália, 2015	454 LifeScience	Análise de gene	<i>EGFR</i> (éxons 18, 19, 20 e 21)	20.230x por amostra	ND	qPCR Cobas <i>EGFR</i> Mutation Test	< 2%
-----------------	--------------	-----------------	-----------------	-------------------------------------	---------------------	----	---	------

¹ 35 amplicons que cobrem 169 variantes hotspot nos 11 genes; ² Utilizou-se o PANAMutyper R *EGFR* (Panagene) para 10/42 amostras. ³ para todas as técnicas descritas. ND: não descrito pelos autores; FA: frequência alélica, SNV: variação de nucleotídeo único; CNV: variação no número de cópias; indel: inserção/deleção; NGS: sequenciamento de nova geração. * Limite de detecção chegou a 0,01% quando pelo menos 10ng de DNA foram analisadas em testes in vitro, mas devido relatos de falso positivo usando FFPE, os autores escolheram utilizar o lod >0,5%.

10.3. Avaliação da Qualidade Metodológica dos Estudos Incluídos (n=13)

A qualidade metodológica dos estudos incluídos foi avaliada com o AMSTAR 2 (Anexo 6) e com o QUADAS 2 (Anexo 7). Entre as revisões sistemáticas com metanálise avaliadas, uma apresentou qualidade criticamente baixa (MLIKA *et al.*, 2018), uma foi considerada de qualidade baixa (PASSIGLIA *et al.*, 2018) e uma teve qualidade classificada como moderada (QIU *et al.*, 2015), segundo classificação pelo AMSTAR 2. A avaliação pela ferramenta Quadas 2 evidenciou que a maior parte dos estudos apresenta problemas no domínio Tempo e Fluxo (*Flow and Timining*), onde todos os estudos apresentam risco de viés alto ou desconhecido, devido a diferentes intervenções terapêuticas entre a aplicação do teste de diagnóstico padrão e index. Já nos domínios relacionados à aplicabilidade, parte dos estudos associaram-se a “*high concerns*” na seleção de pacientes, devido à baixa representatividade de características tumorais desejadas entre os pacientes recrutados, como estágio IV e/ou histologia adenocarcinoma. Ainda, parte dos estudos apresentaram “*high e unclear concerns*” no padrão de referência aplicado nos pacientes recrutados, devido à aplicação parcial e utilização de diferentes testes.

10.4. Síntese de Resultados e Qualidade Geral da Evidência por Desfecho (GRADE)

Em relação às revisões sistemáticas com metanálise, no estudo realizado por PASSIGLIA *et al.* (2018), os autores demonstram que há influência da localização do sítio metastático sobre a acurácia diagnóstica do ctDNA em pacientes com CPNPC. A sensibilidade dos testes foram significativamente superiores em pacientes com sítio metastático extra-torácico (M1b) em comparação àqueles pacientes cujo sítio metastático era intra-torácico (M1a) (OR: 5.09; 95% IC: 2.93 – 8.84) (Tabela 2). Já no estudo realizado por QIU *et al.* (2015), os autores evidenciaram a acurácia da utilização do ctDNA em comparação ao tecido tumoral para realizar o diagnóstico genético de pacientes com CPNPC (Tabela 2). Cabe ressaltar que em ambas as revisões, a população estudada não se limitou a pacientes com adenocarcinoma e estágio tumoral IV, e todas avaliaram apenas o gene *EGFR*. Além disso, apenas MLIKA *et al.* (2018) reuniram evidências da avaliação do ctDNA com a técnica de NGS, inclusive com sub-análise específica para essa técnica. Entretanto, não foi possível confirmar a utilização do NGS em 2 dos 5 estudos primários utilizados para a metanálise em questão (detalhe em Tabela 2, item limitações do respectivo

estudo). Este estudo foi classificado pelo AMSTAR 2 como de qualidade criticamente baixa.

Os estudos primários incluídos apresentaram alta heterogeneidade quanto ao tipo de CPNPC analisado (em média, 77% dos pacientes apresentavam adenocarcinoma), ao estágio do tumor (aproximadamente 63,7% dos pacientes estavam em estágio IV), às plataformas e comparadores utilizados, bem como aos regimes de tratamento a que os pacientes foram submetidos previamente a testagem genética. Cinco artigos (todos primários) analisaram em ctDNA a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia do NGS para detecção de variantes em *EGFR* em relação ao qPCR, e os valores foram, em média, de 94,5%, 46,5% e 86,2%, respectivamente. Nenhum artigo analisou em ctDNA a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia do NGS para detecção de variantes em *BRAF* em relação ao qPCR. Quatro artigos (todos originais) analisaram a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia em ctDNA do NGS para detecção de variantes em *ALK* em relação ao FISH/IHC em tumor, e os valores foram, em média, de 74,3%, 99,4% e 88,9%, respectivamente. Um artigo original analisou em ctDNA a sensibilidade e/ou especificidade e/ou acurácia do NGS para detecção de variantes em *ROS1* em relação ao FISH/IHC em tumor, e os valores foram de 100% para todos os parâmetros. As plataformas de sequenciamento utilizadas variaram entre os estudos, sendo que a mais utilizada foi o NextSeq 500, da Illumina (n=3/10). Os painéis utilizados para o sequenciamento também variaram, desde o sequenciamento de apenas algumas variantes do gene *EGFR* (XU *et al.*, 2017) até um painel contendo 463 genes no total (YANG *et al.*, 2016). Embora a maior parte dos painéis compreendesse todos os genes de interesse, os resultados foram majoritariamente reportados para os genes *EGFR* e *ALK* (Tabelas 1 e 3).

A performance dos painéis de NGS em comparação aos métodos de q-PCR (técnica-padrão) utilizados nas análises de ctDNA foi diferente entre os estudos analisados, e variou mesmo dentro do mesmo estudo para as diferentes variantes analisadas (Tabela 1). Os painéis empregados foram bastante heterogêneos em termos de profundidade de sequenciamento, o que afeta diretamente o limite de detecção, e, portanto, a sensibilidade do teste. A maior parte dos painéis especificou apenas a cobertura em kilobases, de forma que a comparação entre quais os segmentos cobertos em genes críticos não foi possível. Para o gene *EGFR* em geral, a sensibilidade do NGS variou de 67% a 100%; enquanto a especificidade variou de 21% a 100% em relação ao q-PCR. Diferentes variantes no mesmo

gene também apresentaram acurácia distinta entre os estudos na comparação entre NGS e o q-PCR: p.L858R (sensibilidade 67-100%, especificidade 82-100%), deleções no éxon 19 (sensibilidade 100%, especificidade 86-100%) e p.T790M (sensibilidade 100%, especificidade 73-100%). Para a variante p.G719X e para as variantes raras, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade variou de 88-95% e de 95-100%, respectivamente.

As fusões de *ALK* e *ROS1* foram avaliadas por NGS em um pequeno número de estudos, tendo como comparadores as técnicas de FISH e/ou IHC para o gene *ALK* e RT-q-PCR para o gene *ROS1*, ambos em tecido tumoral (CUI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018; MAO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). Metade dos estudos com o gene *ALK* apresentavam um número baixo de pacientes com as alterações, limitando a utilidade destes resultados (LIU *et al.*, 2018; MAO *et al.*, 2017) (Tabela 1). Para os outros dois estudos, em relação à técnica em tecido, o NGS apresentou sensibilidade de 65% (CUI *et al.*, 2017) e 79% (WANG *et al.*, 2016), com especificidade de 100% para ambos. Alterações em *ROS1* foram avaliadas por um estudo, com apenas um paciente verdadeiro positivo, o qual foi corretamente identificado pelo NGS, apresentando uma concordância de 100% com o teste-padrão, que utilizou RNA do tecido tumoral.

Apesar do gene *BRAF* estar contido nos painéis da maior parte dos estudos, não foram relatados resultados para as variantes neste gene nos estudos incluídos. A importância do processo de análise por bioinformática da informação gerada pelo NGS, por vezes chamado de pipeline, é abordada por apenas um dos estudos (YANG *et al.*, 2016), havendo alteração no número de FP para variantes no gene *EGFR* quando as condições de filtragem foram alteradas, mudando a sensibilidade de 100% para 89% após ajuste no software.

Três estudos avaliaram sobrevida em relação aos resultados do teste de ctDNA em plasma (CUI *et al.*, 2017; DONO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2016). No estudo de CUI *et al.* (2017), pacientes com resultados para o gene *ALK* em tecido e plasma receberam crizotinibe e foram divididos em dois grupos com base nos resultados moleculares: 1) tumor e plasma positivos (n=9); 2) tumor positivo e plasma negativo (n=6). A SLP, avaliada por teste de hipóteses, foi de 8.35 meses (95% IC 4.07–12.62) vs. 9.93 meses (95% IC 6.97–12.90), respectivamente, o que não representou diferença estatística entre os dois grupos analisados. DONO *et al.* (2019) utilizaram uma abordagem semelhante, e focam na variante do gene *EGFR* p.T790M, avaliando a SLP e SG em uma população de

pacientes recrutados para o estudo na PD enquanto em tratamento com *EGFR*-TKI de primeira ou segunda geração, e que foram tratados com osimertinibe após resultado positivo para p.T790M (n=17) em plasma avaliado por NGS. Após o tratamento com osimertinibe, pacientes foram divididos em dois grupos, com base nos resultados para o ctDNA pelas técnicas de NGS e q-PCR: 1) p.T790M positivos para NGS e qPCR (n=8); 2) p.T790M positivos no NGS e negativos no qPCR. Não houve diferença na SLP (12,2 vs. 8,6 meses, respectivamente p=0,177). A SG foi de 19,2 meses para o grupo positivo em ambas as técnicas e de 11,6 meses para o grupo com resultados discordantes (p=0,143). Os pacientes com resultados discordantes tiveram evolução do quadro clínico após tratamento com osimertinibe para resposta parcial (n=3) e estabilização (n=5) da doença, demonstrando assim o benefício clínico do NGS em relação ao qPCR, pois estes pacientes seriam tratados de forma inadequada se a técnica de escolha fosse somente o q-PCR.

O estudo de YANG *et al.* (2016) aborda desfechos de utilidade clínica para o gene *EGFR* porém os autores utilizaram como intervenção o ddPCR. Os pacientes do estudo (n=73) foram estratificados entre aqueles 1) positivos para a variante em biópsia tecidual e líquida (n=54) e 2) positivos para a variante em biópsia tecidual e negativos em biópsia líquida (n=19). O primeiro grupo apresentou mediana superior para SLP (12,6 vs. 6,7 meses, p<0,001) e SG (35,6 vs. 23,8 meses, p=0,028). Esta diferença não foi verificada para o plasma coletado após PD. Os autores também avaliaram SLP e SG dividindo os pacientes com base na quantificação da frequência dos alelos mutados, criando três grupos distintos: 1) alta (>5.15%, n=27), baixa (\leq 5.15%, n=27) ou nula (0%, n=19). O grupo com alta percentagem de alelos mutados em plasma apresentaram melhor SLP em comparação aos grupos com frequência alélica mutada baixa ou nula (15,4 vs. 11,1 vs. 6,7 meses, respectivamente, p<0,001). Estes resultados não se repetiram no plasma coletado após a PD. Por fim, os autores evidenciaram que pacientes com decaimento da frequência alélica (n=29) da variante em plasma após tratamento com TKI obtiveram maiores medianas de SLP (12,7 vs. 7,1 meses, p = 0,001) e SG (28,3 vs. 14,9 meses, p= 0,027) que pacientes que não apresentaram essa característica (n=38).

A presença de confundidores, tais como diferentes tratamentos, resposta ao tratamento, desenvolvimento de variantes novas e estágios tumorais menos avançados, quando presentes no estudo, foram consideradas por todos os autores, às vezes de forma conjunta, o que acabou se refletindo na avaliação dos desfechos pelo sistema GRADE

(Tabela 4), uma vez que a maior parte dos estudos apresentava falhas quanto à possíveis explicações de FP e FN encontradas nas análises e validação ortogonal parcial dos resultados do NGS.

Tabela 4. Avaliação dos desfechos dos estudos incluídos pelo sistema GRADE, para os desfechos de interesse.

Desfecho avaliado (NGS ctDNA vs comparador*)	Gene	Estudos	Delineamento	Limitações (Risco de Viés)	Desfecho	Comparações indiretas	Inconsistências	Imprecisão da evidência	Viés de publicação	Qualidade geral da evidência
Sensibilidade	<i>ALK</i>	Cui 2017, Liu 2018, Wang 2016	Transversal	Alto	Não	Sério	Não	Parcial	Não	Baixo
	<i>EGFR</i>	Xu 2017, Dono 2019	Transversal	Alto	Não	Parcial	Não	Parcial	Não	Baixo
	<i>ROS1</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>BRAF</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
Especificidade	<i>ALK</i>	Cui 2017, Liu 2018, Wang 2016	Transversal	Alto	Não	Sério	Não	Parcial	Não	Baixo
	<i>EGFR</i>	Xu 2017, Dono 2019	Transversal	Alto	Não	Parcial	Não	Parcial	Não	Baixo
	<i>ROS1</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>BRAF</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
Acurácia	<i>ALK</i>	Cui 2017, Liu 2018, Wang 2016, Mao 2017	Transversal	Alto	Não	Sério	Não	Parcial	Não	Baixo
	<i>EGFR</i>	Xu 2017, Dono 2019, Mao 2017, Hanibuchi 2019, Marchetti 2015	Transversal	Alto	Não	Sério	Parcial	Sério	Não	Baixo
	<i>ROS1</i>	Mao 2017	Coorte	Alto	Não	Sério	Parcial	Parcial	Não	Baixo
	<i>BRAF</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
SLP	<i>ALK</i>	Cui 2017	Transversal	Baixo	Não	Não	Não	Parcial	Não	Moderado
	<i>EGFR</i>	Yang 2016, Dono 2019	Coorte	Alto	Parcial	Não	Parcial	Parcial	Não	Baixo
	<i>ROS1</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>BRAF</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
SG	<i>ALK</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>EGFR</i>	Yang 2016, Dono 2019	Coorte	Alto	Parcial	Não	Parcial	Parcial	Não	Baixo
	<i>ROS1</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>BRAF</i>	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-

* comparador para o gene *EGFR*: qPCR em plasma; comparador para o gene *ALK*: FISH ou IHC em tecido; comparador para o gene *ROS1*: RT-PCR em tecido.

11. Situação da Tecnologia no Brasil e no Mundo

A situação regulatória dos testes genéticos disponíveis em outros países e no Brasil pode ser consultada no Anexo 8 (agências internacionais) e no Anexo 9 (ANVISA) deste parecer. De forma geral, não existe produto disponibilizado pela ANVISA para NGS em biópsia líquida realizada em pacientes com adenocarcinoma de pulmão metastático. A ANVISA e a maioria dos países cujas agências reguladoras foram consultadas disponibilizam, para esses casos, a pesquisa de variações oncogênicas em *EGFR* por qPCR. Poucos painéis de sequenciamento de nova geração são “aprovados” internacionalmente, mas incluem mais genes do que aqueles de interesse, e os que o disponibilizam, são para utilização em tecido tumoral.

A ANS (Rol 2018) prevê a análise de variantes oncogênicas em *ALK*, *BRAF* e *EGFR*, sem especificar a técnica e o tecido de análise. A DUT específica para cada uma dessas análises delimita a execução das mesmas para o diagnóstico de elegibilidade de pacientes com indicação de uso de medicação em que a bula determine a confirmação da presença da variante para o início do tratamento (Anexo 9).

Em relação aos medicamentos, a ANS disponibiliza os seguintes medicamentos como terapias-alvo para o tratamento de adenocarcinoma de pulmão: erlotinibe (*EGFR*), gefitinibe (*EGFR*), crizotinibe (*ALK*) e afatinibe (*EGFR*). A CONITEC, por sua vez, aprovou a inclusão do erlotinibe e gefitinibe no SUS (Anexo 9).

12. Análise da Avaliação Econômica

O proponente apresentou uma análise de custo-efetividade (do tipo, ‘análise econômica selecionada’), o modelo teve como objetivo comparar os custos médicos diretos e os desfechos clínicos de saúde. A avaliação obedeceu a um modelo de decisão estático, de Markov (Figura 2).

Segundo o proponente, a avaliação foi realizada a partir dos elementos contidos no roteiro elaborado pela equipe técnica da ANS com base nas diretrizes metodológicas publicadas pelo Ministério da Saúde e adaptadas para o contexto da Saúde Suplementar. A avaliação encontra-se no Anexo 11 do presente documento.

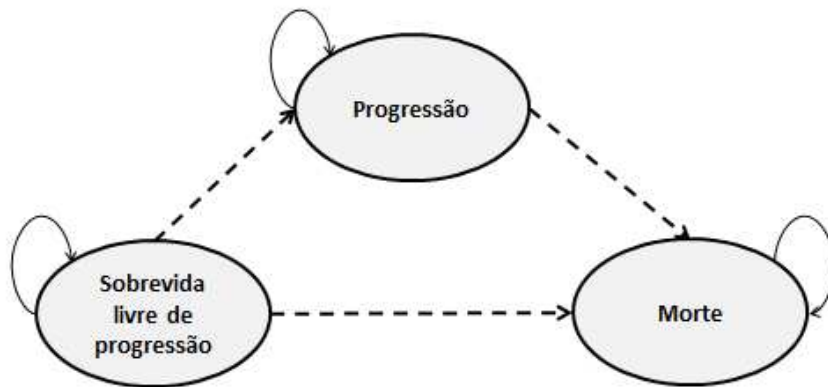


Figura 2. Modelo de Markov utilizado, com os seus estados de transição.

Em relação às características da análise apresentada pelo proponente observou-se, em primeiro lugar que foi utilizado um caso-base genérico, representativo da saúde suplementar como um todo. Os pressupostos a seguir foram observados:

a) a população alvo foi ‘pacientes com CPNPC metastático, quando o material tecidual era insuficiente para avaliação das variantes oncogênicas’.

b) a perspectiva adotada foi a do SSS.

c) o modelo contemplou 3 estados possíveis: a progressão, a SLP e morte (Figura 2).

d) o diagnóstico disponível para avaliar as variantes nos pacientes com CPNPC metastático com material tecidual insuficiente para avaliação do perfil genético foi o teste de *EGFR* ctDNA, o único teste de biópsia líquida disponível para as terapias alvo que tem cobertura obrigatória no SSS para CPNPC (este teste identifica terapias alvos de *EGFR*), sendo este o comparador utilizado. Ainda sobre este aspecto, como as terapias alvos de *ROS1* e *BRAF* não pertencem à lista dos medicamentos antineoplásicos orais de cobertura obrigatória, a análise realizada pelo proponente considerou somente as terapias alvos de *EGFR* e *ALK* (gefitinibe, crizotinibe e pembrolizumabe+QT com pemetrexate e carboplatina, esta última opção para aqueles negativos para ambos *EGFR* e *ALK*).

e) assumiu-se que os tratamentos avaliados seriam todos em primeira linha. Para o tratamento ‘alvo’ de *EGFR* foi considerado no modelo o gefitinibe baseado na literatura (estudo IPASS apresentou resultados de SLP e Sobrevida Global (SG) tanto em pacientes ‘selvagens’ quanto em paciente com as variantes).

f) dados de efetividade: sobrevida total, SLD e taxa de resposta, de todos os antineoplásicos utilizados foram baseados numa revisão da literatura (de estudos experimentais, primários, pivotais).

g) o horizonte de tempo considerado foi de 1 ano, pois a mediana de duração do tratamento, nos estudos clínicos, nestes casos não foi superior a 12 meses. Como o horizonte de tempo foi de um ano, não houve taxa de desconto aplicada a custos e desfechos. Em relação à escolha deste horizonte temporal, idealmente esse deveria ser definido pela sobrevida potencial da população. No caso da população avaliada (pacientes com CPNPC, não escamoso, metastático), é importante considerar que a despeito de certa heterogeneidade neste grupo de pacientes, os estudos não mostram uma sobrevida muito diversa nestes pacientes. Estudos indicam que mesmo com utilização de imunobiológicos mais novos o acréscimo em sobrevida dos pacientes com neoplasia de pulmão metastática situa-se em cerca de 1,5 mês apenas (BAGCCHI, 2017). Em uma revisão sistemática com metanálise recente (ELLIOTT *et al.*, 2020), a sobrevida em 12 meses neste grupo de pacientes situa-se entre 70-86% naqueles que usaram, por exemplo inibidores de *ALK*, comparados a 67-79% naqueles que realizaram quimioterapia, sendo a taxa de sobrevida em 5 anos ainda bem inferior a 10%. Diferentes estudos indicam um tempo de sobrevida média variável, entre 8 meses a 16 meses, de acordo com a performance, subtipo histológico, presença de variantes e locais de metástases (ELKRIEF *et al.*, 2020; SAKIN *et al.*, 2019). Sendo assim, é muito improvável que nesse caso essa escolha alterasse os resultados e conclusões do estudo.

h) os desfechos de saúde considerados foram SLP em meses e SG em meses. A estimativa destes períodos de tempo veio de ensaios clínicos randomizados, disponíveis na literatura.

i) em relação aos testes diagnósticos os dados de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e DOR foram extraídos da literatura disponível (revisão sistemática com metanálise e estudos primários).

j) os desfechos econômicos contemplados foram os custos diretos médicos (procedimento de diagnóstico do perfil molecular, aquisição dos medicamentos, eventos adversos/EAs, custo de progressão) na análise. Os custos indiretos não foram contemplados.

k) dados em relação à frequência e gravidade dos efeitos adversos associados aos antineoplásicos foram também extraídos da literatura disponível.

Como resultado da avaliação econômica executada, o proponente encontrou um custo incremental negativo de R\$- 2315,08 (redução) por pessoa por ciclo de tratamento na comparação entre NGS ctDNA e EGFR ctDNA, resultando em razões de custo efetividade incrementais negativas para os desfechos de efetividade SLP e SG — conforme Tabela 5. Isso significa que NGS ctDNA foi mais efetivo e apresentou menor custo em relação ao EGFR ctDNA, o que caracteriza dominância do primeiro em relação ao segundo. Esta redução, deveu-se predominantemente à redução no custo do tratamento antineoplásico. O solicitante apresentou ainda a redução do custo estimada durante o tempo médio de SLD e de SG (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados de custo-efetividade: painel NGS ctDNA vs. *EGFR* ctDNA (tratamento com terapias *EGFR* e *ALK* do rol ANS).

	NGS ctDNA	<i>EGFR</i> ctDNA	Incremental
Custos			
Procedimento de diagnóstico	R\$ 3.598,94	R\$ 0	R\$ 3.598,94
Tratamento 1ª linha	R\$ 340.060,33	R\$ 345.842,55	-R\$ 5.782,21
Custo de progressão	R\$ 2.394,97	R\$ 2.536,78	-R\$ 141,81
Eventos adversos	R\$ 1.233,40	R\$ 1.223,40	R\$ 10,00
Custo Total	R\$ 347.287,65	R\$ 349.602,72	-R\$ 2.315,08
Efetividade			
SLP (meses)	7,843	7,575	0,269
SG (meses)	10,531	10,467	0,0643
RCEI (R\$ / SLP)			-R\$ 8.615,10
RCEI (R\$ / SG)			-R\$ 36.015,03

Foi apresentada uma análise de sensibilidade univariada (determinística), considerando variações em um único parâmetro por vez. Os parâmetros foram variados \pm 20%. Foi apresentado o diagrama de tornado (Figura 3).

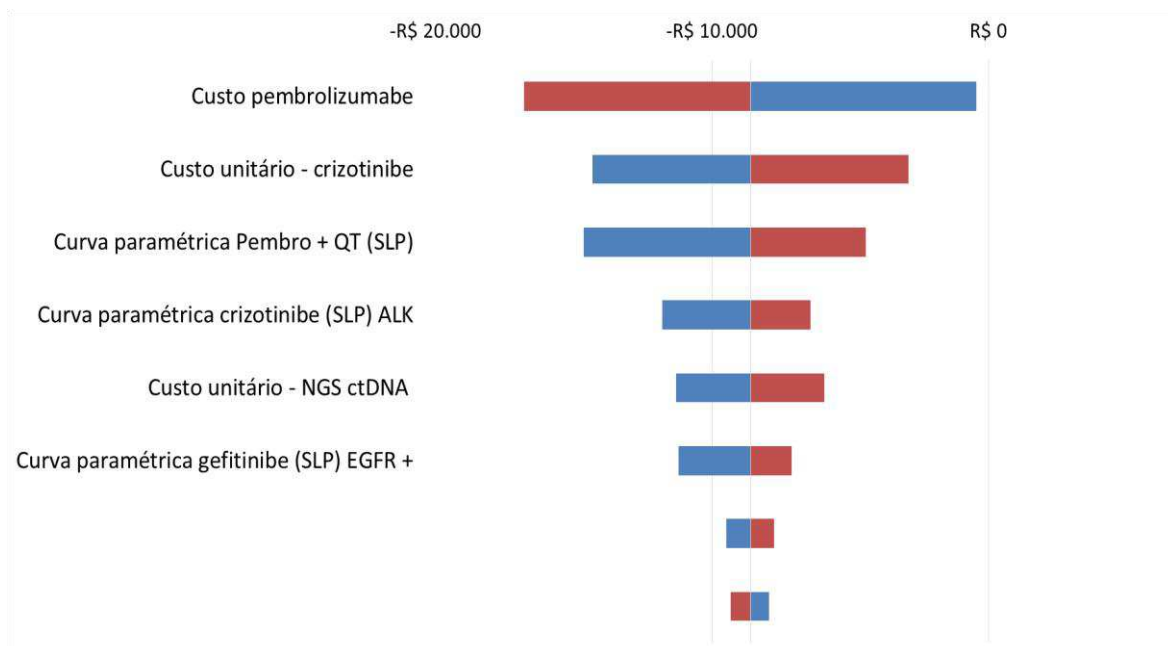


Figura 3. Diagrama de tornado

As razões de custo-efetividade incrementais foram calculadas, segundo o proponente 1.000 simulações foram feitas. A análise de sensibilidade probabilística, que corroborou com os achados prévios indicados pelo proponente (Figura 4). Nesta 82,9% das simulações se apresentaram no quadrante II (maior efetividade e menor custo), enquanto 17,1% das simulações se apresentaram no quadrante I (maior efetividade e maior custo).

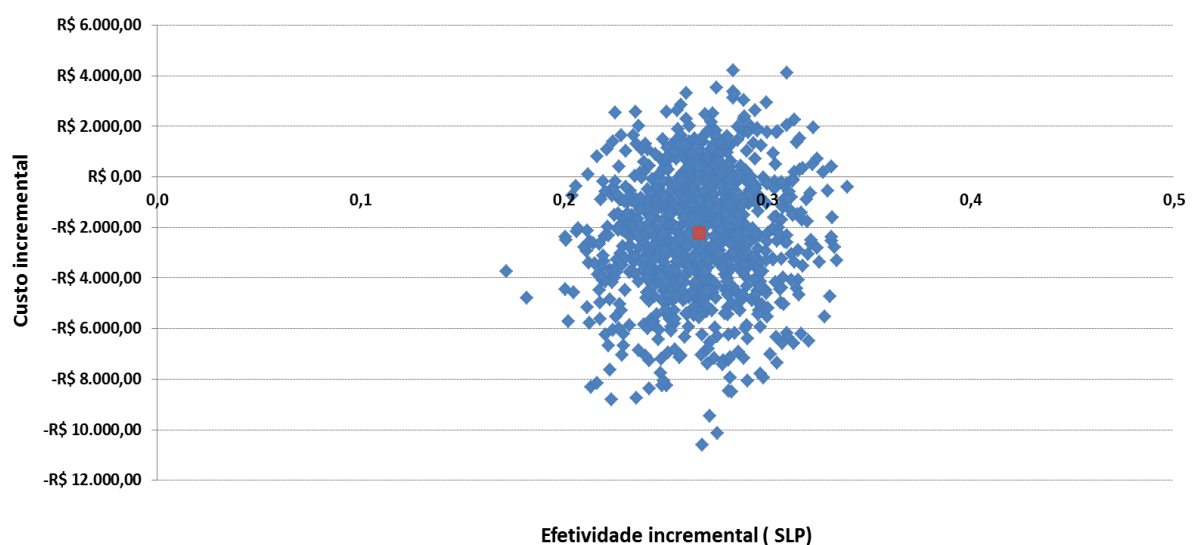


Figura 4. Análise de sensibilidade probabilística (desfecho SLD)

Assim, os resultados confirmariam que o uso do teste de NGS de ctDNA possibilita o melhor direcionamento das terapias oncológicas, de 1ª linha, em CPNPC, não escamoso, metastático levando a um aumento da SLP e uma redução nos custos com a primeira linha de tratamento. Os resultados da análise de sensibilidade probabilística confirmam os resultados encontrados na análise determinística. Os pressupostos e o formato das análises apresentadas pelo proponente foram adequados. Porém, há que se considerar alguns aspectos em relação aos dados apresentados pelo demandante:

Não fica claro qual o painel está se propondo incorporar. Em termos de produtos comercialmente disponíveis e licenciados fora do Brasil que realizam biópsia líquida há dois que englobariam os marcadores escolhidos, são eles: o Cobas *EGFR* mutation test V2 (Roche Molecular System Inc.) e Therascreen *EGFR* Plasma RGQ PCR Kit (Qiagen Manchester Ltd) ambos, no entanto, são direcionados à detecção de variantes relacionadas ao *EGFR* e não ao *ALK*. No Brasil, por sua vez, nenhum dos dois está licenciado. Os kits comerciais licenciados nos EUA, Canadá, Reino Unido ou UE não trazem na sua descrição a análise de *ALK* (Anexo 8). Os dados de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e DOR adotados pelo proponente para a técnica de biópsia líquida, são de um painel que contempla parte de 11 oncogenes. Existe ainda, a possibilidade de que testes desenvolvidos e validados localmente (em instituições ou laboratórios) possam vir a ser utilizados, mas não há disponibilidade de literatura científica sobre sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e DOR destes testes.

Em relação aos custos destes testes, o proponente incluiu somente o custo do painel de NGS de ctDNA. Nessa análise não foi considerado o custo com o procedimento de detecção da variante de *EGFR* por ctDNA devido ao programa das indústrias farmacêuticas arcarem com o custo do teste para os pacientes com CPNPC. O código CBHPM do painel de NGS ainda não foi ainda definido oficialmente, sendo assim o solicitante realizou uma pesquisa de mercado levantando o custo dos painéis de NGS nos principais laboratórios. Segundo este, para o cálculo do preço médio foram consideradas somente as tecnologias realizadas no Brasil. Como não foi possível obter as informações do tamanho em par de bases de todas as tecnologias, a média foi calculada considerando todos os painéis de NGS levantados na pesquisa (um valor médio de R\$ 3.598,94).

A análise econômica do demandante não considerou que a sensibilidade dos testes em ctDNA é menor que no tecido tumoral, o comparador utilizado para esta foi a detecção

de *EGFR* no plasma por qPCR. Convém ressaltar aqui que: a proposta do demandante e o cenário analisado em relação ao uso de testes de ctDNA é em pacientes portadores de neoplasia pulmonar metastática, do tipo não pequenas células, não escamoso, com o diagnóstico confirmado por exame histopatológico e que não possuam material de tecido tumoral disponível ou adequado para a realização de pesquisa de biomarcadores genéticos *in loco*. Sendo assim, por definição, a análise da biópsia líquida não se dará numa circunstância na qual a análise tecidual seja possível. Portanto usar como comparador ao emprego do exame de ctDNA outra técnica empregada no mesmo tipo de material é o apropriado, sendo neste caso, a detecção no plasma por qPCR. Existe uma variação entre estes testes tendo em vista os limites de detecção (de acordo com maior ou menor presença de DNA tumoral circulante) e segmentos gênicos avaliados. A comparação das técnicas empregadas na chamada biópsia líquida (qPCR versus NGS) em termos de sensibilidade, é feita nas seções apropriadas e específicas deste PTC.

Por fim, a matriz com as simulações realizadas pelo proponente não foram disponibilizadas.

13. Análise da Avaliação de Impacto Orçamentário

A análise da AIO foi avaliada a partir de elementos contidos no roteiro elaborado pela equipe técnica da ANS com base nas diretrizes metodológicas publicadas pelo Ministério da Saúde e adaptadas para o contexto da Saúde Suplementar.

A análise realizada pelo solicitante encontra-se no Anexo 11 do presente documento. Em termos resumidos, utilizou-se, como já mencionado, as diretrizes metodológicas do MS e outras referências para população elegível de dados epidemiológicos do INCA [referências utilizadas pelo proponente: ARAÚJO *et al.* Survival and prognostic factors in patients with Non-Small Cell Lung Cancer treated in private health care. 2014;17(4):1001–14; National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 6.2018 - Non-Small Cell Lung Cancer. NCCN Guidel. 2018; Rolfo *et al.* Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. J Thorac Oncol. 2018 Jun; INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017. 130 p. ; MELO. *et al.* Avaliação molecular do Câncer de Pulmão Não Pequenas Células (CPNPC) em uma coorte de pacientes brasileiros [Internet]. <https://www.gbot.med.br/avaliacao-molecular-do-cancer-de-pulmao-nao-pequenas-celulas-cpnpc-em-uma-coorte-de-pacientes-brasileiros-2>; BALDOTTO *et al.* Padrões de

tratamento, uso de recursos e custo do câncer de pulmão de não pequenas células avançado em instituições brasileiras privadas. J Bras Econ da Saúde. 2018;10(2):86–106; Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Taxa de cobertura (%) por planos privados de saúde (Brasil 2008-2018); MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Ciência e Tecnologia. DIRETRIZES METODOLÓGICAS Análise de Impacto Orçamentário Manual para o Sistema de Saúde do Brasil, 2014].

De acordo com o preconizado pelo MS para calcular o impacto orçamentário incremental utiliza-se a seguinte estratégia: $(NiNt \times CtNt) - (NtA \times CttA)$, sendo $NiNt$ = n.de indivíduos utilizando o novo tratamento; $CtNt$ = custo total do novo tratamento; NtA = n. de indivíduos utilizando o tratamento atual; $CttA$ = custo total do tratamento atual.

O modelo de avaliação escolhido foi do tipo estático. A perspectiva adotada foi da Saúde Suplementar. Utilizou-se de um caso-base genérico, representativo da saúde suplementar como um todo. Foi escolhido o método epidemiológico para se estimar a população de interesse. O horizonte temporal, os dados da população alvo, os dados de entrada e saída foram claramente explicitados e adequados.

Foram considerados pelo proponente dois cenários: referência (atual= sem o teste) e projetado (alternativo= pós incorporação do teste). Portanto, o cenário referência representou a situação sem adoção do painel de NGS de ctDNA (situação atual), já o projetado adotou uma adoção gradual da nova tecnologia. O demandante utilizou-se ainda de uma estimativa de *market-share* progressiva ao longo do período de tempo de 5 anos, para estimar o quanto (percentualmente) do novo método diagnóstico, após a introdução, passaria a ser adotado como forma de diagnóstico. A projeção foi realizada no período de 2019 a 2023, simulando os cinco primeiros anos de incorporação da nova tecnologia. Não foi apresentada análise de sensibilidade.

A AIO foi calculada pelo demandante considerando somente o custo com o procedimento de diagnóstico do painel de NGS ctDNA, a população elegível e o respectivo *market share* de utilização no procedimento para cada ano analisado (2019-2023). De acordo com estes cálculos o custo incremental no primeiro ano seria de R\$ 238.592,57, estimou-se um impacto em cinco anos de R\$ 3.646.820,16 com a incorporação do painel de NGS ctDNA no diagnóstico dos pacientes com adenocarcinoma metastático quando o material tecidual fosse insuficiente para avaliação das alterações dos biomarcadores tumorais.

Avaliando de forma crítica a metodologia e modelo escolhido e apresentado pelo demandante, um aspecto que não se considera adequado é o fato de que foi computado apenas o valor do novo teste para cálculo do custo incremental, sendo que o diagnóstico define ainda o tipo de tratamento a ser utilizado, sendo assim é necessário também considerar a parte dos pacientes que submetidos ao novo procedimento diagnóstico que utilizarão o tratamento específico, dirigido à variante identificada, com imunobiológicos, de alto custo de acordo com os receptores encontrados. O crizotinibe, medicamento indicado para pacientes positivos para *ALK* (4%, segundo GOMES *et al.*, 2015) e *ROS1* (1% dos pacientes, segundo DUMA; SANTANA-DAVILA; MOLINA, 2019); o afatinibe, indicado para aqueles positivos para variantes no *EGFR* (24% dos pacientes, segundo HONMA *et al.*, 2014) – medicamentos estes que já fazem parte do rol da ANS para tratamento destes subtipos de neoplasia de pulmão.

Considerando-se estas limitações apontadas na análise realizada pelo proponente, é provável que o cálculo do AIO esteja subestimado. Por este motivo foi realizada uma nova AIO (na planilha padrão da ANS), sendo os dados adotados e resultados obtidos apresentados a seguir (Tabelas 6 a 12).

O período de tempo foi alterado para de 2020 a 2024. Por fim foi considerado uma taxa de utilização do novo exame utilizando-se as frequências de *market-share* propostos pelo demandante por ano de incorporação (que variaram de 10% no 1º ano, com crescimento anual de 10% no uso deste, até 50% no 5º ano) – denominado cenário 1– e alternativamente caso o novo exame passasse a ser utilizado em 100% dos casos necessários– chamado de cenário 2.

A projeção da população foi também revista, pois os dados do proponente eram de 2019 a 2024. A parcela elegível ao diagnóstico no período de 2020 a 2025 foi estimada com base na taxa de crescimento populacional do IBGE (Tabela 7). Os custos considerados para as avaliações aparecem na Tabela 8 e na Tabela 9 são apresentados os custos totais dos três cenários: atual, cenário 1 e cenário 2, considerando-se exame e tratamentos conforme variantes identificadas (nas tabelas já mencionadas). O impacto orçamentário incremental foi calculado e apresentado na Tabela 10, tendo sido este ainda avaliado conforme a inclusão dos seguintes aspectos: efeitos adversos (Tabela 11) e por fim, efeitos adversos e uma taxa de recidiva de 25% naqueles pacientes que não foram tratados com medicamentos específicos para a variante, por não fazerem parte daqueles pacientes que realizaram o teste (Tabela 12).

Tabela 6. Pacientes elegíveis ao diagnóstico com o painel de NGS de ctDNA.

Parâmetro	População	Referência
Incidência de novos casos de câncer de pulmão 2020	30.200	INCA, 2017
Pacientes com CPNPC (85%)	25.670	INCA, 2017
Pacientes com estágio metastático (IV) (52,9%)	13.579	ARAUJO <i>et al.</i> , 2014
Pacientes com câncer não escamoso (79,6%)	10.728	BALDOTTO <i>et al.</i> , 2018
Pacientes com falta de material tecidual (24%)	2.575	THOMPSON <i>et al.</i> , 2016
Destes, pacientes com cobertura do sistema privado em 2019 (24,2%)	623	ANS TABNET, [s.d.]

Tabela 7. Projeção da população elegível.

	2020	2021	2022	2023	2024
Pacientes elegíveis	623	628	633	638	643
<i>ALK</i>+ (4%)	25	25	26	26	26
<i>ROS1</i>+ (1%)	6	6	6	6	7
<i>EGFR</i>+ (24%)	150	151	152	153	154

Tabela 8. Parâmetros de custo e fontes de dados

Insumo	Valor mínimo (R\$)	Valor máximo (R\$)	Dose/dia (ou ciclo) Custo mínimo/dia (ou ciclo)	Tratamento	Custo de 1 ano de tratamento, livre de progressão**	Referência
Crizotinibe (cps 250mg, cx de 60cps)	26.858,80	33.201,58	500 mg/dia R\$ 895,40/dia.	Uso diário até progressão ou toxicidade	R\$ 326.821,00	Lista de Preços CMED – Dezembro de 2019.
Afatinibe (cps.40mg, cx de 28 cps)	5.036,17	6.443,00	40 mg/dia R\$ 179,86/dia	Uso diário até progressão ou toxicidade	R\$ 65.648,90	Lista de Preços CMED – Dezembro de 2019.
Painel de NGS ctDNA	3.598,94	--	--	--	--	Cotação do valor do exame fornecida pelo demandante no relatório para a ANS
Pembrolizumabe (amp 100mg)+ Pemetrexede (amp 500mg) + Carboplatina (amp 150mg)*,&	12.078,09+ 6.247,82+ 386,04	15.573,36+ 7.809,77+ 482,55	200mg/d+ 500mg/m2+ 75mg/m2 (respectivamente), Custo p/indivíduo com 1,5 de superfície corporal =33.889,82/ciclo	A cada 3 semanas, até total de 4 ciclos	R\$ 135.559,28	Lista de Preços CMED – Dezembro de 2019.
Gefitinibe (cps 250mg, cx de 30cps)#	4.969,91	6.206,14	250 mg por dia R\$165,66	Uso diário até progressão ou toxicidade	R\$ 60.467,24	Lista de Preços CMED – Dezembro de 2019.

*Foram utilizados os medicamentos de referência. &Regime de tratamento de 1ª linha para pacientes sem variantes específicas identificadas. #Regime de tratamento para pacientes com variante *EGFR*+ identificada por teste fornecido pelo fabricante do medicamento. **Considerando-se sobrevida de 1 ano para todos os casos conforme: HERBST *et al.*, 2016; MOK *et al.*, 2009; SOLOMON *et al.*, 2018, 2014.

Tabela 9. Impacto orçamentário total em reais*

Período	Cenário de Referência	Cenário: Inclusão exame 1	Cenário: Inclusão exame 2
2020	73.189.625,44	74.255.521,50	82.138.127,38
2021	73.792.329,80	75.087.128,44	82.764.008,10
2022	74.395.034,16	75.921.244,65	83.581.150,54
2023	74.997.738,52	76.758.959,79	84.207.031,26
2024	75.600.442,88	77.600.273,87	85.159.732,98
Total	371.975.170,80	379.623.128,25	417.850.050,3

A= Frequência de uso do exame naqueles que potencialmente necessitariam numa taxa de 10% no 1º ano, aumentando 10% ao ano, até uma taxa de 50% no 5º ano. B= Frequência de uso do exame em todos aqueles que potencialmente o necessitariam. * Os valores foram calculados adicionando-se o custo da realização dos exames e tratamento medicamentoso apropriado conforme o subtipo identificado de variante e *market-sharing* estimado. Para a referência considerou-se os tratamentos atualmente utilizados para aqueles sem variante identificada e para aqueles *EGFR+* tratados com gefitinibe (identificados por exame fornecido pelo próprio fabricante do gefitinibe).

Tabela 10. Impacto orçamentário incremental em reais

Período	Cenário Referência: Atual	Cenário: Inclusão exame 1	Cenário: Inclusão exame 2
2020	-	1.065.896,10	8.948.502,94
2021	-	1.294.798,64	8.971.678,30
2022	-	1.526.210,45	9.186.116,38
2023	-	1.761.221,29	9.209.293,74
2024	-	1.999.830,97	9.559.290,10
Total	-	7.647.957,45	45.874.879,46

A= Frequência de uso do exame naqueles que potencialmente necessitariam numa taxa de 10% no 1º ano, aumentando 10% ao ano, até uma taxa de 50% no 5º ano. B= Frequência de uso do exame em todos aqueles que potencialmente o necessitariam.

Tabela 11. Impacto orçamentário incremental em reais, considerando-se eventos adversos estimados pelo proponente*

Período	Cenário Referência: Atual	Cenário: Inclusão exame 1	Cenário: Inclusão exame 2
2020	-	1.065.706,10	8.946.692,94
2021	-	1.294.608,64	8.969.858,30
2022	-	1.526.020,45	9.185.018,38
2023	-	1.761.031,29	9.207.443,74
2024	-	1.999.640,97	9.557.420,10
Total	-	7.647.007,45	45.866.433,46

A= Frequência de uso do exame naqueles que potencialmente necessitariam numa taxa de 10% no 1º ano, aumentando 10% ao ano, até uma taxa de 50% no 5º ano. B= Frequência de uso do exame em todos aqueles que potencialmente o necessitariam. * Efeitos adversos associados aos diferentes tipos de tratamento, segundo o proponente seriam: R\$ 1.223,40 naqueles tratados com crizotinibe (assumiu-se o mesmo para afatinibe) e para o tratamento convencional de 1ª linha pembrolizumabe+QT ou gefinitibe foi estimado por aquele em R\$ 1.223,40, uma diferença de R\$10,00.

Tabela 12. Impacto orçamentário incremental em reais, considerando-se eventos adversos* estimados pelo proponente e recidiva em 25% daqueles que não receberam tratamento específico para variante, quando teriam indicação**

Período	Cenário Atual	Referência:	Cenário: Inclusão exame 1	Cenário: Inclusão exame 2
2020	-		961.698,12	8.946.692,94
2021	-		1.203.284,56	8.969.858,30
2022	-		1.444.843,49	9.185.018,38
2023	-		1.690.001,65	9.207.443,74
2024	-		1.941.295,03	9.557.420,10
Total	-		7.241.122,85	45.866.433,46

A= Frequência de uso do exame naqueles que potencialmente necessitariam numa taxa de 10% no 1º ano, aumentando 10% ao ano, até uma taxa de 50% no 5º ano. B= Frequência de uso do exame em todos aqueles que potencialmente o necessitariam. * Efeitos adversos associados aos diferentes tipos de tratamento, segundo o proponente seriam: R\$ 1.223,40 naqueles tratados com crizotinibe (assumiu-se o mesmo para afatinibe) e para o tratamento convencional de 1ª linha pembrolizumabe+QT ou gefinitibe foi estimado por aquele em R\$ 1.223,40, uma diferença de R\$10,00. ** Custo estimado da recidiva naqueles não submetidos ao exame de biópsia líquida, segundo o proponente: R\$ 2.536,78.

De forma diversa ao proponente que apresentou uma análise de AIO estimando uma economia de aproximadamente R\$ 153 mil no primeiro ano e R\$ 789 mil no quinto ano, resultando em uma economia acumulada de R\$ 2,3 milhões em cinco anos. Na avaliação por nós realizada, em todos os cenários apresentados e ainda que se acrescentasse os efeitos adversos potenciais aos tratamento e taxas de recidiva de 25% apenas naqueles que não receberam tratamento voltado à variante, quando a apresentavam, observa-se que a incorporação do novo exame levaria a um aumento nos gastos totais. Gasto estes advindos da realização do exame e do tratamento com imunobiológicos dirigidos à variante identificada.

O cenário de número 1, no qual a inclusão do exame em questão implicaria na utilização do mesmo apenas em uma parcela daqueles indivíduos que potencialmente poderiam o fazer, implicaria num aumento de custo anual em torno de 1 milhão de reais no primeiro ano de incorporação e de cerca de 2 milhões no quinto ano a partir da

incorporação. No caso da utilização de tal exame diagnóstico para todos aqueles que por ventura pudessem a vir necessitá-lo, junto com a consequente alteração no tratamento advindo da identificação de uma variante específica redundaria numa elevação de gastos anuais para o SSS significativo, entre 9 e 10 milhões de reais anuais, com um acumulado de cerca de 46 milhões ao longo de 5 anos, cenário este que não sofre alterações relevantes quando se aplica uma análise de sensibilidade.

Diante de todos os aspectos avaliados, como conclusão é relevante ressaltar que a despeito da biópsia líquida ser uma ferramenta promissora na melhora do manejo dos pacientes com adenocarcinoma metastático, possibilitando auxiliar na escolha do tratamento oncológico, o custo associado à sua incorporação e à utilização do tratamento dirigido com imunobiológicos voltados a variantes específicas não é desprezível, pelo contrário é significativo ainda que se considere redução potencial de efeitos adversos e taxas de progressão significativas. Adicionalmente, a possibilidade da adoção do exame ocorrer em frequências superiores aos 50% estimados pelo proponente ao 5º ano de incorporação deve ser fortemente considerada, posto que a busca por terapias dirigidas a variantes tumorais específicas é uma realidade na área da oncologia.

Sendo assim a possibilidade de incorporação da tecnologia pretendida pelo proponente deve ser avaliada cautelosamente frente ao AIO e caso a opção venha a ser de incorporação, sugere-se a elaboração de critérios estritos para sua utilização, com a intenção de maximizar os benefícios reduzindo-se a eventual sobrecarga do SSS.

Por fim, um ponto que lembramos é que os cálculos aqui feitos utilizaram dados sobre sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes diagnósticos avaliados, e ainda, taxa de resposta aos tratamentos (quimioterápico e imunoterápico) e ocorrência de efeitos adversos, obtidos da literatura pesquisada e aqui já citada, sabe-se porém, que tanto o desempenho de testes quanto resultados dos tratamentos, apresentam uma variabilidade esperada, que está relacionada a aspectos como população testada e tratada, experiência técnica dos serviços laboratoriais com os testes diagnósticos e ainda, aspectos locais dos serviços de oncologia, o que pode vir a influenciar nas taxas de identificação correta de variantes e resposta aos tratamentos utilizados. Cabe fazer as seguintes considerações sobre isto: os dados aqui utilizados foram obtidos da literatura a partir de uma revisão sistemática acurada, tendo as análises empreendidas tentado espelhar parte desta variabilidade.

14. Aspectos de Implementação

Os resultados sugerem que o uso do teste NGS em ctDNA possibilita o melhor direcionamento das terapias oncológicas, de 1ª linha ou readequação de tratamento, para adenocarcinoma metastático levando a um aumento da SLP e a uma redução nos custos com a primeira linha de tratamento. Os resultados da análise de sensibilidade probabilística confirmam os resultados encontrados na análise determinística. Os pressupostos e o formato das análises apresentadas pelo proponente foram adequados. Porém, há que se considerar alguns aspectos em relação aos dados apresentados pelo demandante: 1) a elaboração de critérios estritos para utilização deste exame é fundamental e tem como objetivo a maximização dos benefícios advindos do mesmo. Sugere-se, assim, que a implementação deste no SSS seja pautada pela definição de diretrizes de utilização, com critérios de elegibilidade claros, tais como: pacientes portadores de neoplasia pulmonar metastática, do tipo adenocarcinoma, com o diagnóstico confirmado por exame histopatológico e que não possuam material de tecido tumoral disponível ou adequado para a realização de pesquisa de biomarcadores genéticos. Ainda, deve-se atentar para o direcionamento aos pacientes que tenham condições clínicas (performance) de utilizar o(s) tratamento(s) específico(s) direcionados aos genes identificados pelo teste aqui avaliado (*EGFR*, *ROS1*, *BRAF* e *ALK*). 2) Um outro aspecto para a implementação apropriada destas diretrizes seria a elaboração de uma estratégia de disseminação destes critérios entre os profissionais responsáveis pela solicitação dos exames (oncologistas), plano este que deveria contemplar não apenas a difusão de isolada das diretrizes para a solicitação dos exames, mas também aspectos como custo-efetividade das abordagens propostas. 3) Por fim, há de se avaliar as características do painel de NGS a ser incluído, o qual deve ter cobertura e profundidade adequadas, e possibilitarem (no mínimo) a detecção das principais alterações genéticas de cada um dos genes de interesse. Na população brasileira, para o gene *EGFR*, deleções do éxon 19 variaram de 29,6-59% dos casos descritos, a variante p.L858R (éxon 21) de 11,1-45,5%, e a variante p.G719X (éxon 18) foi descrita com frequência de aproximadamente 9% (DE MELO, 2011; ANDREIS *et al.*, 2019; LEAL *et al.*, 2019). A p.T790M foi descrita para um paciente, mas ela é uma mutação que confere resistência ao tratamento e é comumente detectada posteriormente à biópsia primária. No gene *ALK*, fusões *EML-ALK* tipos 1, 2 e 3 são frequentes, representando cerca de 85% das mutações no gene (EVANGELISTA *et al.*, 2017). Para *BRAF*, existem poucos relatos nacionais, e além da variante p.V600E, encontrada mundialmente em cerca de 80% dos

casos, e em cerca de 68% dos pacientes com mutações neste gene em estudo realizado na população do sul do país (ANDREIS *et al.*, 2019), deve-se atentar para variantes raras ou nunca descritas (DE MELO, 2011). É importante ressaltar o fato de que para uma ótima caracterização das alterações patogênicas descritas para estes genes, é necessário amplificar as porções não codificantes do mesmo (intrônicas), pois frequentemente as regiões de quebra que originam as fusões são localizadas nos introns, afetando a sensibilidade pelo painel de NGS. As variantes com relevância clínica crítica no contexto da medicina personalizada analisadas pelo painel devem ter seus limites de detecção determinados de forma individual, com sensibilidade e especificidade definidos e explicitados.

15. Conclusão e Recomendações

Em relação à pergunta de acurácia: “Um painel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK*, aplicado à amostra de ctDNA obtida a partir do plasma de pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso, apresenta acurácia semelhante ao PCR em tempo real (qPCR) realizado em amostra de biópsia líquida (*EGFR* e *BRAF*) ou de tecido tumoral (*ALK* e *ROS1*), para variantes oncogênicas nestes mesmos genes quando o material tumoral é insuficiente para a realização de análises genéticas?”

De modo geral, as técnicas de NGS em ctDNA apresentam acurácia semelhante aos testes de q-PCR em ctDNA. Entretanto, existe uma variação entre os testes comerciais de qPCR. Tendo em vista os limites de detecção e segmentos gênicos avaliados pelas diferentes opções de qPCR, o NGS poderá, inclusive, apresentar uma acurácia maior do que o qPCR em alguns casos, com as vantagens adicionais da testagem de vários genes de forma simultânea e detecção de variantes ainda não descritas, as quais o qPCR não caracterizaria. Segundo a *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC), recomenda-se que, se um paciente testar negativo em ctDNA para o qPCR, o teste deverá ser repetido com uma técnica mais sensível, como o NGS ou ddPCR (ROLFO *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que mesmo as melhores técnicas apresentam sensibilidade de cerca de 85% em relação ao tecido tumoral devido a características inerentes ao tipo de amostra analisada, oriundas de uma maior ou menor presença de ctDNA circulante e frequência alélica da variante patogênica. Tendo em vista a importância da quantidade de ctDNA circulante, recomendações acerca das aplicações de qualquer técnica para a detecção de ctDNA em plasma se fazem necessárias, quanto 1) aos limites de detecção, profundidade

mínima do sequenciamento, e estabelecimento de quais os segmentos gênicos essenciais a serem avaliados pelo painel; 2) ao tempo do último ciclo de tratamento recebido pelo paciente antes do teste; 3) às condições de repetição do teste em caso de metástase intratorácica e/ou resultado negativo; 4) à determinação do tempo e condições para a repetição do teste em caso negativo.

Sugere-se, em caso de teste por NGS negativo, a repetição da testagem genética por outra técnica mais sensível (este fator dependerá da sensibilidade do painel utilizado e do teste alternativo disponível). A rebiópsia é indicada se o paciente tiver condições clínicas (ficando esta a critério do médico), tendo em vista a superioridade da detecção em tecido tumoral. Quanto à repetição do teste em ctDNA pela mesma técnica, dependerá de fatores intrínsecos ao desenvolvimento da doença no paciente (resposta ao tratamento, velocidade de progressão da doença, entre outros), e cabe ao oncologista determinar o prazo para a repetição.

Ainda, segundo GREGG *et al.* (2019), idealmente deve-se buscar a caracterização genética dos tumores o mais próximo ao diagnóstico inicial o possível, preferencialmente em tecido tumoral do paciente ainda não tratado, quando existe a suspeita de CPNPC do tipo adenocarcinoma. A testagem genética precoce traria benefícios aos pacientes e ao sistema de saúde, uma vez que a seleção adequada da primeira linha de tratamento reduziria efeitos colaterais e os custos de terapias sub ótimas, e em última instância, possui o potencial de melhorar os desfechos para os pacientes (GREGG; LI; YONEDA, 2019).

Em relação à pergunta de benefício clínico: “A análise genética do câncer de pulmão por meio de um painel de NGS incluindo os genes *EGFR*, *BRAF*, *ROS1* e *ALK*, aplicado à amostra de ctDNA obtida a partir de plasma de pacientes com CPNPC metastático e não-escamoso, melhora desfechos clínicos relevantes em relação à prática atual (pesquisa somente de *EGFR*) em ctDNA?”

Na perspectiva do SSS, um painel de NGS seria custo-efetivo em termos de avaliação simultânea de vários genes e escolha de tratamento adequado já para a primeira linha de tratamento. Uma vez que a maior parte dos adenocarcinomas são diagnosticados já em estágio avançado, a escolha de uma primeira linha de tratamento efetiva é crucial no combate à doença, levando à uma SLP potencialmente maior. No entanto, o custo associado à incorporação do exame em questão e da subsequente utilização de um tratamento específico com imunobiológicos voltados às variantes específicas é elevado, situando-se na casa de vários milhões de reais por ano. A prática atual é a testagem somente

de *EGFR* em plasma por qPCR. Outras análises, como ICH ou FISH dependerão de sobras histológicas, nem sempre disponíveis e com qualidade adequada para a testagem genética. Pode ocorrer, pela falta de material de biópsia insuficiente, por exemplo, que o paciente não seja testado para outros genes por qPCR pela falta de testes diagnósticos disponíveis. Neste cenário, em um único teste, com o painel adequado, todas as mutações clinicamente acionáveis serão testadas. Além disso, quando se utiliza material histológico antigo de pacientes já tratados, variantes de resistência, por exemplo, provavelmente não serão detectadas - e o tratamento de escolha pode ser inadequado, impedindo o manejo correto e resultando na inefetividade terapêutica. Neste quesito, a testagem múltipla de genes por NGS é vantajosa porque poupa material tecidual (em um cenário em que a classificação histológica correta é cada vez mais importante), poupa tempo, uma vez que um único teste caracteriza mutações clinicamente acionáveis em vários genes, proporciona agilidade na escolha do tratamento correto e, ainda, a detecção de variantes ainda não descritas. Para o paciente, a testagem de múltiplos genes de forma simultânea diminui o tempo diagnóstico, proporciona tratamento adequado, e, com a escolha do tratamento de primeira linha correto ou a readequação do tratamento, evita os efeitos colaterais e custos desnecessários de uma terapia inefetiva e maximiza os efeitos da terapia personalizada.

Com o intuito de maximizar os benefícios oferecidos pelo diagnóstico e tratamento de casos de adenocarcinoma de pulmão em estágio metastático que possuam determinados biomarcadores genéticos, mensuráveis apenas através de biópsia líquida, pela indisponibilidade ou impossibilidade de obtenção de tecido tumoral, a elaboração de diretrizes de utilização do exame em questão, associada a uma estratégia de disseminação dos critérios estabelecidos se fazem necessários.

Além disso, um acompanhamento das taxas de observância destes pressupostos e dos resultados advindos dos métodos adotados (em termos de custos ou resposta aos tratamentos empregados, por exemplo) seria recomendável e geraria dados relevantes para o SSS.

Cabe lembrar que todas as estimativas e cálculos feitos utilizaram dados da literatura, mas que estes dados possuem uma variabilidade que pode influenciar nos resultados aqui relatados. Para uma melhor indicação em termos de comparabilidade de técnicas, o ideal seria indicar especificamente as características técnicas do teste comparador e intervenção, uma vez que estes podem apresentar uma variação considerável

dependendo dos limites de detecção e segmentos analisados. Ainda, para o NGS, a profundidade indicada, pipelines de bioinformática utilizados e a plataforma de sequenciamento podem afetar a acurácia diagnóstica.

A evidência atualmente disponível sobre a aplicação do Painel de Sequenciamento de Nova Geração do DNA circulante tumoral em relação ao PCR em tempo real, em pacientes com Câncer de Pulmão do tipo adenocarcinoma metastático (estágio IV) quando o material tecidual é insuficiente para a detecção das variantes oncogênicas, é baseada em revisões sistemáticas com metanálise e estudos de acurácia, que no geral, não apresentam alta qualidade metodológica, com nível de evidência 3B e grau de recomendação B.

Com base no acima exposto, considerando aspectos da tecnologia avaliados nesse parecer, a incorporação da tecnologia no rol da ANS é:

☐ Recomendada

☐ Não recomendada

☒ Recomendada com ressalvas: 1) elaboração de critérios estritos para utilização deste exame; 2) elaboração de uma estratégia de disseminação destes critérios entre os profissionais responsáveis pela solicitação dos exames (oncologistas); 3) avaliação das características do painel de NGS a ser incluído, o qual deve ter cobertura e profundidade adequadas, e possibilitarem (no mínimo) a detecção das principais alterações genéticas de cada um dos genes de interesse.

16. Lista de Referências

16.1. Referências texto

AGUIAR, P. JR. *et al.* Câncer de Pulmão Células não-pequenas: doença localizada e localmente avançada. **Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**. p. 16, 2017. Disponível em: https://sboc.org.br/diretrizes-sboc-publico;https://sboc.org.br/images/Pulmao_ao_pequenas_celulas_localizada.pdf Acesso em: 31 mar 2020.

ANDREIS, T. F *et al.* Analysis of Predictive Biomarkers in Patients with Lung Adenocarcinoma From Southern Brazil Reveals a Distinct Profile From Other Regions of the Country. **Journal of Global Oncology**, no. 5, p. 1–9, 18 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1200/JGO.19.00174>.

ARAUJO, L. H. *et al.* Lung cancer in Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, n. 1, p. 55–64, fev. 2018. DOI: 10.1590/s1806-37562017000000135.

BAGCCHI, S. Lung cancer survival only increases by a small amount despite recent treatment advances. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 5, n. 3, p. 169, 2017. DOI 10.1016/S2213-2600(17)30041-3.

BERGETHON, K. *et al.* *ROS1* rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 8, p. 863–870, 10 Mar. 2012. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.6345.

BESSE, B.; ADJEI, A.; BAAS, P.; MELDGAARD, P.; NICOLSON, M.; PAZ-ARES, L.; RECK, M.; SMIT, E. F.; SYRIGOS, K.; STAHEL, R.; FELIP, E.; PETERS, S.; PANEL MEMBERS; ESMO. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. **Annals of Oncology**, vol. 25, no. 8, p. 1475–1484, Aug. 2014. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu123>

Câncer de pulmão - versão para Profissionais de Saúde. 16 out. 2018. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao/profissional-de-saude>. Acesso em: 14 jan. 2020.

CUI, S. *et al.* Use of capture-based next-generation sequencing to detect *ALK* fusion in plasma cell-free DNA of patients with non-small-cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 2771–2780, 10 jan. 2017. DOI 10.18632/oncotarget.13741

DE MELO, A. C. Estudo Epidemiológico De Biomarcadores Em Câncer De Pulmão Não Pequenas Células. Dissertação. (Dissertação em oncologia) - Instituto Nacional de Câncer, p. 147, 2011.

DE SÁ, V. K. *et al.* Lung cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 141–148, 14 nov. 2016. DOI: 10.2147/LCTT.S93604.

DONO, M. *et al.* Tag-based next generation sequencing: a feasible and reliable assay for *EGFR* P.T790M mutation detection in circulating tumor DNA of non-small cell lung

cancer patients. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 25, n. 1, p. 15, 27 2019. DOI 10.1186/s10020-019-0082-5.

DUMA, N.; SANTANA-DAVILA, R.; MOLINA, J. R. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 8, p. 1623–1640, 2019. DOI 10.1016/j.mayocp.2019.01.013.

ELKRIEF, A. *et al.* Efficacy of immune checkpoint inhibitors in older patients with non-small cell lung cancer: Real-world data from multicentric cohorts in Canada and France. **Journal of Geriatric Oncology**, 13 jan. 2020. DOI 10.1016/j.jgo.2020.01.002.

ELLIOTT, J. *et al.* ALK inhibitors for non-small cell lung cancer: A systematic review and network meta-analysis. **PLOS One**, v. 15, n. 2, p. e0229179, 2020. DOI 10.1371/journal.pone.0229179.

EVANGELISTA, A. F *et al.* Detection of ALK fusion transcripts in FFPE lung cancer samples by NanoString technology. **BMC Pulmonary Medicine**, vol. 17, 26 May 2017. DOI 10.1186/s12890-017-0428-0. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5446704/>. Accessed on: 15 May 2020.

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019. DOI: 10.1002/ijc.31937.

GOMES, J. R. *et al.* Mutation profile in non-small cell lung cancer: Analysis of a Brazilian population. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 15_suppl, p. e19115–e19115, 20 maio 2015. DOI 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e19115.

GREGG, J. P.; LI, T.; YONEDA, K. Y. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: optimizing the diagnostic journey. **Translational Lung Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. 286–301, jun. 2019. DOI 10.21037/tlcr.2019.04.14.

GRIDELLI, C. *et al.* Non-small-cell lung cancer. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 1, p. 15009, 21 2015. DOI: 10.1038/nrdp.2015.9.

HOLDENRIEDER, S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 245, p. S40-45, 2016. DOI 10.1080/00365513.2016.1208446.

HONMA, H. N. *et al.* EGFR activating mutations and their association with response to platinum-doublet chemotherapy in Brazilian non-small cell lung cancer patients. **Targeted Oncology**, v. 9, n. 4, p. 389–394, dez. 2014. DOI 10.1007/s11523-014-0314-0.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.], 2017.

INCA. **Estatísticas de câncer**. 22 ago. 2018. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 14 jan. 2020.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2019**. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 31 Mar. 2020.

JIANG, P.; LO, Y. M. D. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. **Trends in genetics**: TIG, v. 32, n. 6, p. 360–371, 2016. DOI 10.1016/j.tig.2016.03.009.

LEAL, L. F *et al.* Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 3209, 1 Mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39965-x>.

LIU, L. *et al.* Development and clinical validation of a circulating tumor DNA test for the identification of clinically actionable mutations in nonsmall cell lung cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 57, n. 4, p. 211–220, 2018. DOI 10.1002/gcc.22522.

LOPES, L. F.; BACCHI, C. E. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung cancer in a Brazilian population. **Clinics**, v. 67, n. 7, p. 845–847, jul. 2012. DOI 10.6061/clinics/2012(07)23.

MITSUDOMI, T.; YATABE, Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. **Cancer Science**, v. 98, n. 12, p. 1817–1824, dez. 2007. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00607.x.

MALAPELLE, U. *et al.* Consistency and reproducibility of next-generation sequencing and other multigene mutational assays: A worldwide ring trial study on quantitative cytological molecular reference specimens. **Cancer Cytopathology**, v. 125, n. 8, p. 615–626, ago. 2017. DOI 10.1002/cncy.21868. .

MAO, X. *et al.* Capture-Based Targeted Ultradeep Sequencing in Paired Tissue and Plasma Samples Demonstrates Differential Subclonal ctDNA-Releasing Capability in Advanced Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 12, n. 4, p. 663–672, 2017. DOI 10.1016/j.jtho.2016.11.2235. .

MARCHETTI, A. *et al.* Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of *EGFR* Mutations in Plasma of NSCLC Patients. **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 10, n. 10, p. 1437–1443, out. 2015. DOI 10.1097/JTO.0000000000000643. .

MLIKA, M. *et al.* Liquid Biopsy as Surrogate to Tissue in Lung Cancer for Molecular Profiling: A Meta-Analysis. **Current Respiratory Medicine Reviews**, v. 14, n. 1, p. 48–60, mar. 2018. DOI 10.2174/1573398X14666180430144452.

OLIVEIRA, A. C. da S. M. de *et al.* Perfil molecular do carcinoma pulmonar de células não pequenas no Nordeste brasileiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/1806-3713/e20180181. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1806-37132019000300205&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 15 jan. 2020.

PASSIGLIA, F. *et al.* Metastatic Site Location Influences the Diagnostic Accuracy of ctDNA *EGFR*- Mutation Testing in NSCLC Patients: a Pooled Analysis. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 7, p. 697–705, 2018. DOI 10.2174/1568009618666180308125110.

PONTES, L. D. B. *et al.* *EGFR* mutation screening in non-small cell lung cancer: Results from an access program in Brazil. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 15_suppl, p. 1526–1526, 20 maio 2014. DOI 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.1526.

QIU, M. *et al.* Circulating tumor DNA is effective for the detection of *EGFR* mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 24, n. 1, p. 206–212, jan. 2015. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-14-0895. .

ROLFO, C. *et al.* Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 13, n. 9, p. 1248–1268, 2018. DOI 10.1016/j.jtho.2018.05.030.

SAKIN, A. *et al.* The effect of different treatment modalities on survival in elderly patients with locally advanced non-small cell lung cancer. **Pulmonology**, 12 dez. 2019. DOI 10.1016/j.pulmoe.2019.11.007.

SALIPANTE, S. J. *et al.* Performance Comparison of Illumina and Ion Torrent Next-Generation Sequencing Platforms for 16S rRNA-Based Bacterial Community Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7583–7591, dez. 2014. DOI 10.1128/AEM.02206-14.

SCHÜNEMANN, H. J. *et al.* Grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 336, n. 7653, p. 1106–1110, 17 maio 2008. DOI 10.1136/bmj.39500.677199.AE.

SCILLA, K. A.; ROLFO, C. The Role of Circulating Tumor DNA in Lung Cancer: Mutational Analysis, Diagnosis, and Surveillance Now and into the Future. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 20, n. 7, p. 61, 15 jun. 2019. DOI 10.1007/s11864-019-0653-2.

SHAW, A. T.; SOLOMON, B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 8, p. 2081–2086, 15 abr. 2011. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1591.

SHEA, B. J. *et al.* AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 358, p. j4008, 21 2017. DOI 10.1136/bmj.j4008. .

SHI, Y. *et al.* Molecular Epidemiology of *EGFR* Mutations in Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology - Mainland China Subset Analysis of the PIONEER study. **PLOS One**, v. 10, n. 11, p. e0143515, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0143515.

SIM, W. C. *et al.* Non-invasive detection of actionable mutations in advanced non-small-cell lung cancer using targeted sequencing of circulating tumor DNA. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 124, p. 154–159, 2018. DOI 10.1016/j.lungcan.2018.08.007.

SUN, Y. et al. Comparable rate of *EGFR* kinase domain mutation in lung adenocarcinomas from Chinese male and female never-smokers. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 5, p. 647–648, maio 2010. DOI: 10.1038/aps.2010.43.

TRAVIS, W. D. et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 10, n. 9, p. 1243–1260, set. 2015. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630.

WANG, Y. et al. Noninvasive genotyping and monitoring of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) rearranged non-small cell lung cancer by capture-based next-generation sequencing. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65208–65217, 4 out. 2016. DOI 10.18632/oncotarget.11569.

WHITING, P. F. et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 8, p. 529–536, 18 out. 2011. DOI 10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009.

WU, S.-G. et al. Frequent epidermal growth factor receptor gene mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. **The European Respiratory Journal**, v. 32, n. 4, p. 924–930, out. 2008. DOI: 10.1183/09031936.00167407.

ZHANG, Y. et al. Frequency of driver mutations in lung adenocarcinoma from female never-smokers varies with histologic subtypes and age at diagnosis. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 7, p. 1947–1953, 1 abr. 2012. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2511

XU, T. et al. Cross-Platform Comparison of Four Leading Technologies for Detecting *EGFR* Mutations in Circulating Tumor DNA from Non-Small Cell Lung Carcinoma Patient Plasma. **Theranostics**, v. 7, n. 6, p. 1437–1446, 2017. DOI 10.7150/thno.16558. .

YANG, X. et al. Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20810–20824, 12 abr. 2016. DOI 10.18632/oncotarget.8021.

16.2. Referências Tabela A- Pacientes elegíveis ao diagnóstico com o painel de NGS de ctDNA.

ANS TABNET. [s.d.]. Disponível em: http://www.ans.gov.br/anstabnet/notas_taxa_cobertura.htm. Acesso em: 31 mar. 2020.

ARAUJO, L. H. de L. et al. Survival and prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated in private health care. **Brazilian Journal of Epidemiology**, v. 17, n. 4, p. 1001–1014, dez. 2014. DOI 10.1590/1809-4503201400040017.

BALDOTTO, C. S. R. et al. Padrões de tratamento, uso de recursos e custo do câncer de pulmão de não pequenas células avançado em instituições brasileiras privadas. **J. Bras. Econ. saúde (Impr.)**, p. 86–106, 2018.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.], 2017.

THOMPSON, J. C. *et al.* Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 23, p. 5772–5782, 1 dez. 2016. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-16-1231.

16.3. Referências Tabela C- Parâmetros de custo e fontes de dados

HERBST, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10027, p. 1540–1550, 9 abr. 2016. DOI 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.

MOK, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 10, p. 947–957, 3 set. 2009. DOI 10.1056/NEJMoa0810699.

Lista de Preços CMED. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/374947/2829072/LISTA+CONFORMIDADE_2019-12-10.pdf/fa8a856b-0483-440d-b240-2691814ff74e

SOLOMON, B. J. *et al.* Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in *ALK*-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 22, p. 2251–2258, 01 2018. DOI 10.1200/JCO.2017.77.4794.

SOLOMON, B. J. *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in *ALK*-positive lung cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 23, p. 2167–2177, 4 dez. 2014. DOI 10.1056/NEJMoa1408440.

16.4. Referências Tabela ANVISA

(COBAS® *EGFR* MUTATION TEST V2, [s.d.]; IDYLLA *EGFR* MUTATION TEST, [s.d.]; (PT-BR)THERASCREEN *EGFR* PLASMA - QIAGEN, [s.d.]; (PTBR)THERASCREEN *EGFR* PYRO KIT (24) HANDBOOK - QIAGEN, [s.d.]; (PT)THERASCREEN KRAS RGQ CE - QIAGEN, [s.d.]; THERASCREEN® *EGFR* RGQ PCR KIT HANDBOOK - QIAGEN, [s.d.])

COBAS® *EGFR* MUTATION TEST V2. [s.d.]. **Diagnostics**. Disponível em:
<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-EGFR-mutation-test-v2.html>. Acesso em: 20 jan. 2020b.

IDYLLA *EGFR* MUTATION TEST. [s.d.]. **Biocartis**. Disponível em:
<https://www.biocartis.com/en/meet-idylla/idylla-assays/idylla-EGFR-mutation-test>. Acesso em: 20 jan. 2020.

(PT-BR)THERASCREEN *EGFR* PLASMA - QIAGEN. [s.d.]. Disponível em:
<https://www.qiagen.com/at/resources/resourcedetail?id=6aada24e-f008-4d15-ba1e-37b8700ea4d5&lang=pt-BR>. Acesso em: 20 jan. 2020.

(PTBR)THERASCREEN *EGFR* PYRO KIT (24) HANDBOOK - QIAGEN. [s.d.]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=94c89f69-54f1-43d7-ba5a-2393df515b1e&lang=pt-BR>. Acesso em: 20 jan. 2020.

(PT)THERASCREEN KRAS RGQ CE - QIAGEN. [s.d.]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=575b1b42-489e-484d-b762-f5b5bcc4a6dd&lang=pt-BR>. Acesso em: 20 jan. 2020.

THERASCREEN® *EGFR* RGQ PCR KIT HANDBOOK - QIAGEN. [s.d.]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=db4d279d-ef20-4441-8c86-e765d23c3bba&lang=pt-BR>. Acesso em: 20 jan. 2020.

16.5. Referências Tabela agências internacionais

FOUNDATION MEDICINE. [s.d.]. Disponível em: <https://www.foundationmedicine.com/genomic-testing/foundation-one-cdx>. Acesso em: 20 jan. 2020.

ALK GENE FUSIONS AND *ROS1* GENE FUSIONS DETECTION KIT_AMOYDX. [s.d.]. Disponível em: http://www.amoydiagnostics.com/productDetail_15.html. Acesso em: 20 jan. 2020.

COBAS® *EGFR* MUTATION TEST V2. [s.d.]. **Diagnostics**. Disponível em: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-EGFR-mutation-test-v2.html>. Acesso em: 20 jan. 2020a.

EGFR 29 MUTATIONS DETECTION KIT_AMOYDX. [s.d.]. Disponível em: http://www.amoydiagnostics.com/productDetail_2.html. Acesso em: 20 jan. 2020.

IDYLLA *EGFR* MUTATION TEST. [s.d.]. **Biocartis**. Disponível em: <https://www.biocartis.com/en/meet-idylla/idylla-assays/idylla-EGFR-mutation-test>. Acesso em: 20 jan. 2020.

OVERVIEW | PLASMA *EGFR* MUTATION TESTS FOR ADULTS WITH LOCALLY ADVANCED OR METASTATIC NON-SMALL-CELL LUNG CANCER | ADVICE | NICE. [s.d.]. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/advice/mib137>. Acesso em: 20 jan. 2020.

P160045C.PDF. [s.d.]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/P160045C.pdf. Acesso em: 20 jan. 2020.

PANAGENEa. [s.d.]. Disponível em: <http://panagene.com>. Acesso em: 20 jan. 2020a.

PANAGENEb. [s.d.]. Disponível em: <http://panagene.com>. Acesso em: 20 jan. 2020b.

SUPER-ARMS® *EGFR* MUTATION DETECTION KIT_AMOYDX. [s.d.]. Disponível em: http://www.amoydiagnostics.com/productDetail_3.html. Acesso em: 20 jan. 2020.

THERASCREEN *EGFR* PLASMA RGQ PCR KIT - QIAGEN ONLINE SHOP. [s.d.]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/at/products/diagnostics-and-clinical-research/oncology/therascreen-solid-tumor/therascreen-EGFR-plasma-rgq-pcr-kit-emea/#productdetails>. Acesso em: 20 jan. 2020.

THERASCREEN *EGFR* RGQ PCR KIT VERSION 2 - QIAGEN ONLINE SHOP. [s.d.]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/dk/products/diagnostics-and-clinical-research/oncology/therascreen-solid-tumor/therascreen-EGFR-rgq-pcr-kit-v2/#orderinginformation>. Acesso em: 20 jan. 2020.

THERASCREEN KRAS RGQ PCR KIT - QIAGEN ONLINE SHOP. [s.d.]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/dk/products/diagnostics-and-clinical-research/oncology/therascreen-solid-tumor/therascreen-kras-rgq-pcr-kit-nslcl-crc/#orderinginformation>. Acesso em: 20 jan. 2020.

VYSIS *ALK* BREAK APART FISH PROBE KIT | ABBOTT MOLECULAR. [s.d.]. Disponível em: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/oncology/vysis-ALK-break-apart-fish-probe-kit>. Acesso em: 20 jan. 2020.