

**Dossiê ANS – Painel de Sequenciamento de Nova
Geração do DNA circulante tumoral para o
diagnóstico do Câncer de Pulmão de Não Pequenas
Células metastático e não escamoso**

Dr. Renan Orsati Clara

**Gerente Geral
Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica
SBOC**

São Paulo

2019

Dr. Renan Orsati Clara

**Revisão Sistemática – Painel de Sequenciamento de Nova Geração do
DNA circulante tumoral para o diagnóstico do Câncer de Pulmão de
Não Pequenas Células metastático e não escamoso**

Revisão sistemática apresentada à Agência Nacional de Saúde Suplementar como requisito para incorporação do Painel de Sequenciamento de Nova Geração do DNA circulante tumoral para o diagnóstico do Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células metastático e não escamoso. O presente dossiê respeita a política de transparência da SBOC.

São Paulo

2019

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	5
LISTA DE FIGURAS	8
SUMÁRIO EXECUTIVO	9
1. CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO PEQUENAS CÉLULAS (CPNPC)	10
1.1. Visão geral da doença	10
1.2. Epidemiologia	10
1.3. Manifestações clínicas	12
1.4. Fatores de risco da doença.....	12
1.5. Perfil Molecular.....	13
1.6. Classificação	14
1.7. Detecção do Perfil Molecular	15
1.8. Tratamento	18
1.8.1. Quimioterapia	18
1.8.2. Medicamentos de terapia direcionada	18
1.8.3. Imunoterapia	20
1.9. Qualidade de vida relacionada à saúde.....	21
1.10. Impacto econômico	22
1.11. Necessidades médicas não atendidas	23
1.12. Biópsia líquida	24
2. DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA PROPOSTA.....	26
4. EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS.....	30
4.1. Pergunta estruturada	30
4.2. Objetivo	30
4.3. Critérios de Busca	30
4.4. Critérios de qualidade	31
4.5. Resultados	32
4.5.1. <i>Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling</i>	35
4.5.2. <i>Utility of genomic assessment of blood-derived circulating tumor DNA (ctDNA) in patients with advanced lung adenocarcinoma</i>	37

4.5.3.	<i>Development of a gene panel for next- generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients</i>	41
4.5.4.	<i>Biopsy-free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer ..</i>	43
4.5.5.	<i>Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA</i>	45
4.5.6.	<i>Use of Liquid Biopsies in Clinical Oncology: Pilot Experience in 168 Patients.....</i>	46
4.5.7.	<i>Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA.....</i>	49
4.5.8.	<i>Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/ IFCT-1002... </i>	52
4.5.9.	<i>An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage</i>	53
4.6.	<i>Outras Evidências</i>	55
4.6.1.	<i>Detection of circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer</i>	56
4.6.2.	<i>Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA.....</i>	57
4.6.3.	<i>Bias-corrected targeted next-generation sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients</i>	62
4.6.4.	<i>Tracking the Evolution of Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors through Longitudinal Analysis of Circulating Tumor DNA.....</i>	63
4.6.5.	<i>Clinical Impact of Hybrid Capture–Based Next-Generation Sequencing on Changes in Treatment Decisions in Lung Cancer</i>	65
4.7.	<i>Resumo dos Achados e Avaliação de Qualidade de Evidência</i>	67
5.	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</i>	72
6.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ALK Anaplastic Lymphoma Kinase

ANS Agência Nacional de Saúde Suplementar

ASU Análise de Sensibilidade Univariada

AUC Área abaixo da curva

CBHPM Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos

CMED Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos

CPNPC Câncer de Pulmão de não pequenas células

CNAR Razão de Amplificação do Número de Cópias

CNVs Copy-number Variation

CPPC Câncer de Pulmão de Pequenas Células

CRD Centre for Reviews and Dissemination

ctDNA DNA circulante tumoral

DNA Deoxyribonucleic acid

DP Desvio-padrão

EAs Evento adversos

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

FISH Teste de Fluorescência in-situ

FN Falso Negativo

FP Falso Positivo

HR Hazard ratio

IASLC International Association for the Study of Lung Cancer

IC Intervalo de confiança

IHC Imunohistoquímica

INCA Instituto Nacional do Câncer

KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MSI Instabilidade de Microsatélites

NCCN National Comprehensive Cancer Network

NGS Next-generation Sequencing

OMS Organização Mundial de Saúde

PCR Polymerase Chain Reaction

PET Positron Emission Tomography

QV Qualidade de Vida

RCEI Razão de custo-efetividade incremental

ROC Receiver-operating characteristics

SG Sobrevida Global

SLP Sobrevida Livre de Progressão

SSS Sistema de saúde suplementar

SNVs Single Nucleotide Variants

VAF Frações de Alelos Variantes

VN Verdadeiro Negativo

VP Verdadeiro Positivo

VPP Valor preditivo positivo

VPN Valor preditivo negativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de mutações do gene EGFR	13
Tabela 2 – Relação de terapias alvo aprovadas e status de cobertura no Rol da ANS de terapias-alvo orais.....	19
Tabela 3 – Relação de imunoterapias aprovadas para CPNPC no Brasil (51–53).....	21
Tabela 4. Descrição do procedimento na tabela CBHPM	28
Tabela 5 - Estratégia de busca para a revisão de literatura	30
Tabela 6 - Termos de busca e bases de dados utilizadas	31
Tabela 7. Classificação de Nível <i>Oxford Centre for Evidence Based Medicine</i>	31
Tabela 8 - Estudos encontrados na revisão de literatura	34
Tabela 9 – Resumo dos estudos incluídos, descrevendo comparador, principais resultados, conclusão e nível de evidência	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa do Instituto Nacional de Câncer de novos casos em 2016. Adaptado da estimativa do INCA (12).	11
Figura 2 – Taxas de mortalidade de câncer de pulmão brutas e ajustadas pela idade, de acordo com sexo. Adaptado de Araújo et al (13).	11
Figura 3 – Distribuição de mutações gênicas em câncer de pulmão e respectivas terapias em desenvolvimento e aprovadas. Adaptado de Tsao et al, 2016 (48).	20
Figura 4 – Comparação dos cenários com teste de diagnóstico molecular por ctDNA.	27
Figura 5 - Fluxo de busca para a revisão de literatura	33
Figura 6 – Potenciais tratamentos para alterações detectadas.....	38
Figura 7 – Concordância de alterações em EGFR entre ctDNA e tecido tumoral	39
Figura 8 – Análise de sobrevida global de acordo com níveis de ctDNA	40
Figura 9 - Potenciais tratamentos para alterações detectadas em câncer de pulmão.....	48
Figura 10 – Sensibilidade, especificidade e acurácia de tecido versus DNA livre.	51
Figura 11 - Análise de sensibilidade e especificidade.	55
Figura 12 – Motivos para ausência de amostras teciduais.....	58
Figura 13 – Concordância de mutações de EGFR detectáveis ao longo do tempo após início do tratamento	60
Figura 14 – Sobrevida global de acordo com quantidade de mutações e quantidade de ctDNA.	61
Figura 15 – Detecção de variáveis identificadas no ctDNA por gene.....	62

SUMÁRIO EXECUTIVO

Painel de sequenciamento de nova geração do DNA circulante tumoral no diagnóstico dos pacientes com Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células metastático e não-escamoso quando o material tecidual é insuficiente para detecção das mutações oncogênicas.

- Pacientes com CPNPC são em sua maioria (52,9%) diagnosticados primariamente com estágio IV (metastático)(1).
- O *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* recomenda que pacientes com CPNPC metastático sejam testados para a presença de mutação no EGFR, ALK, ROS-1 e BRAF; e para expressão de PD-L1 (2).
- Em torno de 24% dos pacientes com CPNPC avançado não apresentam material tecidual suficiente para avaliação das mutações oncogênicas (3).
- O painel de NGS de ctDNA é recomendado para avaliação das mutações EGFR, ALK, ROS-1 e BRAF pelo *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)* (4).
- O presente documento demonstrou que o painel de NGS de ctDNA é uma alternativa **dominante (maior efetividade e menor custo)** em relação ao teste de EGFR de ctDNA .
- O painel de NGS de ctDNA apresentou potencial de economia de –R\$ 2.315,08 por paciente em um ano.
- O potencial de economia do painel de NGS do ctDNA demonstrado na avaliação econômica desse documento provém do direcionamento dos pacientes às terapias alvo, conforme as recomendações do *guideline* NCCN, reduzindo o uso da imunoterapia na 1L.
- A análise de impacto orçamentário do parecer demonstrou que o painel NGS de ctDNA apresenta um potencial de economia acumulado de 5 anos (2020-2024) de aproximadamente R\$ 2,3 milhões.

1. CÂNCER DE PULMÃO DE NÃO PEQUENAS CÉLULAS (CPNPC)

1.1. Visão geral da doença

O câncer de pulmão é o câncer de maior incidência no mundo todo. Em 2012, aproximadamente 1.241.600 novos casos ocorreram entre os homens, e 583.100 entre as mulheres globalmente. Além disso, o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer em países mais e menos desenvolvidos (5). A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o câncer de pulmão primário reconhece quatro principais tipos histológicos: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC), adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes; os três últimos tipos são conhecidos como carcinomas de células não pequenas (CPNPCs) (6). Entre os tipos histológicos, o câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC) é o mais comum, representando 85% de todos os casos (7–9). Além disso, o CPNPC é dividido em dois tipos histológicos principais: carcinoma de células escamosas e carcinoma de células não-escamosas (adenocarcinoma, grande células, etc.) (10). O carcinoma de células não-escamosas representam aproximadamente 80% dos CPNPC (11).

1.2. Epidemiologia

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer [INCA] no Brasil, foram estimados 31.270 novos casos de câncer de pulmão (18.740 em homens e 12.530 em mulheres) em 2018, correspondendo a 8,7% e 6,2% de todos os casos de câncer (excluindo câncer de pele não-melanoma) no país em homens e mulheres, respectivamente. Esses valores resultam em um risco estimado de 16,97 novos casos por 100.000 homens e 9,22 por 100.000 mulheres (12).


Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1 – Estimativa do Instituto Nacional de Câncer de novos casos em 2016. Adaptado da estimativa do INCA (12).

Como em diversos outros países, o câncer de pulmão é a principal causa de mortalidade por câncer no Brasil, com aumento da mortalidade de 10,6 mortes/100.000 habitantes em 1979, para 31,1 mortes/100.000 habitantes em 2004 em homens e de 3,0 mortes/100.000 habitantes para 5,4 mortes/100.000 habitantes em mulheres, no mesmo período (Figura 2).

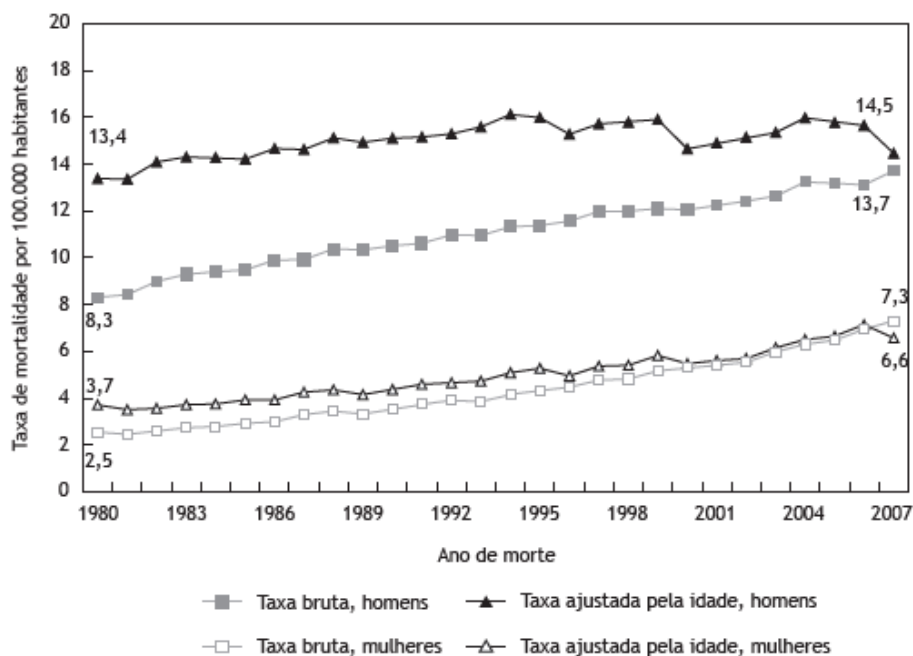


Figura 2 – Taxas de mortalidade de câncer de pulmão brutas e ajustadas pela idade, de acordo com sexo. Adaptado de Araújo et al (13).

Recentemente, um estudo de registro longitudinal com acompanhamento de 10 anos foi conduzido no Hospital de Câncer de Barretos – um hospital público de referência para câncer no Brasil (14). O estudo descreveu todos os pacientes tratados na instituição de 2000 a 2009. Mais de 90% dos 2.067 casos de câncer de pulmão avaliados foram diagnosticados em um estágio tardio (III ou IV). As taxas de sobrevida em 5 anos, de acordo com o estágio da doença, foram as seguintes: 44,0% para o estágio I, 25,4% para o estágio II, 9,9% para o estágio III e 1,6% para o estágio IV (14).

Um outro estudo realizado em uma instituição privada no Rio de Janeiro (Clínicas Oncológicas Intergradadas – COI) também mostrou semelhanças em relação ao perfil clínico

entre pacientes com CPNPC tratados no sistema de saúde privado e público no Brasil. O estudo avaliou retrospectivamente, a partir dos prontuários médicos, um total de 566 casos de CPNPC de 1998 a 2010 e mostrou que a maioria dos pacientes (79,6%) foi diagnosticada em estádios avançados (III/IV); entretanto, adenocarcinoma (59,1%), carcinoma espinocelular (19,9%) e outros (21%) foram as histologias mais comuns. As sobrevidas medianas corresponderam a 99,7; 32,5; 20,2 e 13,3 meses para os estádios I, II, III e IV, respectivamente (15).

1.3. Manifestações clínicas

Pacientes com crescimento na região central ou endobrônquica do tumor podem apresentar tosse, hemoptise, sibilos, estridor, dispneia ou pneumonite obstrutiva. O crescimento periférico do tumor pode causar dor a partir do envolvimento da parede torácica ou pleural, dispnéia e sintomas de abscesso pulmonar. A disseminação regional do tumor no tórax (por crescimento ou por metástase para linfonodos regionais) pode causar obstrução traqueal, compressão esofágica com disfagia, paralisia laríngea recorrente com rouquidão, paralisia do nervo frênico com elevação do hemidiafragma, dispnéia e paralisia do nervo simpático com síndrome de Horner (enoftalmia, ptose, miose e anidrose)(16).

Outros problemas de disseminação regional incluem a síndrome da veia cava superior por obstrução vascular, extensão pericárdica e cardíaca com tamponamento, arritmia ou insuficiência cardíaca, obstrução linfática com conseqüente derrame pleural, e linfangite disseminada pelos pulmões com hipoxemia e dispneia. Além disso, o câncer de pulmão pode se espalhar, produzindo crescimento tumoral ao longo de múltiplas superfícies alveolares, com prejuízo das trocas gasosas, insuficiência respiratória, dispnéia, hipoxemia e produção de escarro. Os sintomas podem incluir anorexia, perda de peso, fraqueza, febre e suores noturnos. Além da curta duração dos sintomas, esses parâmetros não conseguem distinguir claramente o CPPC do CPNPC ou mesmo das neoplasias metastáticas para os pulmões (16).

1.4. Fatores de risco da doença

No Brasil, as tendências de mortalidade por câncer de pulmão refletem a epidemiologia relacionada ao uso de tabaco, que apresentou aumento nas décadas de 1950 e 1960,

atingindo seu ponto máximo em 1970. As políticas anti-tabagismo no Brasil resultaram em redução de consumo de tabaco, sendo exemplo para outros países de baixa e média renda. Como reflexo das políticas anti-tabagismo, tanto a prevalência do tabagismo, como as mortes relacionadas a ele apresentaram diminuição de aproximadamente 50%. Segundo o VIGITEL de 2016, aproximadamente 12,7% dos homens e 8,0% das mulheres acima de 18 anos eram fumantes no ano da pesquisa. Em 1989, as porcentagens eram de 43,3% e 27,0%, respectivamente (13).

1.5. Perfil Molecular

A introdução de testes moleculares para casos de câncer de pulmão é fundamental para melhorar os resultados terapêuticos. Por outro lado, as estratégias de acesso, acessibilidade e incorporação continuam a ser desafios significativos no Brasil. Dentre as mutações mais comumente investigadas em CPNPC, estão EGFR (*epidermal growth factor receptor*), ALK (*anaplastic lymphoma kinase*), ROS1, BRAF, MET, entre outros em que a fase de pesquisa está um pouco mais inicial (17).

Dados brasileiros relativos a presença de mutações nos genes *EGFR* e *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) são escassos, com grande variabilidade na prevalência encontrada nos estudos. Dentre os estudos que avaliam a prevalência de EGFR na população brasileira, as prevalências variam de 22% a 35,3% (11,18–25).

Tabela 1. Frequência de mutações do gene EGFR

Autor	N	Mutação EGFR%	NE
Pontes et al (18)	3.371	25%	100%
Yen et al. (19)	417	25%	100%
Saito et al. (20)	395	26%	91%
Domingues et al.(21)	288	27%	95%
Bacchi et al.(22)	207	30%	82%
Gomes et al.(23)	162	33%	100%
Melo et al.(26)	157	22%	68%
De Sa et al.(25)	100	28%	100%
Baldotto et al.(11)	152	35%	80%

NE: Não escamoso

Com relação a prevalência de ALK em pacientes de CPNPC tratados no Brasil, os dados variam de 4% a 15,8% (11,23). Ao avaliar especificamente ROS1 e BRAF, foi encontrado a presença em 9% e 11,8%, respectivamente, nos pacientes com CPNPC (23).

Uma meta-análise de estudos epidemiológicos da mutação ROS-1 foi realizada com intuito de comparar a diferença dos parâmetros epidemiológicos da população asiática e não asiática. O estudo incluiu 20 estudos com 11.665 pacientes conduzidos globalmente. A prevalência do rearranjo em ROS-1 foi de 2% (IC 95%: 0,016-0,026); para a população asiática a prevalências foi de 2,2% (IC 95%: 0,016-0,029) e a população não asiática de 1,9% (IC 95%: 0,012-0,027), no entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre ambas as populações (27).

Um outro estudo de meta-análise avaliou a associação entre a mutação BRAF e o CPNPC. Foram avaliados 16 estudos contendo 11.711 pacientes com CPNPC. A taxa da mutação BRAF foi encontrada em 2,6% (303/11711) nesses pacientes (28).

1.6. Classificação

Um estadiamento detalhado é mandatório para distinguir os estágios iniciais (I / II) do estágio III potencialmente ressecável do estágio III irresssecável (29), utilizando técnicas de imagem, endoscópicas e cirúrgicas após a exclusão de metástases à distância (30). A precisão é vital para evitar interpretações errôneas que levam a um diagnóstico falso de estágio III ou estágio IV em pacientes em estágio inicial e vice-versa (31).

Considerando a classificação do tumor de acordo com o IASLC (29,32), a etapa T foi dividida em quatro categorias com base no tamanho do tumor, sendo as categorias T1 e T2 divididas em subgrupos (T1a ≤ 2 cm; T1b > 2 cm a ≤ 3 cm), T2 (T2a > 3 cm a ≤ 5 cm; T2b > 5 cm a ≤ 7 cm), T3 (> 7 cm com invasão da pleura, parede torácica, pericárdio, ou outros tecidos adjacentes) e T4 (tumor de qualquer tamanho com invasão no mediastino, diafragma, coração e outros órgãos) (29,31–33). A categoria T2 foi complementada com indicadores de atelectasia, pneumonite ou envolvimento do brônquio principal (34). Os pacientes com metástase podem ser classificados como M1a (ejeção pleural maligna ou pericárdica, nódulos pleurais ou nódulos no pulmão contralateral) ou M1b (metástase à distância; por exemplo, metástase óssea, hepática, adrenal ou cerebral) (31,33,35).

Na presença de um local metastático em exames de imagem, incluindo derrame pleural e pericárdico, deve se obter uma confirmação citológica ou histológica da doença em estágio IV.

Uma avaliação da ressecabilidade ou a adequação da radioterapia com intenção curativa deve ser feita. Isso incluiria avaliação cardiorrespiratória funcional, imagem cerebral, PET e, se necessário, para a tomada de decisão, avaliação invasiva do nódulo mediastinal (31,35).

1.7. Detecção do Perfil Molecular

Com o avanço dos testes moleculares e os tratamentos alvo para o câncer de pulmão, a introdução destes testes é fundamental para um melhor manejo da doença, com melhores desfechos e resultados terapêuticos. Dentre as diversas investigações de alteração gênica avaliadas em CPNPC, EGFR, ALK, ROS1 e BRAF são as principais mutações oncogênicas e alteram a conduta clínica, por apresentarem terapias alvo aprovadas (13). Por outro lado, o acesso dos testes moleculares é limitado no Brasil, e os dados sobre a frequência de mutações clinicamente úteis ainda são escassos, especialmente no sistema público de saúde (13). As estratégias para detecção de mutações em CPNPC vão desde imunohistoquímica, PCR, NGS de tecidos e em biópsia líquida, e até sequenciamento total do genoma. Estas técnicas apresentam diferenças consideráveis quanto a especificidade do teste, procedimentos de amostragem e número de genes avaliados (36).

Devido a crescente quantidade de terapias relacionadas a mutações em CPNPC, algumas diretrizes vêm sendo publicadas indicando o uso de avaliações de mutação gênicas mais amplas. Em sua última edição, a diretriz de diagnóstico de CPNPC do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomenda a utilização de testes genéticos mais abrangentes em todas as histologias contempladas em CPNPC metastático, para que as mutações raras possam ser identificadas e pacientes tenham a escolha de terapia apropriada e, em alguns casos, podendo ser elegíveis a estudos clínicos (2).

Dentre as técnicas disponíveis para a detecção de mutações, estão:

1.7.1 Imunohistoquímica

O propósito da imunohistoquímica (IHC) é reconhecer antígenos, e assim identificar e classificar células específicas dentro de uma certa população celular morfolologicamente heterogênea, ou aparentemente homogênea. A visualização do complexo antígeno-anticorpo é possível pela adição de um fluorocromo conjugado ao anticorpo, que pode então ser observado ao microscópio, ou, alternativamente, de uma enzima, cujo produto de reação pode igualmente

ser visualizado (37). A imunohistoquímica é considerada uma alternativa sensível e específica ao teste de FISH na avaliação de translocações de ALK. Por outro lado, a imunohistoquímica não é recomendada atualmente para a detecção de outras alterações genômicas. No câncer de pulmão, o IHC também é o método definitivo para avaliar a coloração da proteína PD-L1, uma vez que a expressão da proteína PD-L1 não parece estar relacionada a alterações genômicas conhecidas no gene PD-L1. A expressão da proteína tumoral PD-L1 deve ser solicitada, além da genotipagem do tumor, para determinar as opções de tratamento de primeira linha no CPNPC além da quimioterapia (36). Em certos casos, como em EGFR, o uso da imunohistoquímica não é recomendado (38).

1.7.2 Teste de Fluorescência *in-situ* (FISH)

A técnica de FISH é normalmente utilizada para detecção de translocações de genes, ampliações e outros rearranjos, por exemplo, translocações de ALK ou ROS1. A identificação de rearranjos usa duas sondas de DNA de hibridização de cores diferentes que se separam quando duas partes de um gene se separam (36).

1.7.3 PCR específico para um alelo

O teste específico do alelo analisa o DNA para uma anormalidade predefinida e substitui amplamente o sequenciamento direto. O DNA bruto é tipicamente amplificado usando PCR antes que a busca pelo alelo mutado seja realizada, permitindo que sinais raros sejam detectados com maior sensibilidade. Este método representa um avanço tecnológico do sequenciamento direto, pois é um teste *multiplex* e tende a ser mais rápido e mais barato que o sequenciamento de cada gene individualmente. No entanto, apenas metas pré-especificadas podem ser identificadas. Assim, o teste específico de alelo não pode ser usado para identificar novas anormalidades (36).

1.7.4 NGS

O termo *Next-generation sequencing* (NGS) compreende um grupo de plataformas para o sequenciamento de ácidos nucleicos através de um grande número de leituras paralelas e subsequente alinhamento com uma referência para padrão genômico (39).

O sequenciamento de DNA é capaz de realizar dezenas de milhares de leituras e pode usar estatística e diferente abordagem para encontrar uma mutação e definir sua frequência (40). Dessa forma, mutações de base única, pequenas inserções e deleções, grandes deleções

genômicas ou ampliações e rearranjos, como inversões e translocações, todos podem ser potencialmente detectados com NGS (4).

Esta metodologia pode ser usada para sequenciar genomas inteiros, exomas inteiros ou painéis com poucas a centenas de regiões-alvos de éxons ou íntrons. Além disso, painéis alvo têm as vantagens de maior rendimento e melhor sensibilidade, uso eficiente de DNA limitado, custos mais baixos por análises, e uma gama mais ampla de detecção de mutação, pois depois de as bibliotecas de sequenciamento estarem preparadas, a etapa real permanece basicamente a mesma, independentemente do método (4).

As plataformas de NGS são capazes de detectar simultaneamente mutações, inserções e deleções, variações nos números de cópias e rearranjos genômicos. Ademais, painéis direcionados têm vantagens de melhor sensibilidade, uso eficiente de quantidade de DNA limitada, custos menores por análises e detecção de uma grande variedade de mutações (4).

Em painéis direcionados, existem dois tipos de enriquecimento do alvo: 1) captura híbrida, que questiona toda sequência de codificação de oncogenes, genes de supressão tumoral e de íntrons de genes selecionados, fornecendo informações de todo espectro de alterações de DNA; 2) captura por PCR, que é designada como teste *hot spot*, que é um sequenciamento de áreas pré-definidas de alguns genes – estas apresentam alta sensibilidade para mutações, porém, menores para inserções e deleções, e não detectam números de cópias (amplificações e deleções) e fusões gênicas, em contraste com outros métodos de NGS (41).

Em contraste com os métodos de PCR, o NGS pode detectar alterações raras e previamente descaracterizadas no gene sequenciado (4). Dependendo do tamanho do painel analisado, um único reporte do NGS pode fornecer informações de várias anormalidades alvos genéticas simultaneamente, dando assim valor acrescentado pela obtenção de informações úteis. (42)

As plataformas de NGS, em contraste com o PCR, também tem a capacidade de avaliar a supressão dos genes tumorais, onde mutações deletérias podem ocorrer em vários locais ao longo do gene, em oposição aos oncogenes onde mutações de ganho de função tipicamente ocorrem altamente específico, anteriormente a locais reconhecidos. (4)

1.8. Tratamento

1.8.1. Quimioterapia

De acordo com a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), a histologia do CPNPC é importante para o tratamento da doença. Entretanto, os regimes à base de platina continuam sendo uma das opções de primeira linha padrão para os pacientes com CPNPC localmente avançado e metastático que não sejam portadores de uma mutação ativadora de EGFR, rearranjo do gene ALK, ROS1, BRAF ou expressão de PD-L1 <50%. Pacientes no estágio IIIB podem se beneficiar da quimioterapia, com possível melhora da sobrevida global e da qualidade de vida em comparação ao melhor tratamento de suporte. Além disso, o tratamento de pacientes no estágio IV usando quimioterapia à base de platina varia entre a histologia escamosa e não escamosa e pode ser seguido por uma terapia de manutenção ou trocada por outra terapia (por ex., pemetrexede ou erlotinibe) após 6 ciclos de tratamento na ausência de progressão da doença durante o tratamento de primeira linha. A introdução da terapia alvo, dos medicamentos biológicos e imunoterapias representou uma das principais mudanças no tratamento de CPNPC, melhorando a sobrevida após a progressão da doença (2).

1.8.2. Medicamentos de terapia direcionada

O tratamento do CPNPC deve considerar o perfil genético do paciente, uma vez que alterações genéticas que afetem os genes EGFR, ALK, ROS1 e BRAF tem um impacto significativo no tratamento destes pacientes (2). Além disso, o desenvolvimento de resistência adquirida a inibidores a terapias direcionadas é razoavelmente comum, portanto, o desenvolvimento de novos medicamentos capazes de superar mecanismos de resistência tem sido uma importante estratégia terapêutica (2). Para a avaliação destas alterações do perfil genético, são necessários testes moleculares específicos, como PCR, NGS, entre outros (13,17,29).

A introdução de agentes específicos para pacientes EGFR+ resultou em aumento significativo de sobrevida livre de progressão (SLP). O uso do gefitinibe, em primeira linha, resultou no incremento da mediana de SLP de 5,4 meses no braço da quimioterapia para 10,8 meses no braço do gefitinibe (HR 0,30; IC95%: 0,22-0,41; $P < 0,001$) (43). A introdução de terapias alvo para pacientes de primeira linha com translocação no gene ALK resultou em um incremento da mediana de SLP de 7,0 meses no braço da quimioterapia para 10,9 meses no

braço do crizotinibe (HR 0,45; IC95%: 0,35-0,60; P<0,001) (44). O crizotinibe também apresenta bons desfechos em pacientes com rearranjo de ROS1, outro gene de interesse no tratamento de CPNPC. Neste caso, 72% dos pacientes de crizotinibe apresentaram resposta, com SLP mediana de 19,5 meses (45).

Mais recentemente, estudos demonstraram que a mutação de BRAF V600E também é importante na tomada de decisão terapêutica em CPNPC, com tratamento direcionado com dabrafenibe + trametinibe, que apresentou resposta em 64% dos pacientes (46).

Atualmente, o Rol de cobertura das terapias alvos orais não contemplam todas as terapias aprovadas no Brasil (Tabela 2) (47).

Tabela 2 – Relação de terapias alvo aprovadas e status de cobertura no Rol da ANS de terapias-alvo orais.

Biomarcador	Terapia-alvo	Incorporadas no Rol da ANS
EGFR	Erlotinibe	Sim*
EGFR	Afatinibe	Sim ⁺
EGFR	Gefitinibe	Sim*
EGFR	Osimertinibe	Não
ALK	Crizotinibe	Sim
ROS1	Crizotibine	Não
BRAF	Dabrafenibe + Trametinibe	Não

*Pacientes com CPNPC não-escamoso; ⁺ pacientes com CPNPC com histologia de adenocarcinoma.

Além disso, diversos outros genes e terapias-alvo vêm sendo alvos de estudo nos últimos anos, o que deve aumentar o número de moléculas disponíveis no mercado, assim como, o número de genes alvo (48).

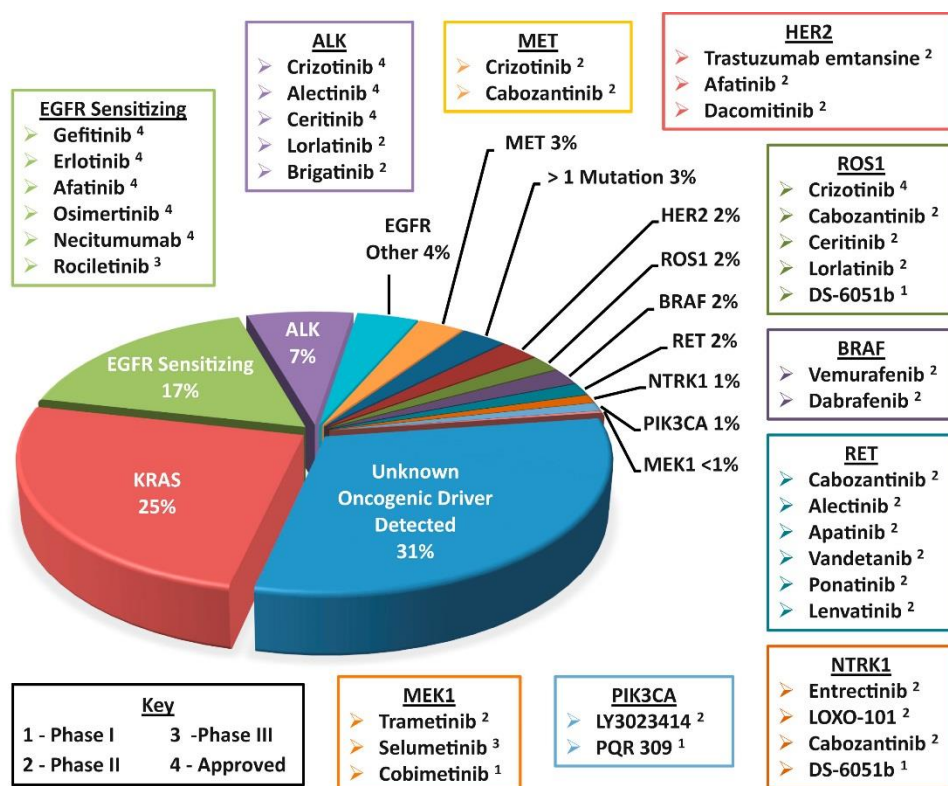


Figura 3 – Distribuição de mutações gênicas em câncer de pulmão e respectivas terapias em desenvolvimento e aprovadas. Adaptado de Tsao et al, 2016 (48).

1.8.3. Imunoterapia

As imunoterapias podem ser utilizadas para auxiliar o sistema imunológico no combate das células cancerígenas. As células cancerígenas podem evitar de serem atacadas pelo sistema imunológico do corpo, usando sinalizadores que normalmente mantêm o sistema imunológico sob controle. As células cancerígenas podem expressar a proteína PD-L1 em sua superfície celular, que funciona como um mecanismo de escape para que as células não sofram ataque do sistema imunológico (49). Novas drogas que bloqueiam a proteína PD-L1, ou a correspondente proteína PD-1 nas células T, podem potencializar a ação do sistema imunológico nas células neoplásicas (50).

Nivolumabe e pembrolizumabe são fármacos anti-PD-1 que demonstraram encolher ou retardar o crescimento de alguns tumores. Atezolizumabe é uma droga anti-PD-L1 que também demonstrou eficácia em alguns tumores (49). Estes fármacos estão aprovados para uso em CPNPC avançado, e são tipicamente usadas em segunda linha de tratamento, com exceção de

pembrolizumabe que também pode ser usado como o primeira linha de tratamento (Tabela 3) (51–53).

Tabela 3 – Relação de imunoterapias aprovadas para CPNPC no Brasil (51–53).

Medicamento	Linha de tratamento aprovada	Incorporadas no Rol da ANS
Nivolumabe	Segunda linha de tratamento	Sim
Pembrolizumabe	Primeira e segunda linha de tratamento	Sim
Atezolizumabe	Segunda linha de tratamento	Sim

1.9. Qualidade de vida relacionada à saúde

Um estudo realizado por Lyer et al. (54), mostrou que os sintomas mais frequentes em pacientes com câncer de pulmão incluem fadiga (98%), perda de apetite (98%), problemas respiratórios (94%), tosse (93%), dor (90%) e sangue na expectoração (70%). Além disso, a análise de correlação mostrou que quanto maior a gravidade dos sintomas, menor a qualidade de vida (QV) (54). Outros estudos também mostram que quanto mais sintomas da doença, menor a QV (55–57). Fadiga aumentada, dispneia, tosse e a dor reduzem o componente emocional da QV, enquanto que problemas com o sono prejudicam o componente cognitivo (58,59).

As limitações na vida social de pacientes com câncer de pulmão foram explicadas pela sensação severa de fadiga, esta foi reconhecida como o efeito colateral mais grave da terapia oncológica em 70% dos pacientes, sendo que 66% afirmaram que os problemas causados pela fadiga prejudicaram a atividade diária mais do que aqueles causados pela dor (60). Outro sintoma que influenciou a avaliação QV foi dor no peito e problemas de deglutição, relatados por um a cada cinco pacientes (60).

Em um estudo realizado por Cooley (61), a dor e a fadiga foram os sintomas mais importantes que levaram a distúrbios no curso do tratamento. Em complemento Gift et al. (62), mostraram que a fadiga, náusea, fraqueza, perda de apetite, perda de peso e vômito foram os sintomas mais mencionados que prejudicavam a atividade diária em pacientes com câncer de

pulmão. Além disso, fatores como estágio da doença, comorbidades e administração de quimioterapia desempenharam papéis importantes para a QV do paciente (59,62).

1.10. Impacto econômico

No Brasil, um estudo realizado por Baldotto et al., descreveu os padrões de tratamento, perfil clínico e uso de recursos do tratamento de pacientes com CPCNP avançado, além do uso de recursos durante o tratamento e a avaliação de fatores prognósticos, em seis instituições brasileiras de saúde, onde foram selecionados 152 pacientes (11). Todos os pacientes incluídos no estudo receberam pelo menos duas linhas de tratamento, e 57,2% e 31,6% receberam três e quatro linhas de tratamento, respectivamente, além disso 10 pacientes (6,6%) passaram por cuidados paliativos exclusivos. No total 16 e 21 regimes diferentes foram usados como tratamentos de primeira e segunda linha, respectivamente. Entre as razões para a seleção terapêutica, o acesso ampliado ao medicamento de ensaio clínico foi o mais comum (26,3%) (11).

Dentre os recursos de saúde utilizados, medicações concomitantes, exames, procedimentos ambulatoriais e radioterapia foram os mais comuns em pacientes em primeira e segunda linha de tratamento. Dentre os pacientes incluídos, 24,3%, 20,4% e 24,4% tiveram ao menos uma hospitalização na primeira, segunda e terceira linha de tratamento, respectivamente. O custo total da coorte de 152 pacientes foi de R\$ 47.692.195,10. O custo total por mês foi de R\$ 13.370.305,10. A quimioterapia foi o principal componente e correspondeu a 67% dos custos totais, seguidos de manutenção (19%), radioterapia (7%), exames (5%) e hospitalização (2%). O custo mediano por paciente foi estimado em R\$ 78.518,30 por mês. Esse custo foi maior na primeira linha (R\$ 32.278,70), na sexta linha (R\$ 24.662,10) e no tratamento de segunda linha (R\$ 18.230,70). O tratamento sistêmico foi o componente de custo mais alto em todas as linhas de tratamento, seguida pelo tratamento de manutenção na primeira, segunda, quarta e quinta linha, e radioterapia na terceira e na sétima linhas (11).

1.11. Necessidades médicas não atendidas

Atualmente em CPNPC, a seleção do tratamento deve ser baseada na correspondência entre a mutação específica do tumor primário e, no caso de mutações encontradas, o mecanismo de ação do medicamento (63,64).

Ademais, de acordo com a diretriz do NCCN, existe a recomendação de que pacientes com CPNPC metastático não escamoso sejam testados de forma ampla para identificar mutações raras que direcionam a terapias eficazes e disponíveis. Além de afirmar que a avaliação ampla do perfil molecular é um componente importante para a melhora do cuidado dos pacientes com CPNPC. Para o estadiamento metastático, o NCCN recomenda avaliação dos testes de EGFR, ALK, ROS1, BRAF e PD-L1 (2).

No Brasil, a maioria dos pacientes com CPNPC são diagnosticados em estágio avançado ou irresssecável quando são avaliados, e geralmente são investigados por meio de procedimentos como biópsia broncoscopia ou biópsia por agulha guiada por tomografia computadorizada (11). Estes procedimentos diagnósticos fornecem amostras pequenas histológicas ou citológicas que normalmente são adequadas para o diagnóstico da malignidade do tumor. Por outro lado, algumas vezes, pouco ou nenhum tecido permanece para estudos diagnósticos adicionais (65). Em um estudo de avaliação das mutações foi avaliado que 24% dos pacientes com CPNPC avançado não possuíam material tecidual suficiente para avaliação do perfil molecular, sendo então realizado somente o teste por ctDNA (3).

Recentemente, foi aprovada pela ANVISA a terapia combinada de pembrolizumabe e quimioterapia para primeira linha de CPNPC não escamoso, metastático independente da expressão de PD-L1, em pacientes que não possuam mutação EGFR sensibilizante ou translocação em ALK (52).

Evidências têm demonstrado que os pacientes com CPNPC e presença de mutação EGFR ou ALK apresentam benefício clínico limitado em relação aos pacientes que não apresentam essas mutações (66). O estudo Keynote-010 demonstrou que os pacientes com mutação EGFR tratados com pembrolizumabe não apresentam diferença estatisticamente significativa para os desfechos de sobrevida global (HR: 0,88; IC 95% 0,45 – 1,70) e sobrevida livre de progressão (HR: 1,79; IC 95% 0,94 – 3,42) em relação aos pacientes tratados com quimioterapia (67).

Sendo assim, é fundamental um procedimento sensível para detectar ambas as mutações. Atualmente, não há um procedimento no Rol da ANS que consiga detectar ambas as mutações em pacientes com CPNPC metastático que não possuam material tecidual suficiente.

1.12. Biópsia líquida

A biópsia líquida é um método de diagnóstico menos invasivo para avaliação das possíveis mutações de um tumor, por meio da análise do DNA livre circulante (cfDNA) presente no plasma do sangue (68).

O DNA livre de células é o DNA de vários tecidos do corpo que circula livremente na corrente sanguínea. Em um paciente com câncer, as células tumorais que sofrem apoptose ou necrose também liberam o DNA livre das células e, se derivadas do tumor, são chamadas de DNA tumoral circulante (ctDNA). Ao analisar o DNA livre de células isolado do sangue de um paciente, podem ser identificadas alterações genômicas clinicamente relevantes, assim como instabilidade de microssatélites (MSI) no ctDNA, que podem ajudar a adequar o paciente a terapias direcionadas, imunoterapias e ensaios clínicos (69).

Recentemente, um painel de discussão com recomendações criadas pelo *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) com relação ao uso de biópsia líquida para análise molecular na orientação do tratamento clínico de pacientes com CPNPC avançado reforça e guia os procedimentos para tal (4). A biópsia líquida é recomendada em casos com amostra insuficiente de tecido tumoral ou nos casos em que amostras de tecidos não são obtidas devido outros motivos, sendo eles (4):

- Um grupo significativo de pacientes não pode se submeter a uma biópsia ou a uma nova biópsia devido à sua condição clínica ou a um local de tumor desfavorável.
- A biópsia líquida pode poupar o paciente de um procedimento invasivo, com os riscos decorrentes de complicações cirúrgicas.
- A escassez de tecido tumoral na biópsia do tumor pode impedir o patologista de realizar todas as análises necessárias.
- A realização de uma biópsia de tecido é consideravelmente mais cara que uma coleta de sangue.

- O tempo de resposta pode ser menor para a biópsia líquida do que para a biópsia tecidual.
- Marcadores circulantes são, em teoria, mais propensos a refletir a carga tumoral e são mais eficazes em representar a diferença interna do próprio tumor.

Atualmente, o teste de biópsia líquida é recomendado pelo *College of American Pathologists (CAP)/ International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC/ Association for Molecular Pathology (AMP)* para o teste molecular nos pacientes com CPNPC (70).

Especificamente em CPNPC metastático não escamoso, a introdução do diagnóstico de alterações gênicas por NGS de biópsia líquida no sistema suplementar de saúde atenderia uma necessidade médica não atendida importante, pois, atualmente pacientes com falta de material tecidual para os testes genômicos não são avaliados adequadamente em relação a sua elegibilidade às terapias alvos.

2. DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA PROPOSTA

Painel de sequenciamento de nova geração do DNA circulante tumoral.

Painéis múltiplos de NGS são plataformas confiáveis e preferíveis para detecção além de mutações comumente avaliadas, como translocações, avaliação de número de cópias, entre outros (71). Ademais, NGS pode atingir níveis aceitáveis de sensibilidade e níveis ótimos de especificidade, tendo maior acurácia no teste na fase metastática da doença, quando os níveis circulantes de ctDNA aumentam (72).

Plataformas baseadas em NGS, em contraste com o PCR, apresenta capacidade de avaliar genes supressores de tumor, onde os efeitos deletérios mutacionais podem ocorrer em vários locais ao longo do gene, em contraste aos oncogenes, onde as mutações de ganho de função ocorrem tipicamente em locais altamente específicos e previamente conhecidos. As vantagens adicionais de um NGS de ctDNA são a capacidade de quantificar as variações do número de cópias do gene, incluindo a amplificação gênica, e identificar rearranjos cromossômicos como fusões oncogênicas (4).

Atualmente, o IASLC não recomenda métodos baseados em PCR para avaliação rotineira dos rearranjos do ALK ou ROS1 em ctDNA (4). Painéis de NGS de ctDNA são consideradas confiáveis e preferíveis por detectarem além das mutações comuns e podem ser de forma acurada a inserção e deleção, alterações no número de cópias e translocações (71). Painéis de NGS de ctDNA podem alcançar níveis aceitáveis de sensibilidade e níveis ótimos de especificidade (72). O IASLC recomenda o início do tratamento de primeira linha quando positivo os resultados do teste de NGS ctDNA para EGFR, ALK, ROS-1 e BRAF (4). Por outro lado, um resultado negativo de NGS para oncogenes não é suficiente para excluir o uso de terapias alvo e necessita da confirmação de biópsia tumoral (4).

Especificamente em pacientes com CPNPC metastático não escamoso e com falta de material tecidual para avaliar mutações oncogênicas, a introdução do diagnóstico de alterações gênicas por NGS de biópsia líquida no sistema suplementar de saúde atenderia uma necessidade médica não atendida importante, pois, atualmente estes pacientes são testados somente pela técnica de PCR EGFR do ctDNA. O teste de EGFR ctDNA é o único teste de biópsia líquida disponível para as terapias alvo que tem cobertura obrigatória no Sistema de Saúde Suplementar (SSS) para CPNPC. Dessa forma, o presente parecer propõe a introdução

do teste de painel de NGS para ser utilizado no lugar do teste de PCR de EGFR, por detectar outras mutações com medicamentos aprovados (

Figura 4).

As evidências apresentadas no presente documento visam demonstrar a acurácia do teste na detecção de mutações com terapias aprovadas e incorporadas no Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde SSS. Estas serão descritas em detalhe na seção de evidências científicas.

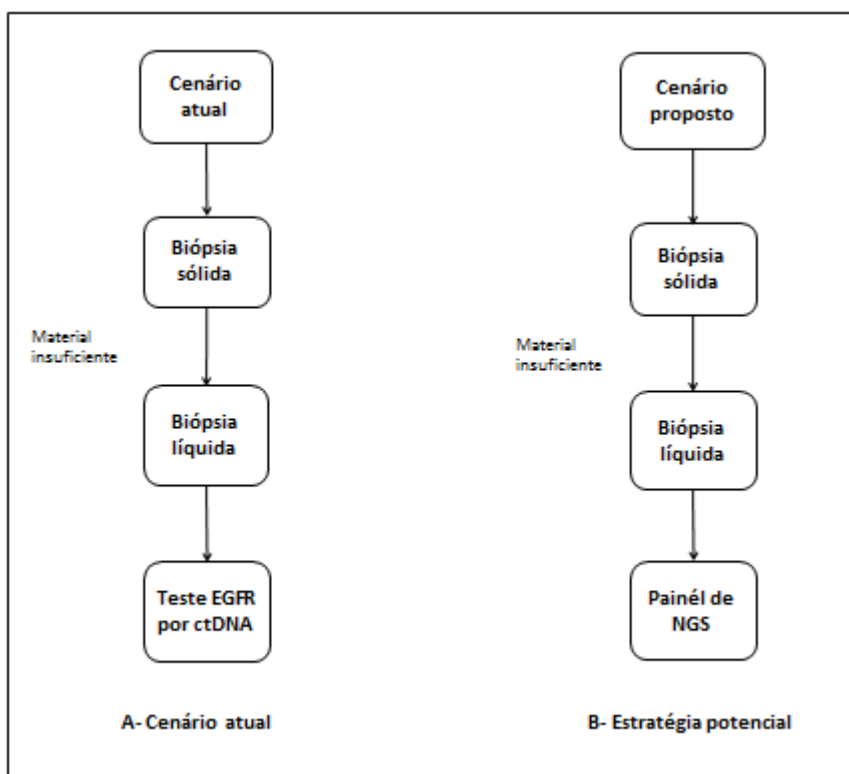


Figura 4 – Comparação dos cenários com teste de diagnóstico molecular por ctDNA.

Código CBHPM

A Câmara Técnica Permanente da CBHPM de 28/11/2018 aprovou a introdução do procedimento “Captura/Amplificação e subsequente sequenciamento de regiões genômicas DE 20 KILOBASES A 1 MEGABASE DE DNA TUMORAL PARA ANÁLISE DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS por qualquer técnica de sequenciamento (Sanger ou qualquer forma de

sequenciamento de nova geração – NGS)” na Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos de 2016. A valoração ainda está para ser definida (Tabela 4) (73).

Tabela 4. Descrição do procedimento na tabela CBHPM

Procedimento	Código
Captura/Amplificação e subsequente sequenciamento de regiões genômicas DE 20 KILOBASES A 1 MEGABASE DE DNA TUMORAL PARA ANÁLISE DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS por qualquer técnica de sequenciamento (Sanger ou qualquer forma de sequenciamento de nova geração – NGS)	4.05.03.87-9

3. SUGESTÃO DE DIRETRIZ DE USO DA TECNOLOGIA PROPOSTA

Considerando o atual cenário de diagnóstico em CPNPC e o valor referente à introdução do painel de NGS em biópsia líquida, o presente documento sugere que o teste seja realizado em pacientes que atendam os seguintes critérios:

- Pacientes não tratados previamente
- Pacientes com CPNPC metastático e não escamoso
- Pacientes com material tecidual insuficiente para a realização dos testes de avaliação das mutações oncogênicas.

Com relação à tecnologia, é fundamental que o painel de NGS ctDNA consiga detectar às mutações com utilidade clínica, ou seja, mutações oncogênicas que tenham terapias aprovadas e com indicação de bula .

4. EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS

4.1. Pergunta estruturada

O painel de NGS de ctDNA apresenta acurácia na detecção das mutações oncológicas em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas ?

Tabela 5 - Estratégia de busca para a revisão de literatura

P – População	Pacientes com Câncer de Pulmão Não Pequenas Células
I – Intervenção	Painel de sequenciamento genético de nova geração (NGS) de DNA tumoral circulante.
C – Comparação	Sem restrição de comparador
O – Desfechos	Detecção de mutações de interesse (EGFR, ALK); sensibilidade, especificidade, acurácia, eficácia, segurança.

4.2. Objetivo

Esta revisão de literatura tem como objetivo avaliar a acurácia dos painéis de sequenciamento genético de nova geração do DNA tumoral circulante na detecção das mutações oncológicas com terapias aprovadas no Brasil. Com o intuito de não restringir a abrangência da revisão da literatura, não foi definido nenhum comparador.

4.3. Critérios de Busca

Foi realizado no dia 13 de agosto de 2018 busca por evidências clínicas nas bases de dados PubMed/MEDLINE, The Cochrane Library, BV Salud e CRD. Como o NGS é um método

recente, priorizou-se uma busca sensível com ao menos cinco termos para avaliação de todos os estudos publicados, realizando filtrações para os critérios de inclusão manualmente.

Fazem parte dos critérios de inclusão desta busca estudos clínicos randomizados ou meta-análises do NGS conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 6 - Termos de busca e bases de dados utilizadas

Base de dados	Termos da busca	Ocorrências
PubMed/MEDLINE	(((((((((next-generation sequencing) OR next generation sequencing) AND cancer)))) AND (((mutation) OR alteration) OR mutant))) AND (((ctDNA) OR cfDNA) OR tDNA) AND ((blood) OR egfr))) AND humans[MeSH Terms]	165
BV Salud	(tw:(next generation sequencing)) AND (tw:(mutation)) AND (tw:(ctDNA)) AND (tw:(blood)) AND (tw:(egfr)) AND (tw:(humans)) AND (tw:(cancer))	4
CRD	(next generation sequencing) AND (egfr) AND (ctDNA)	0
The Cochrane Library	"next generation sequencing" in Title Abstract Keyword AND blood in Title Abstract Keyword AND cancer in Title Abstract Keyword AND ctDNA in Title Abstract Keyword AND egfr in Title Abstract Keyword - (Word variations have been searched)	1

4.4. Critérios de qualidade

O nível de evidência foi avaliado conforme a Classificação de Nível de Evidência *Oxford Centre for Evidence Based Medicine* (Tabela 7).

Tabela 7. Classificação de Nível *Oxford Centre for Evidence Based Medicine*

Grau de recomendação	Nível de Evidência	Estudos de Tratamento
----------------------	--------------------	-----------------------

A	1A	Revisão sistemática de ensaios clínicos controlados randomizados
	1B	Ensaio clínico controlado randomizado com intervalo de confiança estreito
	1C	Resultados terapêuticos do tipo “tudo ou nada”
B	2A	Revisão sistemática de estudos de coorte
	2B	Estudo de coorte (incluindo ensaio clínico randomizado de menor qualidade)
	2C	Observação de resultados terapêuticos (<i>outcomes research</i>); Estudo ecológico
	3A	Revisão sistemática de estudos de caso-controle
	3B	Estudo de caso-controle
C	4	Relato de caso (incluindo coorte ou caso-controle de menor qualidade)
D	5	Opinião desprovida de avaliação crítica ou baseada em matérias básicas (estudo fisiológico ou estudo com animais)

4.5. Resultados

Após revisão da literatura, foram identificadas 9 publicações que atendem aos critérios de inclusão. Buscando priorizar os estudos de maior nível de evidência, o processo de seleção dos estudos está representado no diagrama abaixo. Os estudos encontrados serão descritos no capítulo de Estudos Clínicos.

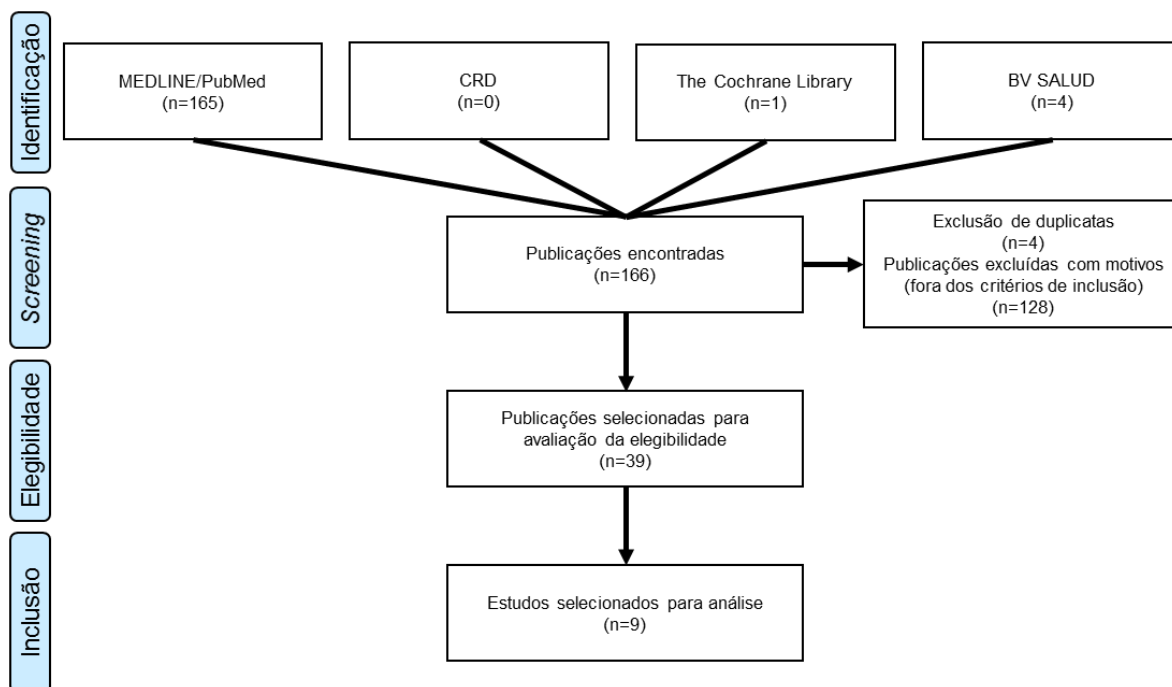


Figura 5 - Fluxo de busca para a revisão de literatura

Tabela 8 - Estudos encontrados na revisão de literatura

#	Autor	Título da Publicação	Data de Publicação
1	Plagnol et al.	Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling.	Março/2018
2	Schwaederlé et al	Utility of Genomic Assessment of Blood-Derived Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma.	Setembro/2017
3	Malapelle et al	Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients.	Março/2017
4	Villaflor et al	Biopsy-free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer.	Outubro de 2016
5	Chae et al	Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA	Outubro de 2016
6	Schwaederle et al	Use of Liquid Biopsies in Clinical Oncology: Pilot Experience in 168 Patients.	Novembro/2016
7	Lanman et al	Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA.	Outubro/2015
8	Couraud et al.	Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002.	Setembro/2014
9	Newman et al	An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage.	Maio/2014

4.5.1. Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling

Este estudo descreve a validação analítica do *InVisionFirst*, uma tecnologia que abrange 36 genes avaliando SNVs, inserções, deleções, CNVs e fusão gênica, incluindo as mutações chave em EGFR e ALK e ROS-1. O *InVisionFirst* é um ensaio NGS projetado para detectar as principais mutações somáticas em CPNCP no ctDNA, liberado na corrente sanguínea de pacientes com CPNCP e que podem ser usadas pelo para guiar a decisão médica a terapia mais adequada (71).

Para análise da especificidade do ensaio, foram analisadas amostras de doadores de sangue sem câncer. Para a avaliação comparando o ensaio *InVisionFirst* com PCR digital, o sangue foi coletado de pacientes com CPNCP e na avaliação complementar de duas localizações gênicas com potencial de falso positivo, um grupo adicional de 242 pacientes com CPCNP não tratados e outros 92 indivíduos sem câncer foram analisados.

Para determinar a capacidade do teste *InVisionFirst* de identificar mutações em diferentes frações de alelos, o estudo conduziu série de diluições através de *Tru-Q7*, este contém 39 mutações validadas na região de sequenciamento, e 32 delas são SNVs presentes em baixas frações de alelos variantes (VAF). As séries de diluição criaram 5 amostras diferentes, contendo respectivamente a maioria das mutações nos seguintes níveis de VAF: 1%-1,3%; 0,5%-0,65%; 0,25%-0,33%; 0,13%-0,16% e 0,06%-0,08%.

Para os valores de VAF $\geq 0,5\%$ 100% dos SNVs foram detectados em todas as análises. Para SNVs no VAF na faixa de 0,25%-0,33%, 99,48% foram detectados, 88,93% dos SNVs foram detectados na faixa do VAF de 0,13%-0,16%, e 56,25% foram detectados na faixa de VAF 0,06%-0,08%. Desta forma, ficou confirmado o limite de detecção de 0,25% de VAF. A identificação de mutação entre réplicas apresentou alta repetibilidade e reprodutibilidade com todas as 32 mutações detectadas em todas as repetições a 0,5% VAF e acima. Combinando as réplicas do ensaio *InVisionFirst*, o VAF médio estimado para os 36 SNVs validados foi correlacionado com as frequências esperadas ($R^2 = 0,9987$).

Para avaliar a capacidade do *InVisionFirst* em identificar inserções e deleções, um material de referência personalizado foi criado, contendo 18 inserções ou deleções de segmentos.

Cinco amostras separadas foram produzidas em um dos cinco níveis diferentes; 2%, 1%, 0,5%, 0,25% ou 0,1% de VAF. Para os 2%, 1% e 0,5% de VAF, 99,7% das inserções e deleções foram detectadas. A um VAF de 0,25%, detectaram-se 92,46%, enquanto a 0,1% de VAF, 72,22% foram detectados.

O teste *InVisionFirst* detecta os pontos de ruptura de DNA que criam as fusões comuns dos genes EML4-ALK e ROS-1. Devido à escassez de amostras de DNA com essas quebras, três abordagens separadas foram usadas para avaliar a sensibilidade dessas fusões. Diluições com estas fusões em cinco níveis diferentes foram criadas, para cada nível de diluição, menos na menor diluição, foram testadas 36 fusões. Em todos os níveis, até 0,13% de VAF, todas as 36 fusões foram detectadas. No nível mais baixo, de 0,06% de VAF, 90% foram detectados.

Para determinar a sensibilidade do ensaio às amplificações de EGFR, FGFR1, ERBB2 e MET, foi utilizado DNA de cadeia dupla que combina as partes destes genes, estes foram quantificados por PCR digital, depois adicionados a DNA de tipo selvagem criando amostras com razões de amplificação do número de cópias (CNAR) de 1,25x, 1,5x e 2x. No total, cada amplificação gênica foi avaliada em cada nível de diluição. Todas as amplificações para os quatro genes foram detectadas em 2x CNAR, enquanto 86 das 88 amplificações foram detectadas em 1,5x (97,7%). A detecção em 1.25x CNAR variou de 59% para o FGFR1 a 90,91% para o EGFR.

Para determinar a especificidade do ensaio, o sangue foi coletado de doadores sem câncer, sendo que 95 amostras foram analisadas para fusões gênicas e nenhuma foi identificada, além disso, 109 amostras foram analisadas para SNVs, inserções, deleções e amplificações. Nenhum CNVs foi detectado nestes 109 indivíduos. Para comparar o painel do estudo com o PCR digital, o sangue de 20 pacientes com CPNPC foi avaliado com as duas tecnologias. No total, 20 pacientes foram inicialmente identificados com uma mutação de KRAS ou EGFR acima de 0,25% de VAF pelo ensaio *InVisionFirst* (0,27% a 65,55% VAF). Nesta coorte, 40% dos pacientes tiveram um VAF <0,75%.

A fim de alcançar alta sensibilidade e especificidade na análise NGS do ctDNA, vários fatores são importantes. Entre eles, estão a conversão de DNA suficiente em uma biblioteca e sequenciamento a uma profundidade suficiente para ler moléculas mutantes múltiplas vezes e ter uma baixa chance de perder moléculas mutantes na etapa de sequenciamento. Outros

métodos para análise de NGS tipicamente incorporam etapas adicionais, o que pode resultar na perda de moléculas mutantes antes do início da análise.

Este estudo demonstra que o *InVisionFirst* possui alta sensibilidade analítica, especificidade e reprodutibilidade, as quais são apropriadas para aplicações clínicas.

4.5.2. Utility of genomic assessment of blood-derived circulating tumor DNA (ctDNA) in patients with advanced lung adenocarcinoma

Neste estudo, os resultados do teste de ctDNA e os resultados clínicos relevantes de 88 pacientes com adenocarcinoma pulmonar foram avaliados através da revisão de prontuário eletrônico dos pacientes para os quais o teste molecular (teste ctDNA) foi realizado em seu plasma no período de 2014 a 2015 (74). O sequenciamento digital do ctDNA em todos os pacientes foi realizado por um laboratório clínico usando o teste *Guardant360*. O ctDNA foi isolado do plasma e o sequenciamento completo com alta profundidade de leitura foi realizado. O painel utiliza captura híbrida seguida por NGS dos éxons críticos em um painel de 70 genes e relata todos os quatro principais tipos de alterações genômicas (mutações pontuais, inserções, deleções, fusões e amplificações de números de cópias).

O estudo realizou o teste de ctDNA em 88 pacientes consecutivos; 34 pacientes também tiveram o tecido sequenciado; 29 realizaram outras formas de genotipagem; e 25 (28,4%) não tiveram teste molecular de tecido por motivos de tecido inadequado ou contraindicado para biópsia.

Setenta e dois pacientes (82%) tiveram alterações ≥ 1 ctDNA; entre estes; 75% carregavam alterações potencialmente ativas pela aprovação do FDA (61,1%) ou medicamentos experimentais em ensaios clínicos (adicionalmente 13,9%).

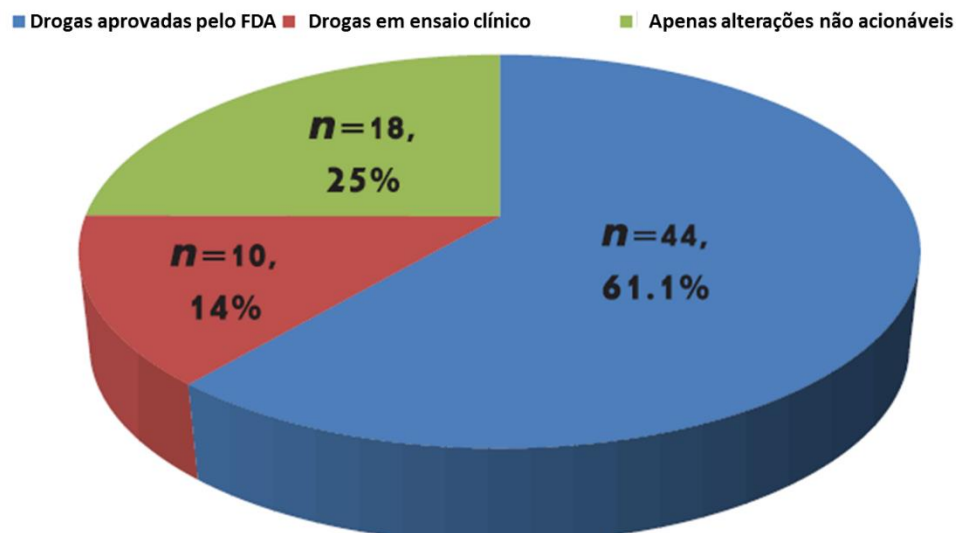


Figura 6 – Potenciais tratamentos para alterações detectadas

A taxa de concordância para alterações de EGFR foi de 90,8% (100% vs. 61,5%; ≤ 1 vs. > 1 mês entre os testes de ctDNA e de tecido; $P=0,04$).

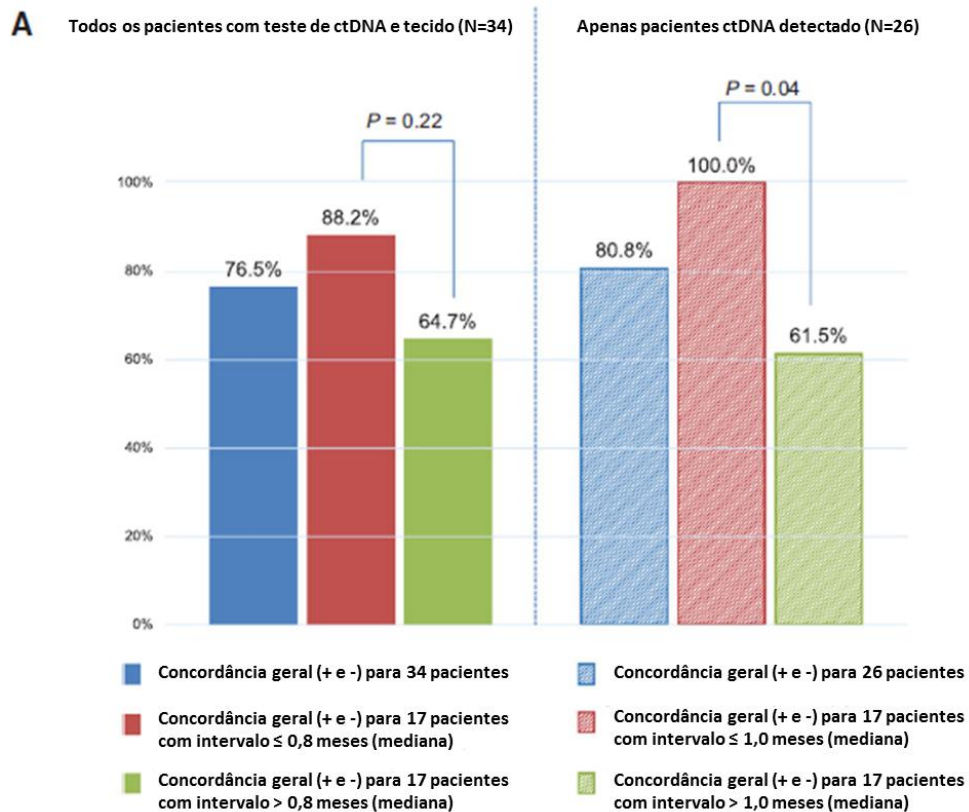
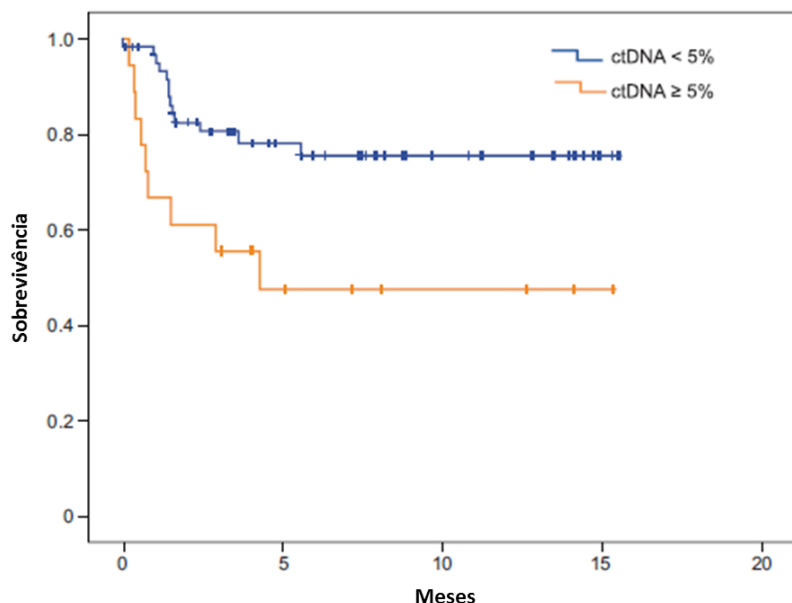


Figura 7 – Concordância de alterações em EGFR entre ctDNA e tecido tumoral



Curvas de Kaplan-Meier comparando a sobrevida geral (dos resultados do teste ctDNA até a morte ou última data de acompanhamento) para pacientes com porcentagem de ctDNA <5% (n = 62; mediana não alcançada) versus ≥ 5% (n = 18; mediana 4,2 meses), P = 0,012. Oito pacientes morreram antes de seus resultados de ctDNA estarem disponíveis e não foram incluídos nesta análise

Figura 8 – Análise de sobrevida global de acordo com níveis de ctDNA

Entre os 88 pacientes, a mediana da sobrevida global (calculada a partir dos resultados do ctDNA até a morte ou até a última data de acompanhamento) não foi alcançada em um acompanhamento médio de 20,2 meses. No entanto, quando se estratificou os pacientes que apresentavam pelo menos uma alteração com percentual de ctDNA detectado superior a 5%, foi observada uma diminuição na sobrevida global.

Dos 25 pacientes analisados, 15 (60%) receberam medicamentos aprovados em bula pelo FDA, 5 (20%) receberam medicações *off-label*, e 5 pacientes com EGFR T790M receberam osimertinibe. No total, 22 pacientes foram avaliados para resposta, destes 16 (72,3%) atingiram doença estável, sendo esta superior a 6 meses (N = 5), ou resposta parcial (N = 11). A sobrevida livre de progressão (SLP) mediana para os 25 pacientes pareados foi de 14,7 meses (IC95%; 3,7 a 25,7), sendo de 15,3 meses para pacientes não-fumantes e 8,1 meses para fumantes (P=0,202). A SLP mediana foi maior em pacientes portadores de alterações em EGFR, quando comparados a pacientes não portadores da mutação (17,6 vs. 5,1 meses,

P=0,009). A mediana de sobrevida global não foi alcançada para os pacientes pareados (n = 25) (tempo médio de acompanhamento de 18,6 meses) em relação a 36,7 meses para os pacientes não pareados (n = 27) (P=0,928).

A análise global da concordância incluindo todas as alterações detectáveis por ambos os testes demonstrou que algumas alterações foram encontradas apenas em tecido ou ctDNA, resultando em uma especificidade de 63,5% quando o tecido foi usado como referência e 76,7% quando o plasma foi usado como referência.

Este estudo demonstrou que pacientes com pelo menos uma alteração com um percentual de ctDNA igual ou superior a 5% tiveram uma sobrevida global mais curta (mediana de 4,2 meses em relação a não alcançada em um acompanhamento médio de 7,5 meses, P=0,012). Além disso, o estudo conclui que a análise do ctDNA detectou alterações na maioria dos pacientes. Com as aberrações potencialmente alvas encontradas na frequência esperada. As terapias correspondentes com as aberrações do ctDNA demonstraram eficácia terapêutica apreciável, sugerindo utilidade clínica que garante futuros estudos prospectivos.

4.5.3. Development of a gene panel for next- generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients

Neste estudo foi relatado o desenvolvimento e implementação de um painel genético (NGS SiRe) que atinge 568 mutações clinicamente relevantes em seis genes (EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, cKIT e PDGFRa), envolvidos em CPNPC, tumor gastrointestinal (GIST), carcinoma colorretal (CRC) e melanoma. Este painel apresentou alta sensibilidade e especificidade e permite a detecção e quantificação de mutações em cfDNA purificadas do plasma e soro de pacientes com diferentes tipos de tumores sólidos. O kit *Ion AmpliSeq Designer* foi usado como genoma de referência para desenvolver um painel personalizado direcionado a seis genes (EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, cKIT e PDGFRa), que estão associados ao resultado do tratamento em CPNPC, GIST, CRC e melanoma (75).

O desempenho do painel foi avaliado em três etapas. Primeiro, a sensibilidade analítica do ensaio foi avaliada no DNA de duas linhas celulares. Em seguida, a sensibilidade e especificidade clínicas foram determinadas usando o DNAC de 63 pacientes com câncer com

tecido tumoral pareado, previamente identificado com um TDA (*Taqman-derived assay*). Por fim, o desempenho do painel na prática clínica foi avaliado usando amostras de sangue coletadas prospectivamente de pacientes com CPNPC avançado.

A especificidade e sensibilidade foram determinadas analisando o cfDNA do soro e do plasma de 40 pacientes com câncer com tecido tumoral pareado. Além disso, foi analisado o cfDNA do soro e do plasma de outros 23 pacientes (18 CPNPC, 2 CRC e 3 melanomas metastático). Todas as 63 amostras de cfDNA e tecidos tumorais foram previamente analisadas para mutações de EGFR, KRAS, NRAS e BRAF usando um TDA, como controle positivo. No caso de tecidos tumorais, a genotipagem foi confirmada por PCR padrão seguida de sequenciamento Sanger. Em casos com divergência de resultados entre o painel NGS SiRe e o TDA, as amostras foram investigadas por PCR digital.

A série retrospectiva de cfDNA foi constituída por 126 amostras de soro e plasma de 63 pacientes. Quando as 63 amostras foram testadas com o painel SiRe, o cfDNA de todos os 8 pacientes com tecido tumoral do tipo selvagem foi negativo (especificidade 100%; IC 64,6 a 100%). Nos restantes 55 pacientes com mutações de EGFR, KRAS, NRAS ou BRAF no tecido tumoral, o painel SiRe detectou a mesma mutação no cfDNA do soro ou plasma em 46 casos (sensibilidade 83,6%; IC 67,3 a 94,3%).

O desempenho do SiRe foi comparado com um TDA previamente relatado em 63 amostras. O teste foi positivo no cfDNA do soro e plasma em 35 pacientes, positivo no plasma, mas não no soro em 5 pacientes, e positivo no soro, mas não no plasma em 6 pacientes. Houve uma alta concordância (Kappa de Cohen: 0,85) entre os resultados obtidos com o painel NGS SiRe e o TDA, embora o desempenho do SiRe tenha sido ligeiramente melhor. Todos os 42 pacientes com mutação positiva em TDA também foram positivos com o painel SiRe, e as 17 amostras negativas com o painel também foram negativas na TDA. Além disso, a NGS detectou mutações no cfDNA de 4 pacientes, enquanto a TDA não. Na análise retrospectiva, o SiRe detectou 40 mutações de EGFR, 11 de KRAS, 1 de NRAS e 5 de BRAF (96,8% de concordância com os resultados em tecido). Nas amostras basais, o SiRe apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 79% em relação ao tecido tumoral.

Neste estudo o desempenho do sequenciamento usando um painel de NGS foi vantajoso, e pode ser usado para o teste de rotina de mutações tumorais relevantes em cfDNA. Além disso, o NGS, por si só, é um procedimento eficiente em termos de tempo para analisar grandes

números de amostras, otimizando assim o fluxo de trabalho em laboratórios de patologia molecular.

4.5.4. Biopsy-free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer

Os objetivos deste estudo foi avaliar um painel genético de ctDNA (NGS) em uma série prospectiva de casos de CPNCP de uma única instituição nos Estados Unidos, determinar a frequência e distribuição de alterações genômicas entre os casos em comparação com os resultados de NGS tecidual e caracterizar aqueles casos em que o ctDNA era indetectável em um ambiente de prática clínica. Foram incluídos 68 pacientes com diagnóstico de CPNCP que haviam sido submetidos a pelo menos um teste de ctDNA em um único laboratório comercial de ctDNA entre 2014 e 2015. O sangue dos pacientes foi coletado, e as bibliotecas de sequenciamento foram geradas a partir do cfDNA. Dois painéis de testes clínicos diferentes foram utilizados durante o período do estudo. As leituras de sequenciamento *Illumina* foram mapeadas para a sequência de referência humana e as alterações genômicas em cfDNA foram identificadas a partir dos dados de sequenciamento *Illumina* por algoritmos (76).

O NGS tecidual foi realizado a critério do médico assistente como parte do atendimento clínico, usando uma variedade de diferentes abordagens e ensaios, variando de teste multiplex direcionado de menos de 10 genes a um NGS com tecido de mais de 300 genes. As estimativas de frequência de mutações identificadas no ctDNA foram calculadas por gene e por paciente. As análises de concordância foram limitadas a mutações ativadoras de BRAF, inserções e deleções de EGFR, ERBB2, amplificação de MET, e fusões de ALK, RET, ROS-1.

A maioria dos pacientes (81%) tinha histologia de adenocarcinoma de pulmão, e 25% dos pacientes foram diagnosticados nos estádios I ou II. Destes pacientes em estádios iniciais, 2 foram era recém diagnosticados no momento da coleta de sangue e 15 apresentaram recidiva local ou distante e, portanto, foram considerados metastáticos. Os demais 51 pacientes estavam no estágio III (7%) ou no estágio IV (68%) no momento do diagnóstico e coleta de sangue.

No total, 83% dos indivíduos tiveram pelo menos uma alteração não sinônima de ctDNA detectada. As mutações em TP53, EGFR e KRAS foram as mais frequentes, além disso, 20 pacientes tiveram um dos seguintes biomarcadores identificados no plasma: mutações

ativadoras do KRAS (n = 12), EGFR (n = 6) e amplificação do MET (n = 2). Essas mutações eram mutuamente exclusivas, em complemento, 2 pacientes que progrediram na terapia com EGFR TKI tiveram alterações no EGFR T790M detectadas no plasma, mas não tiveram uma biópsia para comparação. Dos 68 indivíduos com resultados de ctDNA, 12 (17%) não tiveram alterações de ctDNA detectadas. No total, 31 pacientes tinham amostras de tecido e sangue pareadas. As seguintes mutações condutoras foram identificadas em 23 casos: mutações ativadoras do KRAS (n = 14) e do EGFR (n = 9). Quando o tecido serviu como padrão de referência, a sensibilidade clínica do ensaio de ctDNA foi de 85%, com >99% de especificidade clínica e acurácia diagnóstica. Quando o ctDNA foi considerado o padrão de referência, a sensibilidade clínica da NGS baseada em tecido foi de 81%, com uma especificidade clínica de >99% e acurácia diagnóstica de 99,3%. Outros 23 pacientes tiveram análise de ctDNA, mas nenhum teste genômico em tecido. Nestes pacientes, foram identificadas 7 mutações no KRAS, 2 mutações ativadoras do EGFR e uma mutação ativadora do MET. Dos 12 casos sem alterações detectáveis no ctDNA, 3 tiveram uma mutação identificada no tecido (1 inserção/deleção do EGFR, 1 fusão RET e 1 amplificação do MET). Da mesma forma, em 2 casos a biópsia de tecido não foi possível para o teste e ambos tiveram uma mutação acionável detectada no plasma, sendo uma inserção/deleção de EGFR e uma amplificação de MET.

Um total de 9 indivíduos com amostras pareadas de tecido e sangue tinham uma mutação do EGFR identificada no plasma e tecido (n=5), somente no plasma (n=1) ou somente tecido (n=3), destes, 8 foram tratados com erlotinibe ou afatinibe em primeira ou segunda linha e tiveram 2 pacientes que ainda estavam respondendo à terapia no momento da análise dos dados. Dos 6 pacientes restantes, a mediana de sobrevida livre de progressão foi de 11,5 meses (IC95%variação de 5,7 a 28,7 meses;).

Os desfechos de pacientes com CPCNP avançado podem melhorar, caso o ctDNA identificar o alvo genômico e evitar as complicações potenciais de uma biópsia de tecido invasiva repetida. Quando a suspeita clínica de uma mutação acionável é alta, mas não é identificada pela análise de ctDNA, uma biópsia invasiva então pode ser realizada.

Este estudo consistiu em uma série clínica de pacientes com CPCNP que avaliou os resultados de terapias-alvo usando um ensaio de ctDNA comercialmente disponível. Mais de 80% dos pacientes tinham ctDNA detectável, com alta concordância entre o tecido pareado e o sangue para detecção de oncogênes e os pacientes com biomarcadores identificados no

plasma tiveram SLP na faixa esperada. Os dados deste estudo sugerem que a análise de ctDNA é uma primeira escolha viável, quando a biópsia do tecido de diagnóstico e a genotipagem não forem possíveis, ou no momento da progressão quando uma biópsia de tecido invasivo não é recomendada.

4.5.5. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA

Neste estudo retrospectivo, foram incluídos 54 pacientes com cfDNA avaliado com testes diagnósticos de NGS comercialmente disponíveis. O objetivo deste estudo foi identificar a concordância de alterações genômicas obtidas a partir de biópsias teciduais e análises de cfDNA para pacientes com câncer avançado. Foram incluídos no estudo pacientes 54 com câncer avançado de diversos tipos de tumor, sendo pulmão a localização mais frequente (n=14), seguida de ovário (n=3) e endométrio (n=2). Um paciente foi excluído por amostra insuficiente para teste baseado em tecido (77).

No total, 68 genes foram testados pelo cfDNA, destes, 3 genes foram excluídos (RHEB, RHOA e RIT1) porque não foram incluídos no painel de 315 genes testados por sequenciamento de biópsia de tecidos. Portanto, 65 genes comuns aos dois ensaios foram examinados quanto à concordância.

Dentre os pacientes do estudo, haviam 14 com câncer de pulmão (10 adenocarcinoma, 1 CPNPC pouco diferenciado, 1 escamoso, 1 célula pequena, 1 neuroendócrino de células grandes), 3 com câncer de células ovarianas (2 serosas, 1 células claras), 2 com câncer endometrial (1 mucinoso, 1 epiteloide), 2 com câncer de tireoide (1 papilar, 1 pouco diferenciado sem outra especificação), 2 com câncer hepatocelular (1 célula clara, 1 indiferenciada), 2 com câncer desconhecido primário, 1 colangiocarcinoma (mucinoso), 1 adenocarcinoma de junção esofagogástrica e 1 adenocarcinoma peritoneal (seroso). No geral, 14 de 28 (50%) pacientes tinham câncer de pulmão e 26 de 28 (93%) tinham doença em estágio IV.

A concordância entre os dois ensaios foi de 91,9% (1.672/1.820 genes) incluindo todos os genes examinados (DP: 4,31%). A concordância foi semelhante para os 14 pacientes com câncer de pulmão (91,1%), em comparação com os 14 pacientes com cânceres não-pulmonares (92,6%). Ao excluir os dados genes não sequenciados, a concordância foi de 93,9%. Para essa análise, a concordância também foi semelhante quando comparados pacientes com câncer de pulmão (93,3%) com pacientes com câncer não pulmonar (94,5%). A concordância foi alta em todos os pacientes com variação de 81,5% a 100%. Um dos 28 (3,6%) pacientes apresentou concordância completa e não teve alterações genômicas detectadas em nenhum dos ensaios.

A frequência média do alelo de cfDNA alterado no sangue periférico para o subconjunto de mutações encontradas em ambos os tecidos e no sangue foi de 16,8% (DP: 27,4%). No geral, 65% destas mutações idênticas (15/23), mostraram ter uma frequência alélica relativamente baixa (menos de 10%) de cfDNA circulante alterado.

O número médio de alterações por paciente para tecido e cfDNA foi de 4,82 (SD: 3,02) e 2,96 (SD: 3,01), respectivamente. O número mediano de mutações para tecido e cfDNA foi de 4 e 2, respectivamente. Mais mutações foram detectadas na NGS baseada em tecidos em 21 de 28 (75%) dos pacientes, em complemento um maior número de alterações genômicas foi detectado em cfDNA em 5 de 28 (17,9%) pacientes, e um número igual de mutações foi detectado em 2 dos 28 (7,1%) pacientes. Em conclusão, os achados indicam que o teste possui alta especificidade e concordância quando alterações genômicas estão presentes ou ausentes.

O estudo conclui que o teste de NGS ctDNA oferece detecção precisa e confiável de alterações genéticas clinicamente relevantes através de amostras do plasma de pacientes com câncer.

4.5.6. Use of Liquid Biopsies in Clinical Oncology: Pilot Experience in 168 Patients

Este estudo teve como objetivo analisar o padrão genético com o uso do teste NGS ctDNA em 168 pacientes com diversos tipos de câncer e acompanhar a evolução destes pacientes (78). O teste identifica potenciais mutações genômicas relacionadas ao tumor em 54 genes relacionados ao câncer, bem como amplificações em ERBB2, EGFR e MET através da análise

de DNA extraído do plasma. O ensaio utilizado tem alta sensibilidade (detecta 85% das variantes de nucleotídeo) e especificidade analítica (>99%).

No total, 101 dos 168 pacientes (60%) que tiveram resultados de ctDNA também realizaram sequenciamento de próxima geração (NGS) em seus tecidos. Os locais de tumor primário mais comuns foram o cérebro (33,3%), pulmão (28%) e mama (21,4%). A maioria dos pacientes (85,1%) apresentava doença metastática / recidivante / avançada e sem possibilidade de remoção cirúrgica no momento do teste do ctDNA.

Excluindo as alterações sinônimas, os pacientes tinham uma mediana de 1 alteração (variação de 0 a 19). No geral, 58% dos pacientes incluídos (n=98) tiveram mais de uma alteração identificada em seu plasma. As alterações mais comuns foram no TP53 (31,5%), EGFR (17,3%) e MET (10,1%). No total, 244 alterações (215 mutações e 29 amplificações) foram identificadas em 168 pacientes. Dos 98 pacientes com alterações, 77 (78,6%) tinham apenas mutações, 17 (17,3%) tinham mutação e amplificação, e 4 (4,1%) tinham apenas amplificação.

Ao avaliar as variáveis correlacionadas com número de alterações, pacientes com câncer gastrointestinal, com metástase linfonodal, óssea, pulmonar ou hepática tiveram um número significativamente maior de alterações, enquanto pacientes com tumores cerebrais tiveram alterações significativamente menos alterações detectáveis.

Ainda assim, 16 dos 56 pacientes (28,6%) com tumores cerebrais tiveram ao menos uma alteração, com um número mediano de alterações em todos os pacientes com tumores cerebrais de 0 (variação de 0 a 2). Por outro lado, ao realizar uma análise multivariada, apenas o câncer gastrointestinal ($p = 0,001$) foi descrito como um preditor independente com um número maior de alterações, enquanto os tumores cerebrais se correlacionaram com menos alterações ($p=0,019$) detectadas no plasma.

Dos 34 pacientes com alterações encontradas, 26 (76,5%) apresentaram pelo menos uma alteração que poderia ser alvo de um medicamento (terapia-alvo). Em complemento, 73,5% dos pacientes de CPNPC com alterações identificadas tinham ao menos uma opção de terapia alvo já aprovada pelo FDA e 2,9% apresentavam alterações nas quais terapias alvo em ensaio clínico. No entanto, um percentual de 23,5% apresentou alterações não acionáveis por medicamentos atuais.

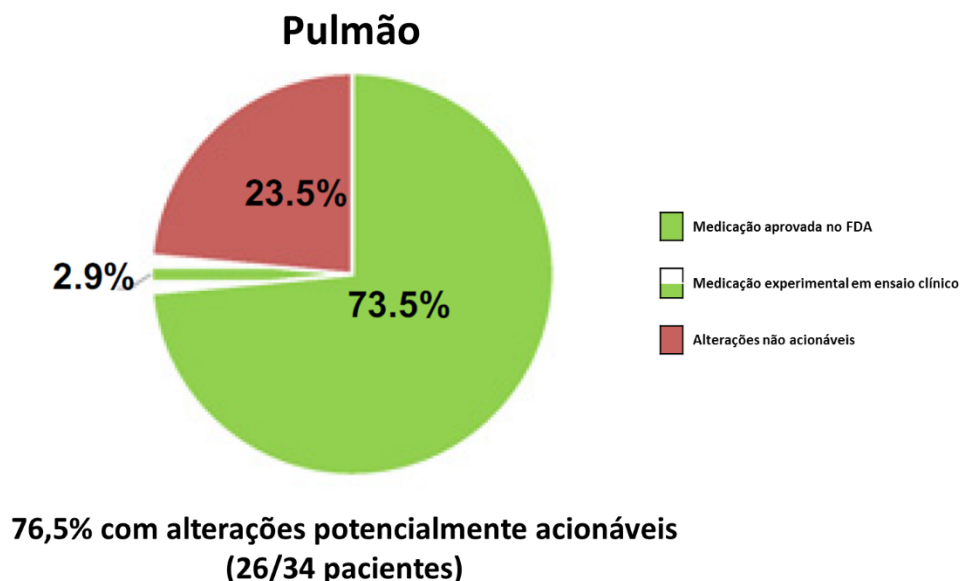


Figura 9 - Potenciais tratamentos para alterações detectadas em câncer de pulmão

Dos 168 pacientes que tiveram resultados do teste de ctDNA, 101 (60%) também tiveram testes genômicos de tecidos. No entanto, apenas 63 pacientes apresentaram alterações no tecido que também faziam parte do painel de ctDNA utilizado, sendo que 22 dos 63 pacientes (35%) apresentaram mais de uma alteração em comum entre o tecido e o ctDNA. Nesses 22 pacientes, a mediana do intervalo de tempo entre a biópsia tecidual e a coleta de sangue foi de 2,7 meses em comparação com 14,4 meses ($p=0,006$) nos 41 (65%) pacientes nos quais não foram identificadas alterações comuns no tecido e plasma.

Os pacientes tinham uma mediana de 1 linha de tratamento anterior (intervalo, 0 a 11) antes do teste de ctDNA. Dos 168 pacientes, 33 (19,6%) foram tratados com pelo menos uma terapia alvo após os resultados do perfil molecular, e 39 (23,2%) sem agentes de terapia alvo, os pacientes restantes não foram avaliados para quanto seus tratamentos após os resultados do teste porque morreram antes do tratamento, ou foram tratados apenas com cirurgia e terapia adjuvante.

Dos 33 pacientes que receberam pelo menos uma terapia alvo, a medicação estava direcionada para uma alteração detectada pelo teste de ctDNA para 15 pacientes (45,5%). Dos 12 pacientes avaliados para resposta, 5 (42%) atingiram estabilidade superior a 6 meses. Dos

39 pacientes com terapia convencional, 28 foram avaliados para resposta. Destes 28 pacientes, 2 (7,1%) atingiram estabilidade superior a 6 meses ($P=0,02$).

O percentual mediano de ctDNA detectado para cada mutação foi de 0,45% (IC 95% 0,3-0,6). Foi observada uma forte correlação entre os casos com pelo menos 1 gene alterado com um percentual de ctDNA superior a 5% e menor sobrevida global (mediana SG = 4,03 meses em relação a não alcançado em um acompanhamento médio de 6,1 meses; $P=0,0001$). As taxas gerais de concordância foram de 70,3% para alterações de TP53 e EGFR, 88,1% para PIK3CA e 93,1% para ERBB2. Em conjunto, esses dados sugerem que os testes de ctDNA podem ter utilidade clínica para o tratamento de pacientes oncológicos.

4.5.7. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA

O estudo em questão conduziu uma validação analítica e clínica de um painel para avaliação de mutações e amplificações gênicas. O painel estudado foi um sequenciamento digital do ctDNA isolado de amostras de sangue. O painel identifica SNVs via sequenciamento de 54 genes abrangendo aproximadamente 78.000 pares de bases, incluindo cobertura completa em todos os éxons em 18 genes e éxons críticos em 36 genes bem como variações no número de cópias em ERBB2, EGFR e MET (79).

Para validade clínica, foram coletadas amostras de plasma de 510 pacientes oncológicos estadios III/IV nos Estados Unidos e na Coreia do Sul, destes 510 indivíduos, 165 também tiveram amostras de biópsia tecidual pareadas coletadas. As 165 amostras combinadas de plasma e tecido foram analisadas na plataforma *Illumina Hi-Seq 2500*. O estudo comparou o desempenho do sequenciamento digital com o sequenciamento tradicional NGS usando *TruSeq DNA Sample Preparation*. Quando o cfDNA da linha celular do tumor com 10 mutações conhecidas é adicionado a frações de alelo mutado a 0,1% em um recipiente de cfDNA extraído de um doador saudável, e esta mistura é sequenciada com um *Illumina* com preparação padrão, estes SNVs são ocultados por vários falsos positivos de 0,05 a 5%.

Para avaliar a precisão do teste, o DNA genômico de 20 doadores saudáveis e jovens foram enviados para um laboratório de referência externo para sequenciamento completo do

exoma. Ao longo do painel de 78.000 pares de bases, o ensaio de sequenciamento de todo o exoma encontrou 365 SNVs e o painel do estudo identificou todos os 365 SNVs com um SNV falso positivo adicional em relação ao sequenciamento total do exoma. Assim, a sensibilidade analítica para SNVs em 2%-10% de MAFs foi de 100%. A descoberta de 365 verdadeiros positivos e um único falso positivo em uma região alvo de 1,56 milhão de pares de bases, equivale a uma especificidade analítica de 99,9999%, ou uma taxa de falsos positivos de 0,0001%.

As alterações de cópias de nucleotídeos para três genes, EGFR, ERBB2 e MET, foram determinadas utilizando 9 linhas celulares bem caracterizadas por hibridização *in situ* com fluorescência. O cfDNA destas linhas celulares foi extraído a partir de meios de cultura de células e sequenciado a partir de bibliotecas. Os resultados mostraram uma excelente correlação com alta precisão diagnóstica.

Com relação a validação clínica do painel cfDNA, 165 pacientes tinham amostras de plasma e tecido compatíveis. As histologias de câncer de tumor sólido incluíram 57 pacientes de câncer colorretal (CRC), 22 pacientes de câncer gastrointestinal, 18 pacientes de melanoma, 18 de câncer de pulmão, 15 de câncer de mama, 8 de câncer geniturinário e 27 outros tipos de câncer de menor frequência, sendo que 24% estavam no estágio III, 73% no estágio IV e 3% eram desconhecidos.

A sensibilidade clínica para o sequenciamento digital para todos os oncogenes mutados em comparação com o NGS baseada em tecido foi de 85,0%, especificidade de 99,6%, acurácia diagnóstica de 99,3%. Ao utilizar NGS baseada em tecido como comparação com o sequenciamento digital de cfDNA, a sensibilidade clínica foi de 80,7%, especificidade de 99,7%, precisão de diagnóstico de 99,3%. Ambos os tipos de amostra foram processados em um sequenciador NGS do *Illumina*. A sensibilidade clínica para o cfDNA em genes individuais variou de 50% a 100% e especificidade de 79% a 100%.

A média do desempenho para cada um dos genes mais comumente mutados usando o cfDNA resultou em sensibilidade de 86,5% (IC95%; 80,3% a 91,1%), especificidade de 98,1% (IC95%; 97,3% a 98,7%) e precisão diagnóstica de 97,0% (96,0% a 97,7%). A média de desempenho de NGS baseado DNA tecidual resultou em sensibilidade de 83,1% (IC95%; 76,7% a 88,2%), especificidade de 98,5% (97,8% a 99,1%) e precisão diagnóstica de 97,0%

(IC95%; 96,0% a 97,7%). Desta forma, o desempenho diagnóstico destes genes no painel estudado foi semelhante ao sequenciamento digital de cfDNA e para o NGS em DNA tecidual.

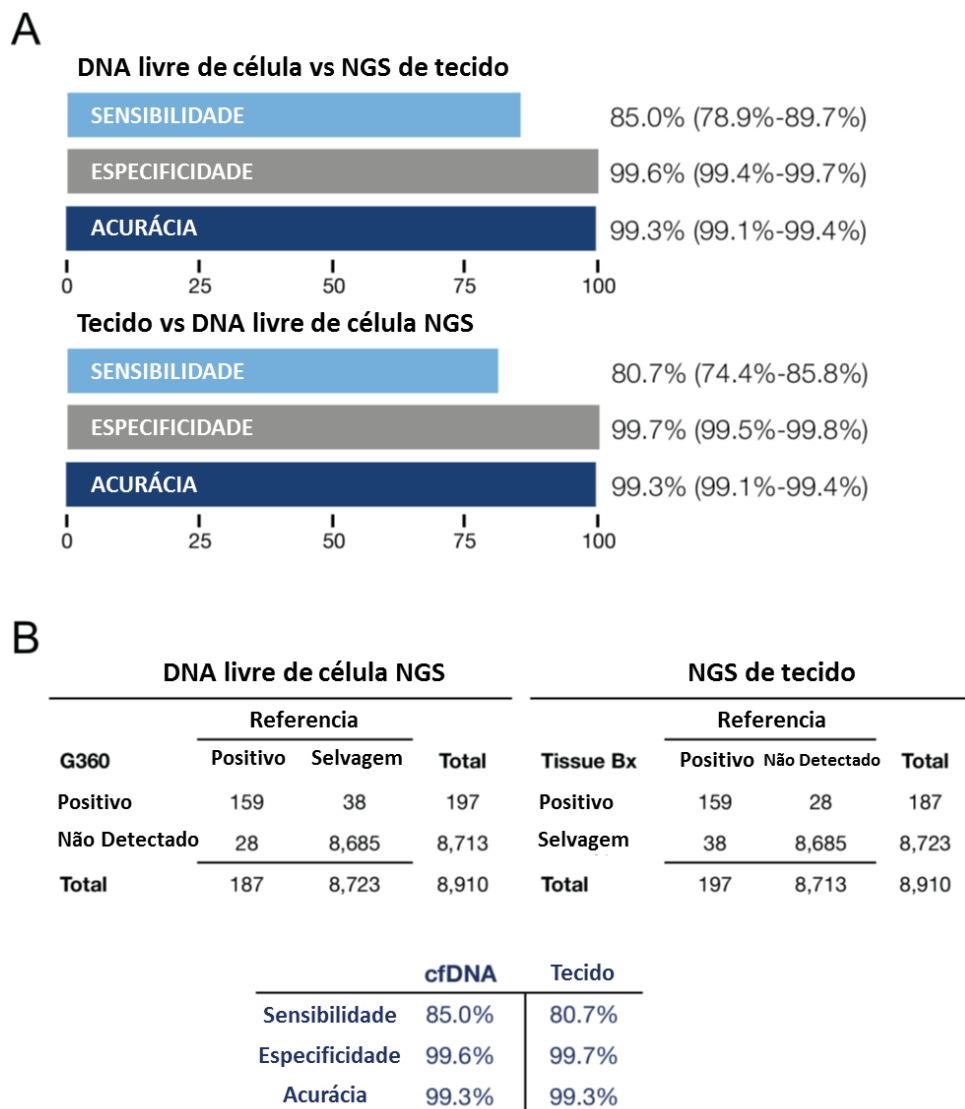


Figura 10 – Sensibilidade, especificidade e acurácia de tecido versus DNA livre.

A partir dos resultados deste estudo foi possível concluir que este teste permite evitar o custo, complicações, atraso de tempo e as taxas de falha inerentes à NGS baseada em tecido tumoral sólido, além disso essa abordagem apresenta uma boa utilidade clínica.

4.5.8. *Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/ IFCT-1002*

O objetivo deste estudo foi analisar as alterações genéticas através de um sequenciamento profundo (*deep sequencing*) das mutações somáticas mais relevantes clinicamente no tDNA e no cfDNA de pacientes não fumantes com CPNPC. O estudo do qual foram selecionados os pacientes se trata de um coorte prospectivo e multicêntrico, conduzido para descrever a epidemiologia clínica, patológica e molecular de câncer de pulmão em pacientes não fumantes na França (80).

Os critérios de inclusão consistiram em casos recém diagnosticados de CPNPC de pacientes autodeclarados não fumantes. No geral, entre 2011 e 2013, 384 pacientes foram selecionados para a triagem de inclusão no estudo em 75 centros de pesquisa, sendo que todos os pacientes incluídos passaram por uma coleta de sangue antes de receber qualquer tratamento para CPNPC. Os segmentos genéticos foram sequenciados utilizando um sequenciador *IonTorrent PGM* para avaliação de perfil de mutação gênica no plasma e tumores.

Entre os 107 pacientes recrutados, 68 tinham ambos, cfDNA e tDNA, disponíveis para análises moleculares. As 68 amostras de cfDNA e tDNA foram analisadas por sequenciamento profundo. No tDNA, uma mutação *hotspot* foi encontrada em 50 amostras (74%), enquanto 18 amostras (26%) eram do tipo selvagem quanto avaliadas por *hotspot*.

No total 5 mutações identificadas pelo sequenciamento de nova geração (NGS) não foram detectadas por análises clínicas de biomarcadores de rotina, das quais 2 não haviam sido testadas para os amplicons correspondentes nas análises clínicas de rotina, e 3 apresentavam frequências alélicas variantes $\leq 25\%$ (limite de detecção usado na rotina clínica). Por outro lado, uma mutação esperada do tumor não foi confirmada pelo NGS. As mutações foram localizadas principalmente no éxon 19 de EGFR (44%) e no éxon 21 de EGFR (18%). Nenhuma mutação foi encontrada no éxon 20 de PIK3CA, no éxon 11 de BRAF, no éxon 3 de KRAS, e no éxon 19 de ERBB2.

Os resultados das análises comparativas de cfDNA e tDNA, usando tDNA como referência e avaliando cada um dos amplicons independentemente, apresentou uma sensibilidade que variou de 55%, para o éxon 19 do EGFR, a 100%, para o éxon 18 do EGFR. No geral, considerando todos os amplicons, a sensibilidade foi de 58% (95% CI, 43% a 71%), a taxa de detecção de mutação foi de 52% e a taxa de concordância foi de 68%. Foi estimado que a especificidade do ensaio tem um valor de 86% para o éxon 9 do PI3KCA, 88% para o éxon 19 do EGFR, 100% para outros amplicons e 87% (62% a 96%) no geral.

O uso de NGS para a detecção de mutação tumoral em cfDNA pode ser clinicamente significativa, uma vez que a análise de biomarcadores é atualmente útil apenas para a seleção de tratamento em pacientes com câncer de pulmão com doença metastática. Avaliando um painel maior de mutações, incluindo mutações pontuais, inserções e deleções, e realizando em uma série maior de pacientes, reforça e amplia a aplicabilidade do NGS para a detecção de alterações genéticas no cfDNA. Portanto, a aplicação de técnicas baseadas em NGS altamente sensíveis no cfDNA pode fornecer uma melhor avaliação do espectro de alterações presentes em todo o tumor.

4.5.9. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage

Neste estudo foram avaliados o desempenho técnico e a utilidade clínica do CAPP-Seq em pacientes com CPNPC em estágio inicial e avançado. Entre 2010 e 2012, os pacientes em tratamento para CPNPC recém-diagnosticados ou recorrentes foram incluídos no estudo, em complemento, os pacientes selecionados não receberam transfusões de sangue dentro de 3 meses da coleta de sangue (81).

Para todos os pacientes o sangue periférico foi coletado, e o DNA genômico foi quantificado pelo kit de ensaio *Quant-iT PicoGreen*. As bibliotecas *Illumina* NGS indexadas foram preparadas a partir de DNA de plasma e tumor de células tóxicas, e DNA genômico de linha celular. A seleção do híbrido foi realizada com uma biblioteca personalizada *SeqCap EZ Choice*. Após a seleção do híbrido, os fragmentos de DNA capturados foram amplificados com 12 a 14 ciclos de PCR em 4 a 6 reações separadas.

A análise do perfil de 90 amostras foi realizada incluindo duas linhas de células CPNPC, 17 amostras de tumores primários e leucócitos de sangue periférico e 40 amostras de plasma de 18 indivíduos humanos, incluindo 5 adultos saudáveis e 13 pacientes com CPNPC. As frações de ctDNA detectadas no plasma variaram de aproximadamente 0,02% a 3,2%, com uma mediana de aproximadamente 0,1% em amostras pré-tratamento. Níveis absolutos de ctDNA no plasma pré-tratamento foram significativamente correlacionados com o volume do tumor, medido por tomografia computadorizada (TC) e tomografia por emissão de pósitrons (PET) ($R^2 = 0,89$; $p=0,0002$).

Análise da *Receiver Operating Characteristic* (ROC) de amostras de DNA plasmático de pré-tratamento e controles saudáveis, divididas em todas as etapas (n = 13 pacientes) e estágios II-IV (n = 9 pacientes). Os valores da área sob a curva (AUC) são significativos em $P < 0,0001$. Sn, sensibilidade; Sp, especificidade. **(b)** Dados brutos relacionados com a. TP, verdadeiro positivo; FP, falso positivo; TN, verdadeiro negativo; FN, falso negativo. **(c)** Concordância entre o volume do tumor, medido por CT ou PET / CT, e pg/mL de ctDNA de amostras DE pré-tratamento (n = 9), medido por CAPP-Seq.

Figura 11 - Análise de sensibilidade e especificidade.

Para determinar se as concentrações de ctDNA refletem a carga da doença em amostras longitudinais, foi analisado o DNA plasmático de três pacientes com CPCNP avançado submetidos a terapias distintas. Como nas amostras pré-tratamento, os níveis de ctDNA foram altamente correlacionados com os volumes tumorais durante a terapia ($R^2 = 0,95$ para o paciente 15; $R^2 = 0,85$ para o paciente 9).

Separadamente, ao analisar especificamente a capacidade de detectar de forma não invasiva mutações acionáveis em EGFR e KRAS25, foram identificadas corretamente 100% das mutações em frações alélicas superiores a 0,1% com especificidade de 99%. O CAPP-Seq pôde, portanto, ter utilidade para genotipagem de tumores sem a necessidade de biópsias em pacientes avançados ou metastáticos. No entanto, melhorias no método são necessárias para detectar tumores de estágio I sem conhecimento prévio do genótipo. Em resumo, a captura híbrida direcionada e o sequenciamento do DNA plasmático permite uma detecção altamente sensível e não invasiva de ctDNA na grande maioria dos pacientes com CPNPC. O CAPP-Seq pode ser aplicado na prática clínica e tem o potencial de acelerar a detecção, a terapia e o monitoramento personalizados do câncer.

4.6. Outras Evidências

Além das evidências encontradas na revisão de literatura, descritas na seção acima, outras evidências relevantes que não foram encontradas na busca são descritas na seção abaixo.

4.6.1. Detection of circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer

Neste estudo 39 pacientes de CPNPC avançado tratados na China foram incluídos e uma abordagem de sequenciamento para detectar e comparar alterações em genes em biópsias de tecidos e amostras de plasma. O sangue foi coletado uma semana antes da cirurgia em todos os pacientes, as amostras de tecidos foram coletadas dos nódulos metastáticos para 11 pacientes, nos quais foram encontradas metástases de pleura na cirurgia. Para os outros sem metástase de pleura, amostras de tecido foram coletadas do sítio primário. Um painel cobrindo 40 genes relacionados ao câncer, tais como EGFR, BRAF, KRAS, PIK3CA, ALK, RET e ROS1, foi usado neste estudo (82).

Amostras de sangue e de tecido obtidas nos 39 pacientes incluídos no estudo. Os participantes foram diagnosticados com CPNPC da fase III a IV. Um total de 34 pacientes (87%) tinham histologia de adenocarcinoma e 5 pacientes (13%) tinham carcinoma de células escamosas. A maioria dos pacientes (n=36; 92,3%) não havia recebido tratamento prévio. Todas as amostras, consistindo de plasma, glóbulos brancos e tecido, foram sequenciadas usando a uma plataforma de NGS.

As mutações concordantes detectadas tanto no DNA tecidual quanto no ctDNA plasmático foram observadas em 47,43%, nenhuma mutação somática foi encontrada nas em 12 pacientes (30,77%), e em 8,5 pacientes (21,80%) mutações foram encontradas somente no DNA tecidual. As mutações genéticas detectadas no DNA tecidual e no ctDNA plasmático foram EGFR, KRAS, rearranjos ELM4-ALK e PIK3CA, e as taxas de mutação no tecido e plasma foram de 30,77%, 7,70%, 6,40% e 2,56%, respectivamente.

A sensibilidade da detecção de mutações no plasma ctDNA foi de 68,5% (18,5; IC95%; 47,8 a 84,1%) e o valor preditivo positivo (VPP) foi de 100% (18,5; IC95%; 78,6 a 100%). A especificidade foi de 100% (12; IC 95%; 69,9 a 100%) e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 58,5% (12; IC95%; 35,4 a 78,7%) e a concordância geral entre os tecidos e plasma foi de 78,21% (30,5 de 39). As frequências de mutação de SNVs, inserções e deleções de DNA tecidual (média de 24,10%, com um intervalo de 0,30 a 52,00%) foram maiores do que as de ctDNA plasmático pareado (média de 3,70%, com variação de 0,20 a 11,60%).

Em resumo, 30 mutações em 39 pacientes foram identificadas em amostras de tecido, e as porcentagens totais de mutação de EGFR, KRAS, PIK3CA, rearranjos de ALK detectados a partir do ctDNA plasmático foram semelhantes aos do DNA tecidual.

Em conclusão, a abordagem de sequenciamento pode ser usada para detectar mutações genéticas, tais como SNVs, inserções, deleções e fusão gênica, tanto no plasma quanto no tecido tumoral de pacientes com CPNPC avançado. Os resultados mostraram uma alta concordância de mutações genéticas encontradas em amostras de plasma e amostras de tecido pareado. Portanto, o ctDNA no plasma provavelmente se tornará um diagnóstico alternativo para mutações relacionadas ao câncer em pacientes com CPNPC avançado, e é útil para prognóstico e seleção direcionada de terapia.

4.6.2. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA

Neste estudo, foi avaliado o uso do painel de sequenciamento de nova geração de 70 genes do DNA circular tumoral para detecção das variantes clinicamente acionáveis em um estudo com de 102 pacientes com CPNPC seguidos prospectivamente no hospital da universidade da Pensilvânia. O estudo avaliou a utilidade clínica do uso de biópsia líquida no manejo de pacientes de CPNPC avançado, incluindo aqueles para os quais o sequenciamento de tecido não poderia ser realizado. O estudo também avaliou a concordância nas alterações genômicas e a capacidade de detectar mutações no ctDNA e DNA tecidual (3).

Os critérios de inclusão para este estudo foram pacientes com um diagnóstico ou suspeita de CPNPC, com amostras de sangue enviadas para NGS de ctDNA como parte de sua rotina clínica. Este estudo não apresentava nenhum critério relativo ao tratamento. O teste utilizado no estudo detecta variações de um único nucleotídeo em até 70 genes, fusões em 6 genes e inserção e deleções em 3 genes. As coletas de sangue para a realização do teste de NGS ctDNA comercialmente disponível foi realizada como indicado pelo oncologista. Variáveis clínicas e resultados do sequenciamento de tumores sólidos foram determinados por revisão de prontuários.

O sequenciamento do ctDNA foi realizado para 112 amostras obtidas de 102 pacientes no total, incluindo 100 pacientes com CPCNP avançado e dois pacientes com câncer de sítio primário desconhecido. A maioria dos pacientes eram mulheres (68%) com adenocarcinoma (81%) e doença em estágio IV (96%).

A razão mais comum para a solicitação do teste de NGS de ctDNA foi a detecção das mutações alvos para 52 pacientes, dentre os quais, 27 pacientes não tinham nenhuma terapia prévia, 18 tratados com quimioterapia e 7 com imunoterapia. Outras razões para solicitar o teste de ctDNA incluem: detecção de mutações de resistência à terapia direcionada (36 pacientes), identificação de mutações acionáveis em pacientes com doença progressiva (12 pacientes) e rastreamento de uma mutação identificada no tDNA para monitorar a resposta à terapia (2 pacientes).

Enquanto a análise de ctDNA foi completada com sucesso para todas as 112 amostras obtidas de 102 pacientes consecutivos, a NGS tecidual só pôde ser completada para 50 (49,0%) pacientes.

Dentre os 52 pacientes em que não foi possível analisar o DNA tecidual, os principais motivos para a ausência da amostra tecidual foram quantidade não suficiente (n=24), biópsia com dificuldade de acesso (n=12) e tecido não disponível (n=9). Os demais motivos estão descritos na figura abaixo:

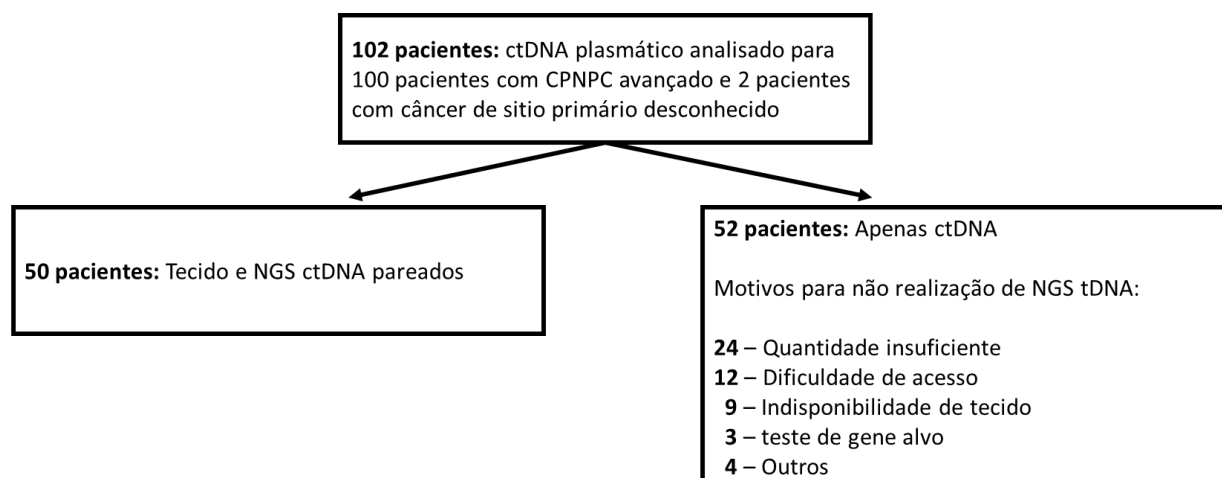
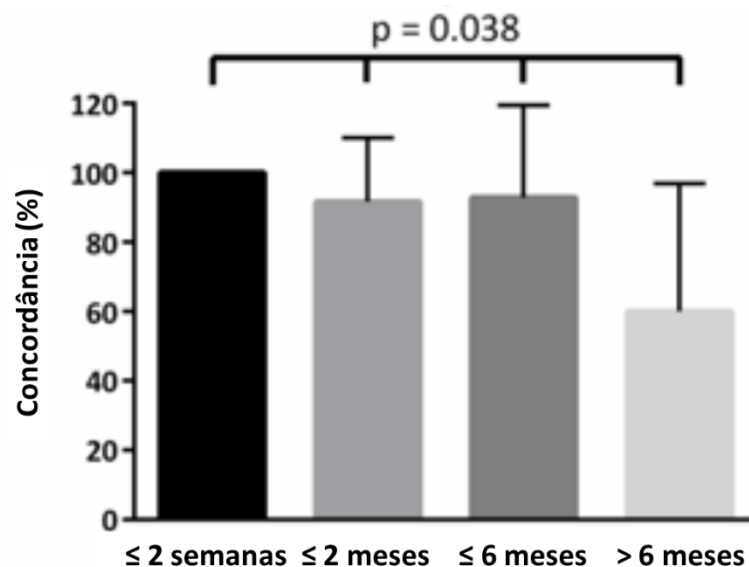


Figura 12 – Motivos para ausência de amostras teciduais

Para identificar o potencial de ação clínico do NGS ctDNA, todas as variantes detectadas foram comparadas com a disponibilidade de terapias já aprovadas pelo FDA, *off-label* ou experimentais. A maioria dos pacientes (70%) poderia receber medicações em pesquisa de ensaio clínico, 56 (55%) pacientes tinham uma terapia direcionada *off-label* que poderia ser usada, e 32 (31%) pacientes tinham uma terapia aprovada pela FDA disponível. Em conjunto, esses dados sugerem que a análise de ctDNA para pacientes CPNPC pode produzir resultados com alta relevância clínica, incluindo a detecção de mutações terapêuticas em EGFR, ALK e outros genes.

Entre os 50 pacientes com tDNA e ctDNA combinados, 24 mutações de EGFR que impactavam na prática clínica foram detectadas em amostras de tDNA e 19 em ctDNA, resultando em uma concordância geral de 79%. A mutação de resistência ao EGFR T790M foi identificada em 4 (8%) amostras de tDNA e 8 (16%) amostras de ctDNA. Dado que o intervalo de tempo entre as coletas de tecido e de sangue para os pacientes variou de 0 a mais de 2 anos, o estudo avaliou se a evolução genética do tumor ao longo do tempo e sob influência da terapia poderia levar a uma diminuição na concordância quando o intervalo de tempo entre a coleta de plasma e de tecido fosse maior.

A fim de amenizar este fator foi calculado a concordância entre as variantes EGFR detectadas em tDNA e ctDNA para intervalos de tempo <2 semanas, <2 meses, <6 meses e superior a 6 meses, sendo encontradas as taxas de concordância 100%, 92%, 94% e 60%, respectivamente, estas foram significativamente correlacionadas com o tempo entre a biópsia tecidual e a coleta de sangue ($p=0,038$).

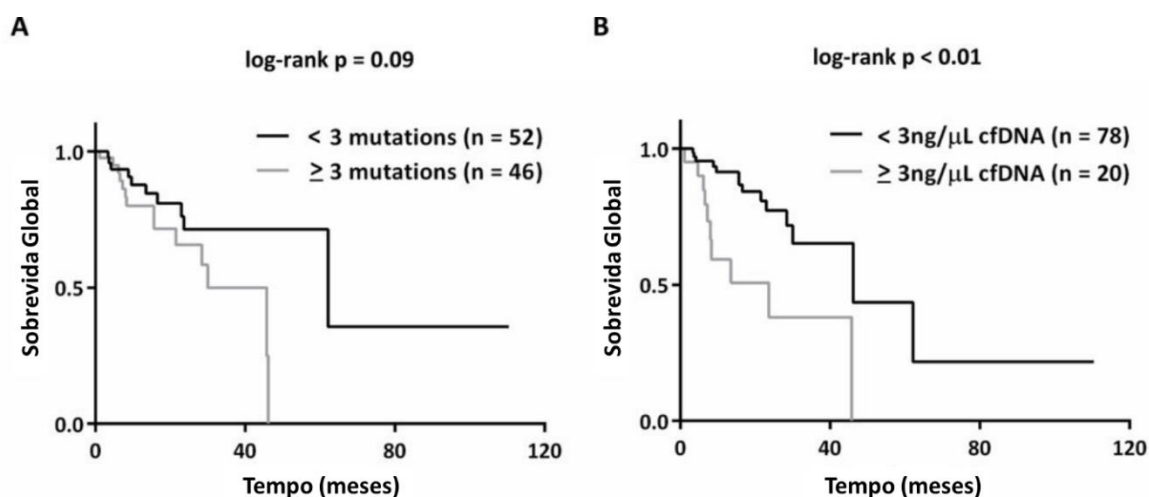


Concordância de mutações de EGFR detectáveis em tDNA e ctDNA em relação ao intervalo de tempo entre biópsia tecidual e coleta de sangue (≤ 2 semanas, n = 9; ≤ 2 meses, n = 12; ≤ 6 meses, n = 14; > 6 meses, n = 10). AF (%) = Fração Alélica.

Figura 13 – Concordância de mutações de EGFR detectáveis ao longo do tempo após início do tratamento

Para os 98 pacientes com doença metastática, a sobrevida global mediana em pacientes com mais de 3 variantes detectadas no plasma foi de 46 meses em relação a 62 meses para aqueles com menos de 3 variantes, embora esse resultado não tenha alcançado significância estatística ($p=0,09$). A concentração média de cfDNA total extraído do plasma foi significativamente maior em pacientes que morreram durante o período de estudo em relação aos pacientes vivos (4,0 em relação a 1,6 ng/mL; $p<0,001$).

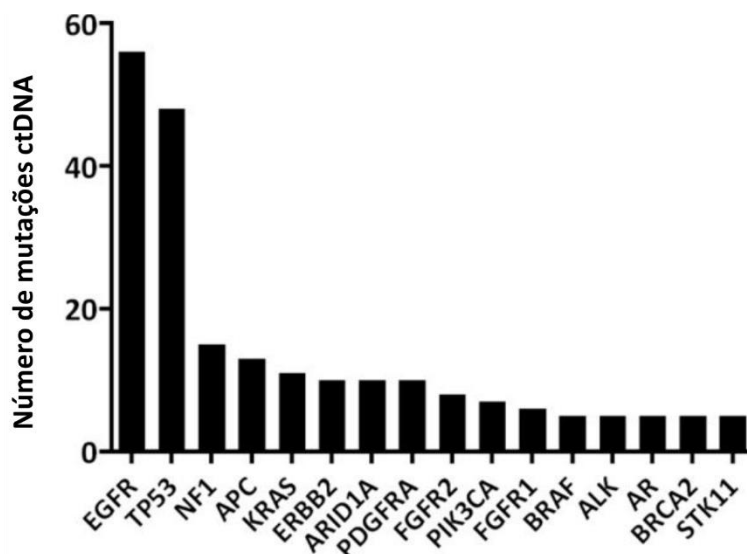
Concentrações mais elevadas de cfDNA foram significativamente associadas com a diminuição da sobrevida global do diagnóstico metastático, e uma concentração de DNA superior a 3 ng/μL foi associada a uma sobrevida global mediana de 24 meses em relação a 46 meses (log-rank. $p<0,01$). Esse resultado permaneceu significativo quando ajustado para idade, status de performance, status de mutação do EGFR e número de sítios metastáticos.



Uso de ctDNA para prever a sobrevivência. A sobrevida do paciente foi calculada como o número de meses desde a data do diagnóstico metastático, e então comparada às medidas do ctDNA (n = 98 pacientes com doença metastática). **(A)** Curva de sobrevida de Kaplan Meier e teste de log-rank em torno de um limiar de ≥ 3 mutações. **(B)** Curva de sobrevida de Kaplan Meier e teste de log-rank em torno de um limiar de $\geq 3\text{ ng} / \mu\text{L}$ de cfDNA detectado.

Figura 14 – Sobrevida global de acordo com quantidade de mutações e quantidade de ctDNA.

O estudo conclui que mutações condutoras e de resistência podem ser detectadas pelo NGS ctDNA, mesmo quando o tecido não está disponível, permitindo assim um diagnóstico mais preciso, melhor manejo do paciente e amostragem seriada para monitorar a progressão da doença e a evolução clonal.



Deteção de variantes no ctDNA. 275 mutações totais foram detectadas no ctDNA de 86 dos 102 pacientes. É mostrada aqui a frequência de variantes por gene para as 219 variantes detectadas nos 16 genes mais comumente mutados.

Figura 15 – Detecção de variáveis identificadas no ctDNA por gene

4.6.3. Bias-corrected targeted next-generation sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients

Este estudo realizou uma abordagem de NGS direcionada para a detecção de mutações e rearranjos em cfDNA de 48 pacientes com CPNPC avançado tratados no Instituto do Câncer Dana-Faber. Os pacientes tiveram o sangue coletado de maneira prospectiva (83). Inicialmente, a metodologia foi validada utilizando DNA de linha celular, e após utilizado no cfDNA do plasma dos pacientes de CPNPC. Para comparação com este ensaio de NGS, a ddPCR plasmática foi realizada usando um ensaio estabelecido e validado para controle. O painel NGS foi validado usando DNA genômico de 14 linhas celulares independentes, com alterações genéticas conhecidas, contendo 4 fusões gênicas, 19 mutações pontuais e duas inserções ou deleções.

Os pacientes foram considerados elegíveis se tivessem CPNPC avançado com um genótipo tumoral conhecido, não tratado ou progressivo. No instituto onde o estudo foi realizado, a genotipagem do tumor é realizada como parte da rotina, usando ensaios de genotipagem convencional (PCR) ou um painel de NGS quando disponível. Neste estudo, o plasma foi coletado antes do início da terapia para CPNPC avançado. Para este painel, foram desenvolvidas sondas que abrangem partes de 11 genes conhecidos como sendo oncogênicos no CPNPC. As regiões de codificação selecionadas de 8 genes foram sequenciadas (KRAS, EGFR, ALK, HER2, BRAF, NRAS, PIK3CA, MET e MEK1).

A sensibilidade da plataforma NGS foi estudada em 29 dos 48 pacientes conhecidos pela genotipagem do tumor com as mutações do EGFR e KRAS testadas com ddPCR. Usando a genotipagem do tumor como padrão ouro, o ddPCR do plasma teve uma sensibilidade de 86%, enquanto a NGS teve uma sensibilidade de 79%, sem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,43$). Em ambos os métodos a sensibilidade foi aumentada com maior quantidade de cfDNA. A fração alélica do alelo mutante em cfDNA, calculada como o número de leituras

mutantes sobre leituras de tipos selvagens, foi correlacionada para NGS plasmático e ddPCR (Correlação de Pearson = 0,93; $p < 0,001$). A detecção de mutações e rearranjos raros no cfDNA foi estudada em 20 dos 48 pacientes com uma mutação KRAS e mutação PIK3CA. A NGS plasmática foi capaz de detectar 6 de 8 casos com rearranjos e 4 casos com mutações raras de HER2 e EGFR. A sensibilidade nesta coorte foi de 75% (15/20).

Os oncogenes avaliados neste estudo são estabelecidos como não sobrepostos na genotipagem do tumor e são, portanto, padrões ouro para avaliação de falsos positivos. A especificidade da plataforma NGS foi de 100% para estes genótipos com 7 fatores, com taxa de falso positivo de 0% (IC95%; 0 a 10%).

A detecção de mutações de resistência foi explorada em 15 dos 48 pacientes que tiveram plasma coletado após o desenvolvimento de resistência adquirida a um inibidor de tirosina quinase. Dos 12 pacientes com resistência adquirida ao erlotinibe ou afatinibe, a NGS detectou a mutação T790M em 8 deles. Um dos 12 pacientes foi refratário ao erlotinibe e a afatinibe, apesar de ter uma deleção do éxon 19 de EGFR, o NGS tumoral identificou elevada amplificação do MET. O NGS detectou de forma semelhante à amplificação do MET, evidenciada por um aumento significativo nas cópias de MET em comparação com o controle.

Em conclusão, o ensaio de NGS avaliado neste estudo foi desenvolvido e testado com sucesso e, usando uma nova técnica de captura e análise, pode detectar mutações e rearranjos no plasma a partir de pacientes de CPNPC avançado. Esta abordagem de NGS plasmática detectou uma ampla gama de alterações genômicas no CPNPC, sem falsos positivos, incluindo mutações complexas, como rearranjos e mutações inesperadas de resistência.

4.6.4. Tracking the Evolution of Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors through Longitudinal Analysis of Circulating Tumor DNA

Este estudo avaliou 22 pacientes de CPNPC ALK+ que apresentaram resistência ao tratamento com TKis relacionados a ALK para descrever a evolução da resistência. Além disso, foi realizada a concordância do entre amostras plasmáticas e teciduais. Este estudo foi

conduzido entre 2015 e 2017 em Massachusetts e o plasma foi coletado de 79 pacientes com CPNCP metastático e ALK-positivo recebendo tratamento com ALK TKIs (84).

Os rearranjos ALK foram identificados por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (n = 7) ou NGS via *Foundation One* (n = 3), *OncoPanel* (n = 1), ou um ensaio de fusão sólida (n = 1). Nos 10 pacientes restantes, o ALK foi avaliado utilizando a combinação de FISH e NGS (n = 9) ou FISH e imuno-histoquímica (n = 1). As bibliotecas foram construídas utilizando o kit *Illumina TruSeq*, enriquecido com um painel *PanCancer* do gene 566.

Primeiro foi avaliado a concordância entre a genotipagem de tecidos e plasma para fusões ALK, mutações ALK e alterações não-ALK. No total 20(91%) dos 22 pacientes foram submetidos à biópsia de um sítio resistente e 3 pacientes foram submetidos a biópsias em dois momentos separados, com cada biópsia representando progressão em um ALK TKI distinto. Das 23 biópsias, o tecido foi adequado para a análise da NGS em 16 (70%) amostras obtidas de 14 pacientes. Foram detectadas alterações do tipo fusão do ALK no plasma de 19 (86%) dos 22 pacientes. Dos 3 casos em que a fusão não foi detectada, um paciente teve progressão de metástases intrapulmonares, enquanto os outros tiveram progressão em outros órgãos, além disso foi detectado EML4-ALK em 18 (94%) casos.

Mutações pontuais na ALK quinase foram identificadas em amostras de plasma de 11 (50%) pacientes, 5 dos quais tinham biópsias pareadas no momento da detecção de mutação. Em 8 de 11 casos, as mutações da ALK foram consideradas suficientes para mediar a resistência ao TKI.

Todas as mutações de ALK detectadas no tecido também foram identificadas em amostras de plasma correspondentes, e todas as mutações de ALK detectadas por plasma também estavam presentes em biópsias pareadas. No geral, houve 100% de concordância entre as mutações de ALK teciduais e plasmáticas detectadas quando amostras correlacionadas foram avaliadas.

Como não foram detectadas diferenças nas alterações teciduais nas amostras seriadas dos 3 pacientes que foram submetidos a múltiplas biópsias, a avaliação da concordância foi restrita a uma biópsia por indivíduo. Entre essas 14 biópsias, foram identificadas mutações envolvendo outros genes além do ALK em 7 (50%) amostras. O TP53 sofreu mutação em 5 (36%) biópsias

de resistência. Para 3 desses pacientes, a mutação TP53 estava presente no diagnóstico inicial.

No geral, os dados confirmam que a genotipagem do plasma usando tecnologia NGS de captura híbrida pode detectar com segurança as fusões de ALK e as mutações de resistência a ALK em pacientes com CPNPC positivo para ALK.

4.6.5. Clinical Impact of Hybrid Capture–Based Next-Generation Sequencing on Changes in Treatment Decisions in Lung Cancer

Este estudo retrospectivo avaliou 101 pacientes de CPNPC avançado tratados em Israel entre 2011 e 2015, com objetivo de avaliar a contribuição da NGS para a tomada de decisão clínica e os impactos de sua aplicação na prática clínica, considerando também outros testes diagnósticos realizados de acordo com as decisões dos médicos (42). Os resultados dos testes moleculares padrões para mutações de EGFR e rearranjos de ALK foram negativos antes da NGS em 80,2% (81 de 101) e 70,3% (71 de 101) dos pacientes, respectivamente. A NGS inicial foi realizada em 15 pacientes devido a pouco material de biópsia. Dos pacientes incluídos, 94% foram diagnosticados em estágio III a IV.

A avaliação NGS foi realizada em amostras de tumores e em amostras de sangue, utilizando uma abordagem de biópsia líquida, caso a amostra de tecido estivesse esgotada. As mutações de EGFR foram avaliadas com PCR em tempo real ou ensaios de NGS de espectro estreito (NGS baseado em amplicon). Os rearranjos de ALK foram avaliados com imuno-histoquímica ou FISH.

A NGS tecidual foi realizada em 82 pacientes (81,2%) e a NGS de biópsia líquida em 19 (18,8%). Para o ensaio tecidual, amostras de biópsia foram obtidas dos pulmões de 40 pacientes e de metástases de 42 pacientes. Na análise inicial, pelo menos uma alteração genética passível de ação foi detectada em 84 pacientes (83,2%), incluindo 73 dos 82 pacientes com NGS tecidual (89,0%) e em 11 dos 19 pacientes com NGS líquida (57,9%). Em 23 pacientes (22,8%), o NGS detectou 2 alterações genéticas passíveis de ação e, em 6 pacientes (5,9%), detectou 3 ou mais alterações genéticas passíveis de ação.

Os genes mais comuns com alteração estrutural ou mutacional envolvidos nas 121 alterações gênicas detectadas em 101 pacientes foram os genes KRAS (18,2%), EGFR

(16,5%), RET (7,4%), serina/treonina quinase 11 (STK11). (7,4%), ALK (6,6%), ERBB2 (5,8%) e MET (5,8%). Na análise subsequente, as alterações genéticas mais comuns em 101 pacientes foram mutações de EGFR (15%), rearranjos RET (9%), rearranjos ALK (8%) e amplificações MET ou mutações do éxon 14 (6%).

Após a avaliação com NGS, 43 pacientes (42,6%) receberam terapias alvo relacionadas a respectiva mutação. Destes 43 pacientes, 6 foram excluídos da análise de impacto de decisão, pois, optaram pela NGS antes do teste padrão de EGFR/ALK e os resultados de NGS detectaram EGFR/ALK alterado que poderiam ter sido identificados por testes padrão previamente. Assim, o impacto exclusivo calculado do teste NGS pós-PCR/FISH foi de 36,6%, representando 37 de 101 pacientes que não poderiam ter sido detectados de outra forma.

O estudo demonstrou uma alta taxa de resultados falso-negativos de testes moleculares padrão (por exemplo, PCR e FISH) para mutações de EGFR e ALK, sendo esta de 15% (n = 15; com 12 desses pacientes [80%] tratados com terapia direcionada após NGS). Os resultados sugerem que o uso amplo de NGS no câncer de pulmão pode fornecer uma alternativa para a tomada de decisão terapêutica e que resultados negativos por testes moleculares padrão (por exemplo, PCR e FISH) não devem impedir o teste NGS quando a probabilidade de identificar uma mutação alvo é elevada.

4.7. Resumo dos Achados e Avaliação de Qualidade de Evidência

Tabela 9 – Resumo dos estudos incluídos, descrevendo comparador, principais resultados, conclusão e nível de evidência

Estudo	População estudada (n)	Método diagnóstico utilizado (primário)	Comparador	Resultados	Conclusão	Nível de Evidência (Oxford) / Grau de Recomendação
Sebastien Couraud (2014) (80)	CPNPC (não fumantes) (n=106)	NGS cfDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 58% Especificidade = 87% Concordância = 68%	Estes dados demonstram o potencial da triagem de mutação em cfDNA usando IonTorrent NGS para a detecção de uma série de biomarcadores tumorais em pacientes com câncer de pulmão.	2B / B
Maria Schwaederle (2016) (78)	Pacientes com câncer (n=168)	NGS ctDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 85% Especificidade = > 99.9999% Concordância (TP53) = 70.3% Concordância (EGFR) = 70.3% Concordância (PIK3CA) = 88.1% Concordância	O estudo demonstra que os testes de ctDNA fornecem informações complementares àquelas em biópsias de tecidos e podem ser úteis na determinação do prognóstico e tratamento.	2C / B

				(ERBB2) = 93.1%		
Umberto Malapelle (2017) (75)	Pacientes com câncer (n=142)	NGS cfDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 79% Especificidade = 100% Concordância = 96.8%	O ensaio detecta mutações relevantes no cfDNA purificado do soro e plasma de pacientes com os tumores mais comumente testados para alterações moleculares. O CAPP-Seq poderia ser aplicado rotineiramente na clínica para detectar e monitorar diversas malignidades, facilitando assim a terapia do câncer. Plataformas de sequenciamento tem o potencial de ser implementado amplamente para o atendimento do paciente e auxiliar no diagnóstico.	2C / B
Aaron M. Newman (2014) (81)	CPNPC (n=17)	NGS ctDNA	PCR	Sensibilidade = 85% Especificidade = 96% Concordância = NA	A análise de ctDNA é uma primeira escolha viável quando a biópsia tecidual é insuficiente para a genotipagem ou	2B / B
Cloud P. Paweletz (2016) (83)	CPNPC (n=48)	NGS cfDNA	PCR	Sensibilidade = 77% Especificidade = 100% Concordância = NA		2B / B
Victoria Villaflor (2016) (76)	CPNPC (n=68)	NGS ctDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 81% Especificidade ≥ 99% Concordância = 71%		2B / B

Richard B. Lanman (2015) (79)	Pacientes com câncer (n=165)	NGS cfDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 85% Especificidade = 99.6% Concordância = Alta	quando uma biópsia invasiva repetida não é possível. O sequenciamento digital de DNA derivado de plasma é indicado em pacientes com câncer avançado para prevenir biópsias invasivas repetidas quando a biópsia inicial é inadequada, ou quando o câncer do paciente progrediu apesar do tratamento. Esta validação analítica	2B / B
Vincent Plagnol (2018) (71)	CPNPC (n=242) Saudáveis (n=92)	NGS ctDNA	PCR	Sensibilidade = >92% Especificidade = 99.9997% Concordância = Alta	demonstrou que o teste é altamente sensível, específico e robusto e atende aos requisitos analíticos para aplicações clínicas. A realização de terapias	2B / B
Maria C. Schwaederlé (2017) (74)	CPNPC (n=88)	NGS ctDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 63.5% Especificidade = 76.7% Concordância = 70%	compatíveis com as alterações de ctDNA demonstraram uma eficácia terapêutica maior, sugerindo utilidade clínica.	2B / B

Ibiayi Dagogo-Jack (2018) (84)	CPNPC (n=79)	NGS ctDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = NA Especificidade = NA Concordância = 100%	A genotipagem plasmática por NGS é um método eficaz para detectar fusões de ALK e mutações de ALK em pacientes que progrediram com inibidores de tirosina quinase. O teste NGS influenciou as decisões de tratamento em quase metade dos pacientes com adenocarcinoma de pulmão e foi associada a uma taxa de resposta global de 65%, o que pode se traduzir em um benefício de sobrevida. As mutações resistentes ao tratamento terapêutico podem ser detectadas pelo ctDNA NGS, mesmo quando o tecido não está disponível, permitindo assim um diagnóstico	2B / B
Anna Belilovski Rozenblum (2016) (42)	Câncer de pulmão (n=101)	NGS de captura híbrida	PCR	Sensibilidade = NA Especificidade = NA Concordância = NA		2B / B
Jeffrey C. Thompson (2016) (3)	CPNPC (n=102)	NGS ctDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = NA Especificidade = NA Concordância = 97.5%		2B / B

Young Kwang Chae (2016) (77)	Câncer de pulmão (n=29)	NGS cfDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 59.1% Especificidade = 94.8% Concordância = >91%	mais preciso, melhor controle do paciente. Os resultados indicam alta especificidade e concordância quando alterações genômicas estão presentes ou ausentes. Os resultados mostram que o NGS ctDNA é uma alternativa para identificar o perfil de mutações relacionadas ao câncer em pacientes com CPNPC avançado.	2B / B
Yu Yao (2016) (82)	CPNPC (n=39)	NGS ctDNA	Biópsia de tecido	Sensibilidade = 68.5% Especificidade = 100 % Concordância = 78.21%		2B / B

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este parecer técnico-científico teve como objetivo mostrar a importância de um diagnóstico molecular diferenciado, como o painel de NGS de ctDNA, no direcionamento da melhor terapia oncológica de acordo com as mutações oncogênicas, as terapias aprovadas no Brasil com indicação de bula e o *guideline* de recomendação internacional (NCCN) .

A biópsia líquida tem demonstrado ser uma ferramenta promissora na melhora do manejo dos pacientes com CPNPC, oferecendo uma alternativa quando o material tecidual é insuficiente ou inviável para os procedimentos padrões, possibilitando auxiliar na escolha do tratamento oncológico (4,85).

O painel de NGS de ctDNA é recomendado para avaliação das mutações EGFR, ALK, ROS-1 e BRAF pelo *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)* (4).

Aprovação da indicação da terapia combinada de pembrolizumabe e quimioterapia para o CPNPC independente da expressão de PD-L1 na 1L é uma alternativa terapêutica para os pacientes que não apresentam as mutações EGFR, ALK, ROS-1 e BRAF, segundo a recomendação do *guideline* NCCN (2,52). O custo de tratamento mensal da terapia combinada de pembrolizumabe e quimioterapia é de R\$ 41.448,69 (CMED PF 18). Avaliação das mutações oncogênicas pode direcionar os pacientes as terapias alvos e possivelmente reduzir o custo com a 1L de tratamento, conforme demonstrado na análise econômica.

Na perspectiva do SSS, o presente documento demonstrou que painel de NGS de ctDNA pode ser uma alternativa **dominante (maior efetividade e menor custo)** em relação ao teste de EGFR por ctDNA. A economia de –R\$ 4 mil por paciente provém do menor direcionamento à imunoterapia na primeira linha. A maior efetividade provém do ganho terapêutico com o direcionamento correto dos pacientes com mutações oncogênicas a suas terapias alvos correspondentes. Há evidências que pacientes com mutação no EGFR ou ALK apresentam baixa resposta à imunoterapia (66).

O custo do teste de NGS ctDNA representa aproximadamente 1,04% do custo total do paciente na primeira linha de tratamento em 1 ano.

Na análise de impacto orçamentário, estima-se 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.

Considerando que o painel de NGS de ctDNA pode atender uma necessidade médica não atendida e melhorar o direcionamento terapêutico desses pacientes com maior benefício clínico e economia considerável nos custos no tratamento da 1L, é solicitada a incorporação da do painel de NGS de ctDNA no diagnóstico dos pacientes com Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células metastático e não-escamoso quando o material tecidual é insuficiente para avaliação das mutações oncogênicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo LHL et al. Survival and prognostic factors in patients with Non-Small Cell Lung Cancer treated in private health care. 2014;17(4):1001–14.
2. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 6.2018 - Non-Small Cell Lung Cancer. NCCN Guidel. 2018;
3. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. Clin Cancer Res. 2016 Dec;22(23):5772–82.
4. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti G V., Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. J Thorac Oncol. 2018 Jun;
5. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015/02/06. 2015;65(2):87–108.
6. Brambilla E, Travis WD, Colby T V, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. Eur Respir J. 2001 Dec;18(6):1059–68.
7. Barros JA, Valladares G, Faria AR, Fugita EM, Ruiz AP, Vianna AGD, et al. Diagnóstico precoce do câncer de pulmão: o grande desafio. Variáveis epidemiológicas e clínicas, estadiamento e tratamento. J Bras Pneumol. 2006 Jun;32(3):221–7.
8. Navada S, Lai P, Schwartz AG, Kalemkerian GP. Temporal trends in small cell lung cancer: Analysis of the national Surveillance, Epidemiology, and End-Results (SEER) database. J Clin Oncol. 2006 Jun;24(18_suppl):7082.

9. Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small Cell Lung Cancer. *Mayo Clin Proc.* 2008 Mar;83(3):355–67.
10. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011 Feb;6(2):244–85.
11. Baldotto C, Julian G, Mascarenhas E, Laloni M, Azevedo C, Kashiura D, 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.
12. INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017. 130 p.
13. Araujo LH, Baldotto C, Castro Jr G de, Katz A, Ferreira CG, Mathias C, et al. Lung cancer in Brazil. *J Bras Pneumol.* 2018 Feb;44(1):55–64.
14. Carneseca EC, Mauad EC, Araujo MAA de, Dalbó RM, Longatto Filho A, Vazquez V de L. The Hospital de Câncer de Barretos Registry: an analysis of cancer survival at a single institution in Brazil over a 10-year period. *BMC Res Notes.* 2013 Apr;6(1):141.
15. Araujo LH de L, Baldotto CS, Zukin M, Vieira FM de AC, Victorino AP, Rocha VR, et al. Survival and prognostic factors in patients with Non-Small Cell Lung Cancer treated in private health care. *Rev Bras Epidemiol.* 2014;17(4):1001–14.
16. J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 20th ed. 2017. 8539 p.
17. De Lima Lopes G, Segel JE, Tan DSW, Do YK, Mok T, Finkelstein EA. Cost-effectiveness of epidermal growth factor receptor mutation testing and first-line treatment with gefitinib for patients with advanced adenocarcinoma of the lung. *Cancer.* 2012;
18. Pontes LDB, Bacchi CE, Queiroga EM, Piha T, Miranda PA, Freire S, et al. EGFR mutation screening in non-small cell lung cancer: Results from an access program in Brazil. *J Clin Oncol.* 2014;

19. Yen C, Bitton RC, De Lima LGCA, Amadio AV, Takahashi TK M, AM et al. Characterization of EGFR activating mutations in Brazilian patients with pulmonary adenocarcinoma. Proc 16th World Conf Lung Cancer. 2015;
20. Saito A, Lima VCC, Dettino ALA, Macedo MP, Cunha IW DM, GZ et al. Patterns of EGFR mutations in a cohort of 395 patients from a single institution in Brazil. Proc 16th World Conf Lung Cancer. 2015;
21. Domingues PM, Montella T, Zukin M, Baldotto C FC. Epidemiology and clinical outcomes of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutant patients at the Brazilian National Cancer Institute (INCA). Proc 16th World Conf Lung Cancer. 2015;
22. Bacchi CE, Ciol H, Queiroga EM, Benine LC, Silva LH, Ojopi EB. Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in Brazilian lung cancer patients. Clin (São Paulo, Brazil). 2012;
23. Gomes JR, Amarante MPF, D'Alpino RD, Moreira RB, Sousa TTS de, Lino ADR, et al. Mutation profile in non-small cell lung cancer: Analysis of a Brazilian population. J Clin Oncol. 2015 May;33(15_suppl):e19115–e19115.
24. Melo A. C. et al. Avaliação molecular do Câncer de Pulmão Não Pequenas Células (CPNPC) em uma coorte de pacientes brasileiros [Internet]. Available from: <https://www.gbot.med.br/avaliacao-molecular-do-cancer-de-pulmao-nao-pequenas-celulas-cpnpc-em-uma-coorte-de-pacientes-brasileiros-2>
25. De Sa VK, Nascimento EC, Meireles SI CV. Epidermal growth factor receptor mutations in primary and metastatic adenocarcinomas from a tertiary hospital in São Paulo, Brazil. Proc 16th World Conf Lung Cancer. 2015;
26. Melo AC, Inada HK, Barros M, Terra SB, Ligorio C SE, Al. E. Non-small cell lung cancer genotyping in a Brazilian cohort. Proc 14th World Conf Lung Cancer. 2011;
27. V. Gupta, N. Godre MA. A meta-analysis on epidemiology of ROS1 rearrangement in Asian and non-Asian population [Internet]. 2017. Available from: <https://oncologypro.esmo.org/Meeting-Resources/ESMO-2017-Congress/A-meta-analysis-on-epidemiology-of-ROS1-rearrangement-in-Asian-and-non-Asian-population>

28. Cui G, Liu D, Li W, Fu X, Liang Y, Li Y, et al. A meta-analysis of the association between BRAF mutation and nonsmall cell lung cancer. *Med (United States)*. 2017;96(14).
29. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):706–14.
30. Vansteenkiste J, Doooms C, de Leyn P. Early stage non-small-cell lung cancer: Challenges in staging and adjuvant treatment: Evidence-based staging. In: *Annals of Oncology*. 2010.
31. Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WEE, Lim E, Senan S, Felip E, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(suppl 6):vi89-vi98.
32. Nowak AK, Chansky K, Rice DC, Pass HI, Kindler HL, Shemanski L, et al. The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2016;11(12):2089–99.
33. Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018 Jan;155(1):356–9.
34. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, et al. DNA Repair by ERCC1 in Non–Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006;
35. Peters S, Adjei AA, Gridelli C, Reck M, Kerr K, Felip E. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012;23(SUPPL. 7).
36. UpToDate. Personalized, genotype-directed therapy for advanced non-small cell lung cancer. 2018. 2018.
37. Capelozzi VL. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. *J Bras Pneumol*. 2009;

38. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers* (Basel). 2018;
39. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat Protoc*. 2017 Jan;12(2):213–8.
40. Uchida J, Kato K, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Daga H, et al. Diagnostic accuracy of noninvasive genotyping of EGFR in lung cancer patients by deep sequencing of plasma cell-free DNA. *Clin Chem*. 2015;
41. Guibert N, Hu Y, Feeney N, Kuang Y, Plagnol V, Jones G, et al. Amplicon-based next-generation sequencing of plasma cell-free DNA for detection of driver and resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;
42. Rozenblum AB, Ilouze M, Dudnik E, Dvir A, Soussan-Gutman L, Geva S, et al. Clinical Impact of Hybrid Capture–Based Next-Generation Sequencing on Changes in Treatment Decisions in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017 Feb;12(2):258–68.
43. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;
44. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014;
45. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014;
46. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF V600E -mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;
47. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Parecer Técnico Nº 27-2018 - Cobertura de Medicamentos Antineoplásicos Orais. 2018. 2018.
48. Tsao AS, Scagliotti G V., Bunn PA, Carbone DP, Warren GW, Bai C, et al. Scientific Advances in Lung Cancer 2015. *J Thorac Oncol*. 2016 May;11(5):613–38.

49. Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM. Comprehensive analysis of the clinical immunology landscape. *Ann Oncol*. 2018 Jan;29(1):84–91.
50. American Cancer Society. About Non-Small Cell Lung Cancer. *Am Cancer Soc Med Inf*. 2016;
51. Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA. Opdivo (nivolumabe) [Bula]. 2018;p.1-80.
52. Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda. KEYTRUDA (pembrolizumabe) [bula]. 2018;p.1-32.
53. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. Tecentriq (atezolizumabe) [Bula]. 2018;p.1-28.
54. Iyer S, Taylor-Stokes G, Roughley A. Symptom burden and quality of life in advanced non-small cell lung cancer patients in France and Germany. *Lung Cancer*. 2013;
55. Hermann CP, Looney SW. Determinants of Quality of Life in Patients Near the End of Life: A Longitudinal Perspective. *Oncol Nurs Forum*. 2011;
56. Gralla RJ. Quality-of-Life Considerations in Patients with Advanced Lung Cancer: Effect of Topotecan on Symptom Palliation and Quality of Life. *Oncologist*. 2004;
57. Hensch I, Bergman B, Gustafsson M, Gaston-Johansson F, Danielson E. The Impact of Symptoms, Coping Capacity, and Social Support on Quality of Life Experience Over Time in Patients with Lung Cancer. *J Pain Symptom Manage*. 2007;
58. Brown DJF, McMillan DC, Milroy R. The correlation between fatigue, physical function, the systemic inflammatory response, and psychological distress in patients with advanced lung cancer. *Cancer*. 2005;
59. J. P, B. J-P, J. R, M. C. Quality of life of patients with lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2016;9:1023–8.
60. Nowicki A, Krzywińska J, Kowalewski J. Ocena jakości życia chorych leczonych operacyjnie z powodu raka płuca. *Współczesna Onkol*. 2006;10(9):468–74.
61. Mary E. Cooley. Quality of life in persons with non-small cell lung cancer: a concept analysis. *Cancer Nurs*. 1998;21(3):151–61.

62. Gift AG, Jablonski A, Stommel M, Given CW. Symptom clusters in elderly patients with lung cancer. *Oncol Nurs Forum*. 2004;
63. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;
64. Ellis PM, Blais N, Soulieres D, Ionescu DN, Kashyap M, Liu G, et al. A systematic review and Canadian consensus recommendations on the use of biomarkers in the treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011.
65. Lim C, Sung M, Shepherd FA, Nouriany N, Sawczak M, Paul T, et al. Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Are Research Biopsies a Barrier to Participation in Clinical Trials? *J Thorac Oncol*. 2016;
66. Gainor JF, Shaw AT, Sequist L V, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Cancer Res*. 2016 Sep;22(18):4585–93.
67. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Perez-Gracia JL, Han J-Y, 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)*. 2016 Apr;387(10027):1540–50.
68. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2014.
69. Mclarty JL, Yeh C-H. Circulating Cell-Free DNA: The Blood Biopsy in Cancer Management Volume 2 Issue 2-2015.
70. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Patho. *J Thorac Oncol*. 2013;

71. Plagnol V, Woodhouse S, Howarth K, Lensing S, Smith M, Epstein M, et al. Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling. Galli A, editor. PLoS One. 2018 Mar;13(3):e0193802.
72. Müller JN, Falk M, Talwar J, Neemann N, Mariotti E, Bertrand M, et al. Concordance between Comprehensive Cancer Genome Profiling in Plasma and Tumor Specimens. J Thorac Oncol. 2017;
73. Associação Médica Brasileira (AMB). RESOLUÇÃO NORMATIVA CNHM N° 038 / 2019. 2019;1–2.
74. Schwaederlé MC, Patel SP, Husain H, Ikeda M, Lanman RB, Banks KC, et al. Utility of Genomic Assessment of Blood-Derived Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2017 Sep;23(17):5101–11.
75. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, et al. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. Br J Cancer. 2017 Mar;116(6):802–10.
76. Villafior V, Won B, Nagy R, Banks K, Lanman RB, Talasaz A, et al. Biopsy-free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer. Oncotarget. 2016 Oct;7(41):66880–91.
77. Chae YK, Davis AA, Carneiro BA, Chandra S, Mohindra N, Kalyan A, et al. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA. Oncotarget. 2016 Oct;7(40):65364–73.
78. Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, et al. Use of Liquid Biopsies in Clinical Oncology: Pilot Experience in 168 Patients. Clin Cancer Res. 2016 Nov;22(22):5497–505.
79. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisano D, Lopez R, Blau S, et al. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. Hoheisel JD, editor. PLoS One. 2015 Oct;10(10):e0140712.
80. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanche H, et al.

Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. Clin Cancer Res. 2014 Sep;20(17):4613–24.

81. Newman AM, Bratman S V, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat Med. 2014 May;20(5):548–54.
82. Yao Y, Liu J, Li L, Yuan Y, Nan K, Wu X, et al. Detection of circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer. Oncotarget. 2017 Jan;8(2):2130–40.
83. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O’Connell A, Mach SL, et al. Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. Clin Cancer Res. 2016 Feb;22(4):915–22.
84. Dagogo-Jack I, Brannon AR, Ferris LA, Campbell CD, Lin JJ, Schultz KR, et al. Tracking the Evolution of Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors through Longitudinal Analysis of Circulating Tumor DNA. JCO Precis Oncol. 2018;2018.
85. Clark TA, Chung JH, Kennedy M, Hughes JD, Chennagiri N, Lieber DS, et al. Analytical Validation of a Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Genomic Profiling of Cell-Free Circulating Tumor DNA. J Mol Diagn. 2018 Sep;20(5):686–702.