

EMPREGO DE PLATAFORMAS DE PESQUISA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM TUMORES SÓLIDOS:



RECOMENDAÇÕES DE UM PAINEL DE ESPECIALISTAS

SBOC

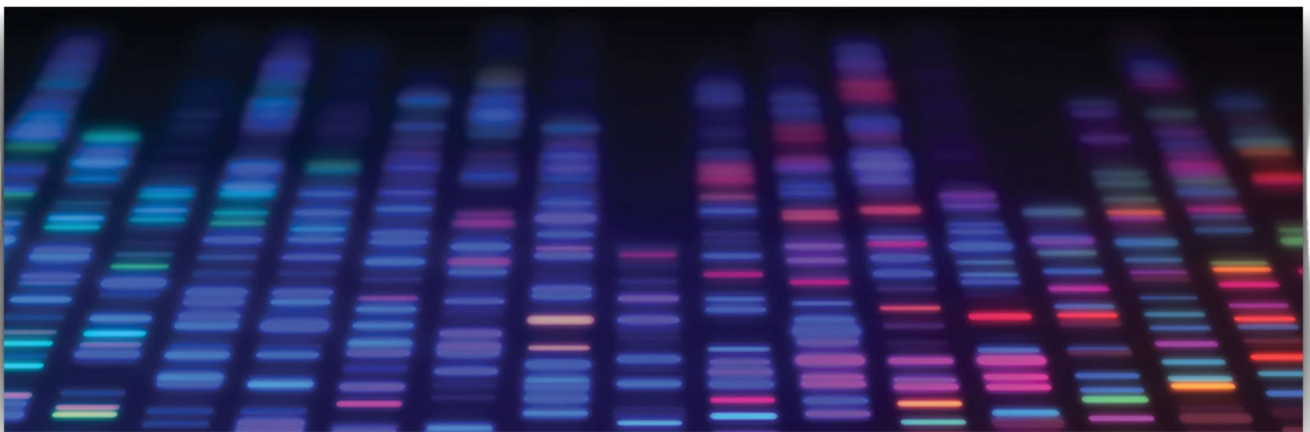
SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE ONCOLOGIA
CLÍNICA

EBO

ESCOLA
BRASILEIRA
DE ONCOLOGIA

ÍNDICE

Cessão de Direitos Autorais	3
Autores	4
Capítulo 1: Introdução	5
Capítulo 2: Evolução dos painéis comerciais	7
Capítulo 3: Aplicação clínica por tipo de câncer	9
Tumores torácicos	9
Tumores de cabeça e pescoço	13
Tumores de glândulas salivares	14
Tumores gastrointestinais	16
Tumores ginecológicos	21
Tumores de mama	24
Tumores geniturinários	28
Hematológicos sólidos	32
Sarcomas	36
Tumores de pele	38
Tumores do sistema nervoso central	40
Capítulo 4: Considerações finais sobre interpretação de mutações somáticas e acionabilidade clínica	44
Referências	46



AUTORIZAÇÃO DE REPLICAÇÃO DE ARTIGO

A *Brazilian Journal of Oncology* (BJO), ISSN 2526-8732, autoriza a publicação gratuita na íntegra do artigo intitulado *Implementing somatic mutation testing in clinical setting: recommendations from a panel of experts*, dos autores Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima; Luiz Henrique Araújo; Bernardo Gari-cochea; Vanderson Rocha; Max Mano; William Nassib William; Aline Lauda Freitas Chaves; Gustavo dos Santos Fernandes; Angelica Nogueira Rodrigues; Denis Leonardo Jardim; Andreia Cristina de Melo; Celso Abdon Mello; Clarissa Serodio Baldotto; Mauro Zukin; Aknar Calabrich; Ana Gelatti; Gilberto de Castro Junior; Thiago Bueno de Oliveira; Markus Gifoni; Williams Barra; Anelisa Kruschewsky Coutinho; Renata D’Alpino Peixoto; Carla Rameri de Azevedo; Eduardo Paulino; José Bines; Romualdo Barroso; Daniel Gi-menes; Rafael Aliosha Kaliks; Andre Poisl Fay; Diogo Bugano; Pedro Isaacsson; Carlos Chiattonne; Jorge Vaz; Guilherme Duffles; Otavio Baiocchi; Rafael Schmerling; Rodrigo Ramela Munhoz; Rodrigo Guedes; Olavo Feher; Camila Yamada; Carolina Fittipaldi; Clarissa Maria de Cerqueira Mathias; Renan Orsati Cla-ra; Alessandro Leal, disponível no site da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), associação civil, científica, de âmbito nacional, sem fins lucrativos, inscrita no CNPJ sob o nº 18.274.290/0001-27, com sede na cidade de São Paulo.

Para a replicação do documento, o editor da BJO concorda em ceder os direitos autorais, além do direito à tradução livre do artigo, o qual foi publicado originalmente em inglês. Os autores acima rela-cionados se responsabilizam publicamente pelo conteúdo científico e cognitivo do documento.

São Paulo, 2021

Dr. Jorge Sabbaga
Editor Executivo da Brazilian Journal of Oncology

AUTORES

Comitê de Oncogenômica - SBOC

Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima (Coordenador)

Alessandro Leal

Bernardo Garicochea

Luiz Henrique Araújo

Vanderson Rocha

Subcomitê de Sarcomas

Celso Abdon Melo (Coordenador)

Rafael Schmerling

Subcomitê de Tumores de Cabeça e Pescoço

Aline Lauda Freitas Chaves (Coordenador)

Gilberto de Castro Jr

Thiago Bueno de Oliveira

Subcomitê de Tumores de Mama

Max Mano (Coordenador)

Daniel Gimenez

José Bines

Rafael Kaliks

Romualdo Barroso

Subcomitê de Tumores de Pele

Andreia Melo, MD, PhD (Coordenador)

Rodrigo Guedes

Rodrigo Munhoz

Subcomitê de Tumores de Sistema Nervoso Central

Clarissa Baldotto (Coordenador)

Camila Yamada

Carolina Fittipaldi

Olavo Feher

Subcomitê de Tumores Gastrointestinais

Gustavo dos Santos Fernandes (Coordenador)

Anelisa K. Coutinho

Diogo Bugano

Markus Gifoni

Renata D'Alpino

Williams Barra

Subcomitê de Tumores Genitourinários

Denis L. Fontes Jardim (Coordenador)

André Fay

Pedro Isaacsson

Subcomitê de Tumores Ginecológicos

Angélica Nogueira-Rodrigues (Coordenador)

Carla Rameri de Azevedo

Eduardo Paulino

Subcomitê de Tumores Hematológicos

Vanderson Rocha, MD, PhD (Coordenador)

Carlos Chiattonex

Guilherme Duffles

Jorge Vaz

Otávio Baiocchi

Subcomitê de Tumores Torácicos

William N. William, MD (Coordenador)

Aknar Calabrich

Ana Gelatti

Mauro Zukin

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO

Medicina Genômica é uma área da medicina emergente que se caracteriza pela utilização de informação derivada do DNA de um indivíduo e que é parte tanto do seu acompanhamento médico (prevenção de doenças, diagnóstico ou decisões terapêuticas) quanto das políticas de saúde. Esse conceito foi adaptado do *Genomic Medicine Working Group*, um grupo de trabalho desenvolvido pelo NIH (*National Institutes of Health*) norte-americano para propulsionar a translação mais veloz da informação obtida em laboratório à prática clínica.

A medicina genômica faz parte de um conceito mais amplo de medicina individualizada, chamada de **Medicina de Precisão**. Essa área mais abrangente envolve novos exames de imagem, com ou sem radionuclídeos, nanotecnologia e busca de biomarcadores não nucleicos em líquidos e tecidos corporais (<https://www.genome.gov/health/Genomics-and-Medicine>).

Este consenso se refere a painéis de alterações somáticas, pesquisadas em ácidos nucleicos provenientes de tecidos tumorais; não são aqui discutidas plataformas que avaliam expressão gênica e testes de metilação. Análises de mutações somáticas em DNA tumoral circulante podem ser discutidas de forma exploratória, mas não fazem parte do escopo deste conjunto de recomendações.

1.1 Medicina Genômica e Oncologia

O oncologista contemporâneo convive com uma avalanche de informações provenientes das descobertas sobre as variantes na estrutura individual das moléculas de DNA e RNA. Essas alterações adquiridas podem se associar a fenótipos diferentes na célula tumoral, com consequentes reflexos no comportamento da mesma. Sabemos que a integração desse conhecimento na prática clínica já se iniciou e se acelera de forma irreversível. O fato em si não surpreende, já que diversas etapas no processo de combate ao câncer podem ser decodificadas com maior precisão a partir de informações contidas no material genético tumoral.

Epidemiologia dos tumores, prevenção e risco, além de prognóstico e decisão terapêutica, já são afetados por conhecimentos extraídos dos estudos de genômica do câncer. O desafio consiste em trazer ao clínico um pouco de entendimento sobre como essas informações são obtidas, como elas são validadas e como impactam a prática médica no cuidado do paciente com câncer.

Apesar do rápido avanço na área, há muitos desafios a serem enfrentados nos próximos anos: a falta de familiaridade com a tecnologia por parte dos pacientes e médicos, o que pode gerar resistência a esse conhecimento; o reduzido número de profissionais com capacitação em genômica; a

escassez de especialistas e laboratórios de bioinformática; a dificuldade de acesso e o custo dos exames. Contribui para dificultar esse quadro a velocidade muito maior que as informações genéticas, potencialmente relevantes, são obtidas sem que etapas preliminares de adequação de descobertas tenham sido ainda assimiladas.

A desproporção de informações sobre variações genéticas catalogadas em populações de algumas regiões do mundo em detrimento de países em desenvolvimento, com etnias bastante diversas, é outro obstáculo que precisa ser superado nos próximos anos. Finalmente, um aspecto prático ainda retarda a implementação da medicina genômica em escala mais extensa na oncologia: afora os casos de mutações validadas clinicamente em um grupo pequeno de genes, as evidências ainda são limitadas sobre a eficácia e o custo-efetividade de estudos genômicos mais extensos na prática clínica.

Diante disso, a SBOC decidiu inaugurar o capítulo de genômica em oncologia em seus comitês, assim como outras sociedades de oncologia têm feito no mundo, na tentativa de colaborar com a compreensão sobre o tipo de tecnologia disponível ao clínico hoje, como ela pode ser utilizada e como interpretar a informação que emerge dessas análises.

As recomendações que se seguem são baseadas nas melhores evidências atuais, com-

piladas por topografia. Os grupos de especialistas em cada uma das maiores subáreas da oncologia foram constituídos por oncologistas representantes de diversos grupos e centros de tratamento de pacientes com câncer, tanto públicos quanto privados, de todas as regiões geográficas do Brasil. Pediu-se que cada grupo discutisse apenas métodos disponíveis no país e que tivessem aplicação prática real, baseada em tratamentos aprovados pela ANVISA ou disponíveis dentro de estudos clínicos abertos no Brasil. Os representantes de grupo se reuniram entre si para responder às seguintes perguntas quanto ao uso de painéis genômicos em suas respectivas áreas:

- Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado e qual o melhor momento?
- O que deve ser pesquisado em um painel de mutações

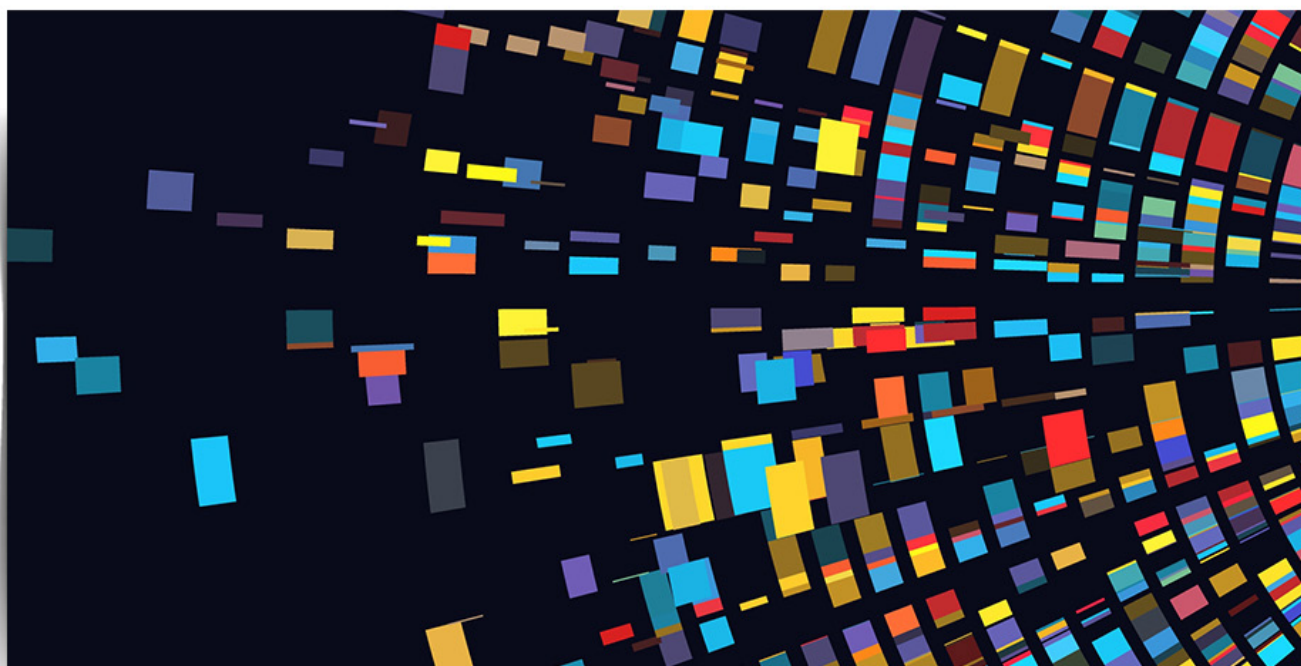
somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

- Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

As respostas a essas perguntas foram organizadas na forma de tópicos, com posterior sessão de discussão, ocasião em que os dados foram colocados em contexto e a sua aplicação clínica discutida brevemente.

Vale mencionar que quando se avalia a evidência de um teste e se gradua a recomendação levando em conta a qualidade dos estudos na realização do teste, existe o risco de vieses inerentes à testagem molecular, incluindo a consistência dos resultados, sua precisão e aplicabilidade. Para que essa avaliação tenha embasamento e resulte em recomendação forte, é estritamente necessária a publicação dos dados e da validação do teste.

Painéis de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*) podem identificar uma determinada mutação acionável, porém com resultados terapêuticos modestos. Assim, embora o teste possa ser sensível, a sua aplicabilidade tem resultados abaixo do ideal. Quanto ao grau de recomendação para uso, este depende da percepção de um painel de avaliadores e do grau de consenso entre eles. Assim, uma recomendação moderada ou fraca não indica que o teste seja ruim, mas que não houve consenso quanto ao benefício de sua utilização; isso certamente varia conforme a dependência do meio em que ele é realizado. Um painel de NGS pode ser fortemente recomendado em um centro com dezenas de estudos de fase I, mas, no caso de um leque limitado de tratamentos e ausência de ensaios clínicos com novas terapias, o grau de recomendação será fraco.



Capítulo 2:

EVOLUÇÃO DOS PAINÉIS COMERCIAIS

Nas últimas décadas, a identificação de terapias-alvo pavimentou o caminho para a oncologia de precisão. Em paralelo, o rápido desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento moderna permitiu a expansão da caracterização molecular do câncer e acelerou a descoberta de eventos mutacionais acionáveis, além do desenvolvimento de terapias-alvo direcionadas. Primeiramente introduzido em 1977¹, o método de sequenciamento de Sanger representou um grande avanço na determinação da sequência de nucleotídeos na molécula de DNA. Descobertas importantes, como as mutações oncogênicas de *RAS* em 1982² e de *EGFR* em 2004³, foram possíveis graças ao sequenciamento de Sanger. Da mesma forma, o *Human Genome Project*⁴ foi todo realizado usando essa plataforma. Contudo, projetos de larga escala, como o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), lançaram mão de novos métodos de sequenciamento paralelo massivo, os quais ficaram largamente conhecidos como NGS⁵.

Métodos de NGS oferecem uma ampla gama de oportunidades para caracterizar o genoma do câncer. Primeiramente, o NGS permite a avaliação de dezenas ou milhares de genes simultaneamente, cobrindo todo o genoma ou transcritoma dentro de poucos dias⁶. Além disso, o NGS é, ao mesmo tempo, mais sensível e abrangente que o método de Sanger, pois avalia não somente as alte-

rações em nucleotídeos únicos, mas também a variação no número de cópias e as múltiplas alterações estruturais, como inserções, deleções e rearranjos, os quais comumente ocorrem no genoma do câncer⁶.

Para se tornarem clinicamente úteis, os métodos de NGS foram progressivamente customizados para reduzir custos; priorizar genes associados ao câncer e alterações gênicas acionáveis, aplicáveis em amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina; e fornecer resultados em tempo adequado⁷. Painéis de sequenciamento gênico direcionado (*targeted gene sequencing panels*) foram primeiramente introduzidos por centros acadêmicos para acelerar a oncologia de precisão e a inclusão em ensaios de fase I e II, direcionados por biomarcadores⁷⁻⁹. Entretanto, painéis comerciais emergiram como uma oportunidade de pacientes e médicos individualizarem o uso de terapias-alvo na clínica¹⁰. Enquanto isso, consensos internacionais foram desenvolvidos para formalizar a recomendação do uso de painéis de sequenciamento gênico em vários cenários¹¹, o que ampliou ainda mais o entusiasmo pela sua solicitação.

Painéis de NGS comercialmente disponíveis podem ser didaticamente classificados em duas grandes estratégias, tecnicamente definidas pelo método de enriquecimento dos alvos: captura baseada em am-

plificação ou hibridização^{12,13}. O enriquecimento do alvo é uma etapa central no NGS, já que os genes de interesse são isolados do restante do genoma e amplificados. Esse passo gera uma biblioteca de DNA, que contém as regiões-alvo que serão sequenciadas e analisadas.

O NGS baseado em amplificação foi rapidamente implementado na clínica devido ao fato de ser um processo mais simples e ter uma análise mais direta, menor custo e tempo de entrega mais curto¹⁴. Em adição, laboratórios locais podem adaptar painéis *in-house* para cobrir as regiões gênicas de interesse. Como limitação, NGS baseado em amplificação é mais adequado para cobrir apenas regiões *hotspot* do DNA e, frequentemente, só algumas dúzias de genes. Por outro lado, o NGS baseado em hibridização (também conhecido como *comprehensive genomic profiling*) é mais facilmente escalonável, tem um alto rendimento e representa uma estratégia mais abrangente, pois permite acessar centenas de genes simultaneamente¹⁵⁻¹⁷. Essa abordagem pode ser mais acurada para procurar todas as formas de alterações genômicas e incluir análises como carga mutacional tumoral e pesquisa de instabilidade de microssatélites. Outras diferenças entre as duas técnicas de NGS incluem o processo de sequenciamento e o algoritmo de bioinformática. Tais particularidades foram revisadas em outras publica-

ções¹² e estão além do escopo deste artigo.

Um passo crucial na implementação de painéis de mutações somáticas é a expertise apropriada de técnicas de patologia molecular e de bioinformática, as quais devem vir acompanhadas de validação adequada para cada etapa desse processo¹². Existem várias diretrizes disponíveis acerca desse tema e que devem ser cuidadosamente seguidos para garantir performance e acurácia ótimas¹⁸.

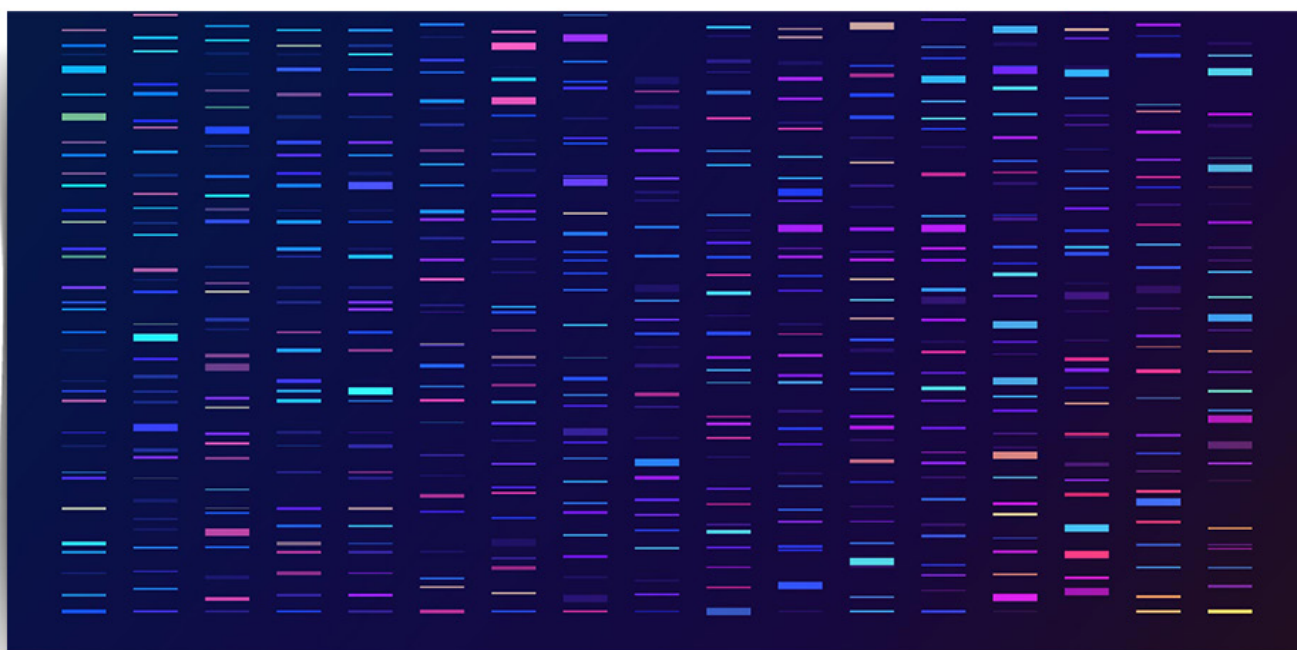
Dada a complexidade dos painéis de NGS, o processo completo deve ser validado desde a extração do ácido nucleico do material biológico à sua análise final. Dentre os pontos essenciais, o processo de validação deve incluir a avaliação da qualidade das amostras clínicas, presentes nos blocos de parafina; demonstrar a habilidade de detectar diferentes tipos de alterações genéticas; de-

finir métricas para as testagens de rotina e para os testes suplementares em regiões genômicas que não são sequenciadas de forma confiável. Variantes acionáveis comuns devem ser especificamente avaliadas quanto à acurácia e reprodutibilidade. Métodos ortogonais devem ser aplicados para confirmar os resultados do processo de validação. Vale ressaltar que mudanças no desenho dos painéis requerem revalidação antes da implementação de um novo painel na rotina.

Os laboratórios devem informar se os painéis de NGS desenvolvidos *in-house* foram adequadamente validados, bem como as possíveis limitações encontradas durante o processo. Adicionalmente, a proficiência do teste e o laboratório devem ser certificados para garantir que os processos de NGS são seguidos de forma segura localmente. Exemplos de programas de testagem de proficiência reconhecidos inter-

nacionalmente são o *College of American Pathologists (CAP)*, o *Clinical Laboratory Improvements Amendments (CLIA)* e o *United Kingdom National External Quality Assessment (UK NEQAS)*¹⁹. Ao confirmar rotinas-padrão de testagem e análise, tais esforços também servem para educar os laboratórios no reporte adequado de variantes clinicamente relevantes²⁰.

A agência regulatória americana - *Food and Drug Administration* - também proveu mecanismos específicos para a aprovação regulatória de NGS destinada à avaliação de perfis genômicos em tumores e definiu níveis de evidência que suportam a acionabilidade e utilidade clínica de testes de NGS. Esses programas são essenciais para assegurar testagem de alta qualidade e embasar políticas de cobertura nacional ou por companhias seguradoras de saúde.



Capítulo 3:

APLICAÇÃO CLÍNICA POR TIPO DE CÂNCER

Tumores Torácicos

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado e qual o melhor momento?

1. Todos os pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP), com qualquer componente histológico não escamoso, com tumor estágio IV ou recorrente e candidatos a tratamento sistêmico paliativo devem ser testados no momento do diagnóstico (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

2. Considerar a testagem de pacientes com CPCNP estágio II ou III tratados, com intuito curativo e a fim de guiar tratamento adjuvante (no caso de mutações em EGFR) e/ou manejo de uma eventual recidiva futura (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: moderada);

3. Considerar a testagem de pacientes com histologia escamosa pura, com baixa ou nenhuma exposição a tabaco (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: fraca).

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

4. No mínimo, devem ser avaliadas mutações somáticas nos

genes *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* e *NTRK1-3* (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

5. Adicionalmente ao painel mínimo, considerar avaliações acerca de alterações somáticas nos seguintes genes: *ERBB2*, *MET*, *RET*, *KRAS* (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada).

Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

6. O uso de painéis de sequenciamento contendo múltiplos genes é preferível à avaliação de genes individuais de maneira sequencial (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada);

7. Avaliação de alterações somáticas em DNA circulante tumoral (biópsia líquida para genotipagem) pode ser considerada especialmente nos casos em que haja dificuldades de obtenção de material tecidual. Se não forem encontradas alterações somáticas em DNA circulante tumoral, recomenda-se a avaliação molecular em material tecidual (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada);

8. Métodos alternativos ao sequenciamento gênico podem ser utilizados para avaliação molecular do câncer de pulmão, a saber:

a. IHQ (IHQ) positiva para ALK com anticorpo D5F3 ou 5A4 pode ser usada como critério de seleção para tratamento de pacientes com inibidores de ALK, sendo considerado o método preferencial. FISH positivo para ALK pode ser usado como critério de seleção para tratamento de pacientes com inibidores de ALK (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

b. Imuno-histoquímica (IHQ) positiva para ROS com o anticorpo D4D6 deve ser confirmada com FISH e/ou NGS antes do uso de inibidores de ROS. FISH positivo para *ROS1* é considerado como critério de seleção para tratamento de pacientes com inibidores de ROS (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

c. IHQ para TRK positiva com o anticorpo Pan-TRK: TRKA, TRKB e TRKC, ou VENTANA pan-TRK EP17341. Pode ser usada como critério de seleção para tratamento de pacientes com inibidores de TRK, porém é preferível confirmação por FISH ou NGS (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada);

d. Os dados em câncer de pulmão são insuficientes para se recomendar a IHQ para BRAF V600E como critério de seleção para tratamento de pacientes com inibidores de BRAF (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada);

e. IHQ para EGFR não deve ser usada para seleção de pacientes candidatos a inibidores de EGFR (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte).

Discussão

O uso de terapia-alvo paliativa em pacientes selecionados conforme perfil molecular aumenta a sobrevida livre de progressão e sobrevida global quando comparado à quimioterapia citotóxica²¹. Estudos de terapia-alvo bem controlados incluíram somente pacientes com adenocarcinoma, predomínio de adenocarcinoma, ou com histologia mista com componente de adenocarcinoma. Pacientes sem o diagnóstico definitivo de adenocarcinoma (por exemplo, carcinoma sem outras especificações, SOE) podem apresentar mutações *drivers* (especialmente em análises de biópsias pequenas não representativas) e devem também ser tratados com terapia-alvo nessa situação. Mutações *drivers* também são encontradas em pacientes com histologia escamosa, com nenhuma ou pouca exposição ao tabaco (1 a 10 anos-maço)²².

A decisão de se testar pacientes com doença em estágios mais iniciais deve levar em conta o custo de se obter tais exames em indivíduos que podem ser curados da doença (e para os quais os resultados terão pouca ou nenhuma utilidade) *versus* a vantagem de se conhecer o perfil molecular precocemente, caso o paciente venha a recidivar^{11,22}. Mutações *drivers* com relevância clínica em geral estão presentes desde o diagnóstico inicial em pacientes com estágios menos avançados e permanecem estáveis ao longo da evolução natural da doença²³.

A terapia-alvo na adjuvância ou em contexto não paliativo é objeto de vários estudos²⁴, sendo que o uso de osimertinibe adjuvante começa a ser considerado por demonstrar aumento de sobrevida livre de doença *versus* placebo em pacientes com CPNPC estágio II-III ressecado²⁵.

O painel molecular mínimo deve incluir avaliação de *EGFR*, *ALK*, *ROS*, *BRAF* e *NTRK1-3*. Esse painel reflete a aprovação de terapias-alvo no Brasil e deve ser expandido à medida que novas drogas demonstrem benefício clínico (Tabela 1). Inibidores do EGFR são recomendados para o tratamento de primeira linha dos pacientes com mutações de sensibilidade no gene do *EGFR* devido ao aumento de sobrevida livre de progressão, taxa de resposta e qualidade de vida quando comparados à quimioterapia²⁶. Pacientes com mutação em *EGFR*, tratados com inibidores de primeira ou segunda geração, desenvolvem, frequentemente, a mutação secundária de resistência T790M no momento da progressão. O uso de osimertinibe nessa situação é considerado padrão-ouro de tratamento, conforme resultados de estudo de fase 3, o que torna a busca da mutação T790M obrigatória nesse contexto²⁷. A presença de rearranjos do gene *ALK* confere alta sensibilidade aos TKIs do ALK (crizotinibe, ceretininibe, alectininibe, brigatinibe e lorlatinibe)²⁸.

Devido ao alto grau de homologia nos domínios tirosinoquinase do *ALK* e *ROS*, o crizotinibe apresentou alta taxa de resposta e controle de doença em pacientes com fusão do *ROS1*, sendo a droga de escolha no tratamento de primeira linha desses pacientes²⁹. A presença de mutação do *BRAF* V600E é

mutuamente excludente de outras alterações moleculares, exceto da mutação do *KRAS*, que pode coexistir com outros tipos de mutação do *BRAF*³⁰. A combinação de dabrafenibe e trametinibe para o tratamento dos pacientes com mutação V600E do *BRAF* está aprovada no Brasil e baseia-se em estudos positivos de fase 2³¹. Fusão em um dos três receptores TRK confere sensibilidade ao larotrectinibe em câncer de pulmão e em outros tumores TRK positivos, sendo essa a primeira terapia agnóstica aprovada no Brasil³².

A realização do painel expandido pode detectar alterações genéticas que têm drogas aprovadas para outros tipos de tumores, porém com atividade em câncer de pulmão (por exemplo, bloqueio do HER2 com trastuzumabe, afatinibe ou T-DM1 no contexto de mutações em *ERBB2* ou amplificação de HER2)³³. Também permite reposicionamento de drogas aprovadas para outro contexto (por exemplo, uso de crizotinibe para os tumores com aplicações do MET ou mutações tipo *skipping* do éxon 14 desse gene)³⁴, uso de medicações já aprovadas em outros países (por exemplo, capmatinibe para câncer de pulmão com mutação tipo *skipping* do éxon 14 do gene *MET*³⁵ e salpercatinibe para câncer de pulmão com translocação de *RET*)³⁶ e inclusão de pacientes em estudos com novas drogas³⁷.

Frequentemente, um painel de *hotspot* é usado para testar pacientes em busca de alterações genômicas mais comuns³⁸. Sequências de testes de gene único também podem ser utilizados sem um painel de *hotspot*, testando primeiramente as alterações mais frequentes e, após, as mais raras. Em ambos

os casos, executar uma sequência de testes de gene único consome tempo e pode exigir uma quantidade relativamente grande de amostra tecidual³⁹.

O sequenciamento de nova geração (NGS) emergiu como uma estratégia confiável para testar simultaneamente várias alterações a partir do uso de uma amostra única de tecido⁴⁰. Modelos informatizados demonstraram que o NGS foi associado ao mesmo tempo como resultado para o teste (quando comparado ao painel do *hotspot*) ou menor (quando comparado aos testes sequenciais ou de exclusão) e a custos reduzidos⁴¹. O uso de NGS resultou na identificação de quase 40% a mais de pacientes com alterações genômicas e com terapias-alvo ainda não aprovadas por agências regulatórias. Esses pacientes poderiam ser candidatos a ensaios clínicos⁴².

A biópsia líquida em conteúdo plasmático pode superar algumas limitações da biópsia de tecido sólido⁴³. O DNA tumoral circulante pode refletir o perfil genético do tumor e a capa-

cidade de caracterizá-lo pode, portanto, ter valor prognóstico e terapêutico^{44,45}. Não obstante, a biópsia líquida pode falhar ao detectar baixos níveis de DNA tumoral circulante (seja por baixa carga tumoral ou por baixa liberação de DNA pelo tumor), podendo levar a resultados falso-negativos de biópsia líquida. A concordância da biópsia líquida com a análise baseada no tecido tumoral depende da porcentagem de alterações teciduais encontradas no sangue^{46,47}, do tamanho da amostra tumoral de tecido, do tempo da amostra, além de outros fatores, como heterogeneidade tumoral, intervalo do tratamento e método de análise utilizado^{45,48,49}.

Além do sequenciamento gênico, o perfil molecular do câncer de pulmão pode ser determinado por métodos alternativos, incluindo IHQ e FISH para genes específicos. Os anticorpos D5F3 e 5A4 para ALK apresentam sensibilidade de 96% e especificidade de 100% para diagnóstico de CPNPC, com translocação de *ALK*⁵⁰, e são considerados como testes-pa-

drão para seleção de pacientes pelas diretrizes da ASCO, ESMO e NCCN^{11,24,46}. FISH para *ALK* também é um método aceitável para detecção de translocação de *ALK*, porém apresenta desvantagens em relação ao NGS, como a impossibilidade de definição do parceiro de translocação e menor sensibilidade⁵⁰. A IHQ para ROS pode funcionar como teste de rastreamento para tumores com translocação de *ROS1*. O anticorpo D4D6 para ROS pode marcar células não neoplásicas e, por isso, resultados positivos devem ser confirmados por FISH ou NGS⁵¹. O FISH para *ROS1* tem sensibilidade de 100% e especificidade de 92%⁵¹.

Várias metodologias alternativas podem ser utilizadas para detecção das fusões de *NTRK*, incluindo FISH e IHQ. O FISH pode necessitar até três sondas para uma análise completa¹¹. O anticorpo monoclonal anti-BRAF V600E está comercialmente disponível¹¹, porém há necessidade de validação desse método na detecção das mutações de *BRAF* em câncer de pulmão.

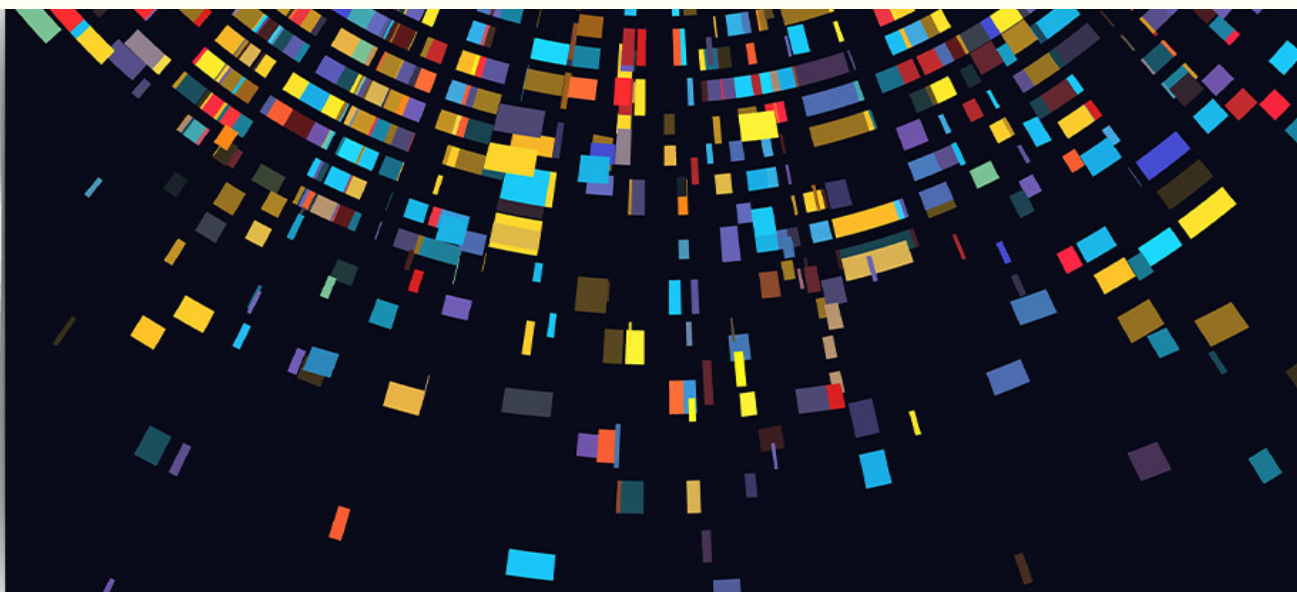


Tabela 1. Principais alterações somáticas no câncer de pulmão de não pequenas células e não escamoso

Gene / Alteração	Alteração	Teste	Comentário
<i>EGFR</i> (10-25%)	Mutações nos éxons 18-21. As mais frequentes (90% dos casos) são as deleções do éxon 19 e a mutação de substituição L858R no éxon 21	NGS RT-PCR dd-PCR	Mutações incomuns no éxon 20 estão frequentemente associadas à resistência. A pesquisa da mutação T790M do <i>EGFR</i> está indicada na progressão aos inibidores tirosino-quinases de primeira ou segunda geração
<i>ALK</i> (2-5%)	Translocações (rearranjos) gênicas	NGS Métodos alternativos: IHQ com anticorpos D5F3 ou 5A4 ou técnica de FISH	O principal parceiro é o gene <i>EML4</i> , que determina o oncogene de fusão <i>EML4-ALK</i>
<i>ROS1</i> (1-2%)	Translocações (rearranjos) gênicas	NGS Métodos alternativos: FISH / se IHQ positiva com anticorpo D4D6, deve ser confirmada com FISH e/ou NGS	
<i>BRAF</i> (2%)	Presença da mutação pontual V600E	NGS	Outras mutações no gene <i>BRAF</i> não são consideradas drivers
<i>NTRK1,2 e 3</i> (< 1%)	Translocações (rearranjos) gênicas	NGS Métodos alternativos: FISH ou IHQ com o anticorpo (pan-TRK: TRKA, TRKB e TRKC, ou VENTANA pan-TRK EPR17341)	
<i>HER2</i> (1-3%)	Dois mecanismos de desregulação podem ocorrer: Amplificação / hiperexpressão gênica ou mutação de inserção no éxon 20	NGS	Raramente pode ocorrer mutações pontuais no éxon 20.
<i>MET</i> (3%)	Mutação do tipo <i>skipping</i> no éxon 14	NGS	A amplificação gênica está envolvida na resistência aos inibidores tirosino-quinases do <i>EGFR</i>
<i>RET</i> (1-2%)	Translocações (rearranjos) gênicas	NGS	
<i>KRAS</i> (20%)	Mutações pontuais	NGS	A acionabilidade atual reside no achado da alteração G12C do gene <i>KRAS</i>

Tumores de cabeça e pescoço

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado e qual o melhor momento?

1. Não se indica painel somático de rotina. IHQ para avaliar superexpressão de p16 (determinar se HPV positivo ou negativo) na orofaringe é mandatória para estadiamento e avaliação prognóstica (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte). Na doença metastática, é necessária avaliação de PD-L1 através de IHQ (CPS) para definição de tratamento (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte).

› Carcinoma de nasofaringe

2. Não se indica painel somático de rotina. Pode-se indicar IHQ ou hibridização *in situ* (preferencialmente) na amostra tumoral para avaliar correlação etiológica com o vírus Epstein-Barr (EBV) (tipo da recomendação: forte, baseada em evidências; força da evidência: forte).

› Carcinomas de glândulas salivares

3. Na doença metastática, indica-se: 1) IHQ ou hibridização *in situ* para avaliar superexpressão de HER2 (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderada); 2) IHQ para avaliar expressão de receptor androgênico (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderada); 3) Pesquisa de fusão dos genes *NTRK1-3*, inicialmente por IHQ pan-TRK e, se positivo, confirmação com NGS (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderada).

Câncer de tireoide

› Carcinoma diferenciado de tireoide

4. Não se indica painel somático de rotina. Na doença metastática, indica-se: 1) pesquisa de fusões dos genes *NTRK1-3*, seja por rastreamento inicial por IHQ pan-TRK (EPR 17341 Abcam ou Roche/Ventana) e, se positivo, confirmação com NGS, ou testagem direta por NGS (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderada); 2) NGS para pesquisa de fusões de *RET* (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderado).

› Carcinoma medular de tireoide

5. Não se indica painel somático de rotina. Nos casos avançados ou metastáticos, recomenda-se: NGS para pesquisa de mutações no gene *RET* no tecido tumoral e pesquisa de mutação germinativa nos casos suspeitos de neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte).

› Carcinoma anaplásico de tireoide

6. Não se indica painel somático de rotina. Nos casos localmente avançados ou metastáticos, indica-se: 1) RT-PCR (*real time polymerase chain reaction*) ou NGS para detectar mutação *BRAF V600E* (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderada); 2) IHQ para pan-TRK como ferramenta de rastreio e, se positivo, confirmação com NGS, preferencialmente de RNA (tipo da recomendação: baseada em evidências; Força da evidência: moderada). Não se recomenda a pesquisa de PD-L1 ou TMB (*tu-*

mor mutational burden) de rotina nesses pacientes.

Discussão

O carcinoma de cabeça e pescoço é um grupo heterogêneo de tumores epiteliais que se iniciam na cavidade oral, laringe e faringe (vias aerodigestivas superiores), além dos seios paranasais, glândulas salivares e tireoide.

› Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECCP)

O CECCP representa 90% dos tumores de cabeça e pescoço. Além da heterogeneidade clínica, fenotípica e etiológica, esses tumores apresentam alta heterogeneidade molecular⁵². Não há marcadores genéticos preditivos de respostas atualmente úteis para definir o tratamento. Portanto, não se indicam painéis para avaliar mutações somáticas de rotina para CECCP.

A superexpressão da proteína p16 por IHQ na amostra de tumores da orofaringe (positividade acima de 70% da amostra) é um marcador da presença do vírus do papiloma humano (HPV) e é mandatória para estadiamento e avaliação prognóstica desses tumores⁵³. Para os CECCP metastáticos em linfonodos cervicais de sítio primário desconhecido, deve-se pesquisar, no tecido tumoral, a presença do p16 (por IHQ) e, se negativo, a presença do vírus EBV através de IHQ ou *hibridização in situ*, preferencialmente⁵³. Na doença metastática é necessária a avaliação por IHQ da expressão de PD-L1 (22C3 pharmDx), caracterizado pelo CPS (*combined proportional score*).

Em um estudo de fase III (KEYNOTE 048), foram comparados pembrolizumabe isolado ou em associação com cisplatina

e 5-fluorouracil *versus* o regime EXTREME (cisplatina, 5-fluorouracil e cetuximabe)⁵⁴. Esse estudo foi positivo em sobrevida global, com superioridade de pembrolizumabe isolado nos pacientes com CECCP diagnosticado e com CPS superior ou igual a 1% (12,3 *versus* 10,3 meses, HR=0,74) e de pembrolizumabe associado à cisplatina e 5-fluorouracil, independentemente do CPS (13 *versus* 10,7 meses, HR=0,72), em comparação ao braço EXTREME. Pacientes com CPS menor que 1 não apresentaram benefício em relação ao uso de imunoterapia em primeira linha⁵⁵.

Tumores de glândulas salivares

Nos tumores de glândulas salivares, a pesquisa de alvos terapêuticos é indicada em alguns casos e, dentro das neoplasias de cabeça e pescoço, esse seria o cenário no qual painéis de mutações somáticas estariam mais próximos do uso na prática clínica.

Fusões dos genes *NTRK1-3* são descritas em 90-100% dos carcinomas secretórios de glândula salivar (também conhecidos como MASC)^{56,57}, especificamente a fusão *ETV6-NTRK3*^{58,59}. Podem estar presentes também em 2-15% dos carcinomas papilíferos de tireoide⁶⁰⁻⁶² e em menos de 1% em outros tumores de cabeça e pescoço^{63,64}.

Recomenda-se o rastreamento por IHQ através do anticorpo pan-TRK (EPR 17341 Abcam ou Roche/Ventana)⁶⁵, seguido de NGS para confirmação, com pesquisa de fusões relacionada aos genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*, preferencialmente baseada em RNA⁶⁶. No caso de diagnóstico histológico de MASC, o NGS pode ser realizado como exame

inicial. Para pacientes metastáticos com indicação de tratamento sistêmico e com presença de fusão de *NTRK*, recomenda-se tratamento de primeira linha com larotrectinibe³². O entrectinibe também é opção nesse cenário⁶⁷, embora não esteja disponível no Brasil.

Hiperexpressão de HER2 está presente em até 30% dos carcinomas mucoepidermóides ou adenocarcinomas sem outra especificação (SOE)^{68,69}, e em até 40% dos carcinomas ductais salivares^{68,70-75}. Embora não haja consensos específicos, a maioria dos estudos avalia a expressão de HER2 nos moldes do câncer de mama,^{76,77} sendo considerado positivo IHQ 3+ ou 2+ com FISH razão HER2/CEP17 \geq 268⁷⁸. Na doença metastática, o tratamento com combinação de quimioterapia (taxanos com ou sem platina) e trastuzumabe é embasada por uma série de casos^{79,80} e estudo de fase II⁷⁸. Há também dados para bloqueio duplo com trastuzumabe e pertuzumabe^{81,82}. Trastuzumabe-entansina (TDM-1) pode ser utilizado em segunda linha^{83,84} e há dados iniciais sobre a eficácia de trastuzumabe-deruxtecano⁸⁵. O uso de terapia anti-HER2 no tratamento adjuvante foi avaliada apenas em ensaios retrospectivos^{79,86}.

Expressão de receptor androgênico (RA) por IHQ, caracterizada como nuclear, forte e difusa (>70%), é observada na maioria dos carcinomas ductais salivares⁸⁷⁻⁹¹ e em adenocarcinomas SOE. O uso de bloqueio hormonal combinado, com agonista de GnRH e bicalutamida, mostrou efetividade em doença metastática com expressão de RA em estudos retrospectivos⁹²⁻⁹⁴ e prospectivo de fase II⁹⁵. Um estudo randomizado de fase 2 e que

compara bloqueio hormonal e quimioterapia nesse cenário está em andamento⁹⁶. O uso no cenário adjuvante foi avaliado apenas retrospectivamente⁹⁷.

› Câncer de tireoide

No carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) iodo-refratário metastático, estima-se a presença de fusões do *NTRK* em até 12% dos casos⁶⁴. Recomenda-se o rastreamento desses casos com IHQ composto por anticorpo pan-TRK (EPR 17341 Abcam ou Roche/Ventana)⁶⁵, seguido de NGS para confirmação, com pesquisa de fusões relacionada aos genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*, preferencialmente baseado em RNA⁶⁶. Para pacientes metastáticos com indicação de tratamento sistêmico e com presença de fusão de *NTRK1-3*, recomenda-se tratamento de primeira linha com larotrectinibe - já aprovado no Brasil. Essa aprovação foi baseada em uma análise combinada de três estudos com sete indivíduos portadores de câncer de tireoide avançado. Houve 100% de resposta ao larotrectinibe nessa população³². O rearranjo do gene *RET* foi encontrado em, aproximadamente, 20% desses pacientes⁹⁸.

Recentemente, o FDA aprovou o selpercatinibe em primeira linha para o tratamento de CDT iodo-refratário metastático com fusões de *RET*. Essa medicação demonstrou resultados bastante animadores em estudo de fase 1/2. Especificamente nos CDT, a taxa de resposta foi de 100% quando utilizado em primeira linha e 79% nas demais linhas de tratamento³⁶. Recomenda-se a pesquisa de fusões do gene *RET* por NGS⁹⁸.

No carcinoma medular de tireoide (CMT), a ativação do gene *RET* é comprovadamente um dos principais mecanismos de oncogênese. Nos pacientes com CMT esporádico, mutações somáticas do *RET* são encontradas em, aproximadamente, 40-60% dos casos⁹⁹. Os resultados do estudo LIBRETTO-001 com selipratinibe demonstraram taxa de resposta de 73% em primeira linha, especificamente em CMT, e 69% em pacientes previamente tratados³⁶. NGS é indicado para pesquisa de mutações no gene *RET* no tecido tumoral⁹⁸.

No carcinoma anaplásico de tireoide (CAT), a mutação V600E do gene *BRAF* é encontrada no intervalo de 20% a 50% dos casos¹⁰⁰. A combinação de dabrafenibe e trametinibe já está aprovada para o tratamento de pacientes com CAT localmente avançado ou metastático, com mutação *BRAF* V600E sem opções eficazes de tratamento local/regional. Foi demonstrada taxa de resposta de 69% com a combinação, sendo a estratégia preferencial nessa situação¹⁰¹. Para esses casos, indica-se a pesquisa dessa mutação atra-

vés de RT-PCR ou NGS¹⁰². Fusões do gene *NTRK* também são relevantes nos CAT.

Como mencionado, o larotrectinibe apresenta resultados animadores nessa população e deve-se realizar o rastreamento desses casos com IHQ composto por anticorpo pan-TRK (EPR 17341 Abcam ou Roche/Ventana)⁶⁵, seguido de NGS para confirmação⁶⁶.

Tabela 2. Principais alterações somáticas no câncer de cabeça e pescoço

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Cabeça e pescoço (carcinoma espinocelular)	Não há gene com alteração acionável validada	IHQ para superexpressão de p16 (determinar se HPV positivo ou negativo) na orofaringe é mandatória para estadiamento e avaliação prognóstica (positivo em 70% dos casos) IHQ para PD-L1 (CPS) destinado à definição de tratamento no contexto metastático	Não há indicação de teste de sequenciamento somático
Carcinoma de nasofaringe	Não há gene com alteração acionável validada	IHQ ou hibridização <i>in situ</i> (preferencialmente) na amostra tumoral para avaliar correlação etiológica com o vírus Epstein-Barr	Não há indicação de teste de sequenciamento somático
Carcinoma de glândulas salivares	<i>NTRK</i> 1-3	IHQ para HER-2 e para expressão do receptor androgênico (AR) IHQ pan-TRK como triagem para fusão de <i>NTRK</i> 1-3; se positivo confirmar com NGS	Não há indicação de teste de sequenciamento somático na ausência de triagem positiva para pan-TRK

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Carcinoma diferenciado (papilífero, folicular) de tireoide	<i>NTRK1-3</i> <i>RET</i>	IHQ: pan-TRK (EPR 17341 Abcam ou Roche/Ventana) para rastreio e, se positivo, confirmação com NGS (positivo em 12% casos) NGS para pesquisa de fusões do gene <i>RET</i> no tecido tumoral (20%)	
Carcinoma medular de tireoide	<i>NTRK1-3</i>	NGS para pesquisa de fusões do gene <i>RET</i> no tecido tumoral (40-60%)	Está indicada a pesquisa de mutação germinativa para casos suspeitos de neoplasia endócrina múltipla tipo 2
Carcinoma anaplásico de tireoide	<i>NTRK1-3</i> <i>BRAF</i>	NGS para pesquisa de mutação <i>BRAF</i> V600E (20-50%) IHQ pan-TRK como ferramenta de rastreio e, se positivo, é necessária a confirmação com NGS	

Tumores gastrointestinais

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. No diagnóstico da doença metastática ou localmente avançada irrissecável em adenocarcinomas esofagogástricos, pancreáticos, biliares, intestinais (delgado e colorretal) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

2. No diagnóstico da doença localizada em estágio clínico (EC) II e III, em adenocarcinoma esofagogástrico (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

3. No diagnóstico da doença localizada em EC II, em adenocarcinoma colorretal (tipo de recomendação: baseada em evi-

dência; força da recomendação: forte).

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

4. Em todos os adenocarcinomas ou carcinomas pouco diferenciados metastáticos ou irrissecáveis:

a) pesquisa de instabilidade de microssatélites (MSI) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte).

b) pesquisa de fusões de *NTRK1-3* (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte).

› **5. Adenocarcinoma esofagogástrico:**

a) doença metastática/localmente avançada irrissecável: pesquisa de superexpressão *HER2* ou amplificação de *ERBB2* (*Human epidermal growth factor receptor*; superexpressão ou amplificação (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

b) doença localizada: pesquisa de MSI (*microsatellite instability*) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte).

› **6. Tumores de vias biliares:**

a) doença metastática/localmente avançada irrissecável: pesquisa de fusão ou rearranjos de *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: forte); mutação de *IDH1* (*isocitrate-dehydrogenase*) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação:

moderada); mutação V600E do gene *BRAF* (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: forte); amplificação de *ERBB2* (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: fraca).

› 7. Adenocarcinoma colorretal:

a) doença metastática (estágio IV): pesquisa de mutação nos genes *KRAS* e *NRAS* (éxon 2: códons 12, 13; éxon 3: códons 59 a 61; éxon 4: códons 117 e 146) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte); mutação V600E do *BRAF* (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte); superexpressão de HER2 ou amplificação de *ERBB2* (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada); mutação de *POLE* (*DNA polymerase epsilon*) (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: fraca).

b) Doença estágio II: pesquisa de MSI (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte)

› 8. Tumores neuroendócrinos:

a) Doença metastática, G3/ Carcinoma neuroendócrino (NEC): pesquisa de mutação V600E do *BRAF* (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: fraca).

Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

Existem testes alternativos na prática clínica (ex. sequenciamento de gene único, FISH, IHQ, etc.)? No caso de testes alternativos, sempre que possível, determinar se o painel é o preferível.

9. *HER2/ERBB2*: IHQ complementada por ensaios de hibridização *in situ* (ISH), como FISH, caso inconclusivo. Na IHQ, a expressão do anticorpo é graduada em escore 0, 1, 2 ou 3 cruzes. Quando o escore for 3+ indica superexpressão; quando 2 é duvidosa e é recomendado fazer FISH. A amplificação ou mutações evidenciadas por painéis de NGS não devem ser utilizadas como critério para tratamento na ausência de positividade em IH.

10. MSI/MMR: IHQ, PCR ou NGS. A IHQ é o teste mais disponível e menos dispendioso, entretanto, por ser um método indireto, é mais sujeito a falhas, devendo ser confirmado por técnica direta quando positivo. A IHQ consiste na pesquisa da expressão das proteínas de reparo MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. A ausência de expressão significa a presença de MSI. A IHQ isoladamente não detecta 10% dos casos com MSI, por isso, se disponível, exames negativos deveriam ser repetidos com análise molecular. O painel validado mais utilizado no mundo para pesquisa de instabilidade de microssatélites envolve cinco marcadores monomórficos (painel pentaplex). A presença de dois marcadores com instabilidade caracteriza um status de alta instabilidade. A presença de um ou nenhum marcador instável caracteriza estado de baixa instabilidade ou de microssatélites estáveis;

11. *NTRK*: NGS. IHQ pode ser usada para rastreio, sendo rápido e menos dispendioso. Contudo, casos positivos precisam ser avaliados com sequenciamento para confirmar a fusão do gene;

12. *KRAS/NRAS*: O teste ideal é o sequenciamento do gene por

PCR em tempo real, podendo ou não ser parte de um painel com outros genes. Na ausência da técnica, é comum e confiável a pesquisa de *hotspots* por sequenciamento simples, ou até por uso de PCR comum com enzimas de restrição;

13. *BRAF* V600E: O teste ideal é o sequenciamento do gene por PCR em tempo real, podendo ou não ser parte de um painel com outros genes. Na ausência da técnica, é comum e confiável a pesquisa das alterações mais comuns de *hotspots* por sequenciamento simples, ou até por uso de PCR comum com enzimas de restrição;

14. *FGFR2*: Sequenciamento do gene por PCR em tempo real, podendo ou não ser parte de um painel com outros genes;

15. *IDH1*: Sequenciamento do gene por PCR em tempo real ou por NGS;

16. *POLE*: Sequenciamento do gene por PCR em tempo real ou por NGS. Habitualmente, fazem parte dos painéis de NGS, sendo característico o elevado número de mutações encontrado nas células tumorais, denominado de genótipo ultramutado.

Obs. Pelo custo de cada uma das análises e pelo tempo dispendido, os painéis por NGS tendem a substituir rapidamente as tecnologias acima, abordando todos esses genes com sequenciamento profundo simultaneamente.

Discussão

› Alterações agnósticas

Instabilidade de microssatélites (MSI) – Microssatélites são sequências curtas repetidas de nucleotídeos que têm ocorrência em todo o genoma. Sua instabilidade é um marcador de deficiência do reparo por emparelhamento errôneo (MMR), sistema composto por quatro enzimas codificadas pelos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, cuja disfunção pode ser germinativa (síndrome de Lynch) ou somática, mais frequentemente associada a alterações epigenéticas (metilação da região promotora do gene). A detecção dessa alteração em painéis somáticos por diferentes metodologias (seção 1), além do rastreamento de indivíduos e famílias com síndrome de Lynch, está associada a uma potencial resposta à imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunes (ICI) em diversas histologias¹⁰³⁻¹⁰⁵, sendo essa estratégia a primeira terapia oncológica agnóstica aprovada em muitos países após a falha em, pelo menos, uma linha de tratamento.

Na plenária da ASCO 2020, o estudo KEYNOTE-177 mostrou benefício em sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (SLP) e taxa de resposta a favor do pembrolizumabe quando comparado com a quimioterapia à escolha do investigador e anticorpo monoclonal na primeira linha do câncer colorretal metastático¹⁰⁶. Vale ressaltar ainda que a presença de mutações em *POLE* ou *POLD1* também estão associadas ao melhor prognóstico na doença inicial e benefício com imunoterapia¹⁰⁷. Em neoplasias colorretais estágio II, a presença de MSI-H foi associada ao melhor prognóstico, de maneira que a quimioterapia adjuvante é con-

siderada ineficaz e não recomendada nesse cenário.¹⁰⁸

Em adenocarcinoma gastroesofágico, a presença de MSI-H foi associada à ausência de eficácia da quimioterapia para doença localizada em análises *post-hoc* de estudos clínicos de fase III^{109,110} e sua indicação é considerada controversa, especialmente no cenário perioperatório.

Fusões e rearranjos de *NTRK* – Os genes *NTRK* codificam as proteínas quinase do receptor de tropomiosina (TRK). As fusões desses genes levam à hiperexpressão de proteínas de fusão com TRK, o que resulta em sinalização persistente em diferentes tumores¹¹¹. A atividade de inibidores de tirosina-quinase (TKI) de *NTRK* ocorre em diversas histologias³². O uso dos agentes inibidores de TRK deve ser considerado em terapias subsequentes à primeira linha nesses pacientes. Larotrectinibe é a droga dessa classe disponível no Brasil.

Observação: Em pacientes de uma coorte de 2.314 tumores colorretais metastáticos, as alterações de *NTRK* foram achadas em pacientes sem mutações, ou seja, selvagem para *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*. Sete das oito fusões de *NTRK* dessa análise ocorreram em pacientes MSI-H¹¹². Se confirmado, esse achado pode restringir a população de câncer colorretal metastático para quem o teste estaria indicado.

› Câncer esofagogástrico

HER2 - A proteína HER2 é um receptor-tirosina quinase transmembrana, membro da família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e responsável pela regulação da proliferação celular, diferenciação e

sobrevivência¹¹³. Cerca de 7-20% dos adenocarcinomas esofagogástricos são HER2 positivos, isto é, apresentam intensidade de expressão IHQ para HER2 3+, ou 2+ com FISH (hibridização *in situ* por fluorescência), ou CISH (hibridização *in situ* cromogênica) positivos¹¹⁴. As taxas de positividade são semelhantes entre pacientes europeus e asiáticos (23,6% vs. 23,9%), mas são maiores no tipo intestinal do que no difuso (31,8% vs. 6,1%); e no adenocarcinoma de junção esofagogástrica do que em tumores gástricos (32,2% vs. 21,4%)¹¹⁵.

O estudo ToGA avaliou um anticorpo monoclonal humanizado contra o HER2, demonstrando ganho de SLP e SG¹¹⁵ em pacientes com câncer gastroesofágico localmente avançado, irrissecável ou metastático, HER2 positivos, quimioterapia isolada e comparada à quimioterapia associada ao trastuzumabe. O estudo DESTINY-Gastric01, aberto, de fase 2, randomizado, demonstrou que o trastuzumabe deruxtecán (DS-8201), comparado ao tratamento escolhido pelo investigador, aumentou a taxa de resposta e a SG em pacientes refratários em, pelos menos, duas linhas de tratamento, incluindo trastuzumabe¹¹⁶.

› Tumores de vias biliares

FGFR – O receptor do fator de crescimento de fibroblasto é um receptor transmembrana com um domínio tirosina-quinase, dividido em quatro subtipos (FGFR1-4). Entre 6 e 15% dos colangiocarcinomas é apresentada alguma alteração nos genes *FGFR*, sendo as fusões mais frequentes¹¹⁷. Elas são mais comuns no colangiocarcinomas intra-hepáticos e, em geral, são associadas a tumores de melhor prog-

nóstico¹¹⁸. O pemigatinibe é uma droga inibidora do *FGFR1*, -2 e -3, aprovada pelo FDA em 2020 para uso em pacientes com fusão de *FGFR2*. A aprovação se baseia no estudo de fase 2, FIGHT-202, no qual 107 pacientes com fusão de *FGFR2*, que tinham falhado em, pelo menos, uma quimioterapia prévia, foram tratados com o pemigatinibe. A taxa de resposta e de controle da doença foi de 35% e 88%, respectivamente, com SLP mediana de 6,9 meses¹¹⁹. Pacientes com mutação não apresentaram benefício no uso da droga.

IDH1/2 – Mutações em *IDH1/2* são encontradas em até 7% dos colangiocarcinomas extra-hepáticos, mas em até 15% dos intra-hepáticos, em geral, essas mutações são mutuamente excludentes com alterações de *FGFR*.¹²⁰ O ivosidenibe é um inibidor de *IDH1* usado para o tratamento de leucemias com alteração de IDH. No estudo de fase III, ClarIDHy, 185 pacientes com falha em quimioterapia prévia foram randomizados para receberem ivosidenibe ou placebo. O grupo de tratamento com ivosidenibe teve maior número de pacientes com doença estável e maior SLP¹²¹.

BRAF – As mutações de *BRAF* ocorrem em 1-7% dos tumores de vias biliares, sendo a maioria em colangiocarcinomas intra-hepáticos. A alteração mais comum é a mutação V600E¹¹⁸. Especificamente em pacientes com a mutação *BRAF* V600E, a combinação dabrafenibe-trametinibe foi avaliada no estudo ROAR, no qual 35 pacientes foram tratados com uma taxa de resposta de 36% e SLP de 9,2 meses¹²².

HER2 – As amplificações de *ERBB2* ocorrem em 1-3% dos

colangiocarcinomas intra-hepáticos, mas em 10-16% dos extra-hepáticos e tumores de vesícula biliar¹¹⁸. Há relatos de hiperexpressão de *HER2* como um mecanismo de resistência adquirida a inibidores de *FGFR*. Os dados de drogas anti-*HER2* se limitam a uma série de casos retrospectivos, com taxas de resposta de até 50% para tumores de vesícula biliar tratados com trastuzumabe, com ou sem pertuzumabe¹²³. O maior estudo prospectivo sobre terapias anti-*HER2* para tumores de vias biliares é o MyPathway, no qual 11 pacientes com amplificação ou mutação de *ERBB2* foram tratados com trastuzumabe-pertuzumabe, resultando em uma taxa de resposta de 36% e duração de resposta de 4,2 meses¹²⁴.

› Carcinoma colorretal

KRAS, *NRAS* e *HRAS* - Os três genes *RAS* humanos, *KRAS*, *NRAS* e *HRAS*, encontram-se frequentemente alterados por mutações somáticas em vários tumores, incluindo os colorretais¹²⁵. *RAS* é um componente *downstream* da via *EGFR*. Anticorpos monoclonais anti-*EGFR* agem bloqueando a cadeia de sinalização e impedindo a proliferação celular. Entretanto, quando há mutações nos genes que codificam *RAS*, essa via fica constantemente ativada. O *KRAS* está mutado em, aproximadamente, 40% dos tumores colorretais^{126,127}, representando um evento precoce na carcinogênese e o primeiro a ser identificado como marcador preditivo negativo em relação ao uso de anticorpos monoclonais anti-*EGFR*. As mutações de *NRAS*, embora menos frequentes (5-10%), também são preditoras negativas de resposta aos anti-*EGFR*, sendo hoje testadas em conjunto com *KRAS* e nomea-

das *all-RAS*. O cetuximabe e o panitumumabe são os anticorpos monoclonais anti-*EGFR* que demonstraram benefício nos pacientes com câncer colorretal metastático *RAS* selvagem, especialmente quando o tumor primário está localizado em cólon esquerdo¹²⁸⁻¹³².

BRAF – O gene *BRAF* codifica a proteína quinase serina-treonina e age como efetor *downstream* da sinalização do *RAS*, sendo parte da via *RAS-RAF-MEK-MA-PK*¹³³. A mutação V600E ocorre em 8-10% dos adenocarcinomas colorretais metastáticos, sendo mais comuns nos tumores do lado direito e conferindo pior prognóstico¹³⁴. As mutações dos genes da família *RAS* e *BRAF* V600E são mutuamente excludentes¹³⁵.

Estudos demonstraram que o tratamento com combinação tripla de QT FOLFOXIRI, associada ou não ao bevacizumabe, é superior às combinações duplas¹³⁶. Em pacientes com tumores mutados para *BRAF* V600E e já previamente tratados, um estudo fase II randomizado mostrou evidências de benefício com associação de inibidor de *BRAF* (vemurafenibe), QT (irinotecano) e anticorpo anti-*EGFR* (cetuximabe).¹³⁷ Mais recentemente, o estudo fase III BEACON mostrou benefício no aumento de SG, SLP e taxa de resposta com a combinação de inibidor de *BRAF* (encorafenibe) e anticorpo anti-*EGFR* (cetuximabe), com ou sem inibidor de *MEK* (binimetinibe), em pacientes previamente tratados, sendo aprovado pelo FDA^{138,139}.

A mutação *BRAF* V600E também é preditora negativa de benefício à terapia anti-*EGFR*, como mostrado em metanálise¹⁴⁰. Há outras mutações no

BRAF, não V600E, que não apresentam o mesmo perfil prognóstico das V600E, assemelhando-se ao *BRAF* selvagem. Essas mutações podem ser concomitantes às mutações dos genes da família RAS em, aproximadamente, 30% dos casos¹⁴¹.

HER2 – A amplificação ou hiperexpressão de *ERBB2* está presente em 6% dos adenocarcinomas colorretais metastáticos

RAS selvagem, sendo considerado um mecanismo de resistência à terapia anti-EGFR. No estudo HERACLES, 27 pacientes com câncer colorretal metastático RAS selvagem, HER2+, refratários a terapias-padrão, receberam trastuzumabe e lapatinibe, atingindo uma taxa de resposta de 34%¹⁴². Já no estudo de fase IIa MyPathway, 57 pacientes com câncer colorretal HER2+ receberam trastuzumabe-per-

tuzumabe com taxa de resposta de 32%¹²⁴. Recentemente, o estudo de fase II Destiny-CRC01 em pacientes com câncer colorretal metastático HER2-positivo (imuno 3+, ou imuno 2+/ISH+), previamente tratados, demonstrou atividade do trastuzumabe deruxtecan e obteve taxas de resposta de 45%, independente da exposição prévia a anti-HER2. Na amostra, 30% já haviam recebido agentes anti-HER2¹⁴³.

Tabela 3. Principais alterações somáticas no câncer de tumores gastrointestinais

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração*	Teste
Em todos os sítios (aprovação agnóstica)	Instabilidade de microssatélites (MSI-high) <i>NTRK1-3</i>	Pesquisa de instabilidade de microssatélites por IHQ, RT-PCR ou NGS IHQ pan-TRK como triagem para fusão de <i>NTRK1-3</i> ; se positivo, confirmar com NGS
Adenocarcinoma esofagogástrico	Instabilidade de microssatélites (MSI-high) <i>ERBB2</i>	Pesquisa de instabilidade de microssatélites por IHQ, RT-PCR ou NGS Pesquisa de amplificação de HER-2 por IHQ e, se duvidoso, confirmar com FISH
Adenocarcinoma de vias biliares	<i>FGFR2</i> (fusão) <i>IDH1</i> <i>BRAF</i> (V600E) <i>ERBB2</i> (amplificação)	NGS IHQ para HER-2 e, se duvidoso, FISH
Adenocarcinoma colorretal	Instabilidade de microssatélites (MSI-high) <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> (V600E) <i>ERBB2</i> <i>POLE</i>	Em EC II, pesquisar MSI por IHQ, RT-PCR ou NGS No contexto metastático, solicitar painel NGS para via RAS-RAF IHQ para amplificação HER-2 e, se duvidoso, FISH
Tumores neuroendócrinos	<i>BRAF</i> (V600E)	NGS no contexto metastático, G3/Carcinoma neuroendócrino (NEC)

*As frequências podem variar significativamente dependendo do tumor considerado.

Tumores ginecológicos

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

No câncer ginecológico, de acordo com as evidências atuais, há benefício em realização de painel somático apenas nos cânceres de ovário e endométrio, conforme detalhamento a seguir.

› Câncer de endométrio

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

1. Todas as pacientes com carcinoma de endométrio (CE), ao diagnóstico, independentemente da histologia e estadiamento, devem ser submetidas à investigação de deficiência de *mismatch repair* (MMR), podendo ser por pesquisa de instabilidade de microssatélite (MSI), por *next generation sequencing* (NGS) ou por pesquisa de expressão das proteínas de MMR - MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 por IHQ. Há evidência de alta concordância entre MSI e IHQ para expressão das proteínas MMR no CE (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

2. É aconselhável, ao diagnóstico, a realização de pesquisa de mutação nos genes *POLE* (por NGS) e pesquisa de expressão de p53 (IHQ). É aconselhável também a realização de pesquisa de LICAM (IHQ) nessas pacientes (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: fraca);

3. Pacientes com diagnóstico de CE seroso, FIGO III/IV ou doença recorrente também devem ser consideradas para pesquisa de HER2 por IHQ, seguido de FISH nos casos duvidosos (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: moderada);

4. É recomendada a realização de pesquisa de receptores hormonais, progesterona e estrogênio por IHQ nos CE (histologia endometriode) estágio III, IV ou recorrente (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: moderada).

Discussão

Devido à alta prevalência de deficiência em MMR em CE, as diretrizes do NCCN e da *Society of Gynecologic Oncology* recomendam sua pesquisa universal em pacientes no momento do diagnóstico, podendo ser realizada a pesquisa de MSI por NGS ou por IHQ para proteínas de MMR^{144,145}. Até 40% dos CE podem apresentar MSI, mas apenas 3-5% apresentam mutação germinativa nos genes MMR/Síndrome de Lynch¹⁴⁶.

Estudo recente demonstrou discordância dos exames (NGS com MSI-high e ausência de MMRd na IHQ) em 5% dos casos de CE¹⁴⁷. As pacientes discordantes apresentavam *Tumor Mutation Burden* (TMB) semelhante às concordantes e obtiveram elevadas taxas de resposta à imunoterapia.

Em 2013, com a publicação do *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA), foi possível subdividir o câncer de endométrio epitelial (endometriode e seroso) em quatro grupos moleculares: a) *POLE* ultra-mutado, caracterizado

pela mutação no gene *POLE*; b) instabilidade microssatélite (MSI) hipermutado, caracterizado por mutações nos genes de MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*; c) número de cópias baixas (NCB), que não possui uma mutação específica; e d) número de cópias altas (NCA), compreendendo a quase totalidade dos tumores serosos e caracterizado por mutação no gene *TP53*¹⁴⁶. Nesse estudo, as pacientes com mutação de *POLE* apresentaram excelente prognóstico, já as pacientes do subgrupo de NCA apresentaram o pior prognóstico. As pacientes MSI e NCB tiveram um prognóstico intermediário. Os achados do TCGA foram replicados por grandes grupos em Vancouver (Canadá) e Leiden (Holanda) através de técnicas mais acessíveis, utilizando IHQ para p53 e MMRd, e sequenciamento do gene *POLE*¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

Pacientes do grupo *POLE* e MSI são considerados portadores de tumores quentes com alta formação de neoantígenos, elevado TMB e, por isso, são excelentes candidatos à imunoterapia¹⁴⁶. Vários estudos têm demonstrado atividade de drogas anti-PD1 (ex: pembrolizumabe e dostalimabe) e anti-PD-L1 (ex: atezolizumabe e avelumabe) com respostas globais que variam de 25 a 50% para perfis MSI¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Pacientes com mutação em *TP53* apresentaram, em uma recente análise do PORTEC 3, benefício para o tratamento combinado com quimiorradioterapia, sobretudo quando comparado à radioterapia isolada. Já em outra análise realizada no estudo PORTEC 2, as pacientes com mutação em *TP53* apresentaram melhor sobrevida quando tratadas com radioterapia pélvica e comparada à braquiterapia¹⁵⁵.

O subgrupo de NCA apresenta amplificação de *ERBB2* em, aproximadamente, 25% dos casos¹⁴⁶. Em um estudo de fase II randomizado, pacientes em estágio III/IV ou recorrente com carcinoma seroso e IHQ com expressão de HER2 (baseado em diretriz da ASCO/Colégio Americano de Patologia de 2007) apresentaram ganho de sobrevida livre de progressão (SLP) e global (SG) quando o trastuzumabe foi adicionado à carboplatina e paclitaxel^{156,157}.

Pacientes com CE receptor hormonal positivo parecem ter uma maior probabilidade de responder à terapia endócrina. Em um estudo randomizado, a taxa de resposta observada em pacientes com RE e RP positiva foi de 25% e 37%, respectivamente, mas apenas de 7% a 8% em pacientes com doença RE/RP negativa^{158,159}. Hormonioterapia é o tratamento sistêmico preferido para pacientes com tumores RH positivo, graus 1 ou 2, e ausência de doença rapidamente progressiva¹⁶⁰.

LICAM é uma proteína de adesão que vem sendo reconhecida como fator prognóstico adverso em CE. Em uma análise multicêntrica, dentre 1.021 pacientes com tumores endometriais, aquelas LICAM positivo apresentaram pior SLP e SG¹⁶¹.

› Câncer de ovário

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

1. Em pacientes com diagnóstico de carcinoma epitelial do ovário (CEO) não mucinoso, estágios III e IV ou recidivadas,

cuja pesquisa de mutação germinativa de *BRCA1/2* foi negativa, deve ser realizada a pesquisa de mutação somática desses genes através de NGS (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

2. As pacientes com carcinomas endometrioides, mucinosos e de células claras devem realizar pesquisa de MMRd por sequenciamento dos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* por NGS, ou por IHQ para as respectivas proteínas (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: moderada);

Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

3. O sequenciamento deve empregar painel multigênico, incluindo no mínimo os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *PALB2* (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: moderada);

4. O método recomendado para o sequenciamento somático do *BRCA1/2* é o NGS na parafina. Já a opção de escolha para avaliação de MMRd isoladamente é a IHQ, um método acessível e de baixo custo (painéis de NGS também podem ser usados) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte).

Discussão

Variantes patogênicas em um dos genes *BRCA* são encontradas em cerca de 21% das pacientes com CEO: 14% são mutações germinativas e 7% somáticas. Defeitos no reparo de DNA secundário à deficiência de vias de recombinação homóloga (DRH)

são detectados em cerca de 50% das pacientes. A DRH, especialmente por mutação em *BRCA*, está associada à sensibilidade de inibidores de PARP (iPARP)¹⁶².

Quatro estudos randomizados respaldam o uso dessa classe de drogas na primeira linha de pacientes com CEO. O estudo SOLO-1 demonstrou benefício da manutenção com olaparibe em primeira linha nos pacientes com mutação de *BRCA1/2* e com resposta parcial ou completa à platina, redução de risco de progressão ou morte na ordem de 70% (IC95%:0,23-0,41; $p < 0,0001$)¹⁶³. Esses resultados embasaram a aprovação do olaparibe nessa indicação no Brasil.

Os estudos PRIMA, VELIA e PAOLA-1 avaliaram, respectivamente, manutenção com niraparibe¹⁶⁴, veliparibe concomitante à quimioterapia e seguida de manutenção por três anos¹⁶⁵, e olaparibe, com manutenção por dois anos em associação ao bevacizumabe¹⁶⁶. Os três estudos incluíram pacientes a despeito da presença do status *BRCA*. O maior benefício observado com o uso dos iPARP foi na população com variante patogênica em *BRCA* (HR: PRIMA 0,4; VELIA 0,44; PAOLA 0,31). A presença de HRD (VELIA *cut-off* ≥ 33 ; PRIMA e PAOLA-1 ≥ 42) sem mutação de *BRCA 1/2* também se associou à sensibilidade dos iPARPs nos estudos PRIMA e PAOLA-1, mas não no estudo VELIA; apenas o estudo PRIMA revelou benefício nos proficientes em RH. Veliparibe e niraparibe ainda não têm aprovação no Brasil.

Os estudos SOLO-2 e estudo 19 respaldam o uso do olaparibe na população com CEO recidivado e sensível à platina (PS). O primeiro incluiu pacientes mutadas

em *BRCA1/2*, após, pelo menos, duas linhas terapêuticas baseadas em platina e em resposta parcial ou completa, levando a um significativo ganho de SG¹⁶⁷. O segundo, um estudo de fase 2 que incluiu pacientes a despeito da mutação de *BRCA1/2*, foi o primeiro estudo a demonstrar benefício de olaparibe em CEO recidivado OS¹⁶⁸, tendo sido a base para a sua aprovação no Brasil nesse contexto, independentemente da presença de mutação de *BRCA1/2*.

Resultados semelhantes em SLP foram obtidos com iPARP niraparibe e rucaparibe, drogas ainda não disponíveis no Brasil; os dados de SG dos estudos ARIEL3 e NOVA ainda não estão maduros¹⁶⁹. NCCN e ESMO recomendam o uso de iPARP em CEO recidivado PS, independente do status de mutação em *BRCA*^{170,171}. O valor preditivo de HDR ainda é discutido, mas vem ganhando força. Em 2019, a plataforma myChoice foi aprovada para o uso do niraparibe em CEO recidivado PS e, recente-

mente, para o uso de olaparibe combinado com bevacizumabe na primeira linha de tratamento dos pacientes sem mutação em *BRCA*. Vale ressaltar que esse teste ainda não está disponível no Brasil.

De forma não selecionada, 10-12% dos tumores epiteliais de ovário podem apresentar dMMR¹⁷² e, embora não se tenha no Brasil aprovação agnóstica do pembrolizumabe, essas pacientes são potencialmente candidatas à imunoterapia.

Tabela 4. Principais alterações somáticas no câncer de endométrio e ovário

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Em todos os sítios (aprovação agnóstica)	Instabilidade de microssatélites (<i>MSI-high</i>)	Pesquisa de instabilidade de microssatélites por IHQ, RT-PCR ou NGS	
	<i>NTRK 1-3</i>	IHQ pan-TRK como triagem para fusão de <i>NTRK 1-3</i> ; se positivo, confirmar com NGS	
Câncer de ovário (estágio III e IV)	<i>BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D, BRIP1 e PALB2</i> (<i>BRCA1</i> ~8% germinativo e 3% somático; <i>BRCA2</i> ~6% germinativo e 3% somático)	NGS com painel que inclua genes associados ao reparo do DNA por recombinação homóloga	A pesquisa de mutação em genes de reparo por recombinação homóloga deve ser realizada em DNA germinativo e, caso negativa, sequenciar o DNA somático
	<i>MLH1, MLH2, MSH6, PMS2</i> (<i>MSI</i> ~12% não selecionado por histologia; endometrióide ~20%, mucinoso ~17% e células claras ~12%)	Pesquisa de instabilidade de microssatélites por IHQ, RT-PCR ou NGS em carcinomas endometrioides, mucinosos e de células claras	

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Câncer de endométrio	<i>POLE</i> (~7%)	NGS	
	<i>MLH1, MLH2, MSH6, PMS2, p53</i> (MSI~30%; p53~25%)	Pesquisa de instabilidade de microssatélites e p53 por IHQ, RT-PCR ou NGS	
	<i>LICAM</i> (~17%)	IHQ	
	<i>HER2</i> (superexpressão em ~25% dos tumores serosos)	IHQ	
	Receptores hormonais (estrogênio e progesterona)	IHQ	

Tumores de mama

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. O tratamento de primeira linha utilizado em câncer de mama metastático (CMM) está fundamentado em ampla literatura. O uso dos painéis pode ser considerado somente em pacientes com CMM que apresentem indicação para receber tratamentos oncológicos adicionais – especialmente quando as opções de tratamento padrão/registrados se tornam limitadas. Quando a finalidade é essa, é fundamental que os pacientes e suas famílias entendam que os painéis somáticos fornecem resultados úteis apenas em uma minoria dos casos. Muitas vezes, o acesso ao tratamento indicado é muito restrito – visto que a maioria dos tratamentos indicados com base nesses painéis não são registrados pelas agências regulatórias brasileiras e, assim, não são disponibilizados, seja

na saúde pública ou na saúde suplementar; há, ainda, um número muito restrito de estudos clínicos que se baseiam em resultados de painéis somáticos no nosso país. As famílias também devem entender que, em geral, precisarão arcar com possíveis custos financeiros tanto dos próprios painéis quanto dos eventuais tratamentos. Portanto, este presente documento não deve ser utilizado como justificativa de solicitação junto aos planos de saúde ou ao sistema público de saúde, seja por via judicial ou outra.

Outro uso potencial dos painéis é a testagem de múltiplos biomarcadores necessários (para os tratamentos registrados) em um único exame do que a testagem individual e sequencial de um número rapidamente crescente de biomarcadores.

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de

cada gene)? Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

2. Sugere-se a pesquisa de alterações genômicas somáticas com alto nível de evidência para intervenção, incluindo amplificação do gene *ERBB2*, mutações ativadoras no gene *PIK3CA*, instabilidade de microssatélites, fusões em *NRTK1*, *NRTK2* e *NRTK3*, e alta carga mutacional (*tumor mutational burden* - TMB). Todas essas alterações descritas são preditivas de benefícios em diferentes terapias, além de possuírem aprovação pela agência americana FDA. Ademais, sugere-se a pesquisa de mutações somáticas em *BRCA1* ou *BRCA2* e de mutações do gene *ERBB2* quando estas apresentarem níveis de evidência fraca/moderada para modificação de conduta clínica.

Ainda são poucas as situações nas quais a identificação de mutações específicas com base em painéis somáticos leva à disponibilização de outras terapias com benefício clínico

documentado – além de casos anedóticos ou pequenas séries de casos. No Brasil, onde a disponibilidade de estudos clínicos de fase I e II é limitada, a realização de painéis somáticos em pacientes com CMM deve ser muito criteriosa, já que apenas raramente irá ampliar as opções de tratamento fora de um ambiente de pesquisa.

O tratamento do CMM continua sendo decidido majoritariamente com base na avaliação de expressão de receptores hormonais (por IHQ), hiperexpressão (por IHQ) e/ou amplificação (por ISH – hibridização *in situ*) de HER2, identificação de mutações ativadoras de *PIK3CA* (por PCR, nos 3 *hotspots*), expressão de PD-L1 (por IHQ), mutações germinativas de *BRCA1*, *BRCA2* e, possivelmente, *PALB2* (por sequenciamento genômico do DNA do hospedeiro em sangue ou saliva), instabilidade de microsatélites (por IHQ e/ou PCR) e fusões de *NTRK* (PCR ou NGS). A propósito, muitos desses testes são fornecidos gratuitamente pelos fabricantes das drogas.

É importante mencionar que, para as pesquisas das alterações genômicas supracitadas, é possível a realização de testes individuais, com confiabilidade semelhante ao uso de painéis somáticos de ampla cobertura e com menor custo. No entanto, com o crescente número de alvos a serem pesquisados, questões referentes ao esgotamento/circulação de material biológico devem ser consideradas, já que os painéis representam uma alternativa prática à testagem de múltiplos biomarcadores individualmente. Mesmo para essa finalidade, ressalta-se que ainda não há cobertura das seguradoras no país.

Discussão

O câncer em estágio avançado adquire alterações durante a evolução da doença e, dessa forma, o perfil genômico torna-se mais complexo do que aquele do CM precoce¹⁷³. Embora o sequenciamento seja tradicionalmente realizado no tecido tumoral, o que é limitado pela disponibilidade da amostra e pelo risco associado à biópsia, a utilização do sequenciamento de DNA de tumor no plasma constitui uma alternativa crescente¹⁷⁴.

É importante avaliar se a alteração encontrada corresponde a uma terapia direcionada e se a mesma se traduz em efeito antitumoral de magnitude clinicamente relevante.

A identificação de alterações genômicas relacionadas à sensibilidade e resistência podem auxiliar na seleção de tratamentos para o CMM. Embora as técnicas avançadas de sequenciamento tenham possibilitado a detecção de alterações genômicas importantes, antes de considerar o teste, é fundamental determinar se o sequenciamento é clinicamente indicado e como os resultados afetariam as decisões de tratamento. Além disso, as evidências associadas às decisões de tratamento com base nas alterações genômicas descobertas no sequenciamento precisam ser continuamente avaliadas de forma crítica¹⁷⁴. Esforços vêm sendo feitos para criar um esquema de classificação abrangente que oriente e priorize metas de acordo com o nível de evidência¹⁷⁵.

Amplificação de *ERBB2* (*HER2*): define o subtipo HER2+ e está amplamente validada como fator preditivo de resposta

às terapias anti-HER2: trastuzumabe, pertuzumabe, T-DM1, lapatinibe, neratinibe, trastuzumabe deruxtecan e tucatinibe. Estudos prospectivos randomizados demonstraram o aumento de sobrevida global (SG) e a sobrevida livre de progressão (SLP) em pacientes com CMM e portadores dessa amplificação¹⁷⁶. Embora o emprego do sequenciamento de última geração e o uso de painéis somáticos sejam capazes de detectar a amplificação do *ERBB2*, esta é mais comumente determinada no cenário clínico usando IHQ ou hibridização fluorescente ou cromogênica *in situ* (quando a IHC é duvidosa).

Mutações em *PIK3CA*: cerca de 40% dos CMM hormônio-positivos apresentam mutações ativadoras no gene *PIK3CA*, que codifica a cadeia alfa da proteína PI3K. O estudo randomizado de fase III SOLAR-1 demonstrou a relevância clínica das mutações de *PIK3CA* no CMM hormônio-positivo. Nesse estudo, pacientes com a mutação em *PIK3CA* tratados com alpelisibe (um inibidor alfa-seletivo de PI3K) e fulvestrante tiveram uma SLP mediana de 11 meses versus 5,7 meses no braço que recebeu placebo e fulvestrante (HR 0,65; p=0,00065). Não houve diferença entre os grupos na coorte sem mutação em *PIK3CA*¹⁷⁷.

Instabilidade de microsatélites: a incidência no CM é estimada em cerca de 1%¹⁷⁸. Tumores com deficiência no sistema de reparo por recombinação de bases não pareadas são mais responsivos ao bloqueio de PD-1 pelo pembrolizumabe¹⁰³. Essa droga é aprovada nos EUA de maneira agnóstica (independente da histologia), com base na análise de 149 pacientes (2 com CM) incluídos em cinco es-

tudos de coorte de braço único, prospectivos. A taxa de resposta objetiva geral foi de 39,6%. Os dois pacientes com CM apresentaram resposta parcial. Embora existam métodos de detecção dessa alteração usando NGS, é importante reconhecer que o atual padrão-ouro para detecção é PCR ou IHC¹⁷⁹.

Fusões de *NTRK*: família dos receptores de tropomiosina quinase (TRK) é composta por três proteínas transmembranares (TrkA, TrkB e TrkC), as quais são codificadas pelos genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*, respectivamente. Alterações cromossômicas que levam a fusões de diferentes genes com genes *NTRK* determinam a transcrição de proteínas TRK quiméricas com função de quinase, constitutivamente ativadas ou superexpressas, conferindo a essas células potencial oncogênico¹⁸⁰. Atualmente, dois inibidores de TRK estão aprovados: o larotrectinibe e o entrectinibe (sem aprovação no Brasil). Larotrectinibe demonstrou eficácia no estudo LOXO-101. Ao todo, 55 pacientes foram incluídos e tratados com larotrectinibe, incluindo um paciente com CM (2%). A taxa de resposta objetiva foi de 75%. Após um ano, 71% dos pacientes que obtiveram resposta objetiva permaneceram com a resposta e 55% dos pacientes permaneceram sem progressão. A duração mediana da resposta e a SLP mediana não foram atingidas³², porém a frequência de fusões *NTRK* no CM é muito baixa; um estudo que examinou 12.214 pacientes consecutivos com CMM encontrou que 0,13% dos tumores abrigavam fusões dos genes *NTRK*¹⁸¹. Entre os subtipos de CM, é importante notar que fusões de *NTRK* são encontradas mais comumente no carcinoma de glândula salivar análogo ma-

mário e no carcinoma secretor de mama¹⁸². É importante notar que a fusão *NTRK* tem múltiplos parceiros e nem todos são, de fato, alterações oncogênicas. Além disso, mutações de *hospots* do *NTRK1*, G595R, e *NTRK3*, G623R, estão provavelmente associadas à resistência ao larotrectinibe³².

Alta carga mutacional (*tumor mutational burden*): agência americana aprovou recentemente o uso de pembrolizumabe para tumores sólidos com alta carga mutacional¹⁸³. Essa aprovação é considerada também agnóstica e é baseada em carga mutacional ≥ 10 mutações por megabase (mut/Mb), determinada pelo painel somático FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.). A aprovação desse tratamento foi baseada numa análise retrospectiva do estudo KEYNOTE-158, o qual envolveu dez coortes de tumores tratados com pembrolizumabe 200mg a cada três semanas. Ao todo, 102 pacientes (13%) apresentavam tumores com alta carga mutacional. A taxa de resposta objetiva foi de 29%, além de taxa de resposta completa de 4% e taxa de resposta parcial de 25%. A duração de resposta mediana não foi alcançada, pois 57% dos pacientes tiveram uma duração de resposta ≥ 12 meses e 50% dos pacientes apresentaram uma duração de resposta ≥ 24 meses. É importante ressaltar que nenhum paciente com CMM foi incluído nessa análise. No cenário de CMM, diferentes grupos têm apontado uma frequência com alta carga mutacional, em torno de 10%¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Alguns estudos preliminares sugerem benefício em termos de SLP e de SG para o uso de inibidores de *checkpoint* nessa população^{187,188}.

Abaixo são mencionadas alterações com mais fraco nível de evidência, porém com utilidade potencial, especialmente na dependência de mais dados científicos:

Mutações somáticas no *BRCA1/2*: enquanto existir evidência robusta sobre o fato que mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* predizem benefício ao uso de inibidores de PARP^{189,190} ou agentes platinantes¹⁹¹, os dados sobre esse mesmo papel em relação às mutações somáticas ainda serão preliminares. Recentemente, Tung e colaboradores apresentaram resultados do estudo TB-CRC 048, um estudo de fase II, de braço único e que mostrou taxa de resposta de 50% após o uso de olaparibe em monoterapia de pacientes com mutações somáticas em um desses dois genes¹⁹². É preciso salientar que os painéis somáticos podem não capturar todas as mutações germinativas de *BRCA1/2* e *PALB2* (possivelmente em 10-20% dos casos)¹⁹³, e podem responder muito bem aos inibidores da PARP¹⁹².

Mutações de *ERBB2*: alterações de *ERBB2*, além de promover a amplificação, chegam a representar 20% do total de alterações de *ERBB2* nesses painéis (e 2-3% do total de casos de CM), não sendo detectáveis por IHQ ou FISH convencionais¹⁹⁴. Dados preliminares sugerem possibilidade de resposta às terapias anti-HER2¹⁹⁵.

Apesar desses potenciais benefícios pontuais, os estudos clínicos prospectivos que tentaram avaliar o impacto dessas tecnologias, em grande parte, falharam¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. As principais justificativas são a heterogeneidade intratumoral, a falta de medica-

mentos eficazes para a maioria dos alvos moleculares até o momento, as populações de pacientes heterogêneas e, além disso, o tratamento prévio e intenso da vasta maioria dos pacientes recrutados, podendo ter ocorrido a seleção de casos com tumores que desenvolveram vários mecanismos de resistência.

Diante desses dados, salvo exceções supracitadas, conclui-se que o uso de painéis somáticos no CMM ainda permanece grandemente restrito à pesquisa clínica, contrapondo o posicionamento da ASCO e as diretrizes da ESMO *Advanced Breast Cancer (ABC) 4*, que afirmam que painéis multigênicos não devem ser usados

na prática clínica de rotina do CMM¹⁹⁹. No entanto, os painéis somáticos podem ser utilizados em programas prospectivos de triagem molecular que envolvem a seleção de pacientes para ensaios terapêuticos, ou, então, como um substituto prático à testagem de múltiplos marcadores individuais¹⁹⁹.

Tabela 5. Principais alterações somáticas no câncer de mama

Gene / Alteração	Teste	Comentário
PIK3CA (~40%)	RT-PCR ou NSG para PIK3CA, em cfDNA ou tecido	Trata-se de um teste padrão para pacientes com tumores RH+ HER2-
BRCA1 ou BRCA2 germinativo (até 10%)*	NGS pode ser útil para identificação de potenciais mutações germinativas desses genes	Trata-se de um teste padrão para pacientes com câncer de mama metastático
PALB2 germinativo (~2%)*	NGS pode ser útil para identificação de potenciais mutações germinativas desse gene	O uso desse teste deve ser restrito e individualizado devido à escassez de estudos pivotais definidores de conduta
TMB (~10% em triplo negativo; <5% em luminais)	NGS pode ser útil para definição de carga mutacional tumoral	Na doença metastática, o teste de NGS somático tem seu uso restrito e individualizado devido à escassez de estudos pivotais definidores de conduta
BRCA1 ou BRCA2 somático (~5-10%)	NGS pode ser útil para definição de mutações somáticas desses genes	
PD-L1 (~2-6% para amplificações, ~20-25% incorporando ganhos em cópias)	NGS pode ser útil para definição de ganhos em cópias/amplificação desse gene	
MSI (~1%)	NGS ou RT-PCR pode ser útil para definição de instabilidade de microssatélites	
NTRK1/2/3 (<0,5%)	NGS ou RT-PCR pode ser útil para definição de fusões de NTRK	
ERBB2 (~2-3% para mutações e ~10% para amplificação)	NGS pode ser útil para definição de amplificação ou mutações de <i>ERBB2</i> – com informações adicionais ao status HER2 já determinado por IHQ/ FISH padrão	

*Quando identificadas em painéis somáticos, mutações nesses genes precisam ser confirmadas em testes para avaliação de mutações germinativas em sangue ou saliva. Especificamente em relação aos genes *BRCA1* e *BRCA2*, mesmo mutações somáticas estão associadas à resposta ao tratamento com inibidores da PARP.

Tumores genitourinários

› Câncer de Próstata

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado?

Qual o melhor momento?

Doença Localizada

1. Pode ser oferecido teste de alterações somáticas aos pacientes diagnosticados com câncer de próstata localizado de risco baixo ou risco intermediário-favorável. O momento ideal para oferecer o teste é na ocasião do diagnóstico histopatológico, antes do tratamento (tipo de evidência: baseada em evidências; força da recomendação: fraca);

2. Apesar de muitos genes isoladamente se correlacionarem com o prognóstico em pacientes com doença localizada, não há validação para mudança de conduta baseada em alterações pontuais de análises genômicas (tipo de evidência: baseada em evidências; força da recomendação: moderada).

Doença Avançada

3. Deve ser oferecido teste de alterações somáticas aos pacientes com câncer de próstata resistente à castração (CPRC) metastático. O momento ideal para oferecer o teste é, preferencialmente, na ocasião do diagnóstico da doença metastática resistente à castração (tipo de evidência: baseada em evidências; força da recomendação: forte).

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais

plataformas ou testes são mais apropriados?

4. Sequenciamento por técnica de NGS: Alterações deletérias em genes responsáveis pelo reparo de DNA apresentam implicações prognósticas e podem prever respostas a diferentes terapias. Alterações em genes da via de recombinação homóloga (RH), incluindo BRCA1, BRCA2, ATM, BRIP1, BARD1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, e RAD54L, e alterações deletérias em genes responsáveis pela via de reparo de mismatch (dMMR), incluindo genes MSH2, MSH6, PMS2 e MLH1, devem constar em painéis de NGS para pacientes com CPRC (tipo de evidência: baseada em evidências; força da recomendação: forte);

5. Alterações em genes como *PI3K*, *AKT*, *PTEN*, *TP53*, *RBI*, *CTNNB1*, *APC* e *RNF43* também apresentam implicações prognósticas e, dessa forma, também devem constar, preferencialmente, nos painéis de NGS. Esses testes podem ser realizados a partir de tecido parafinado em boas condições de conservação, entretanto, deve-se dar preferência, se factível, à biópsia recente, de lesão metastática ou DNA tumoral circulante, uma vez que estes refletem de maneira mais fidedigna o status molecular do tumor. Outros biomarcadores não moleculares também podem ter implicação prognóstica, entre eles o mais relevante é a presença da variante 7. do receptor androgênico (AR-V7), biomarcador com valor preditivo de resistência à terapia antiandrogênica e também relacionado ao pior prognóstico (tipo de evidência: baseada em evidências; força da recomendação: fraca);

6. Na pesquisa de defeitos de reparo de DNA na via de recombinação homóloga (RH), painéis multigênicos validados são sempre mais completos do que a avaliação de genes únicos (BRCA1 ou BRCA2, por exemplo), uma vez que a terapia-alvo, nesse contexto, foi aprovada com base em um painel com 15 genes da via de RH. Logo, com a pesquisa de genes únicos, muitos pacientes poderiam ser privados de terapia efetiva. Em pacientes com suspeita de tumores com instabilidade de microssatélites, a avaliação por IHQ da perda de expressão de MSH2, MSH6, PMS2 e MLH1 pode substituir adequadamente os painéis pela técnica de NGS (tipo de evidência: baseada em evidências; força da recomendação: forte).

Discussão

Pacientes com câncer de próstata localizado podem se beneficiar da realização de testes moleculares, tanto para estratificação prognóstica quanto para seleção de tratamento^{200, 201}.

Apesar das decisões terapêuticas em pacientes com câncer de próstata localizado serem realizadas a partir de fatores clínicos (PSA, estágio clínico) e patológicos (escore de Gleason), alguns testes moleculares podem ajudar na definição de conduta em pacientes com doença de baixo risco e em alguns pacientes com risco intermediário-favorável^{200,201}, candidatos à vigilância ativa. Testes diagnósticos moleculares como Decipher²⁰², OncotypeDx Prostate²⁰³ e Prolaris²⁰⁴ são comercialmente disponíveis e, em casos selecionados, podem ajudar no manejo do câncer de próstata localizado^{200,201}. No Brasil, nem

todos os testes diagnósticos estão disponíveis e, devido à ausência de comparações entre eles, deve-se priorizar o mais facilmente disponível. Apesar das múltiplas opções de testes no contexto da doença localizada, nenhuma delas se consagrou como padrão-ouro e, dessa maneira, decisões terapêuticas baseadas em fatores clínicos e patológicos ainda são o padrão.

Alterações em alguns genes estão associadas aos piores desfechos em pacientes com câncer de próstata localizado, como, por exemplo, mutações em BRCA2 e em genes responsáveis pelo reparo de mismatch (MSH2, MSH6, PMS2 e MLH1), presentes em cerca de 3-8% dos pacientes nesse estágio. Alterações nesses genes de reparo de DNA associam-se à progressão nos pacientes em vigilância ativa, menor sobrevida livre de metástases, tempo mais curto para início de hormonioterapia e pior sobrevida global²⁰⁵⁻²⁰⁷. Pacientes com escore de Gleason mais alto²⁰⁸, aqueles com Gleason primário 5 (5+4 e 5+5)²⁰⁹, histologia ductal⁹⁶, estágio mais avançado²⁰⁶, envolvimento linfonodal²⁰⁶, invasão angiolinfática⁹⁶ e metástases ao diagnóstico²⁰⁶ apresentam risco aumentado de presença dessas alterações genéticas deletérias. Apesar de ainda não haver recomendação para mudança de conduta na presença dessas alterações, podem ser oferecidos estudos clínicos com terapias-alvo aos pacientes com essas anormalidades genéticas^{200,201}.

Na doença avançada, algumas alterações moleculares têm ganhado grande importância nos últimos anos, especialmente em genes responsáveis pelo reparo de DNA – as quais são mais comuns nos pa-

cientes com câncer de próstata resistente à castração (CPRC). Cerca de 23%²¹⁰ dos pacientes com CPRC apresentam alterações somáticas desses genes e 12% alterações germinativas²¹¹. As duas vias de reparo de DNA com alterações vistas em pacientes com CPRC são a via da recombinação homóloga (RH) e a via de reparo de *mismatch* (dMMR). Na doença avançada, alterações nessas vias têm implicações terapêuticas relevantes. Pacientes com alterações em genes da via de RH são candidatos ao uso de inibidores da PARP²¹²⁻²¹⁴ e pacientes com alterações em reparo de *mismatch* (dMMR) são candidatos a inibidores de PD1¹⁵¹.

O estudo de fase III PROFound avaliou olaparibe em pacientes com CPRC²¹³. Pacientes com alterações deletérias em genes da via de RH e que haviam progredido para uma terapia antiandrogênica com abiraterona ou enzalutamida foram incluídos. Olaparibe demonstrou benefício em sobrevida livre de progressão por imagem (desfecho primário do estudo), tanto na coorte A (alterações em *BRCA1*, *BRCA2* e *ATM*) quanto na população geral do estudo (incluindo outras alterações na via da RH). Pacientes da coorte A que receberam olaparibe apresentaram benefício em sobrevida global, demonstrando que essa terapia pode aumentar a sobrevida de pacientes selecionados²¹⁵. Apesar de serem analisados em grupo, cada tipo de alteração genética na via da RH deriva, provavelmente, de um benefício diferente da terapia com o inibidor de PARP olaparibe. Cada caso deve ser individualizado, pesando-se riscos e benefícios.

Várias séries retrospectivas

sugerem que defeitos na via de reparo de DNA pela via de RH também foram associados às melhores respostas com uso de radium-223^{216,217} e quimioterapia baseada em platina²¹⁸. Entretanto, esses achados devem ser interpretados com cautela até serem validados em estudos prospectivos.

Já o benefício do uso de pembrolizumabe em pacientes com CPRC vem dessa medicação como terapia agnóstica em pacientes com defeitos na via de reparo *mismatch*^{151,219}, via que é alterada em até 8% nos pacientes com CPRC²⁰⁷. Apesar de dados preliminares demonstrarem benefício no uso de inibidores de PD1 em pacientes com mutações no gene *CDK12*²²⁰, novos estudos com casuísticas maiores não confirmaram que as mutações nesse gene seriam um biomarcador de resposta à imunoterapia^{218,221}.

Alguns genes que estão contidos na maior parte dos painéis de NGS comercialmente disponíveis podem trazer informações prognósticas e de associação com resistência a algumas terapias. Genes como *PI3K*, *AKT*, *PTEN*, *TP53*, *RBI*, *CTNNB1*, *APC* e *RNF43* estão relacionados tanto ao pior prognóstico quanto à resistência a terapias antiandrogênicas. Apesar de clinicamente relevantes, esses dados devem ser interpretados com cautela até a sua validação em estudos prospectivos²²²⁻²²⁵.

Pelos dados expostos acima, pacientes com câncer de próstata, em diferentes momentos da doença, podem se beneficiar da realização de testes moleculares somáticos tanto para estratificação prognóstica quanto para seleção de tratamento²⁰¹.

› Carcinoma Urotelial

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. Pacientes com carcinoma urotelial avançado (estágio IV), preferencialmente durante a primeira linha de tratamento ou logo após a falha da mesma. Testes podem ser realizados a partir de tecido parafinado em boas condições de conservação (tipo de recomendação: baseada em consenso formal; força da recomendação: forte).

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

2. Alvo com aprovação regulatória: alterações (mutações e fusões) nos genes *FGFR2* e *FGFR3* (tipo de recomendação: baseada em evidências; força da recomendação: forte);

3. Biomarcadores (não moleculares) com implicações regulatórias: expressão de PD-L1 (anticorpos 22C3 ou SP142 por IHC) (tipo de recomendação: baseada em evidências; força da recomendação: moderada);

4. Outros alvos terapêuticos potenciais para inclusão em estudos clínicos: *HER-2*, *TSC1*, genes de reparo de DNA (tipo de recomendação: baseada em evidências; força da recomendação: fraca).

Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

5. RT-PCR (PCR em tempo real) para *FGFR* Therascreen (QIAGEN) (teste preferível). Disponível comercialmente ou por meio de programas de testes patrocinados (tipo de recomen-

dação: baseada em evidências; força da recomendação: forte);

6. Painel NGS: painéis multi-genômicos disponíveis no mercado (verificar se no painel de genes estão incluídos os genes *FGFR2* e *3*, contemplando fusões e mutações - dar preferência aos painéis que incluam essas alterações) (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: fraca).

Discussão

Pacientes com carcinoma urotelial avançado podem se beneficiar da realização de testes moleculares somáticos para seleção de tratamento. Idealmente, a solicitação desses testes deve ser considerada no estágio clínico IV da doença, preferencialmente antes ou durante uma primeira linha de tratamento. Atualmente, não existem evidências para suportar a seleção de terapias baseadas em testes moleculares em tumores não metastáticos. No entanto, é importante considerar que alguns carcinomas uroteliais apresentam rápida progressão, não existindo tempo hábil para realização de exames em fases avançadas da doença. Estudos clínicos estão disponíveis com drogas-alvo em estágios mais precoces, o que pode justificar a realização de testes específicos nesse cenário.

Atualmente, os principais alvos terapêuticos disponíveis com aprovação regulatória de tratamento são as alterações nos genes *FGFR2* e *FGFR3* (mutações e fusões). Os pacientes com essas alterações podem ser tratados com a medicação erdafitinibe, aprovada pela ANVISA após falha em, pelo menos, uma linha terapêutica prévia na doença metastática. Essa aprovação é baseada em um estudo clínico de fase II, o qual demonstrou taxa de res-

posta objetiva de 40%, sobrevida livre de progressão de 5,5 meses e sobrevida global de 13,8 meses com erdafitinibe²²⁶. Além disso, atualmente existem estudos clínicos abertos para pacientes com alterações em *FGFR*, inclusive em centros brasileiros. Importante lembrar que a amplificação de *FGFR* ou do ligante FGF pode ser detectada em algumas plataformas de NGS, mas não é um fator preditivo ao uso dos inibidores de *FGFR*.

A expressão de PD-L1, apesar de não fazer parte da análise molecular, é um biomarcador de importância na definição da primeira linha de tratamento de carcinoma urotelial. Pacientes não candidatos à cisplatina, cujos tumores expressem PD-L1, são candidatos ao uso de inibidores de PD-1/PD-L1 em primeira linha de tratamento^{227,228}. Importante mencionar que tal biomarcador não é necessário ao se optar pela utilização dessas drogas em linhas posteriores de tratamento. Na utilização de inibidores de *checkpoint* imunológico em tumores uroteliais, não são necessários marcadores moleculares, como a carga mutacional (TMB) ou a presença de instabilidade de microssatélites (MSI), que podem ser pesquisados em plataformas de NGS. No entanto, diversos estudos demonstram que TMB elevado ou *MSI-high* se correlacionam com maior probabilidade de resposta à imunoterapia²²⁹, o que pode ser uma informação útil à decisão terapêutica, dependendo do contexto clínico.

Existem outras alterações moleculares no carcinoma urotelial que podem ser classificadas como *Tier 2*, ou seja, alvos investigacionais com alguma evidência clínica de benefício²³⁰. Esses alvos podem ser pesquisados em pacientes com boa con-

dição clínica para inclusão em estudos. Dentre eles, citam-se as mutações em *TSC1* (prevalência aproximada de 8%), que podem se correlacionar com respostas aos inibidores de mTOR²³¹; as mutações e amplificações em *HER2* e *HER3* (prevalência aproximada de 15%), que podem prever respostas às drogas anti-HER2²³²; e as alterações em genes de reparo de DNA (DDR), que podem indicar atividade de inibidores de PARP²³³.

Em relação às recomendações de consenso, segundo a Sociedade Europeia de Oncologia Clínica (ESMO), não há consenso sobre a realização de testes moleculares em carcinoma urotelial avançado, incluindo os tipos de marcadores que devem ser pesquisados; no entanto, existe consenso contrário ao não considerar esse tipo de avaliação dependendo do con-

texto²³⁴. O NCCN recomenda a realização de testes moleculares para estágios IVA e IVB, principalmente a análise de *FGFR* por RT-PCR (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf).

Dessa forma, atualmente, o teste molecular a ser considerado no carcinoma urotelial avançado é a avaliação de *FGFR* 2 e 3, que define a indicação do inibidor de FGFR. Painéis moleculares mais amplos podem ser considerados para inclusão de pacientes em estudos clínicos.

› Câncer de rim

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. Não há recomendação para solicitação de testes moleculares somáticos em pacientes com carcinoma de células re-

nais. Tal recomendação se aplica à doença localizada ou metastática (tipo de recomendação: baseada consenso informal; força da recomendação: forte). Testes moleculares podem ser realizados com o objetivo de incluir pacientes em estudos clínicos.

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

2. Não existem alvos com aprovação ou implicação regulatória no carcinoma de células renais (tipo de recomendação: baseada em evidências; força da recomendação: forte);

3. Testes e plataformas disponíveis: não se aplicam.

Tabela 6. Principais alterações somáticas nos tumores urológicos

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Câncer de próstata (avançado)*	<p>Instabilidade de microssatélites (MSI-high) (3-4%)</p> <p>Genes associados ao reparo do DNA por recombinação homóloga: BRCA1, BRCA2, ATM, BRIPI1, BARD1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L (23%)</p> <p>PI3K, AKT, PTEN, TP53, RB1, CTNNB1, APC, RNF43</p> <p>AR (variante VII) (20%)</p>	<p>Pesquisa de instabilidade de microssatélites por IHQ, RT-PCR ou NGS</p> <p>NGS (no contexto metastático, na doença castração resistente)</p> <p>RT-PCR para detecção da variante VII do transcrito do receptor de androgênio (AR)</p>	<p>Painéis genômicos podem ajudar na decisão de tratamento da doença localizada de baixo risco e em alguns pacientes com risco intermediário-favorável.</p>

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Carcinoma urotelial	Mutações ou fusões em FGFR2 e FGFR3 (20%)	RT-PCR (PCR em tempo real) para FGFR Therascreen (QIAGEN) NGS para alvos além do FGFR	Análise de PD-L1 por IHQ é necessário para utilização de inibidores de <i>checkpoint</i> imune em primeira linha para pacientes não elegíveis a receber cisplatina.

*Os dados de frequência estão relacionados à doença metastática resistente à castração.

Hematológicos sólidos

Abordam-se aqui somente os linfomas mais frequentes, como tumores hematológicos sólidos. Existem dezenas de subtipos de linfomas. As duas principais categorias de linfomas são os linfomas de células B e linfomas de células T (não abordados neste texto). Além disso, pode-se dividir os linfomas também entre Linfomas de Hodgkin (LH) e Linfomas não Hodgkin (LNH). Cerca de 90% dos linfomas são LNH e, dentre eles, o Linfoma difuso de grandes células B e o Linfoma folicular são os mais frequentes.

› Linfoma Difuso de grandes células B (LDGCB)

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. Todos os casos de LDGCB devem fazer teste para classificação de COO (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte);

2. A pesquisa de painéis de mutações somáticas com NGS e a identificação de subgrupos de LDGCB baseado nessas alterações, apesar de estudadas em um grande número de casos, não têm ainda validade práti-

ca e, portanto, não devem ser utilizadas na rotina clínica para tomada de decisões (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: moderada).

O que deve ser pesquisado (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

1. O algoritmo de Hans, com uso de CD10, BCL6 e MUM1, analisado por IHQ, pode ser usado na pesquisa de célula de origem (COO) (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: moderada);

2. Não é indicado o uso rotineiro de perfil de expressão gênica (GEP) para definição de COO. O uso de algoritmos de IHQ é permitido, apesar da definição de COO ser mais acurada por GEP (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte);

3. Sempre que possível, solicitar FISH para pesquisa de translocação do *MYC*, *BCL2* e *BCL6* (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: forte);

4. Deve-se pesquisar a dupla expressão por IHQ de *MYC* e *BCL2* em todos os casos. Na

ausência da translocação dos respectivos genes (FISH negativo), esses pacientes devem ser relatados como “duplos expressores” (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte);

5. É aceitável pesquisa da translocação isolada para o *MYC* inicialmente e, se positiva, prosseguir com *BCL2* e *BCL6* (tipo da recomendação: consenso informal; força da evidência: moderada);

6. Nas situações de dificuldade de realização de FISH, priorizar os casos com taxas superiores na imunexpressão de 40% para o *MYC* e 50% para o *BCL2* (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: fraca).

Discussão

A determinação da célula de origem (COO) é considerada mandatória pela versão mais recente da Organização Mundial de Saúde (OMS). A COO pode ser determinada por meio de IHQ. O algoritmo de Hans utiliza CD10, BCL6 e MUM1, e consegue distinguir os tipos centro germinativo (CG) e célula B ativada/não classificável (não CG ou CBA)²³⁵. Quan-

do comparado com a análise de expressão genética (GEP - *gene expression profiling*), o algoritmo de Hans apresenta acurácia de cerca de 85-90%²³⁶. Devido à sua fácil aplicação, baixo custo e boa correlação, é indicado para uso na prática clínica. A distinção entre CG e CBA é importante, pois o último subgrupo está associado ao pior prognóstico²³⁷.

De forma mais recente, o papel da expressão proteica do MYC e BCL2 por meio da IHQ tem se configurado como fator de mau prognóstico²³⁸, independente da COO²³⁹. Seu resultado positivo deve ser considerado quando for maior que 40% para o MYC e 50% para o BCL2. O cenário em que ambos são positivos, mas sem presença da translocação genética, se chama “duplo expressor”. Baseado nesses resultados de COO e expressão de MYC e BCL2 por IHQ, novas drogas estão sendo testadas em conjunto com o protocolo padrão de quimioterapia, R-CHOP, para tentar melhorar o prognóstico dessa população²⁴⁰.

Estudos utilizando NGS conseguiram demonstrar de maneira mais robusta a diferença entre os subtipos CG e CBA, além de desvendar novas mutações com potencial prognóstico e terapêutico. As alterações mais frequentemente encontradas em pacientes com COO do tipo CG envolvem o gene *BCL2* (34%, translocação e mutação), enquanto aqueles com subtipo CBA envolvem *TNFAIP3* (30%, mutação e deleção) e *MYD88* (30%, mutação)²⁴¹. Translocação do *BCL6* (35%) e mutação do *KMT2D* (35%) apresentam frequência similar nos dois subtipos de COO. Após análise de quase

600 biópsias de casos de LDGCB²⁴², quatro subgrupos genéticos foram propostos: MCD (mutação do *MYD88* e *CD79B*), BN2 (fusão do *BCL6* e mutação do *NOTCH2*), N1 (mutação do *NOTCH1*) e EZB (mutação do *EZH2* e translocação do *BCL2*). Os grupos BN2 e EZB parecem ter melhor desfecho clínico do que os grupos MCD e N1.

Alterações envolvendo os genes *MYC*, *BCL2* e *BCL6* podem resultar de diferentes mecanismos²⁴³. Anormalidades moleculares desses genes tendem a produzir fenótipos mais agressivos da doença, no caso de translocações, do que por mutações de ponto ou indels. A forma mais tradicional de identificar essas translocações é pelo uso de hibridização *in situ* (FISH). Os linfomas que albergam simultaneamente as translocações mencionadas são denominados de *Double Hit* (*MYC + BCL-2*) ou *Triple Hit* (*MYC + BCL-2 + BCL-6*). Os linfomas B de alto grau, com translocação do *MYC* e *BCL2* ou *BCL6*, são reconhecidos como uma nova entidade pela recente classificação da OMS²³⁶. Esse grupo de especial pior prognóstico tem uma resposta muito pobre à quimioterapia convencional e ainda não há um consenso sobre como esses casos devem ser abordados^{244,245}.

Em situações de escassez de recursos para pesquisa de translocação genética, é possível fazer o FISH inicialmente apenas para o *MYC*, reservando a pesquisa do *BCL2* e do *BCL6* para as situações em que o primeiro for positivo²⁴⁶. Outro marcador com possível papel prognóstico, visto em IHQ, é o IRF4/MUM1. Já foi demonstrado que sua expressão pode

estar associada à maior taxa de resposta em tratamentos no subtipo CBA²⁴⁷.

› Linfoma Folicular (LF)

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. Não está indicado, no momento, um painel genético específico para pacientes com LF e que auxilie na avaliação da evolução, resposta terapêutica ou risco de transformação para linfoma agressivo (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: forte).

O que deve ser pesquisado (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

1. Todos os casos de LF com dúvida diagnóstica devem ser encaminhados para pesquisa direta de t(14;18)(q32.3;q21.3), por meio de método específico (FISH) (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte);

2. Não é indicado o uso rotineiro do FLIPI-m7 como índice prognóstico, uma vez que não é validado em diferentes coortes de pacientes com LF (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: moderada);

3. A perda da translocação do *BCL2* e hiperexpressão de deaminase induzida por ativação (AID) podem servir como pista no diagnóstico de um linfoma folicular transformado para LDGCB (tipo da recomendação: consenso informal; força da evidência: fraca).

Discussão

A alteração genética mais característica do LF é a presença da translocação do proto-oncogene *BCL2* com o locus do gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH)²⁴⁸. O resultado é uma translocação recíproca t(14;18)(q32.3,q21.3), que resulta em super-expressão constitutiva de *BCL2* e confere efeito antiapoptótico à célula tumoral²⁴⁸. Isoladamente, essa translocação não é capaz de promover a linfomagenese, sendo necessário que outras alterações sejam somadas para esse processo ocorrer. Indivíduos saudáveis podem apresentar a t(14;18)(q32.3,q21.3) em linfócitos B circulantes sem desenvolver a doença²⁴⁹. Entre as alterações moleculares, a mais importante e frequente é a mutação do gene *KMT2D* (ou *MLL2*), que ocorre entre 70-80% dos casos²⁵⁰. Em geral, as alterações epigenéticas são frequentemente vistas no LF.

Com o objetivo de agregar as informações relativas às alterações moleculares com dados clínicos em um índice prognóstico combinado, foi desenvolvido o FLIPI-m7²⁵¹. Esse escore prognóstico integrou os fatores de risco do FLIPI (escore que usa idade, número de sítios nodais, valor do LDH, hemoglobina e estadiamento de Ann Arbor) ao status performance e somou a isso sete genes frequentemente mutados no LF (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, *CARD11*). O FLIPI-m7 foi validado em pacientes tratados com R-CHOP ou R-CVP, esquemas clássicos de primeira linha no tratamento da doença, mas não em pacientes expostos à bendamustina ou rituximabe em monoterapia²⁵². Pacientes com LF e progressão da doença dentro dos primeiros dois anos

após o tratamento de primeira linha com R-CHOP (POD24) representam um grupo de pior prognóstico, sobretudo quando comparados aos pacientes com progressão após dois anos²⁵³. Em um estudo que avaliou de forma prospectiva o FLIPI-m7 em pacientes com POD24, quase metade da população foi classificada como baixo risco, mostrando que essa não é uma ferramenta suficientemente sensível para identificar um grupo com evolução pior.

A transformação do LF para um linfoma agressivo (grau histológico 3B) é um evento que ocorre em cerca de 10-15% dos casos²⁵⁴ e que representa uma das principais causas de mortalidade relacionadas à doença²⁵⁵. Quando ocorre a transformação histológica, na maioria dos casos, a morfologia se assemelha a um LDGCB *novo*. Esse fenômeno parece estar relacionado à hiperexpressão de deaminase induzida por ativação (AID)²⁵⁶ e à perda da translocação de *BCL2*^{236,257}. Contudo, não há, até o momento, uma combinação de mutações que possa ser diagnóstica desse processo.

› Linfoma de Hodgkin (LH)

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. Não está indicado, no momento, um painel genético específico para pacientes com LH que auxilie na avaliação da evolução ou resposta terapêutica (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: forte).

O que deve pesquisado (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais plataformas ou

testes são mais apropriados?

1. Pela grande prevalência do vírus EBV em pacientes com LH, indica-se a sua pesquisa através de expressão proteica (LMP1, IHQ) ou direta do seu material genômico (EBER, hibridização *in situ*), responsáveis por auxiliar o diagnóstico desse linfoma (tipo da recomendação: baseada em evidências; força da evidência: forte);

2. O uso de IHQ para avaliar expressão de PD-L1 tumoral e a positividade do MHC de classe II são preditores de desfechos favoráveis aos pacientes tratados com bloqueadores de PD1 (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: moderada);

3. Avaliação genética para alterações associadas ao pior prognóstico com tratamento quimioterápico, como amplificação do cromossomo 9p24.1, não deve ser feita como rotina (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: moderada);

4. Pesquisa de *hotspots* com DNA circulante tumoral (ctDNA), como mutação do *STAT6*, ainda é experimental no LH e não deve ser aplicada, até esse momento, na condução de casos na prática clínica (tipo da recomendação: consenso formal; força da evidência: moderada).

Discussão

O LH tem uma íntima relação com o vírus do EBV, presente em espécimes de biópsia ganglionar²⁵⁸, assim como uma relação inversamente proporcional com infecções comuns da infância, notadamente sarampo, rubéola e caxumba²⁵⁹. O LH pode ser dividido em LH clássico e predominância linfo-

cítica nodular²³⁶. O primeiro é o tipo mais comum, representa cerca de 90% dos casos. A célula neoplásica característica é a célula de Reed-Stenberg (RS), de origem centro folicular B, gigante, multinucleada e com um infiltrado inflamatório ao seu redor²⁶⁰. Considerando todo o tecido tumoral, a célula de RS representa entre 0,1-10%, sendo o restante composto por linfócitos, histiócitos e eosinófilos reacionais periféricos²³⁶. A célula de RS tem expressão aumentada dos ligantes 1 e 2 do PD-1 (*programmed death-1*), PD-L1 e PD-L2, o que confere proteção contra os mecanismos de morte induzida pelos linfócitos T (fenômeno de evasão imune)^{261,262}.

Variação no número de cópias cromossômicas são frequentes no LH, especialmente no cromossomo 9p24.1 (localização tanto do gene *JAK2* como dos genes do PD-L1 e de PD-L2), achado frequente em pacientes com doença avançada e associado à redução de sobrevida livre de progressão com tratamento quimioterápico²⁶¹⁻²⁶³.

As alterações genéticas mais vistas no LH levam a mudanças em três vias principais de sinalização: NF-κB (gene *TNFAIP3* mutado em cerca de 40% dos pacientes e em maior frequência nos casos EBV+), JAK/STAT (*SOCS1* e *STAT6* mutados em 30-40% dos casos) e MHC1

(gene *B2M* mutado em até 70% dos casos, sobretudo no subtipo predominância linfocítica nodular)²⁶⁴. Como a quantidade de células neoplásicas em relação ao tecido tumoral é bastante reduzida, estudos de alterações genéticas desse linfoma sempre foram bastante desafiadores. O uso de DNA circulante tumoral (ctDNA) ganhou destaque no LH e autores italianos que utilizavam essa técnica foram capazes de demonstrar mutações do *STAT6* em 40% dos casos²⁶⁵, concordando com outros trabalhos.

Tabela 7. Principais alterações somáticas no câncer de próstata

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste
Linfoma difuso de células B	CD10, BCL2, BCL6, MUM1, MYC e BCL2	IHQ
	Translocação de MYC, BCL2 e BCL6	FISH
Linfoma folicular		Não está indicado, no momento, um painel genômico específico que auxilie na avaliação da evolução, resposta terapêutica ou risco de transformação para linfoma agressivo
Linfoma de Hodgkin	Não está indicado painel genômico Podem ser úteis: LMP1 e PD-L1	IHQ para pesquisa de LMP1 que denota presença de EBV e pesquisa da expressão de PD-L1

Sarcomas

Os sarcomas são neoplasias malignas raras e heterogêneas. Serão incluídos nesta recomendação os sarcomas de partes moles de extremidades e retroperitoneais, os tumores ósseos e o GIST.

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento? O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)? Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

1. Considerar testes moleculares com pesquisa de alterações gênicas somáticas em situações cuja morfologia e IHQ não são suficientes para estabelecer o diagnóstico preciso, ou uma informação prognóstica/preditiva necessária. A técnica a se considerar pode ser orientada conforme a suspeita diagnóstica e disponibilidade. Alternativamente, o sequenciamento amplo de múltiplos genes pela técnica de NGS pode ser considerado (tipo de recomendação: baseada em evidência; força de recomendação: forte);

2. Considerar testes de sequenciamento pela técnica de NGS para diagnóstico, prognóstico e planejamento terapêutico de sarcomas não GIST (tipo de recomendação: baseada em consenso; força de recomendação: fraca);

3. Considerar a análise mutacional em GIST (genotipagem) no planejamento do tratamento adjuvante. Não há uma técnica considerada preferencial (tipo de recomendação: baseada em consenso; força de recomendação: moderada);

4. Considerar a análise mutacional em GIST (*KIT*, *PDGFRA*, *NF1*, *RAS* e *SDH*) no planejamento do tratamento da doença metastática ou inoperável. Não há uma técnica considerada preferencial (tipo de recomendação: baseada em consenso; força de recomendação: moderada);

5. Caso o tratamento inicial do GIST não tenha sido orientado por pesquisa molecular, a pesquisa da mutação em *PDGFRA* D842V deve ser feita nos casos de progressão da doença, com indícios de resistência primária à imatinibe (tipo de recomendação: baseada em evidência; força de recomendação: forte);

6. Pesquisa da translocação do gene *ALK* em pacientes com diagnóstico de tumor miofibroblástico inflamatório pode ser feita para confirmar o diagnóstico e orientar potencial terapia com inibidor de *ALK*. Ocorre em, aproximadamente, 50% dos IMFT²⁶⁶ (tipo de recomendação: baseada em evidência; força de recomendação: fraca);

7. A pesquisa da fusão de *NTRK* pode ser realizada em pacientes que progridem à primeira linha, independente da histologia. A pesquisa pode ser feita primariamente por técnica de sequenciamento, FISH ou orientada por IHQ (tipo de recomendação: baseada em evidência; força de recomendação: forte);

8. A pesquisa da amplificação de *CDK4* e *MDM2* pode ser realizada para uso de inibidores de *CDK4*. Do total, 97% dos liposarcomas são bem diferenciados e os desdiferenciados apresentam essa alteração²⁶⁷ (tipo de recomendação: baseada em evidência; força de recomendação: fraca).

Discussão

As mutações somáticas identificadas na maioria dos sarcomas não são mutações *drivers* e, conseqüentemente, resultarão em limitado benefício clínico imediato ao paciente. Por outro lado, as mutações somáticas encontradas no momento do diagnóstico são importantes para refinar o diagnóstico histológico e, posteriormente, direcionar a melhor terapia. A IHQ, aliada à expertise de um patologista especialista em sarcomas, é um método acessível de classificação dos sarcomas. No contexto de definição diagnóstica, os testes moleculares são fortemente recomendados como métodos auxiliares e complementares à IHQ²⁶⁸. Mais de 30% dos sarcomas apresentam alguma translocação conhecida²⁶⁹. Dessa forma, o uso de hibridização *in situ* (FISH), ou mesmo a técnica de PCR em tempo real para detecção dessas alterações, devem ser realizadas em casos em que o diagnóstico histológico não pode ser firmado com precisão apenas pela morfologia ou IHQ²⁷⁰. Um exemplo da importância da pesquisa de fusões é a identificação de diversas translocações nas neoplasias de células redondas. As translocações envolvendo o gene *EWS* são inúmeras e, cada vez mais, são reconhecidas como marcadores prognósticos nos sarcomas de Ewing e nos Ewing-símiles²⁷⁰⁻²⁷².

O sequenciamento pela técnica de NGS com painéis amplos é capaz de identificar inúmeras alterações somáticas nos sarcomas. No entanto, a chance de se encontrar alguma alteração molecular *driver* e que seja alvo de tratamento é baixa. Essa estratégia pode ser utilizada quando há a possibilidade de incluir o paciente em estudos clínicos²⁷³.

Em um estudo conduzido no MD Anderson Cancer Center, com 102 pacientes portadores de sarcomas recidivados e metastáticos, as principais alterações encontradas foram mutação em *TP53* (31%), *CDK4* (23%), *MDM2* (21%), *RBI* (18%) e *CDKN2A* (13%). Apenas 14/102 pacientes apresentaram mutação que é alvo de duas drogas aprovadas: pazopanibe e imatinibe. Contudo, essas drogas exercem efeito *off-target* em *PDGFRA*, *FGFR* e *KIT*²⁷⁴. Logo, o sequenciamento amplo pode ser utilizado para o auxílio da classificação histológica e identificação de pacientes destinados à inclusão em estudos clínicos experimentais²⁷⁵.

Estudos de fase II avaliaram a eficácia de inibidores de *CDK4* (palbociclib) em pacientes portadores de lipossarcoma bem diferenciados e desdiferenciado com amplificação de *MDM2/CDK4*. Os resultados mostram que essa estratégia resulta em controle de doença com sobrevida livre de progressão promissora, mas com poucas respostas objetivas²⁷⁶.

Crizotinibe e ceritinibe são inibidores de *ALK* e demonstraram atividade em pacientes portadores de tumor miofibroblástico inflamatório (IMFT), com translocação de *ALK*^{277,278}. Pacientes com diagnóstico de PEComa e linfangioleiomiomatose foram tratados com inibidores de mTOR e os resultados são promissores²⁷⁹.

Por outro lado, pacientes com diagnóstico de GIST podem ter a genotipagem tumoral realizada no momento do diagnóstico da doença localizada ou no tratamento da doença recidivada ou metastática²⁸⁰. As alterações mais frequentes no GIST são mutação em *KIT* e *PDGFRA*. Em, aproximadamente, 15% dos pacientes, não foi encontrado nenhum tipo de mutação nesses dois genes (*KIT* e *PDGFRA* selvagem). No entanto, o subtipo selvagem tem sido caracterizado por mutações em *NF1*, *BRAF*, *SDH1*, *RAS* e *NTRK*²⁸¹⁻²⁸³. A presença de mutação no éxon 11 do gene *KIT* é a mais frequente e está relacionada com a maior sensibilidade ao

imatinibe no cenário de doença metastática. Outras mutações conferem resistência parcial ou total ao imatinibe²⁸⁴. O conhecimento prévio dessas mutações pode direcionar melhor a abordagem terapêutica como o uso de drogas alternativas, como o sunitinibe, na primeira linha de mutação em *KIT* exon 9²⁸⁵.

Recentemente, foi aprovado nos EUA o avapratinibe que inibe de forma potente a mutação em *PDGFRA* D842V²⁸⁶. Os pacientes que desenvolvem resistência secundária ao imatinibe adquirem novas mutações em *KIT* ou *PDGFRA*, e a identificação dessas mutações pode facilitar a inclusão em estudos clínicos.

As alterações moleculares nos genes *NTRK* são infrequentes nos sarcomas do adulto (0,76)⁶³. No entanto, podem ocorrer em mais de 70% dos casos de fibrosarcoma infantil, uma doença rara que acomete crianças, geralmente abaixo de um ano de idade²⁸⁷.

Tabela 8. Principais alterações somáticas em sarcomas

Tipo de neoplasia	Gene / Alteração	Teste
Todos os sarcomas do adulto	NTRK 1-3 (fusão) (0,76%)	IHQ pan-TRK como triagem para fusão de NTRK 1-3; se positivo confirmar com NGS
Lipossarcoma desdiferenciado bem diferenciado	CDK4 e MDM2 (amplificação) (>97%)	NGS
GIST	KIT, PDGFRA, NF1, RAS e SDH (alguma das alterações em >98%)	NGS
Fibrossarcoma infantil	NTRK (fusão) (>70%)	IHQ pan-TRK como triagem para fusão de NTRK 1-3; se positivo confirmar com NGS
Tumor miofibroblástico inflamatório	ALK (fusão) (>50%)	RT-PCR ou NGS

Tumores de pele

› Melanoma

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. A investigação de mutações somáticas deve ser solicitada para todo paciente com diagnóstico de melanoma cutâneo, de mucosa ou de primário desconhecido, nos estágios III ou IV (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte). Não há indicação, fora de protocolos de pesquisa, para realização de testes que busquem mutações somáticas nos estágios I e II;

2. A investigação de mutações somáticas deve ser solicitada no momento do diagnóstico do melanoma (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte).

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

3. Para melanoma cutâneo, de mucosa ou de primário desconhecido, deve ser pesquisada a presença de mutação do gene *BRAF*, sendo a mais frequente a mutação do tipo *V600E* e *V600K* (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte);

4. Para melanoma cutâneo (principalmente melanoma do subtipo sptizoide), de mucosa ou de primário desconhecido, deve ser pesquisada a presença de fusão do gene *TRK* (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte);

5. Para melanoma cutâneo, de mucosa ou de primário desconhecido, pode ser pesquisada a presença de mutação do gene *NRAS*, sendo a mais frequente a mutação do tipo *Q61*, usualmente *Q61L*, e, menos frequentemente, *Q61R* e *Q61H* (tipo de recomendação: consenso informal; força de recomendação: fraca);

6. Para melanoma de mucosa ou acral lentiginoso, pode ser pesquisada a mutação do gene *KIT*, sendo mais frequentes as mutações dos éxons 9, 11, 13 e 17 (tipo de recomendação: consenso informal; força de recomendação: fraca).

Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

7. Diversos testes estão disponíveis para avaliação da mutação *V600* do gene *BRAF* no melanoma, empregando tanto análise do DNA quanto anticorpos. Esses testes são baseados em técnicas como reação em cadeia da polimerase *real-time* (RT-PCR), mutação-específica ou de gene único, sequenciamento do tipo Sanger ou NGS, pirosequenciamento, *high-resolution melting* e IHQ, essa última utilizando o anticorpo monoclonal VE1. No Brasil, os testes utilizados com maior frequência e acessíveis incluem versões comercialmente disponíveis, as quais envolvem técnicas de RT-PCR (Cobas 4800, Idylla, THx1-D-BRAF) e apresentam elevada sensibilidade e especificidade para mutações do gene *BRAF* *V600E* e *V600K*, porém com baixa acurácia para demais mutações no códon 600 (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte). Mais recentemente, tornaram-se disponíveis painéis genômicos amplos, baseados

em NGS com variadas composições, incluindo as principais mutações de interesse no melanoma (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* e fusões de *TRK*);

8. Para avaliação de fusões de *TRK*, pode-se utilizar, como triagem, IHQ com anticorpo pan-TRK. Todavia, faz-se necessária a confirmação molecular das fusões de *NTRK1*, *NTRK2* ou *NTRK3*, usualmente feita através de NGS. Alternativas incluem hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou RT-PCR (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte);

9. A pesquisa de mutações nos genes *KIT* e *NRAS* é feita por PCR ou RT-PCR mutação-específica, sequenciamento do tipo Sanger ou NGS. Convém salientar que o uso da IHQ para avaliação da expressão do CD117 (c-KIT) não é validado no melanoma (tipo de recomendação: consenso informal; força de recomendação: fraca).

Discussão

Mutações no gene de *BRAF* que ativam constitutivamente a via da MAPK estão presentes em, aproximadamente, 40 a 60% dos melanomas. Em 80 a 90% dos casos, essa mutação ativadora consiste na substituição da valina por ácido glutâmico no códon 600 (mutação *V600E*), e a maior parte do restante consiste em uma substituição alternativa (valina por lisina) (*V600K*)²⁸⁸.

No cenário adjuvante, o estudo de fase III COMBI-AD (2) avaliou o uso da combinação de dabrafenibe e trametinibe *versus* placebo em 870 pacientes com diagnóstico recente de melanoma cutâneo totalmente ressecado, com doença estágio

IIIA, considerado de alto risco de recidiva (metástases linfonodais >1 mm), IIIB ou IIIC, com mutação no gene do *BRAF* (V600E ou V600K), e demonstrou redução estatisticamente significativa de 51% do risco de recidiva de doença. Com um seguimento mediano de cinco anos, a sobrevida livre de recidiva (SLR) foi maior com dabrafenibe e trametinibe (taxa em 5 anos, 52% x 36%; HR 0,51; IC95% 0,42-0,61). Com um seguimento mediano de 2,8 anos, a sobrevida global (SG) foi prolongada com dabrafenibe mais trametinibe (taxa em 3 anos, 86% x 77%; HR 0,57; IC95% 0,42-0,79), mas permanece ainda imatura. Com base nesse estudo, a combinação de dabrafenibe mais trametinibe foi aprovada para uso adjuvante²⁸⁹.

No cenário metastático, inibidores de BRAF e MEK também foram combinados em um esforço para retardar o desenvolvimento da resistência ao tratamento e reduzir algumas toxicidades diretamente associadas à inibição do BRAF²⁹⁰.

No estudo COMBI-D de fase III, 423 pacientes metastáticos com mutação em *BRAF* V600E ou V600K, virgens de tratamento sistêmico anterior, foram randomizados para receber dabrafenibe e trametinibe, ou dabrafenibe e placebo²⁹⁰. A sobrevida livre de progressão (SLP) foi significativamente maior com a combinação do que com o uso de dabrafenibe sozinho (mediana 11,0 x 8,8 meses, HR 0,67; IC95% 0,53-0,84). A SG foi maior com a combinação (mediana 25,1 x 18,7 meses, HR 0,71, IC95% 0,55-0,92). Com um seguimento mínimo de 36 meses, 19% dos pacientes tratados com a combinação permaneceram em terapia em compara-

ção aos 3% dos tratados apenas com dabrafenibe²⁹¹. A taxa de resposta objetiva (TRO) foi significativamente melhor (68% x 55%) com a combinação em comparação ao uso isolado de dabrafenibe; as taxas de RC foram de 18% contra 15%, respectivamente.

Um segundo estudo de fase III, o COMBI-V, randomizou 704 pacientes com melanoma metastático, mutação em *BRAF* (V600) e não tratados anteriormente para receber dabrafenibe e trametinibe, ou vemurafenibe em monoterapia²⁹². A SG aumentou significativamente com a combinação dabrafenibe e trametinibe (sobrevida em 1 ano 72% versus 65%, HR 0,69; IC95% 0,53-0,89). A SLP em três anos permaneceu mais alta com a combinação de dabrafenibe e trametinibe (25% x 11%); 58% dos pacientes randomizados para dabrafenibe e trametinibe que estavam vivos aos três anos permanecem em seu regime original. A SLP mediana também aumentou significativamente (11,4 x 7,3 meses, IC 95% 0,46-0,69), assim como a TRO (67% x 53%) a favor da combinação.

Em uma análise combinada dos estudos COMBI-D e COMBI-V, a combinação de dabrafenibe e trametinibe demonstrou medianas de SLP e SG de, aproximadamente, 11 e 26 meses, respectivamente²⁹³. A SLP estimada e a SG em cinco anos foram de, aproximadamente, 19% e 34%, respectivamente. Entre os 19% com uma RC, a SG estimada em cinco anos foi de 71%.

Uma outra combinação de inibidores de BRAF e MEK foi testada utilizando vemurafenibe mais cobimetinibe em um estudo de fase III, quando 495 pacientes com melanoma

avançado e com mutação em *BRAF*, previamente não tratados, foram randomizados para vemurafenibe mais cobimetinibe, ou vemurafenibe mais placebo²⁹⁴. Com um seguimento mediano de 14,2 meses, a SLP aumentou significativamente com a combinação de vemurafenibe e cobimetinibe quando comparado com vemurafenibe e placebo (mediana 12,3 x 7,2 meses, HR 0,58; IC95% 0,46-0,72). A TRO foi aumentada com vemurafenibe mais cobimetinibe (70% x 50%), assim como a taxa de RC (16% x 11%). A SG mediana também foi significativamente mais longa com a combinação (22,3 x 17,4 meses, HR 0,70; IC95% 0,55-0,90).

Uma terceira combinação de inibidores de BRAF e MEK, o uso de encorafenibe com binimetinibe foi comparado com a monoterapia de encorafenibe ou de vemurafenibe no estudo de fase III COLUMBUS, envolvendo 577 pacientes com melanoma metastático mutados em *BRAF* (V600)²⁹⁵; também foi positivo para SLP em comparação com vemurafenibe (mediana 14,9 x 7,3 meses, HR 0,51; IC95% 0,39-0,67) e com encorafenibe (mediana 14,9 x 9,6 meses, HR 0,77; IC95% 0,59-1,00). A SG também foi superior com a combinação do que com o uso isolado de vemurafenibe (mediana 33,6 x 16,9 meses, HR 0,61; IC95% 0,47-0,79) e de encorafenibe (mediana 33,6 x 23,5 meses, HR 0,81; IC95% 0,61-1,06).

É importante ressaltar que as três diferentes combinações não foram comparadas entre si em um estudo de fase III.

Além das mutações em *BRAF*, a via MAPK também pode levar ao desenvolvimento de tumores em decorrência de

mutações no gene do *NRAS*. O binimetinibe é um inibidor da MEK que foi estudado especificamente em pacientes com mutações no *NRAS*. Um estudo de fase III randomizou 402 pacientes com melanoma avançado e mutação de *NRAS* para receber binimetinibe ou dacarbazina²⁹⁶. A SLP foi prolongada com binimetinibe do que com dacarbazina (2,8 x 1,5 meses, HR 0,62; IC 95% 0,47-0,80). A TRO também aumentou com binimetinibe (15% x 7%). No entanto, não houve diferença significativa

na SG (11 x 10 meses) em uma análise interina pré-especificada. Aproximadamente 45% dos pacientes do estudo foram submetidos à imunoterapia subsequente, o que pode ter mascarado qualquer diferença de SG.

As mutações no gene *KIT* são observadas em, aproximadamente, 15 a 20% dos pacientes com melanomas acrais ou de mucosa, e em uma porcentagem menor de melanomas que surgem em áreas de danos crônicos na pele. Os estudos de

fase II usando imatinibe ou nilotinibe em grupos de pacientes com melanoma avançado demonstraram apenas evidências mínimas de atividade²⁹⁷.

Os rearranjos de *NTRK* podem ser encontrados em um pequeno subconjunto de melanomas cutâneos e de mucosa. Recentemente, o inibidor da NTRK, o larotrectinibe, demonstrou uma taxa de resposta objetiva de 78% em tumores com fusões da família NTRK, independentemente da histologia²⁹⁸.

Tabela 9. Principais alterações somáticas no melanoma

Tipo de melanoma	Gene / Alteração	Teste	Comentário
Todos os melanomas	NTRK 1-3 (fusão) (0,8%) BRAF (40-60%) NRAS (15-20%) KIT (10-15%)	IHQ pan-TRK como triagem para fusão de NTRK 1-3; se positivo, confirmar com NGS NGS para as outras alterações	Pesquisar mutações em KIT em melanoma acral ou de mucosa

Tumores do sistema nervoso central

› Gliomas do adulto

Para quem e quando um teste de painel somático deve ser solicitado? Qual o melhor momento?

1. A investigação de mutações somáticas deve ser solicitada para todo paciente com diagnóstico de glioma difuso (tipo de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte);

2. A investigação de mutações somáticas deve ser solicitada preferencialmente no momento do diagnóstico (tipo

de recomendação: baseado em evidência; força de recomendação: forte).

O que deve ser pesquisado em um painel de mutações somáticas (quais genes devem ser incluídos e quais alterações são esperadas de cada gene)?

3. A presença da mutação de *IDH* deve ser pesquisada para gliomas difusos do adulto (astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas) no momento do diagnóstico (tipo de recomendação: baseada em evidência; força de recomendação: forte);

4. A perda completa dos braços cromossômicos 1p e 19q (co-

deleção de 1p/19q) deve ser pesquisada em pacientes adultos com diagnóstico de glioma difuso, com fenótipo oligodendroglioma e que apresentam mutação do gene *IDH* (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

5. Nos gliomas difusos com histologia astrocítica, perda de *ATRX* e mutação em *TP53* não se recomenda a pesquisa de co-deleção (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

6. A presença da mutação *K27M* no gene da família H3 da histona 3A (*H3F3A*) deve ser pesquisada em todos os pacien-

tes adultos com diagnóstico de glioma difuso de linha média (medula espinhal, tálamo, tronco e cerebelo) (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

7. A presença de fusão dos genes *NTRK* deve ser pesquisada em pacientes com diagnóstico de glioma difuso (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

8. A pesquisa da mutação *V600E* de *BRAF* deve ser pesquisada em casos selecionados; em adultos, principalmente no xantastrocitoma pleomórfico (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

9. A pesquisa de amplificação do *EGFR*, ganho do cromossomo 7, perda do cromossomo 10 e presença da mutação do promotor *TERT* pode ser considerada em pacientes com astrocitoma difuso e *IDH* selvagem (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada);

10. A pesquisa de mutações de *ATRX*, de *TP53*, além de pesquisa de deleção homozigótica em *CDKN2A* e/ou *CDKN2B*, podem ser consideradas em pacientes com diagnóstico de glioma difuso com mutação de *IDH* (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: moderada).

Como? Quais plataformas ou testes são mais apropriados?

11. Mutações de *IDH*: IHQ para mutação *IDH1* com anticorpo R132H é considerada o método preferencial. Casos negativos deverão sempre seguir para análise por sequenciamento (tipo de recomendação: baseada

em evidência; força da recomendação: forte);

12. Codeleção 1p/19q: *FISH* é o método de escolha para avaliação de codeleção 1p/19q em pacientes com diagnóstico de glioma difuso e mutação de *IDH*, embora não exista consenso sobre o padrão-ouro. Na indisponibilidade do método, a IHQ indicando mutação de *ATRX* (mostrando perda da expressão nuclear de *ATRX*) é considerada característica de astrocitomas e mutuamente excludente com a presença de codeleção 1p/19q. Outros métodos podem ser utilizados como alternativa (ex: *CISH*, *PCR-based microsatellite analysis*, *RT-PCR*, *MLPA*, *SNP array*). O teste ideal deve identificar a perda parcial ou completa dos braços cromossômicos (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

13. Mutação *H3K27M*: IHQ é o método preferencial em pacientes com diagnóstico de glioma difuso de linha média. Métodos de sequenciamento podem ser empregados como alternativa (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

14. Fusões do gene *NTRK*: métodos de sequenciamento que identifiquem fusões gênicas são o método de escolha para identificação dessas alterações em tumores de SNC. A IHQ não é adequada nesse cenário por apresentar alto índice de falso-positividade (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

15. Amplificação de *EGFR*, ganho do cromossomo 7, perda do cromossomo 10, presença da mutação do promotor *TERT* e pesquisa de deleção

homozigótica em *CDKN2A* e/ou *CDKN2B*: preferencialmente solicitadas dentro de um painel de sequenciamento amplo. Como alternativa, *FISH* ou técnicas citogenéticas de alta resolução (por exemplo, *array-CGH*, *SNP arrays*, *methylation arrays*) podem ser usadas para detectar deleções homozigóticas de *CDKN2A/CDKN2B* e perdas cromossômicas (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: intermediária);

16. Mutações de *ATRX* e de *TP53*: podem ser pesquisadas por IHQ, principalmente com o intuito de diagnóstico. Como alternativa, podem ser avaliadas em um painel de sequenciamento (tipo de recomendação: baseada em evidência; força da recomendação: forte);

17. Mutação *V600E* de *BRAF*: preferencialmente, recomenda-se a pesquisa em um painel de sequenciamento gênico. Como alternativa, pode ser pesquisada por IHQ (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: forte);

18. Avaliação de alterações somáticas em DNA circulante tumoral (biópsia líquida) não deve ser considerada em tumores de SNC (tipo de recomendação: consenso formal; força da recomendação: intermediária).

Discussão

Testes moleculares foram incorporados na Classificação de Tumores Primários do SNC, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016²⁹⁹. Esses testes devem, portanto, ser solicitados no momento do diagnóstico. Além disso, a maioria também possui importante papel prognóstico. As mutações de isocitrato desidrogenase

(*IDH*) tipo 1 ou 2 foram identificadas como eventos iniciais no desenvolvimento de gliomas difusos. Estão presentes em todos os tumores oligodendrogliais e são mais comuns em pacientes com diagnóstico de glioma difuso grau II da OMS (59-90% dos casos) quando comparados aos gliomas grau III (28-82% dos casos) e gliomas grau IV (10% dos casos). Sua presença confere um melhor prognóstico frente aos tumores com *IDH* selvagem. Quando observadas no glioma de alto grau, sugerem que o tumor tenha se desenvolvido a partir de uma lesão precursora de baixo grau. Cerca de 80-90% dos casos são identificados por IHQ (IHQ), que também pode ajudar a diferenciar gliose reativa de infiltração tumoral³⁰⁰. O sequenciamento genético pode ser utilizado em casos de testes imuno-negativos. O desenvolvimento de terapias inibidoras de *IDH* representam uma estratégia promissora e pode conferir papel preditivo ao marcador³⁰¹.

Para o diagnóstico de oligodendroglioma é necessária a presença da mutação *IDH1/2* associada à codeleção 1p/19q. Esta é causada por uma translocação não balanceada entre os cromossomos 19 e 1, com perda total de um cromossomo híbrido t(1p;19q) e perda da heterozigose. Um dos testes mais práticos para a detecção da codeleção 1p/19q é o FISH (hibridização por fluorescência *in situ*), embora possa resultar falso-positivo em deleções parciais ou incompletas. A codeleção 1p/19q é amplamente reconhecida como um marcador prognóstico e preditivo, associada à sobrevida prolongada dos pacientes, além de melhor resposta à quimioterapia³⁰². Quase todos os tumores oligodendrogliais, com codeleção 1p/19q e mutação *IDH*, apre-

sentam mutações ativadoras na região promotora do gene da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*). Contudo, vale lembrar que essas mutações também são frequentes nos glioblastomas *IDH* selvagem, conferindo pior prognóstico nesse cenário³⁰³.

A mutação do *TP53* é identificada em 36-60% dos gliomas em adultos. Já a perda da expressão do *ATRX* está fortemente associada às mutações *IDH1/2* e foi identificada em 65-97% dos astrocitomas com mutação *IDH1/2*. Sua concordância com mutações no *TP53* ocorre em 70-94% dos casos. É importante ressaltar que as mutações *ATRX* e *TP53* são quase mutuamente excludentes da presença de codeleção 1p/19q, portanto, sua identificação pode ser utilizada como método de triagem³⁰⁴.

O glioma difuso de linha média com mutação *H3K27M* é identificado como um subgrupo que abriga uma mutação *K27M* no gene da família H3 da histona 3A (*H3F3A*), ou no gene da família H3 de histonas do cluster 1/B (*HIST1H3B/C*). Apresenta um fenótipo glial e um padrão difuso de crescimento, além de estar localizado na linha média. Morfologia e alterações moleculares são importantes para sua definição, uma vez que as mutações no *H3K27M* não são exclusivas dos gliomas da linha média. Esse tumor ocorre predominantemente em pacientes jovens, com localização na linha média (medula espinhal, tálamo, tronco cerebral e cerebelo), e possui um pior prognóstico, com taxa de sobrevida de dois anos abaixo de 10% e sobrevida mediana de nove meses. A presença da mutação *H3K27M* pode ser demonstrada de forma confiável usando IHQ³⁰⁵.

O entendimento sobre como as alterações moleculares afetam a tipagem e a classificação dos tumores no SNC continua evoluindo. Além dos já mencionados marcadores obrigatórios para o diagnóstico, atualizações propostas pelo *Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy* (consórcio *cIMPACT-NOW*) sugerem outras alterações com potencial impacto prognóstico. Pela proposta, um astrocitoma difuso *IDH* selvagem, com mutação do promotor *TERT* e/ou amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e/ou de ganho combinado do cromossomo 7, associado à perda do cromossomo 10, seria classificado como um tumor grau IV pela OMS. A sobrevida dos pacientes com esses tumores é semelhante a dos pacientes com glioblastoma (com achados histológicos clássicos), *IDH* selvagem, grau IV da OMS³⁰⁶.

Da mesma forma, astrocitomas anaplásicos (OMS grau III) *IDH* mutados deveriam ser testados quanto à presença de deleção homozigótica de *CDKN2A/B* e, caso esta esteja presente, o tumor deveria ser designado como grau 4. Atividade mitótica permanece como critério de graduação. Proliferação microvascular e necrose continuam sendo critérios para diagnosticar um tumor grau 4, embora esses tumores possam se comportar de forma menos agressiva, sobretudo se não apresentarem deleção homozigótica de *CDKN2A/B*. Na prática neuropatológica, FISH ou técnicas citogenéticas de alta resolução (por exemplo, *array-CGH*, *SNP arrays*, *methylation arrays*) podem ser usadas para detectar deleções homozigóticas de *CDKN2A/B*³⁰³.

Alterações de *BRAF* podem caracterizar subtipos de gliomas. Em adultos, as mutações pontuais tipo *V600E* de *BRAF* estão presentes em até dois terços dos xantastrocitomas pleomórficos. Ocasionalmente, gliomas difusos também podem apresentar essa alteração, com potencial preditivo para utilização de terapia-alvo. Um anticorpo específico está disponível para detecção da mutação *V600E* por IHQ, mas também pode ser detectada por sequenciamento³⁰⁷.

A família TRK de receptores transmembrana é composta por três proteínas, TRKA, TRKB

e TRKC, que são codificadas, respectivamente, pelos genes *NTRK1*, *NTRK 2* e *NTRK 3*. Esses receptores possuem papel crucial no desenvolvimento do sistema nervoso durante a embriogênese e permanecem expressos após o nascimento, no tecido neuronal. Fusões patogênicas envolvendo os genes *NTRK* resultam em oncoproteínas. Trata-se de uma alteração agnóstica rara, porém potencialmente presente em qualquer tipo tumoral. Em tumores primários de SNC, a frequência reportada é <1%, podendo ser mais alta em gliomas pediátricos³⁰⁸. O desenvolvimento de te-

rapia-alvo, com medicamentos inibidores de TRK, tornou obrigatória a investigação dessas alterações em todos os tipos de tumor. Especificamente em tecido proveniente de tumores do SNC, a IHQ, embora disponível, é inadequada pelo alto índice de resultados falso-positivos^{309,310}.

A prática neuro-oncológica atual depende cada vez mais do diagnóstico molecular do tecido tumoral. A classificação de tumores de acordo com achados histológicos, integrados a achados moleculares, é diagnóstica, prognóstica e potencialmente terapêutica.

Tabela 10. Principais alterações somáticas em gliomas

Gene / Alteração	Teste	Comentário
<ul style="list-style-type: none"> • <i>NTRK 1-3</i> (fusão) (<1%) • <i>1p/19q</i> (codeleção) (somente oligodendrogliomas) • <i>IDH</i> (até 90% casos de glioma grau II) <ul style="list-style-type: none"> • <i>ATRX</i> • <i>TP53</i> (36-60%) <ul style="list-style-type: none"> • <i>H3K27M</i> (gliomas de linha média) <ul style="list-style-type: none"> • <i>BRAF</i> (<i>V600E</i>) (1-5% gliomas difusos do adulto) • <i>EGFR</i> • Alterações citogenéticas: • Ganho do cromossomo 7, perda de cromossomo 10 e presença da mutação do promotor de <i>TERT</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • IHQ pan-TRK como triagem para fusão de <i>NTRK 1-3</i>, se positivo confirmar com NGS • FISH • NGS • Hibridização genômica comparativa (<i>CGH-array</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutações no gene da família H3 da histona 3A (<i>H3F3A</i>) estão presentes nos tumores de linha média • Mutações na região promotora de <i>TERT</i> estão presentes no astrocitoma difuso e gliomas <i>IDH</i> selvagem

Capítulo 4:

CONSIDERAÇÕES FINAIS NA INTERPRETAÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS E ACIONABILIDADE CLÍNICA

Na última década, painéis somáticos começaram a ser rapidamente adotados para a identificação de alterações genômicas que pudessem auxiliar na tomada de decisão sobre a seleção de terapias-alvo e manejo do paciente^{10,311-315}. Hoje, centenas de laboratórios em todo o mundo fornecem resultados de testes genômicos baseados em painéis somáticos, gerando dezenas de milhares de laudos a cada ano. Contudo, ainda há pouca uniformidade quanto aos mecanismos de análises de variantes e padronização de laudos de sequenciamento³¹⁶⁻³¹⁸.

Apesar do desenvolvimento de recomendações para a validação de testes de NGS³¹⁹, muitos desafios permanecem na detecção de mutações somáticas. Entre esses desafios, encontram-se a detecção de alterações subclonais ou variantes em amostras de tumor de baixa pureza, bem como a distinção de alterações da linhagem germinativa ou de artefatos relacionados à amplificação ou sequenciamento durante a reação em cadeia da polimerase (PCR). Comparações diretas de testes de NGS desenvolvidos em laboratórios que utilizam técnicas distintas de processamento e sequenciamento da amostra demonstram discordância de resultados, o que traz

preocupação com relação à precisão de tais testes³²⁰⁻³²².

Uma análise recente dos algoritmos *in silico*, mais comumente utilizados para chamada de mutação, revelou que os métodos existentes para a detecção de mutação somática podem ser influenciados por fatores que geram resultados falso-positivos e falso-negativos³²³. Abordagens computacionais que implementam aprendizado de máquina para análises direta dos dados brutos de sequenciamento paralelo podem ser úteis na minimização do montante de chamadas falso-positivas, otimizando a sensibilidade para detecção de alterações reais do tumor³²³.

A anotação final de variantes clinicamente relevantes requer suporte computacional validado para a acurada interpretação de mutações acionáveis de uma determinada neoplasia^{324,325}. Por outro lado, sabe-se que a curadoria manual é parte essencial no processo de geração dos laudos e das bases de dados públicas de mutações somáticas^{326,327}. A padronização do processo de curadoria pode melhorar o controle de qualidade e a interoperabilidade entre os bancos de dados disponíveis, facilitando a aprovação regulatória desses esforços de interpretação clínica de variantes^{20,328}. Nos últimos

anos, duas importantes bases de dados têm se destacado como ferramentas públicas de curadoria de variantes somáticas em câncer: OncoKB e CIViC, desenvolvidas, respectivamente, pelo Memorial Sloan Kettering Cancer Center³²⁹ e pela Washington University School of Medicine³³⁰.

A base de dados OncoKB (*Precision Oncology Knowledge Base*) inclui informações biológicas, clínicas e terapêuticas, com curadoria de recursos provenientes de informações não estruturadas, incluindo recomendações e diretrizes do FDA (*Food and Drug Administration*), da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e de grupos de especialistas³²⁹. Uma vez que as implicações clínicas variam substancialmente com base na alteração específica em um determinado gene e no contexto do tumor, as informações na OncoKB são hierarquicamente organizadas por gene, alteração, tipo de neoplasia e potenciais implicações clínicas. As informações da OncoKB estão publicamente disponíveis por meio de um site interativo (<http://oncokb.org/>) e incorporadas ao cBioPortal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org/>)^{331,332}, facilitando a interpretação de dados genômicos complexos para oncologistas e pesquisadores de câncer. Até o momento, a OncoKB

anotou mais de 5.300 alterações em 682 genes associados ao câncer em 55 tipos de tumores.

A base de dados CIViC (*Clinical Interpretation of Variants in Cancer*) contém, atualmente, 7.532 interpretações curadas de relevância clínica para 2.622 variantes que afetam 431 genes (<https://civicdb.org/home>). Essas interpretações foram selecionadas a partir de 2.737 estudos publicados por 256 curadores da CIViC³³⁰. Os registros de evidência CIViC são apoiados por uma ampla gama de

níveis de evidência, atualmente focada em alterações somáticas e em associações positivas com resposta ao tratamento. Pelo menos um registro de evidência foi criado para 309 subtipos de câncer e 454 fármacos, sendo a maioria dos dados disponíveis para acionabilidade de genes em câncer de pulmão, mama, colorretal e tumores hematológicos.

Desde o lançamento público do CIViC em junho de 2015, curadores externos (não afiliados à *Washington University*)

contribuíram com quase metade de todos os registros de evidências nessa base de dados, indicando a importância de colaborações externas longitudinais na curadoria de variantes somáticas. Assim como a OncoKB, a base CIViC pode ser acessada gratuitamente sem necessidade de inscrição ou *login*. Tanto a adoção acadêmica quanto comercial dessas bases de dados devem ser amplamente incentivadas por oncologistas, cirurgiões oncológicos, radio-oncologistas, patologistas e pesquisadores em geral.



REFERÊNCIAS

1. SANGER, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687-95, 1977. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
2. REDDY, E. P.; REYNOLDS, R. K.; SANTOS, E.; BARBACID, M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. **Nature**, v. 300, n. 5888, p. 149-52, 1982. <https://doi.org/10.1038/300149a0>
3. LYNCH, T. J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **The New England journal of medicine**, v. 350, n. 21, p. 2129-39, 2004. <https://doi.org/10.1056/nejmoa040938>
4. INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931-45, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
5. MEYERSON, M.; GABRIEL, S.; GETZ, G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 10, p. 685-96, 2010. <https://doi.org/10.1038/hrg2841>
6. MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 198-203, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature09796>
7. WAGLE, N. *et al.* High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. **Cancer discovery**, v. 2, n. 1, p. 82-93, 2012. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-11-0184>
8. ROYCHOWDHURY, S. *et al.* Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. **Science translational medicine**, v. 3, n. 111, p. 111ra21, 2011. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003161>
9. MERIC-BERNSTAM, F.; FARHANG-FAR, C.; MENDELSON, J.; MILLS, G. B. Building a personalized medicine infrastructure at a major cancer center. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 15, p. 1849-57, 2013. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.45.3043>
10. FRAMPTON, G. M. *et al.* Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. **Nat Biotechnol**, v. 31, n. 11, p. 1023-31, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2696>
11. KALEMKERIAN, G. P. *et al.* Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 9, p. 911-9, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.76.7293>
12. YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 141, n. 11, p. 1544-57, 2017. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-ra>
13. SAMORODNITSKY, E. *et al.* Evaluation of Hybridization Capture Versus Amplicon-Based Methods for Whole-Exome Sequencing. **Hum Mutat**, v. 36, n. 9, p. 903-14, 2015. <https://doi.org/10.1002/humu.2282514>. CHANG, F.; LI, M. M. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. **Cancer Genet**, v. 206, n. 12, p. 413-9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cancer-gen.2013.10.003>
14. KOBOLDT, D. C.; STEINBERG, K. M.; LARSON, D. E.; WILSON, R. K.; MARDIS, E. R. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 27-38, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>
15. MAMANOVA, L. *et al.* Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. **Nat Methods**, v. 7, n. 2, p. 111-8, 2010. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1419>
16. NG, S. B. *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 272-6, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08250>
17. REHM, H. L. *et al.* ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. **Genet Med**, v. 15, n. 9, p. 733-47, 2013. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.92>
18. RICHMAN, S. D. *et al.* Results of the UK NEQAS for Molecular Genetics reference sample analysis. **J Clin Pathol**, v. 71, n. 11, p. 989-94, 2018. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205277>
19. LI, M. M. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. **J Mol Diagn**, v. 19, n. 1, p. 4-23, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>
20. KRIS, M. G. *et al.* Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. **Jama**, v. 311, n. 19, p. 1998-2006, 2014. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741>
21. LINDEMAN, N. I. *et al.* Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 142, n. 3, p. 321-46, 2018. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-cp>
22. JAMAL-HANJANI, M. *et al.* Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 376, n. 22, p. 2109-21, 2017. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1616288>
23. ETTINGER, D. S. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2020. **Journal of the National Comprehensive**

- sive Cancer Network**, v. 17, n. 12, p. 1464-72, 2019. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0059>
25. WU, Y. L. *et al.* Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 383, n. 18, p. 1711-23, 2020. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2027071>
26. PLANCHARD, D. *et al.* Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**, v. 29, suppl 4, iv192-iv237, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>
27. MOK, T. S. *et al.* Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 376, n. 7, p. 629-40, 2017. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1612674>
28. MCCUSKER, M. G.; RUSSO, A.; SCILLA, K. A.; MEHRA, R.; ROLFO, C. How I treat ALK-positive non-small cell lung cancer. **ESMO open**, v. 4, suppl 2, e000524, 2019. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fesmooopen-2019-000524>
29. SHAW, A. T. *et al.* Crizotinib in ROS-1-rearranged non-small-cell lung cancer. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 21, p. 1963-71, 2014. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1406766>
30. LI, S. *et al.* Coexistence of EGFR with KRAS, or BRAF, or PIK3CA somatic mutations in lung cancer: a comprehensive mutation profiling from 5125 Chinese cohorts. **British journal of cancer**, v. 110, n. 11, p. 2812-20, 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.210>
31. LEONETTI, A. *et al.* BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Picking another brick in the wall. **Cancer treatment reviews**, v. 66, p. 82-94, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.006>
32. DRILON, A. *et al.* Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. **The New England journal of medicine**, v. 378, n. 8, p. 731-9, 2018. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1714448>
33. EKMAN, S. HER2: defining a Neu target in non-small-cell lung cancer. **Annals of oncology**, v. 30, n. 3, p. 353-5, 2019. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz043>
34. DRILON, A. *et al.* Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. **Nature medicine**, v. 26, n. 1, p. 47-51, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0716-8>
35. GARON, E. B. *et al.* Capmatinib in METex14-mutated (mut) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Results from the phase II GEOMETRY mono-1 study, including efficacy in patients (pts) with brain metastases (BM). **AACR 2020**, v. 80, n. 16, p. CT082, 2020. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM-2020-CT082>
36. DRILON, A. *et al.* Registrational Results of LIBRETTO-001: A Phase 1/2 Trial of LOXO-292 in Patients with RET Fusion-Positive Lung Cancers. **J Thorac Oncol**, v. 14, n. 10, p. S6-7, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.059>
37. RECKAMP, K. L. Molecular Targets Beyond the Big 3. **Thoracic surgery clinics**, v. 30, n. 2, p. 157-64, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2020.01.004>
38. DONG, L. *et al.* Clinical Next Generation Sequencing for Precision Medicine in Cancer. **Current genomics**, v. 16, n. 4, p. 253-63, 2015. <https://doi.org/10.2174/1389202915666150511205313>
39. DANIELS, M. *et al.* Whole genome sequencing for lung cancer. **Journal of thoracic disease**, v. 4, n. 2, p. 155-63, 2012. <https://dx.doi.org/10.3978%2Fj.issn.2072-1439.2012.02.01>
40. SEQUIST, L. V. *et al.* Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. **Annals of oncology**, v. 22, n. 12, p. 2616-24, 2011. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr489>
41. LEVY, B. P. *et al.* Molecular Testing for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: How to Implement Evidence-Based Recommendations. **The oncologist**, v. 20, n. 10, p. 1175-81, 2015. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0114>
42. PENNEL, N. A. *et al.* Economic Impact of Next-Generation Sequencing Versus Single-Gene Testing to Detect Genomic Alterations in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer Using a Decision Analytic Model. **JCO Precision Oncology**, 2019. <https://doi.org/10.1200/PO.18.00356>
43. FRANCIS, G.; STEIN, S. Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 14122-42, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160614122>
44. KRISHNAMURTHY, N.; SPENCER, E.; TORKAMANI, A.; NICHOLSON, L. Liquid Biopsies for Cancer: Coming to a Patient near You. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 1, p. 3, 2017. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fjcm6010003>
45. CHENG, F.; SU, L.; QIAN, C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 48832-41, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9453>
46. SHU, Y. *et al.* Circulating Tumor DNA Mutation Profiling by Targeted Next Generation Sequencing Provides Guidance for Personalized Treatments in Multiple Cancer Types. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 583, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00520-1>
47. CHEN, K. Z. *et al.* Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing. **Scientific reports**, v. 6, p. 31985, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep31985>
48. SCHWAEDERLE, M. C. *et al.* Utility of Genomic Assessment of Blood-Derived Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 17, p. 5101-11, 2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-2497>
49. CHAE, Y. K. *et al.* Concordance between genomic alterations asses-

- sed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65364-73, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11692>
50. LINDEMAN, N. I. *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 of Molecular Pathology. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 8, n. 7, p. 823-59, 2013. <https://doi.org/10.1097/jto.0b013e318290868f>
51. SHOLL, L. M. *et al.* ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 37, n. 9, p. 1441-9, 2013. <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e3182960fa7>
52. LEEMANS, C. R.; SNIJDERS, P. J. F.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269-82, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>
53. MAGHAMI, E. *et al.* Diagnosis and Management of Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary in the Head and Neck: ASCO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 22, p. 2570-96, 2020. <https://doi.org/10.1200/jco.20.00275>
54. BURTNESS, B. *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. **Lancet**, v. 394, n. 10.212, p. 1915-28, 2019. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32591-7)
55. report EA. Pembrolizumab in head and neck cancer. 2020. (INCOMPLETO)
56. SKALOVA, A. *et al.* Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 5, p. 599-608, 2010. <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e3181d9efcc>
57. BISHOP, J. A.; YONESCU, R.; BATTISTA, D.; BEGUM, S.; EISELE, D.W.; WESTRA, W. H. Utility of mammaglobin immunohistochemistry as a proxy marker for the ETV6-NTRK3 translocation in the diagnosis of salivary mammary analogue secretory carcinoma. **Hum Pathol**, v. 44, n. 10, p. 1982-8, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.03.017>
58. BOON, E. *et al.* Clinicopathological characteristics and outcome of 31 patients with ETV6-NTRK3 fusion gene confirmed (mammary analogue) secretory carcinoma of salivary glands. **Oral Oncol**, v. 82, p. 29-33, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.04.022>
59. URANO, M.; NAGAO, T.; MIYABE, S.; ISHIBASHI, K.; HIGUCHI, K.; KURODA, M. Characterization of mammary analogue secretory carcinoma of the salivary gland: discrimination from its mimics by the presence of the ETV6-NTRK3 translocation and novel surrogate markers. **Hum Pathol**, v. 46, n. 1, p. 94-103, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.09.012>
60. PENAULT-LLORCA, F.; RUDZINSKI, E. R.; SEPULVEDA, A. R. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. **J Clin Pathol**, v. 72, n. 7, p. 460-7, 2019. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205679>
61. BRZEZIANSKA, E.; KARBOWNIK, M.; MIGDALSKA-SEK, M.; PASTUSZAK-LEWANDOSKA, D.; WLOCH, J.; LEWINSKI, A. Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. **Mutat Res**, v. 599, n. 1-2, p. 26-35, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.013>
62. SOLOMON, J. P. *et al.* NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. **Modern pathology**, v. 33, n. 1, p. 38-46, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0324-7>
63. OKAMURA, R.; BOICHARD, A.; KATO, S.; SICKLICK, J. K.; BAZHE-NOVA, L.; KURZROCK, R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. **JCO Precision Oncology**, 2018. <https://doi.org/10.1200/po.18.00183>
64. STRANSKY, N.; CERAMI, E.; SCHALM, S.; KIM, J. L.; LENGAUER, C. The landscape of kinase fusions in cancer. **Nature Communications**, v. 5, p. 4846, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms5846>
65. HECHTMAN, J. F. *et al.* Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 41, n. 11, p. 1547-51, 2017. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000000911>
66. SOLOMON, J. P.; BENAYED, R.; HECHTMAN, J. F.; LADANYI, M. Identifying patients with NTRK fusion cancer. **Annals of Oncology**, v. 30, suppl 8, p. viii16-viii22, 2019. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz384>
67. DOEBELE, R. C. *et al.* Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 2, p. 271-82, 2020. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30691-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30691-6)
68. LOCATI, L. D. *et al.* Treatment relevant target immunophenotyping of 139 salivary gland carcinomas (SGCs). **Oral Oncol**, v. 45, n. 11, p. 986-90, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.05.635>
69. CLAUDITZ, T. S. *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in salivary gland carcinomas. **Pathology**, v. 43, n. 5, p. 459-64, 2011. <https://doi.org/10.1097/pat.0b013e3283484a60>
70. BOON, E. *et al.* A clinicopathological study and prognostic factor analysis of 177 salivary duct carcinoma patients from The Netherlands. **Int J Cancer**, v. 143, n. 4, p. 758-66, 2018. <https://doi.org/10.1002/ijc.31353>
71. GILBERT, M. R. *et al.* A 20-Year Review of 75 Cases of Salivary Duct

- Carcinoma. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 142, n. 5, p. 489-95, 2016. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2015.3930>
72. DALIN, M. G. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of Salivary Duct Carcinoma Reveals Actionable Targets and Similarity to Apocrine Breast Cancer. **Clinical cancer research**, v. 22, n. 18, p. 4623-33, 2016. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-0637>
73. MASUBUCHI, T. *et al.* Clinicopathological significance of androgen receptor, HER2, Ki-67 and EGFR expressions in salivary duct carcinoma. **Int J Clin Oncol**, v. 20, n. 1, p. 35-44, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10147-014-0674-6>
74. SHIMURA, T. *et al.* Prognostic and histogenetic roles of gene alteration and the expression of key potentially actionable targets in salivary duct carcinomas. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 1852-67, 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22927>
75. TAKASE, S. *et al.* Biomarker immunoprofile in salivary duct carcinomas: clinicopathological and prognostic implications with evaluation of the revised classification. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 59023-35, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19812>
76. DAGRADA, G. P. *et al.* HER-2/neu assessment in primary chemotherapy treated breast carcinoma: no evidence of gene profile changing. **Breast Cancer Res Treat**, v. 80, n. 2, p. 207-14, 2003. <https://doi.org/10.1023/a:1024579206250>
77. WOLFF, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, 2013. <https://doi.org/10.1200/jco.2013.50.9984>
78. TAKAHASHI, H. *et al.* Phase II Trial of Trastuzumab and Docetaxel in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Salivary Duct Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 2, p. 125-34, 2019. <https://doi.org/10.1200/jco.18.00545>
79. LIMAYE, S. A. *et al.* Trastuzumab for the treatment of salivary duct carcinoma. **The oncologist**, v. 18, n. 3, p. 294-300, 2013. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0369>
80. PERISSINOTTI, A. J.; LEE PIERCE, M.; PACE, M. B.; EL-NAGGAR, A.; KIES, M. S.; KUPFERMAN, M. The role of trastuzumab in the management of salivary ductal carcinomas. **Anticancer Res**, v. 33, n. 6, p. 2587-91, 2013.
81. PARK, J. C. *et al.* Exceptional responses to pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in human epidermal growth factor receptor-2 high expressing salivary duct carcinomas. **Head Neck**, v. 40, n. 12, p. E100-E6, 2018. <https://doi.org/10.1002/hed.25392>
82. KURZROCK, R. *et al.* Targeted therapy for advanced salivary gland carcinoma based on molecular profiling: results from MyPathway, a phase IIa multiple basket study. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 3, p. 412-21, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.018>
83. JHAVERI, K. L. *et al.* Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-amplified tumors excluding breast and gastric/gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinomas: results from the NCI-MATCH trial (EAY131) subprotocol Q. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 11, p. 1821-30, 2019. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz291>
84. SWED, B. L.; COHEN, R. B.; AGGARWAL, C. Targeting HER2/neu Oncogene Overexpression With Ado-Trastuzumab Emtansine in the Treatment of Metastatic Salivary Gland Neoplasms: A Single-Institution Experience. **JCO Precision Oncology**, v. 3, 2019. <https://doi.org/10.1200/po.18.00351>
85. TSURUTANI, J. *et al.* Targeting HER2 with Trastuzumab Deruxtecan: A Dose-Expansion, Phase I Study in Multiple Advanced Solid Tumors. **Cancer discovery**, v. 10, n. 5, p. 688-701, 2020. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-19-1014>
86. HANNA, G. J. *et al.* The Benefits of Adjuvant Trastuzumab for HER-2-Positive Salivary Gland Cancers. **The oncologist**, v. 25, n. 7, p. 598-608, 2020. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0841>
87. MITANI, Y. *et al.* Alterations associated with androgen receptor gene activation in salivary duct carcinoma of both sexes: potential therapeutic ramifications. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 24, p. 6570-81, 2014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-1746>
88. BUTLER, R. T.; SPECTOR, M. E.; THOMAS, D.; MCDANIEL, A. S.; MCHUGH, J. B. An immunohistochemical panel for reliable differentiation of salivary duct carcinoma and mucoepidermoid carcinoma. **Head Neck Pathol**, v. 8, n. 2, p. 133-40, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12105-013-0493-5>
89. CROS, J. *et al.* Expression and mutational status of treatment-relevant targets and key oncogenes in 123 malignant salivary gland tumours. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 10, p. 2624-9, 2013. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt338>
90. WILLIAMS, M. D. *et al.* Differential expression of hormonal and growth factor receptors in salivary duct carcinomas: biologic significance and potential role in therapeutic stratification of patients. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 31, n. 11, p. 1645-52, 2007. <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e-3180caa099>
91. LIANG, L.; WILLIAMS, M. D.; BELL, D. Expression of PTEN, Androgen Receptor, HER2/neu, Cytokeratin 5/6, Estrogen Receptor-Beta, HMGA2, and PLAG1 in Salivary Duct Carcinoma. **Head Neck Pathol**, v. 13, n. 4, p. 529-34, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12105-018-0984-5>
92. VISCUSE, P. V.; PRICE, K. A.; GARCIA, J. J.; SCHEMBRI-WISMAYER, D. J.; CHINTAKUNTLAWAR, A. V. First Line Androgen Deprivation Therapy vs. Chemotherapy for Patients With Androgen Receptor Positive Recurrent or Metastatic Salivary Gland Carcinoma-A Retrospecti-

- ve Study. **Front Oncol**, v. 9, p. 701, 2019. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffonc.2019.00701>
93. LOCATI, L. D. *et al.* Clinical activity of androgen deprivation therapy in patients with metastatic/relapsed androgen receptor-positive salivary gland cancers. **Head Neck**, v. 38, n. 5, p. 724-31, 2016. <https://doi.org/10.1002/hed.23940>
94. BOON, E. *et al.* Androgen deprivation therapy for androgen receptor-positive advanced salivary duct carcinoma: A nationwide case series of 35 patients in The Netherlands. **Head Neck**, v. 40, n. 3, p. 605-13, 2018. <https://doi.org/10.1002/hed.25035>
95. FUSHIMI, C. *et al.* A prospective phase II study of combined androgen blockade in patients with androgen receptor-positive metastatic or locally advanced unresectable salivary gland carcinoma. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 4, p. 979-84, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx771>
96. ISAACSSON VELHO, P. *et al.* Intraductal/ductal histology and lymphovascular invasion are associated with germline DNA-repair gene mutations in prostate cancer. **The Prostate**, v. 78, n. 5, p. 401-7, 2018. <https://doi.org/10.1002/pros.23484>
97. VAN BOXTEL, W. *et al.* Adjuvant androgen deprivation therapy for poor-risk, androgen receptor-positive salivary duct carcinoma. **Eur J Cancer**, v. 110, p. 62-70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.12.035>
98. NIKIFOROVA, M. N.; WALD, A. I.; ROY, S.; DURSO, M. B.; NIKIFOROV, Y. E. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 11, p. E1852-60, 2013. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2292>
99. YOUNIS, E. Oncogenesis of Thyroid Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 18, n. 5, p. 1191-9, 2017. <https://dx.doi.org/10.22034%2FAPJCP.2017.18.5.1191>
100. SANDULACHE, V. C. *et al.* Real-Time Genomic Characterization Utilizing Circulating Cell-Free DNA in Patients with Anaplastic Thyroid Carcinoma. **Thyroid**, v. 27, n. 1, p. 81-7, 2017. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0076>
101. SUBBIAH, V. *et al.* Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.73.6785>
102. XU, X. *et al.* Detection of BRAF V600E mutation in fine-needle aspiration fluid of papillary thyroid carcinoma by droplet digital PCR. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 91-6, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.017>
103. LE, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 26, p. 2509-20, 2015. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1500596>
104. OVERMAN, M. J. *et al.* Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 8, p. 773-9, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.76.9901>
105. MARABELLE, A. *et al.* Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 1, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1200/jco.19.02105>
106. ANDRE, T. *et al.* Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: The phase 3 KEYNOTE-177 Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 18, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.18_suppl.LBA4
107. WANG, F. *et al.* Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types. **JAMA oncology**, v. 5, n. 10, p. 1504-1506, 2019. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2963>
108. SARGENT, D. J. *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3219-26, 2010. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.1825>
109. SMYTH, E. C. *et al.* Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival: An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. **JAMA oncology**, v. 3, n. 9, p. 1197-203, 2017. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6762>
110. CHOI, Y. Y. *et al.* Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer: Post Hoc Analysis of the CLAS-SIC Randomized Controlled study. **Ann Surg**, v. 270, n. 2, p. 309-16, 2019. <https://doi.org/10.1097/sla.0000000000002803>
111. GATALICA, Z.; XIU, J.; SWENSEN, J.; VRANIC, S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. **Modern pathology**, v. 32, n. 1, p. 147-53, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0118-3>
112. COCCO, E. *et al.* Colorectal Carcinomas Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. **Cancer Res**, v. 79, n. 6, p. 1047-53, 2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-3126>
113. AKIYAMA, T.; SUDO, C.; OGAWARA, H.; TOYOSHIMA, K.; YAMAMOTO, T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. **Science**, v. 232, n. 4758, p. 1644-6, 1986. <https://doi.org/10.1126/science.3012781>
114. VAN CUTSEM, E.; SAGAERT, X.; TOPAL, B.; HAUSTERMANS, K.; PRENEN, H. Gastric cancer. **Lancet**, v. 388, n. 10060, p. 2654-64, 2016. <https://doi.org/10.1016/s0140->

115. VAN CUTSEM, E. *et al.* HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. **Gastric Cancer**, v. 18, n. 3, p. 476-84, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10120-014-0402-y>
116. SHITARA, K. *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. 2419-30, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2004413
117. JUSAKUL, A. *et al.* Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. **Cancer discovery**, v. 7, n. 10, p. 1116-35, 2017. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-17-0368>
118. JAVLE, M. *et al.* Biliary cancer: Utility of next-generation sequencing for clinical management. **Cancer**, v. 122, n. 24, p. 3838-47, 2016. <https://doi.org/10.1002/cncr.30254>
119. ABOU-ALFA, G. K. *et al.* Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 5, p. 671-84, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30109-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30109-1)
120. BATTAGLIN, F. *et al.* Comprehensive molecular profiling of IDH1/2 mutant biliary cancers (BC). **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 4, p. 479-479, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.479
121. ABOU-ALFA, G. K. *et al.* Ivosidenib in IDH1-mutant, chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma (ClarIDHy): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 6, p. 796-807, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30157-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30157-1)
122. WAINBERG, Z. A. *et al.* Efficacy and safety of dabrafenib (D) and trametinib (T) in patients (pts) with BRAF V600E-mutated biliary tract cancer (BTC): A cohort of the ROAR basket trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 4, p. 187, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.4_suppl.187
123. JAVLE, M. *et al.* HER2/neu-directed therapy for biliary tract cancer. **J Hematol Oncol**, v. 8, p. 58, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0155-z>
124. MERIC-BERNSTAM, F. *et al.* Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 4, p. 518-30, 2019. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30904-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30904-5)
125. MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 459-65, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1097>
126. ANDREYEV, H. J. *et al.* Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 5, p. 692-6, 2001. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1964>
127. SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLAG, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295-308, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2109>
128. VAN CUTSEM, E. *et al.* Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 2011-9, 2011. <https://doi.org/10.1200/jco.2010.33.5091>
129. DOUILLARD, J. Y. *et al.* Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 31, p. 4697-705, 2010. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.4860>
130. DOUILLARD, J. Y. *et al.* Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 11, p. 1023-34, 2013. DOI: 10.1056/NEJMoa1305275
131. KARAPETIS, C. S. *et al.* K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 17, p. 1757-65, 2008. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0804385>
132. AMADO, R. G. *et al.* Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 10, p. 1626-34, 2008. <https://doi.org/10.1200/jco.2007.14.7116>
133. RAJAGOPALAN, H.; BARDELLI, A.; LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V. E. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 934, 2002. <https://doi.org/10.1038/418934a>
134. SELIGMANN, J. F. *et al.* Exploring the poor outcomes of BRAF mutant (BRAF mut) advanced colorectal cancer (aCRC): Analysis from 2,530 patients (pts) in randomized clinical trials (RCTs). **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 15, p. 3509-3509, 2015. DOI: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.3509
135. DE ROOCK, W. *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 753-62, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70130-3)
136. LOUPAKIS, F. *et al.* Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 17, p. 1609-18, 2014. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1403108>
137. KOPETZ, S. *et al.* Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colo-

- rectal cancer (SWOG 1406). **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 4, p. 520-520, 2017. <https://doi.org/10.1200/jco.20.01994>
138. KOPETZ, S. *et al.* Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib for BRAF V600E metastatic colorectal cancer: Updated survival results from a randomized, three-arm, phase III study versus choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab (BEACON CRC). **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15, p. 4001-4001, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.4001
139. KOPETZ, S. *et al.* Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 17, p. 1632-43, 2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1908075>
140. PIETRANTONIO, F. *et al.* Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. **Eur J Cancer**, v. 51, n. 5, p. 587-94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.01.054>
141. JONES, J. C. *et al.* (Non-V600) BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 23, p. 2624-30, 2017. <https://doi.org/10.1200/jco.2016.71.4394>
142. SARTORE-BIANCHI, A. *et al.* Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 6, p. 738-46, 2016. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(16\)00150-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(16)00150-9)
143. SIENA, S. *et al.* A phase II, multicenter, open-label study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (mCRC): DESTINY-CRC01. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15, p. 4000-4000, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.4000
144. NCCN. **Uterine neoplasms**. 2020. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterinepdf
145. SGO. **SGO Clinical Practice Statement: screening for lynch syndrome in endometrial cancer**. 2014. Available at: <https://www.sgo.org/resources/screening-for-lynch-syndrome-in-endometrial-cancer/>.
146. CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 67-73, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12113>
147. HECHTMAN, J. F. *et al.* Retained mismatch repair protein expression occurs in approximately 6% of microsatellite instability-high cancers and is associated with missense mutations in mismatch repair genes. **Modern pathology**, v. 33, n. 5, p. 871-9, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0414-6>
148. TALHOUK, A. *et al.* Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. **Cancer**, v. 123, n. 5, p. 802-13, 2017. <https://doi.org/10.1002/cncr.30496>
149. KOMMOSS, S. *et al.* Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 5, p. 1180-8, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy058>
150. STELLOO, E. *et al.* Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. **Modern pathology**, v. 28, n. 6, p. 836-44, 2015. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.43>
151. LE, D. T. *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. **Science**, v. 357, n. 6349, p. 409-13, 2017. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>
152. KONSTANTINOPOULOS, P. A. *et al.* Phase II Study of Avelumab in Patients With Mismatch Repair Deficient and Mismatch Repair Proficient Recurrent/Persistent Endometrial Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 30, p. 2786-94, 2019. <https://doi.org/10.1200/jco.19.01021>
153. LIU, J. F. *et al.* Safety, clinical activity and biomarker assessments of atezolizumab from a Phase I study in advanced/recurrent ovarian and uterine cancers. **Gynecologic oncology**, v. 154, n. 2, p. 314-22, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ygy-no.2019.05.021>
154. OAKNIN, A. *et al.* Preliminary safety, efficacy, and PK/PD characterization from GARNET, a phase I clinical trial of the anti-PD-1 monoclonal antibody, TSR-042, in patients with recurrent or advanced MSI-H endometrial cancer. **ESMO**, v. 29, n. 8, p. VIII334, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy285.144>
155. WORTMAN, B. G. *et al.* Ten-year results of the PORTEC-2 trial for high-intermediate risk endometrial carcinoma: improving patient selection for adjuvant therapy. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 1067-74, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0310-8>
156. FADER, A. N. *et al.* Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Versus Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Uterine Serous Carcinomas That Overexpress Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 20, p. 2044-51, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.76.5966>
157. FADER, A. N. *et al.* Randomized phase II trial of carboplatin-paclitaxel compared to carboplatin-paclitaxel-trastuzumab in advanced or recurrent uterine serous carcinomas that overexpress Her2/neu (NCT01367002): Updated survival analysis. **SGO**, 2020. Available at: <https://sgoconfexcom/sgo/2020/meetingapccgi/Paper/16297>.
158. THIGPEN, J. T. *et al.* Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a

- dose-response study by the Gynecologic Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1736-44, 1999. <https://doi.org/10.1200/jco.1999.17.6.1736>
159. DECRUZE, S. B.; GREEN, J. A. Hormone therapy in advanced and recurrent endometrial cancer: a systematic review. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, n. 5, p. 964-78, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.00897.x>
160. COLOMBO, N. *et al.* ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**, v. 27, n. 1, p. 16-41, 2016. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv484>
161. EL GHONAIMY, E. *et al.* Serum gastrin in chronic renal failure: morphological and physiological correlations. **Nephron**, v. 39, n. 2, p. 86-94, 1985. <https://doi.org/10.1159/000183350>
162. MOSCHETTA, M.; GEORGE, A.; KAYE, S. B.; BANERJEE, S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1449-55, 2016. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw142>
163. MOORE, K. *et al.* Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 26, p. 2495-505, 2018. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1810858>
164. GONZALEZ-MARTIN, A. *et al.* Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 25, p. 2391-402, 2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910962>
165. COLEMAN, R. L. *et al.* Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 25, p. 2403-15, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1909707
166. RAY-COQUARD, I. *et al.* Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 25, p. 2416-28, 2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1911361>
167. PUJADE-LAURINE, E. *et al.* Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1274-84, 2017. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30469-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30469-2)
168. LEDERMANN, J. *et al.* Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1382-92, 2012. DOI: 10.1056/NEJMoa1105535
169. COLEMAN, R. L. *et al.* Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**, v. 390, n. 10106, p. 1949-61, 2017. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)32440-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32440-6)
170. NCCN. **Ovarian cancer**. 2020. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarianpdf.
171. LEDERMANN, J. A. *et al.* Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines. **Ann Oncol**, v. 24, suppl 6, p. vi24-vi32, 2013. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt333>
172. KONSTANTINOPOULOS, P. A. *et al.* Germline and Somatic Tumor Testing in Epithelial Ovarian Cancer: ASCO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 11, p. 1222-45, 2020. <https://doi.org/10.1200/jco.19.02960>
173. BERTUCCI, F. *et al.* Genomic characterization of metastatic breast cancers. **Nature**, v. 569, n. 7757, p. 560-4, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1056-z>
174. LI, A.; SCHLEICHER, S. M.; ANDRE, F.; MITRI, Z. I. Genomic Alteration in Metastatic Breast Cancer and Its Treatment. **American Society of Clinical Oncology educational book**, v. 40, p. 1-14, 2020. https://doi.org/10.1200/edbk_280463
175. CONDORELLI, R. *et al.* Genomic alterations in breast cancer: level of evidence for actionability according to ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). **Annals of Oncology**, v. 30, n. 3, p. 365-73, 2019. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz036>
176. MOASSER, M. M.; KROP, I. E. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. **JAMA oncology**, v. 1, n. 8, p. 1154-61, 2015. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2286>
177. ANDRE, F. *et al.* Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 20, p. 1929-40, 2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1813904>
178. CORTES-CIRIANO, I.; LEE, S.; PARK, W. Y.; KIM, T. M.; PARK, P. J. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. **Nature communications**, v. 8, p. 15180, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms15180>
179. MARCUS, L.; LEMERY, S. J.; KEEGAN, P.; PAZDUR, R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 13, p. 3753-8, 2019. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-4070>
180. AMATU, A.; SARTORE-BIANCHI, A.; SIENA, S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. **ESMO open**, v. 1, n. 2, p. e000023, 2016. <https://doi.org/10.1136/esmo-open-2015-000023>
181. ROSS, J. S. *et al.* NTRK fusions in breast cancer: Clinical, pathologic and genomic findings. **Cancer Res**, v. 78, n. 4, p. P2-09-15, 2018. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS17-P2-09-15>
182. COCCO, E.; SCALTRITI, M.; DRILON, A. NTRK fusion-positive cancers

and TRK inhibitor therapy. **Nature Reviews Clinical oncology**, v. 15, n. 12, p. 731-47, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0113-0>

183. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TM-B-H solid tumors. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors>.
184. BARROSO-SOUSA, R. *et al.* Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 3, p. 387-94, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.010>
185. ANGUS, L. *et al.* The genomic landscape of metastatic breast cancer highlights changes in mutation and signature frequencies. **Nature genetics**, v. 51, n. 10, p. 1450-8, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0507-7>
186. WINER, E. *et al.* Association of tumor mutational burden (TMB) and clinical outcomes with pembrolizumab (pembro) versus chemotherapy (chemo) in patients with metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) from KEYNOTE-119. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15, p. 1013, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.1013
187. BARROSO-SOUSA, R. *et al.* Tumor Mutational Burden and PTEN Alterations as Molecular Correlates of Response to PD-1/L1 Blockade in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 11, p. 2565-72, 2020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-19-3507>
188. ALVA, A. S. *et al.* Pembrolizumab (P) in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC) with high tumor mutational burden (HTMB): Results from the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15, p. 1014, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.1014
189. ROBSON, M. *et al.* Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 523-33, 2017. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1706450>
190. LITTON, J. K. *et al.* Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 8, p. 753-63, 2018. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1802905>
191. TUTT, A. *et al.* Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. **Nature medicine**, v. 24, n. 5, p. 628-37, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0009-7>
192. TUNG, N. M. *et al.* TBCRC 048: A phase II study of olaparib monotherapy in metastatic breast cancer patients with germline or somatic mutations in DNA damage response (DDR) pathway genes (Olaparib Expanded). **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15, p. 1002, 2020. <https://doi.org/10.1200/jco.20.02151>
193. LIN, N. U. *et al.* Tucatinib versus placebo added to trastuzumab and capecitabine for patients with previously treated HER2+ metastatic breast cancer with brain metastases (HER2CLIMB). **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15, p. 1005, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.1005
194. ROSS, J. S. *et al.* Nonamplification ERBB2 genomic alterations in 5605 cases of recurrent and metastatic breast cancer: An emerging opportunity for anti-HER2 targeted therapies. **Cancer**, v. 122, n. 17, p. 2654-62, 2016. <https://doi.org/10.1002/cncr.30102>
195. SMYTH, L. M. *et al.* Efficacy and Determinants of Response to HER Kinase Inhibition in HER2-Mutant Metastatic Breast Cancer. **Cancer discovery**, v. 10, n. 2, p. 198-213, 2020. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0966>
196. LE TOURNEAU, C. *et al.* Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 13, p. 1324-34, 2015. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00188-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00188-6)
197. ANDRE, F. *et al.* Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIRO1/UNICANCER). **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 3, p. 267-74, 2014. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70611-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70611-9)
198. MASSARD, C. *et al.* High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. **Cancer discovery**, v. 7, n. 6, p. 586-95, 2017. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-1396>
199. CARDOSO, F. *et al.* 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4) dagger. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 8, p. 1634-57, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy192>
200. EGGNER, S. E. *et al.* Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 13, p. 1474-94, 2020. DOI: 10.1200/JCO.19.02768
201. MOHLER, J. L. *et al.* Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 5, p. 479-505, 2019. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0023>
202. DEN, R. B. *et al.* Decipher correlation patterns post prostatectomy: initial experience from 2 342 prospective patients. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 19, n. 4, p. 374-9, 2016. <https://doi.org/10.1038/pcan.2016.38>
203. CHANG, E. M.; PUNGLIA, R. S.; STEINBERG, M. L.; RALDOW, A. C. Cost Effectiveness of the Oncotype DX Genomic Prostate Score for Guiding Treatment Decisions in Patients With Early Stage Prostate Cancer. **Urology**, v. 126, p. 89-95, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.urol.2018.12.016>

204. HEALTH QUALITY O. Prolaris Cell Cycle Progression Test for Localized Prostate Cancer: A Health Technology Assessment. **Ontario Health Technology Assessment Series**, v. 17, n. 6, p. 1-75, 2017.
205. CASTRO, E. *et al.* Effect of BRCA Mutations on Metastatic Relapse and Cause-specific Survival After Radical Treatment for Localized Prostate Cancer. **European urology**, v. 68, n. 2, p. 186-93, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.10.022>
206. CASTRO, E. *et al.* Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 14, p. 1748-57, 2013. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.43.1882>
207. RODRIGUES, D. N. *et al.* Immunogenomic analyses associate immunological alterations with mismatch repair defects in prostate cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 10, p. 4441-53, 2018. <https://doi.org/10.1172/jci121924>
208. MARSHALL, C. H.; FU, W.; WANG, H.; BARAS, A. S.; LOTAN, T. L.; ANTONARAKIS, E. S. Prevalence of DNA repair gene mutations in localized prostate cancer according to clinical and pathologic features: association of Gleason score and tumor stage. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 22, n. 1, p. 59-65, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0086-1>
209. ISAACSSON VELHO, P. *et al.* Molecular Characterization and Clinical Outcomes of Primary Gleason Pattern 5 Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. **JCO Precision Oncology**, v. 3, 2019. <https://doi.org/10.1200/po.19.00081>
210. ROBINSON, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1215-28, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>
211. PRITCHARD, C. C. *et al.* Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 443-53, 2016. DOI:10.1056/NEJMoal603144
212. MATEO, J. *et al.* DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 18, p. 1697-708, 2015. DOI:10.1056/NEJMoal506859
213. DE BONO, J. *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 22, p. 2091-102, 2020. <https://doi.org/10.1056/nejmoal911440>
214. HUSSAIN, M. *et al.* Targeting Androgen Receptor and DNA Repair in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Results From NCI 9012. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 10, p. 991-9, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.75.7310>
215. HUSSAIN, M. *et al.* Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 24, p. 2345-2357, 2020. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2022485>
216. ISAACSSON VELHO, P. *et al.* Efficacy of Radium-223 in Bone-metastatic Castration-resistant Prostate Cancer with and Without Homologous Repair Gene Defects. **European urology**, v. 76, n. 2, p. 170-6, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.040>
217. DOELEN, M. J. *et al.* Overall survival using radium-223 (Ra223) in metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) patients with and without DNA damage repair (DDR) defects. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 6, p.121-121, 2020. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.6_suppl.121
218. MOTA, J. M. *et al.* Platinum-Based Chemotherapy in Metastatic Prostate Cancer With DNA Repair Gene Alterations. **JCO Precision Oncology**, v. 4, p. 355-366, 2020. <https://doi.org/10.1200/po.19.00346>
219. ANTONARAKIS, E. S. *et al.* Clinical Features and Therapeutic Outcomes in Men with Advanced Prostate Cancer and DNA Mismatch Repair Gene Mutations. **European urology**, v. 75, n. 3, p. 378-82, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.10.009>
220. WU, Y. M. *et al.* Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. **Cell**, v. 173, n. 7, p. 1770-82 e14, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.034>
221. SCHWEIZER, M. T. *et al.* CDK12-Mutated Prostate Cancer: Clinical Outcomes With Standard Therapies and Immune Checkpoint Blockade. **JCO precision oncology**, v. 4, p. 382-92, 2020. <https://doi.org/10.1200/PO.19.00383>
222. ISAACSSON VELHO, P. *et al.* Wnt-pathway Activating Mutations Are Associated with Resistance to First-line Abiraterone and Enzalutamide in Castration-resistant Prostate Cancer. **European urology**, v. 77, n. 1, p. 14-21, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.05.032>
223. MAUGHAN, B. L. *et al.* p53 status in the primary tumor predicts efficacy of subsequent abiraterone and enzalutamide in castration-resistant prostate cancer. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 21, n. 2, p. 260-8, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41391-017-0027-4>
224. CARREIRA, S. *et al.* Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. **Science translational medicine**, v. 6, n. 254, p. 254ra125, 2014. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009448>
225. FERRALDESCHI, R. *et al.* PTEN protein loss and clinical outcome from castration-resistant prostate cancer treated with abiraterone acetate. **European urology**, v. 67, n. 4, p. 795-802, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.10.027>
226. LORIOT, Y. *et al.* Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 4, p. 338-48, 2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoal817323>
227. BALAR, A. V. *et al.* First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible

patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 11, p. 1483-92, 2017. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30616-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30616-2)

228. BALAR, A. V. *et al.* Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **Lancet**, v. 389, n. 10064, p. 67-76, 2017. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32455-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32455-2)
229. LYAGIN, I. V.; ANDRIANOVA, M. S.; EFREMENKO, E. N. Extensive hydrolysis of phosphonates as unexpected behaviour of the known His6-organophosphorus hydrolase. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 13, p. 5829-38, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7407-x>
230. MATEO, J. *et al.* A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). **Annals of Oncology**, v. 29, n. 9, p. 1895-902, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy263>
231. IYER, G. *et al.* Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. **Science**, v. 338, n. 6104, p. 221, 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1226344>
232. CHOUDHURY, N. J. *et al.* Afatinib Activity in Platinum-Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma in Patients With ERBB Alterations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 18, p. 2165-71, 2016. <https://doi.org/10.1200/jco.2015.66.3047>
233. GARJE, R.; VADDEPALLY, R. K.; ZAKHARIA, Y. PARP Inhibitors in Prostate and Urothelial Cancers. **Front Oncol**, v. 10, p. 114, 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00114>
234. HORWICH, A. *et al.* EAU-ESMO consensus statements on the management of advanced and variant bladder cancer-an international collaborative multi-stakeholder effort: under the auspices of the EAU and ESMO Guidelines Committeesdagger. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 11, p. 1697-727, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00114>
235. HANS, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 275-82, 2004. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
236. SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. revised 4th edition. Lyon: IARC, 2017.
237. SCOTT, D. W. *et al.* Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 26, p. 2848-56, 2015. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.60.2383>
238. JOHNSON, N. A. *et al.* Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 28, p. 3452-9, 2012. <https://doi.org/10.1200/jco.2011.41.0985>
239. STAIGER, A. M. *et al.* Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/ BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 22, p. 2515-26, 2017. <https://doi.org/10.1200/jco.2016.70.3660>
240. YOUNES, A. *et al.* Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15, p. 1285-95, 2019. <https://doi.org/10.1200/jco.18.02403>
241. PASQUALUCCI, L.; DALLA-FAVEIRA, R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 131, n. 21, p. 2307-19, 2018. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-764332>
242. SCHMITZ, R. *et al.* Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 15, p. 1396-407, 2018. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1801445>
243. RIEDELL, P. A.; SMITH, S. M. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. **Cancer**, v. 124, n. 24, p. 4622-32, 2018. <https://doi.org/10.1002/cncr.31646>
244. LANDSBURG, D. J. *et al.* Outcomes of Patients With Double-Hit Lymphoma Who Achieve First Complete Remission. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 20, p. 2260-7, 2017. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.72.2157>
245. OKI, Y. *et al.* Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. **Br J Haematol**, v. 166, n. 6, p. 891-901, 2014. <https://doi.org/10.1111/bjh.12982>
246. SCOTT, D. W. *et al.* High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. **Blood**, v. 131, n. 18, p. 2060-4, 2018. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820605>
247. ZHANG, L. H.; KOSEK, J.; WANG, M.; HEISE, C.; SCHAFER, P. H.; CHOPRA, R. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. **Br J Haematol**, v. 160, n. 4, p. 487-502, 2013. <https://doi.org/10.1111/bjh.12172>
248. PICKARD, L.; PALLADINO, G.; OKOSUN, J. Follicular lymphoma genomics. **Leuk Lymphoma**, v. 61, n. 10 p. 2313-23, 2020. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1762883>
249. DÖLKEN, G.; ILLERHAUS, G.; HIRT, C.; MERTELSMANN, R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors

and patients with nonmalignant diseases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 4, p. 1333-44, 1996. <https://doi.org/10.1200/jco.1996.14.4.1333>

250. OKOSUN, J. *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. **Nature genetics**, v. 46, n. 2, p. 176-81, 2014. <https://doi.org/10.1038/ng.2856>
251. PASTORE, A. *et al.* Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 9, p. 1111-22, 2015. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00169-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00169-2)
252. LOCKMER, S. *et al.* M7-FLIPI is not prognostic in follicular lymphoma patients with first-line rituximab chemo-free therapy. **Br J Haematol**, v. 188, n. 2, p. 259-67, 2020. <https://doi.org/10.1111/bjh.16159>
253. CASULO, C. *et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 23, p. 2516-22, 2015. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.59.7534>
254. FEDERICO, M. *et al.* Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. **Lancet Haematol**, v. 5, n. 8, p. e359-e67, 2018. [https://doi.org/10.1016/s2352-3026\(18\)30090-5](https://doi.org/10.1016/s2352-3026(18)30090-5)
255. SARKOZY, C. *et al.* Cause of Death in Follicular Lymphoma in the First Decade of the Rituximab Era: A Pooled Analysis of French and US Cohorts. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 2, p. 144-52, 2019. <https://doi.org/10.1200/jco.18.00400>
256. CASULO, C.; BURACK, W. R.; FRIEDBERG, J. W. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 125, n. 1, p. 40-7, 2015. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-516815>
257. LOSSOS, I. S.; GASCOYNE, R. D. Transformation of follicular lymphoma. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 24, n. 2, p. 147-63, 2011. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.beha.2011.02.006>
258. WEISS, L. M.; STRICKLER, J. G.; WARNKE, R. A.; PURTILO, D. T.; SKLAR, J. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v. 129, n. 1, p. 86-91, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1899692/>
259. ALEXANDER, F. E. *et al.* Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 5, p. 1117-21, 2000. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1049>
260. ANSELL, S. M. Hodgkin lymphoma: A 2020 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol**, v. 95, n. 8, p. 978-89, 2020. <https://doi.org/10.1002/ajh.25856>
261. ROEMER, M. G. *et al.* PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 23, p. 2690-7, 2016. <https://doi.org/10.1200/jco.2016.66.4482>
262. GREEN, M. R. *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 116, n. 17, p. 3268-77, 2010. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282780>
263. ROEMER, M. G. M. *et al.* Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 10, p. 942-50, 2018. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.77.3994>
264. BORCHMANN, S.; ENGERT, A. The genetics of Hodgkin lymphoma: an overview and clinical implications. **Curr Opin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 307-14, 2017. <https://doi.org/10.1097/cco.0000000000000396>
265. SPINA, V. *et al.* Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 131, n. 22, p. 2413-25, 2018. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-812073>
266. COFFIN, C. M.; PATEL, A.; PERKINS, S.; ELENITOBA-JOHNSON, K. S.; PERLMAN, E.; GRIFFIN, C. A. ALK1 and p80 expression and chromosomal rearrangements involving 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumor. **Modern Pathology**, v. 14, n. 6, p. 569-76, 2001. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880352>
267. BINH, M. B. *et al.* MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, n. 10, p. 1340-7, 2005. <https://doi.org/10.1097/O1.pas.0000170343.09562.39>
268. CASALI, P. G. *et al.* Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 29, suppl 4, p. iv51-iv67, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy096>
269. JAIN, S.; XU, R.; PRIETO, V. G.; LEE, P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 3, n. 4, p. 416-28, 2010.
270. ITALIANO, A. *et al.* Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): a prospective, multicentre, observational study. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 4, p. 532-8, 2016. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00583-5](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00583-5)
271. ITALIANO, A. *et al.* High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription

factors in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 51, n. 3, p. 207-18, 2012. <https://doi.org/10.1002/gcc.20945>

272. BRCIC, I. *et al.* Undifferentiated round cell sarcomas with CIC-DUX4 gene fusion: expanding the clinical spectrum. **Pathology**, v. 52, n. 2, p. 236-42, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.015>
273. GOUNDER, M. M. *et al.* Impact of next-generation sequencing (NGS) on diagnostic and therapeutic options in soft-tissue and bone sarcoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 15, p. 11001, 2017. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.11001
274. GROISBERG, R. *et al.* Clinical genomic profiling to identify actionable alterations for investigational therapies in patients with diverse sarcomas. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39254-67, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16845>
275. PESTANA, R. C. *et al.* Precision Oncology in Sarcomas: Divide and Conquer. **JCO Precision Oncology**, 2019. <https://doi.org/10.1200/po.18.00247>
276. DICKSON, M. A. *et al.* Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 16, p. 2024-8, 2013. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.46.5476>
277. SHAW, A. T. *et al.* Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1189-97, 2014. <https://doi.org/10.1056/nejmc1404894>
278. KIM, D. W. *et al.* Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 4, p. 452-63, 2016. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00614-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00614-2)
279. ITALIANO, A. *et al.* Treatment with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with malignant PEComa. **Annals of Oncology**, v. 21, n. 5, p. 1135-7, 2010. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq044>
280. SERRANO, C. *et al.* Clinical value of next generation sequencing of plasma cell-free DNA in gastrointestinal stromal tumors. **BMC cancer**, v. 20, n. 1, p. 99, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6597-x>
281. HEINRICH, M. C. *et al.* Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 23, p. 4342-9, 2003. <https://doi.org/10.1200/jco.2003.04.190>
282. MIETTINEN, M.; LASOTA, J. Succinate dehydrogenase deficient gastrointestinal stromal tumors (GISTs) - a review. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 53, p. 514-9, 2014. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.biocel.2014.05.033>
283. BOIKOS, S. A. *et al.* Molecular Subtypes of KIT/PDGFR α Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. **JAMA oncology**, v. 2, n. 7, p. 922-8, 2016. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0256>
284. SZUCS, Z. *et al.* Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumors and their prognostic and therapeutic implications. **Future oncology**, v. 13, n. 1, p. 93-107, 2017. <https://doi.org/10.2217/fo-2016-0192>
285. CASALI, P. G. *et al.* Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 29, suppl 4, p. iv68-iv78, 2018. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy095>
286. HEINRICH, M. C. *et al.* Clinical activity of avapritinib in \geq fourth-line (4L+) and PDGFRA Exon 18 gastrointestinal stromal tumors (GIST). **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15, p. 11022, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.826
287. BOURGEOIS, J. M.; KNEZEVIČ, S. R.; MATHERS, J. A.; SORENSEN, P. H. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 24, n. 7, p. 937-46, 2000. <https://doi.org/10.1097/0000478-200007000-00005>
288. WELLBROCK, C.; HURLSTONE, A. BRAF as therapeutic target in melanoma. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 561-7, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.03.019>
289. LONG, G. V. *et al.* Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 19, p. 1813-23, 2017. DOI: 10.1056/NEJMoa1708539
290. LONG, G. V. *et al.* Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1877-88, 2014. <https://doi.org/10.1056/nejmoal406037>
291. LONG, G. V. *et al.* Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 7, p. 1631-9, 2017. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx176>
292. ROBERT, C. *et al.* Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 1, p. 30-9, 2015. <https://doi.org/10.1056/nejmoal412690>
293. ROBERT, C. *et al.* Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 7, p. 626-36, 2019. <https://doi.org/10.1056/nejmoal1904059>
294. LARKIN, J. *et al.* Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1867-76, 2014. <https://doi.org/10.1056/nejmoal408868>

295. DUMMER, R. *et al.* Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 10, p. 1315-27, 2018. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(18\)30497-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(18)30497-2)
296. DUMMER, R. *et al.* Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 4, p. 435-45, 2017. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30180-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30180-8)
297. WYMAN, K. *et al.* Multicenter Phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy. **Cancer**, v. 106, n. 9, p. 2005-11, 2006. <https://doi.org/10.1002/cncr.21834>
298. LEZCANO, C.; SHOUSHARI, A. N.; ARIYAN, C.; HOLLMANN, T. J.; BUSAM, K. J. Primary and Metastatic Melanoma With NTRK Fusions. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 42, n. 8, p. 1052-8, 2018. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000001070>
299. LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 803-20, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
300. ECKEL-PASSOW, J. E. *et al.* Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 26, p. 2499-508, 2015. <https://doi.org/10.1056/nejmoal407279>
301. VAN DEN BENT, M. J.; MELLINGHOFF, I. K.; BINDRA, R. S. Gray Areas in the Gray Matter: IDH1/2 Mutations in Glioma. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 40, p. 1-8, 2020. DOI: 10.1200/EDBK_280967
302. CAIRNCROSS, G. *et al.* Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 3, p. 337-43, 2013. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.43.2674>
303. KRISTENSEN, B. W.; PRIESTERBACH-ACKLEY, L. P.; PETERSEN, J. K.; WESSELING, P. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 8, p. 1265-78, 2019. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz164>
304. ICHIMURA, K.; NARITA, Y.; HAWKINS, C. E. Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathol**, v. 129, n. 6, p. 789-808, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1439-7>
305. MOLINARO, A. M.; TAYLOR, J. W.; WIENCKE, J. K.; WRENSCH, M. R. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. **Nat Rev Neurol**, v. 15, n. 7, p. 405-17, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0220-2>
306. LOUIS, D. N. *et al.* cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. **Brain Pathol**, v. 30, n. 4, p. 844-56, 2020. <https://doi.org/10.1111/bpa.12832>
307. SCHINDLER, G. *et al.* Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. **Acta Neuropathol**, v. 121, n. 3, p. 397-405, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0802-6>
308. VAISHNAVI, A.; LE, A. T.; DOEBELE, R. C. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. **Cancer discovery**, v. 5, n. 1, p. 25-34, 2015. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0765>
309. HONG, D. S. *et al.* Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 4, p. 531-40, 2020. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30856-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30856-3)
310. DEMETRI, G. D. *et al.* Efficacy and safety of entrectinib in patients with NTRK fusion-positive (NTRK-fp) Tumors: Pooled analysis of STARTRK-2, STARTRK-1 and ALKA-372-001. **Proceedings of ESMO 2018 Congress**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy424017>
311. JONES, S. *et al.* Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 283, p. 283ra53, 2015. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7161>
312. IZUMCHENKO, E. *et al.* Targeted sequencing reveals clonal genetic changes in the progression of early lung neoplasms and paired circulating DNA. **Nature communications**, v. 6, p. 8258, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms9258>
313. CHENG, D. T. *et al.* Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. **J Mol Diagn**, v. 17, n. 3, p. 251-64, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.12.006>
314. SINGH, R. R. *et al.* Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. **J Mol Diagn**, v. 15, n. 5, p. 607-22, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.003>
315. MANDELKER, D. *et al.* Mutation Detection in Patients With Advanced Cancer by Universal Sequencing of Cancer-Related Genes in Tumor and Normal DNA vs Guideline-Based Germline Testing. **Jama**, v. 318, n. 9, p. 825-35, 2017. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11137>
316. AZIZ, N. *et al.* College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 139, n. 4, p. 481-93, 2015. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0250-cp>

317. YOHE, S. L. *et al.* Standards for Clinical Grade Genomic Databases. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 139, n. 11, p. 1400-12, 2015. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0568-cp>
318. EL-DEIRY, W. S. *et al.* The current state of molecular testing in the treatment of patients with solid tumors, 2019. **CA Cancer J Clin**, v. 69, n. 4, p. 305-43, 2019. <https://doi.org/10.3322/caac.21560>
319. JENNINGS, L. J. *et al.* Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. **J Mol Diagn**, v. 19, n. 3, p. 341-65, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>
320. WEISS, G. J. *et al.* Evaluation and comparison of two commercially available targeted next-generation sequencing platforms to assist oncology decision making. **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 959-67, 2015. <https://dx.doi.org/10.2147/OT.FOTT.S81995>
321. SQUILLACE, R. M.; FRAMPTON, G. M.; STEPHENS, P. J.; ROSS, J. S.; MILLER, V. A. Comparing two assays for clinical genomic profiling: the devil is in the data. **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 2237-42, 2015. <https://doi.org/10.2147/ott.s88908>
322. MISYURA, M. *et al.* Comparison of Next-Generation Sequencing Panels and Platforms for Detection and Verification of Somatic Tumor Variants for Clinical Diagnostics. **J Mol Diagn**, v. 18, n. 6, p. 842-50, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.004>
323. WOOD, D. E. *et al.* A machine learning approach for somatic mutation discovery. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 457, 2018. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar7939>
324. HOSKINSON, D. C.; DUBUC, A. M.; MASON-SUARES, H. The current state of clinical interpretation of sequence variants. **Curr Opin Genet Dev**, v. 42, p. 33-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.01.001>
325. YORCZYK, A.; ROBINSON, L. S.; ROSS, T. S. Use of panel tests in place of single gene tests in the cancer genetics clinic. **Clin Genet**, v. 88, n. 3, p. 278-82, 2015. <https://doi.org/10.1111/cge.12488>
326. AMENDOLA, L. M. *et al.* Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: challenges of variant classification. **Genome Res**, v. 25, n. 3, p. 305-15, 2015. <https://doi.org/10.1101/gr.183483.114>
327. SHAH, P. D.; NATHANSON, K. L. Application of Panel-Based Tests for Inherited Risk of Cancer. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 18, p. 201-27, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035305>
328. RICHARDS, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**, v. 17, n. 5, p. 405-24, 2015. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
329. CHAKRAVARTY, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. **JCO Precision Oncology**, 2017. <https://doi.org/10.1200/po.17.00011>
330. GRIFFITH, M. *et al.* CIViC is a community knowledgebase for expert crowdsourcing the clinical interpretation of variants in cancer. **Nature genetics**, v. 49, n. 2, p. 170-4, 2017. <https://doi.org/10.1038/ng.3774>
331. CERAMI, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer discovery**, v. 2, n. 5, p. 401-4, 2012. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-12-0095>
332. GAO, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Sci Signal**, v. 6, n. 269, p11, 2013. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>



A SBOC reserva todos os direitos autorais deste documento, que é disponibilizado gratuitamente ao público da entidade e demais interessados. Sua reprodução com fins comerciais é expressamente proibida, sujeitando-se o infrator às penalidades cíveis e criminais cabíveis.

Outras reproduções devem ser solicitadas diretamente à [SBOC](#).
