PREVALÊNCIA DO REARRANJO DO GENE *ROS1* EM CARCINOMA DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS NÃO ESCAMOSO, *EGFR* E *ALK* NEGATIVO: ANÁLISE DE UMA COORTE BRASILEIRA

PEDRO ALVES CABRAL FILHO

Teses apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com a Universidade Federal do Vale do São Francisco, para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

São Paulo
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

C117p Cabral Filho, Pedro Alves

Prevalência do rearranjo do gene ROS1 em carcinoma de pulmão de células não pequenas não escamoso, EGFR e ALK negativo: análise de uma coorte brasileira. Pedro Alves Cabral Filho – São Paulo, 2021.

48p.

Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com a Universidade Federal do Vale do São Francisco - Área de concentração: Oncologia

Orientador: Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. Rearranjo do gênico/Gene Rearrangement. 2. Carcinoma de Pulmão de Células não Pequenas/Carcinoma, Non-Small-Cell Lung. 3. Receptores ErbB/ErbB Receptors. 4. Quinase de linfoma anaplásico/Anaplastic Lymphoma Kinase

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

AGRADECIMENTOS

Ao ex-reitor da UNIVALI Prof. Mario César dos Santos peça fundamental para o início da parceria UNIVALI/A.C.Camargo Cancer Center.

Ao Prof. Alexandre Nova Cruz por estar ao nosso lado nessa trajetória.

Aos amigos de turma por toda ajuda e entusiasmo nessa jornada.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e todos professores e funcionários pela disponibilidade e dedicação prestados.

Ao Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima por toda orientação prestada.

Ao Prof. Giuliano Borges por sua inspiração científica na origem deste trabalho.

Ao Laboratório Infolaudo, seus patologistas e funcionários que foram fundamentais na execução desta tese.

Aos meus pacientes, maior razão por todo esforço.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, por serem minha referência de respeito a vida e as pessoas.

Ao meu filho por ser minha fonte inspiradora para aprender e lutar por um mundo melhor.

A minha esposa e companheira por ser a base e alicerce de todas as minhas conquistas.

RESUMO

Cabral Filho PA. **Prevalência do rearranjo do gene *ROS1* em carcinoma de pulmão de células não pequenas não escamoso, *EGFR* e *ALK* negativo: análise de uma coorte brasileira**. [Tese]. São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com a Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2021.

Introdução: A prevalência do câncer de pulmão tem aumentado cerca de 2% ao ano e é considerado um problema de saúde pública mundial, sendo a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres. O Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas (CPCNP) representa 85-90% dos cânceres de pulmão. A detecção do rearranjo do gene *ROS1*, considerada um importante fator preditivo para direcionamento terapêutico, constitui uma etapa crítica no tratamento de CPCNP. **Objetivo:** Avaliar a prevalência do rearranjo do gene *ROS1* em pacientes portadores de CPCNP não escamoso, sem mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK*, diagnosticados na Região da Foz do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 02/01/2019 a 27/07/2020. **Materiais e Métodos:** Estudo observacional, retrospectivo e prospectivo, descrito e analítico com 95 pacientes que possuíam material de biópsia suficiente para a realização de novas análises e que não apresentavam mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK*. Os pacientes com imuno-histoquímica positiva para a proteína ROS1 foram testados pelo método de FISH, utilizando-se uma sonda de DNA do tipo break-apart para o gene *ROS1*. Foi realizada uma análise descritiva da amostra, e os resultados foram apresentados em números absolutos e porcentagens, representados por tabelas. O teste de qui-quadrado ($\chi 2$) foi empregado para comparação das frequências entre os grupos analisados. **Resultados:** 52,6% foram pacientes do sexo masculino; a idade mediana foi de 64 anos; 54,7% declararam-se tabagistas; 40,0% apresentavam doença estágio IV; 29,5% apresentaram tumores com alta expressão de PD-L1. Quanto a expressão de ROS1 por imuno-histoquímica: 89,5% foram identificados como ROS1+ em 0% das células tumorais, 4,2% como ROS1+ em <70% das células, e 6,3% como ROS1+ em ≥70% das células do tumor; portanto, 10,5% apresentaram resultados positivos para expressão de ROS1. Estes pacientes foram submetidos à análise de rearranjo de *ROS1* pelo método de FISH e 7 (7,4%) apresentaram resultados positivos. **Conclusão:** Na população estudada, a análise pelo método de FISH mostrou uma prevalência de 7,4% para rearranjos do gene *ROS1*.

Descritores: Rearranjo do gênico. Carcinoma de Pulmão de Células não Pequenas. Receptores ErbB. Quinase de linfoma anaplásico.

ABSTRACT

Cabral Filho PA. **[Prevalence of *ROS1* gene rearrangements in *EGFR*-Negative and *ALK*-negative nonsquamous NSCLC: analysis of a Brazilian cohort]**. [Tese]. São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com a Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2021.

Introduction: Lung cancer prevalence has been increasing at rate of 2% per year and is considered a major public health concern worldwide, being the main cause of cancer death among women and men. Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents 85-90% of total lung cancer. Detecting the rearrangement of the *ROS1* gene is critical to the treatment of NSCLC. **Objective**: To assess the prevalence of the *ROS1* gene rearrangement in patients diagnosed with non-squamous NSCLC patients diagnosed between January 2019 to July 2020 at Foz do Rio Itajaí, in the state of Santa Catarina, Brazil. **Materials and Methods**: This is a retrospective and prospective observational study Ninety-five NSCLC whose tumors were negative for *EGFR* mutation and *ALK* rearrangement and who had enough tumor tissue to carry out additional molecular analysis. Patients whose tumors were positive for ROS1 by immune-histochemistry were tested using by FISH using a break-apart DNA probe (Abbot Molecular) for the *ROS1* gene. A descriptive analysis was performed and results were presented as absolute frequencies and percentages and depicted in charts. Frequencies were compared with the chi-squared test ($\chi 2$). **Results:** 52,6% were male, mean and median age were 65,10 and 64 years, respectively. 54,7% self-declared as smokers; 40,0% had stage IV disease; 29,5% had tumours with high expression of PD-L1. Regarding the expression of *ROS1* by immunohistochemistry: 89,5% were identified as ROS1+ in 0% of cells, 4,2% as ROS1+ in <70% of cells, and 6,3% as ROS1+ in ≥70% of the cells; therefore, 10,5% displayed positive results for the expression of ROS1+. These tumors were subjected to the analysis of *ROS1* rearrangement by FISH and 7 (7,4%) were positive. **Conclusion**: We observed 7,4% prevalence for *ROS1* gene rearrangements in this pre-selected population.

Keywords: Gene Rearrangement. Carcinoma, Non-Small-Cell Lung. ErbB Receptors. Anaplastic Lymphoma Kinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Incidência de câncer de pulmão no Brasil etapa do estudo 2

Figura 2 Evolução da classificação do CPCNP 6

Figura 3 Fluxograma para investigação do rearranjo de ROS1 11

Figura 4 Marcação imuno-histoquímica para ROS1 observada em pneumócito II (coloração acastanhada) em pulmão normal, usada como controle positivo.. 22

Figura 5 Análise imuno-histoquímica da marcação para ROS1 com microfotografias mostrando o agrupamento das intensidades de marcação. 22

Figura 6 Amostra de tumor com FISH positivo para rearranjo do gene ROS1 25

Figura 7 Fluxograma de seleção de amostras em cada etapa do estudo 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação de carcinomas de pulmão – IASLC/ATS/ERS, 2011..... 5

Tabela 2 Alvos acionáveis em câncer de pulmão e as terapêuticas disponíveis 8

Tabela 3 Municípios da Foz do Rio Itajaí, Vale do Itajaí, Estado de Santa Catarina, população estimada para 2020..... 19

Tabela 4 Características clínico-demográficas dos 477 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma ou carcinoma adenoescamoso de pulmão) 29

Tabela 5 Características clínico-demográficas dos pacientes da amostra analisada para presença de expressão de ROS1 (N=95)..... 30

Tabela 6 Associação entre expressão de ROS1 avaliada por imuno-histoquímica e características clínico-demográficas e expressão de PD-L1 (N=95)..... 31

Tabela 7 Associação entre rearranjo de ROS1 e características clínico-demográficas, expressão de ROS1 e expressão de PD-L1 (N=10)..... 32

Tabela 8 Comparação da frequência de EGFR e ALK encontrada neste estudo com outros estudos realizados no Brasil..... 33

Tabela 9 Frequência de rearranjos ROS1 em tumores de pacientes com CPCNP descrita em diversas coortes previamente selecionadas de mutação no gene EGFR, rearranjo de ALK ou mutação de KRAS e em uma coorte brasileira não pré-selecionada para comparação 36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	*American Cancer Society*
ALK	Quinase de linfoma anaplásico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPCNP	Câncer de pulmão de células não pequenas
CPPC	Câncer de pulmão de pequenas células
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FISH	Hibridização *in situ* por fluorescência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHQ	Análise imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NCR	Reagente de controle negativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
SC	Santa Catarina
SLP	Sobrevida livre de progressão
TIL	Linfócitos infiltrantes do tumor
TKI	Inibidores de tirosina-quinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Câncer de Pulmão de Células não Pequenas 4
1.1.1 Classificação *IASLC/ATS/ERS* 4
1.1.2 Tratamento 6
1.1.3 Sobrevida dos pacientes com *CPCNP* 9
1.1.4 O gene ROS1 em *CPCNP* 9
1.1.5 Diagnóstico do rearranjo de *ROS1* 10
1.1.6 Tratamento do *CPCNP* com rearranjo de *ROS1* 12
1.2 Expressão de *PD-L1* em *CPCNP* 14

2 OBJETIVOS 17
2.1 Objetivo Geral 17
2.2 Objetivos Específicos 17

3 MATERIAL E MÉTODOS 18
3.1 Desenho do Estudo 18
3.2 Local da Pesquisa 18
3.3 População do Estudo 18
3.4 Período de Realização da Pesquisa (Coleta De Dados) 19
3.5 Seleção Dos Pacientes 19
3.5.1 Critérios de inclusão 19
3.5.2 Critérios de exclusão 20
3.6 Coleta de Dados Clínicos e Patológicos 20
3.6.1 Variáveis analisadas 20
3.7 Análise Imuno-Histoquímica 20
3.8 Método de FISH 24
3.9 Análise Estatística 25
3.10 Considerações Éticas 26

4 RESULTADOS 27

4.1 Processo de Seleção de Pacientes 27
4.2 Características Clínicas dos Pacientes 28
4.3 Associação entre Características Clínicas, Demográficas e Patológicas e Rearranjo do Gene ROS1 avaliado por FISH 31

5 DISCUSSÃO 33

6 CONCLUSÃO 38

7 REFERÊNCIAS 39

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão constitui um problema de saúde pública mundial, com aumento de incidência de 2% ao ano (Gridelli et al. 2015), e é definido como neoplasia maligna que se origina nas vias aéreas inferiores ou no parênquima do pulmão. É considerado a principal causa de mortalidade por câncer entre homens e mulheres, superando os cânceres de cólon, mama e próstata juntos.

A maioria das pessoas diagnosticadas com esse tipo de câncer tem idade ≥65 anos ao diagnóstico (American Cancer Society-ACS 2019). A maioria das estatísticas inclui os cânceres de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) que, juntos, representam cerca de 95% das neoplasias malignas do pulmão (Midthun 2017; ACS 2019).

O CPPC é menos comum que o CPCNP, representando entre 10-15% de todos os casos de câncer de pulmão. Esse tipo de câncer é menos frequente em não fumantes e tende a apresentar metástases ao ser diagnosticado (Gridelli et al. 2015).

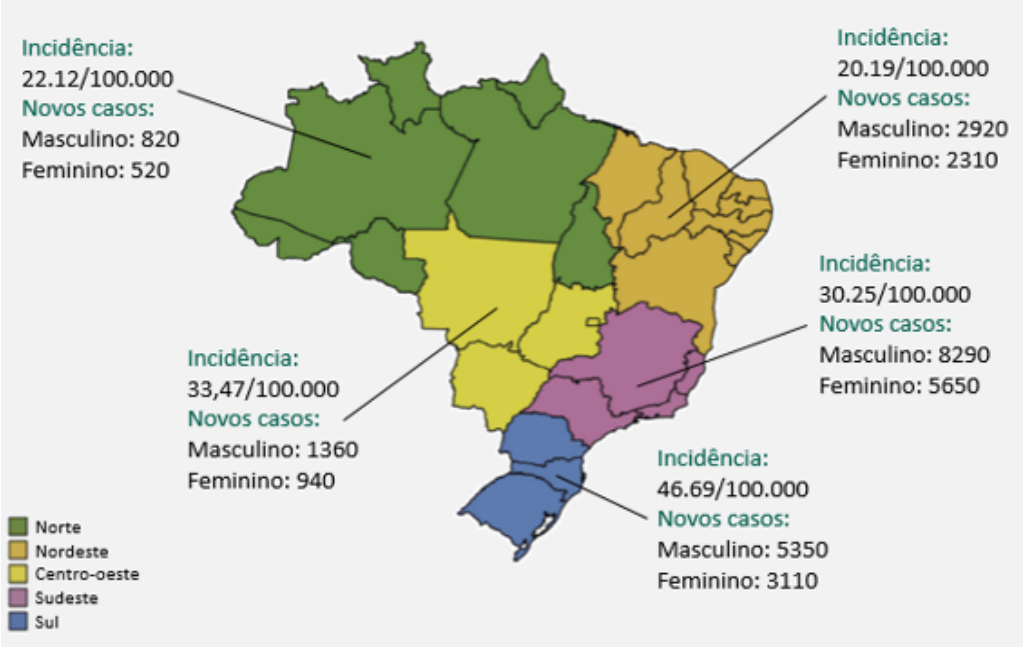
O CPCNP representa aproximadamente 85-90% dos cânceres de pulmão (Gridelli et al. 2015; Bubendorf et al. 2016; ACS 2019), e é representado por três subtipos principais: carcinoma de células escamosas (epidermoide), adenocarcinoma e carcinoma de grandes células (Gridelli et al. 2015).

Nos Estados Unidos, as estimativas da ACS para 2020 foram de, aproximadamente, 228.820 novos casos de câncer de pulmão (116.300 em homens e 112.520 em mulheres), e cerca de 135.720 mortes por esse tipo de câncer (72.500 em homens e 63.220 em mulheres) (Siegel et al. 2020).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio 2020-2022, são de 30.200 novos casos de câncer de pulmão, sendo que os homens responderão por 17.760 novos casos e as mulheres por 12.440. Portanto, a cada 100 mil homens estima-se que surgirão 16,99 casos novos e 11,56 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de pulmão em homens é o tumor mais incidente nas Regiões Sul (31,07/100 mil) e Nordeste (11,01/100 mil). Entre as mulheres da Região Sul, o câncer de pulmão é o terceiro mais frequente (18,66/100 mil), assim como no Sudeste (12,09/100 mil). Nas demais regiões, ocupa a quarta posição (Centro-Oeste 10,87/100 mil; Nordeste 8,86/100 mil; Norte 6,47/100 mil) (Ministério da Saúde 2019). É importante observar que os valores de

câncer de pulmão no Brasil sugerem uma subnotificação dessa patologia, um dos motivos poderia ser a necessidade de uma readequação no sistema de notificações, outro motivo poderia ser o avanço rápido da doença em que o paciente viria a óbito antes mesmo de ser diagnosticado.

A Figura 1 apresenta a incidência de pulmão no Brasil de acordo com cada região do país, sendo maior na Região Sul com 46,69 casos novos/100.000 habitantes (Mathias et al. 2020).



Fonte: Mathias et al. (2020).

Figura 1 - Incidência de câncer de pulmão no Brasil

A maioria dos pacientes com CPCNP, aproximadamente 85%, apresenta avaliação diagnóstica devido aos sintomas suspeitos de câncer de pulmão (tosse seca ou produtiva, hemoptoico, dor torácica, dispneia, emagrecimento) ou à descoberta incidental por imagem de tórax. O objetivo da avaliação inicial é obter informações clínicas e radiológicas suficientes para orientar a biópsia, o estadiamento e o tratamento (Thomas e Gould 2017).

O tratamento de pacientes com CPCNP metastático, historicamente, consistia em quimioterapia citotóxica sistêmica. Ao eliminar as células que estão se dividindo, a quimioterapia reduz os sintomas, melhora a qualidade de vida e prolonga a sobrevida em alguns pacientes com CPCNP (Sequist e Neal 2017).

A identificação de mutações nos genes condutores (*driver genes*) levou a uma melhora no resultado clínico de subgrupos de pacientes geneticamente definidos, como aqueles que possuem uma mutação sensibilizante no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), tratados com inibidores de tirosina-quinase (TKI) direcionados a *EGFR,* ou aqueles

com rearranjo do gene *ALK* (quinase de linfoma anaplásico), tratados com TKI específicos (Scheffler et al. 2015).

É importante selecionar adequadamente os pacientes com câncer de pulmão com indicação terapêutica para o uso de TKI, sendo fundamental estabelecer quais os melhores métodos para diagnóstico desses pacientes (Scheffler et al. 2015).

Os rearranjos de *ROS1* são oncogênicos em múltiplas patologias malignas, entre elas o câncer de pulmão de células não pequenas (Song et al. 2016; Drilon et al. 2016). A fusão oncogênica do gene *ROS1* foi primeiramente identificada por Rikova et al. (2007), sendo descrita em 1-2% dos pacientes com CPCNP (Takeuchi et al. 2012; Kohno et al. 2015; Facchinetti et al. 2017; Suryavanshi et al. 2017; Kato et al. 2018; Luk et al. 2018; Joshi et al. 2019).

O gene *ROS1* (localizado no cromossomo 6q22) codifica um receptor de tirosina-quinase pertencente à família de receptores de insulina, que sinaliza principalmente pela via MAPK. Esse receptor associado à tirosina-quinase foi inicialmente descoberto como o homólogo celular da sequência v-ros de transformação do vírus do Sarcoma aviário UR2. A proteína é constituída por uma porção C-terminal intracelular contendo o domínio de proteína-quinase, um único domínio transmembrana e um grande domínio extracelular N-terminal que contém várias repetições fibronectina tipo III (Davies et al. 2012).

No câncer de pulmão, os parceiros de fusão com *ROS1* incluem *FIG, CD74, SLC34A2* e *SDC4*, que quando fundidos com o gene *ROS1* levam à ativação constitutiva da quinase e transformação maligna de células normais em cultura celular ou *in vivo* (Scheffler et al. 2015).

A detecção do rearranjo do gene *ROS1* é, nesse sentido, uma etapa crítica no tratamento de CPCNP, considerado um importante fator preditivo para direcionamento terapêutico e pode ser realizada usando diferentes técnicas, incluindo imuno-histoquímica (IHQ), hibridização in situ por fluorescência (FISH) e *Next Generation Sequencing* (NGS) (Rossi et al. 2017; Davies et al. 2018; Clavé et al. 2019).

Como a proteína ROS1 está ausente no tecido pulmonar normal e a prevalência do rearranjos de *ROS1* no CPCNP varia de 0,5% a 2%, a IHQ parece ser um exame de triagem custo-efetivo, permitindo resultados rápidos com menores custos (Gainor e Shaw 2013; Yoshida et al. 2013; Cai et al. 2013; Kim et al. 2014; Rossi et al. 2017).

Estudos realizados por Davies et al. (2018) e Clavé et al. (2019) compararam os métodos FISH e NGS para a detecção de rearranjos ROS1. Davies et al. (2018) concluíram que ambos os métodos apresentam limitações que podem resultar em resultados falsos-negativos. Tanto no FISH quanto no NGS, os pontos de quebra e rearranjo genômicos são preditores não confiáveis

de pontos de quebra e rearranjo no nível transcricional, provavelmente devido ao *splicing alternativo.* Contudo, no estudo realizado por Clavé et al. (2019), concluiu-se que o NGS parece uma técnica mais confiável para avaliar rearranjos *ALK* e *ROS1*, oferecendo a vantagem sobre a imuno-histoquímica de detectar outras alterações moleculares com potenciais implicações terapêuticas. Já o FISH, com a identificação do padrão de sinal isolado 3' em casos *ALK* e *ROS1* pode representar um resultado falso-positivo.

Estudos recentes têm demonstrado que os cânceres pulmonares com rearranjos do gene *ROS1* são altamente sensíveis ao tratamento com o inibidor de tirosina-quinase, crizotinibe (Shaw et al. 2014; Zhong e Huang 2016; Drilon et al. 2016; Joshi et al. 2019), com uma taxa de resposta de 72% e uma sobrevida livre de progressão (SLP) mediana de 19 meses com base em dados da coorte de expansão do estudo de fase I (PROFILE 1001) (Shaw et al. 2014).

A avaliação da expressão PD-L1 na prática clínica de rotina no momento do diagnóstico patológico inicial, antes de qualquer tratamento antitumoral, é um importante fator preditivo para avaliação da expressão PD-L1 em CPCNP, especialmente durante o tratamento de primeira linha (Lee et al. 2019). Existe uma escassez de dados de expressão de PD-L1 em tumores com rearranjo do gene *ROS1* na literatura acadêmica, entretanto os dados existentes sugerem que esses tumores geralmente não respondem bem à imunoterapia mesmo quando apresentam elevada expressão de PD-L1 (Shaw et al. 2014; Lee et al. 2019).

Esta pesquisa justifica-se pelo fato de que o CPCNP é um problema que atinge pessoas, de ambos os sexos, em todo o mundo e tem como principal fator etiológico o tabagismo. A descoberta de pontos de controle imunológico (*checkpoints* imunes) corrobora a hipótese de que moléculas presentes no tumor modulam os mecanismos de carcinogênese e a atividade imunológica no microambiente tumoral, assim, buscamos aumentar a compreensão da biologia tumoral de pacientes com CPCNP por meio da avaliação dos biomarcadores *ROS1* e PD-L1 na população brasileira.

1.1 CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS

1.1.1 Classificação IASLC/ATS/ERS

A Classificação IASLC/ATS/ERS de 2011 foi atualizada pela OMS (Travis et al. 2015) com a inclusão de recomendações de rotina, uma nova abordagem para pequenas biópsias e citologia, além de uma nova classificação de subtipos de adenocarcinomas de pulmão representados por espécimes cirúrgicos (Tang et al. 2014; Zugazagoitia et al. 2014; Travis et

al. 2015). Os demais grupos de cânceres pulmonares não apresentaram mudanças em relação à última classificação (Travis et al. 2015).

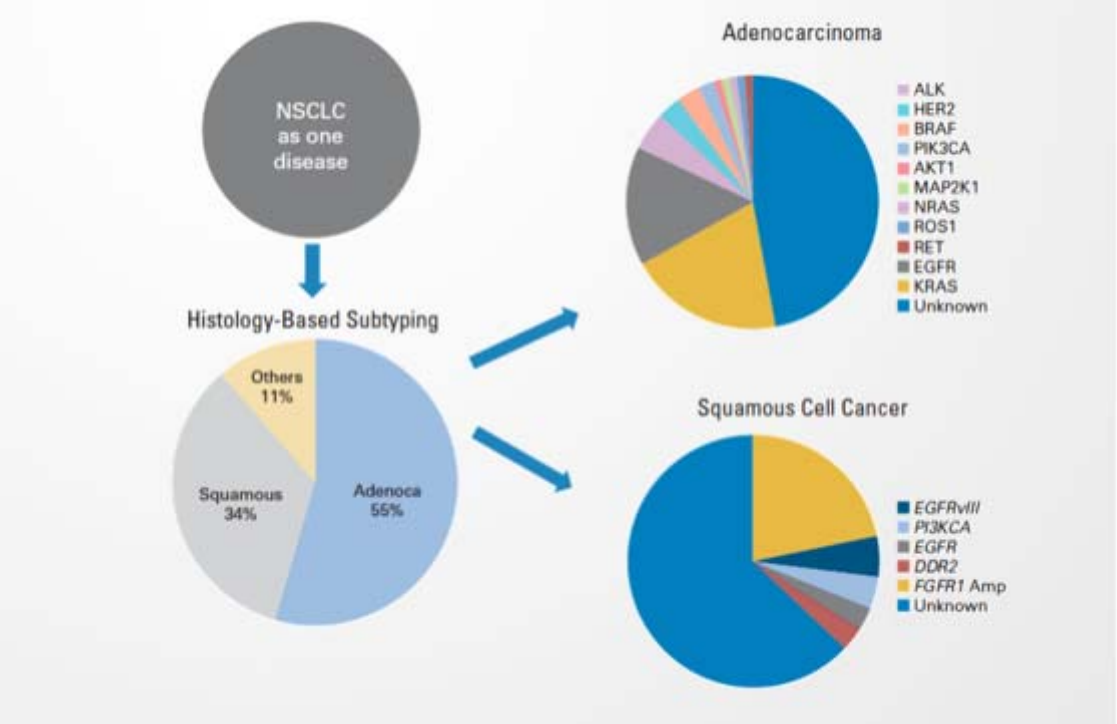
A Tabela 1 apresenta a classificação dos carcinomas de pulmão, considerando a classificação dos adenocarcinomas pela IASLC/ATS/ERS de 2011 e sua atualização pela OMS (Travis et al. 2015).

Tabela 1 - Classificação de carcinomas de pulmão – IASLC/ATS/ERS, 2011 atualizada pela OMS.

Classificação	Tipos/características
01- Lesões pré-neoplásicas	-Hiperplasia adenomatosa atípica -Adenocarcinoma *in situ* (≤ 3cm, antigo carcinoma bronquíolo-alveolar – CBA) – não mucinoso; mucinoso (raro); misto (mucinoso e não mucinoso)
02- Adenocarcinoma minimamente invasivo (≤ 3 cm, predominantemente lepídico com ≤ 5 mm de invasão)	- não mucinoso - mucinoso (raro) - misto (mucinoso e não mucinoso)
03- Adenocarcinoma invasivo	- Predominantemente lepídico (antigo CBA não mucinoso, >5 mm de invasão) - Predominantemente acinar - Predominantemente papilar - Predominantemente micropapilar - Predominantemente sólido com mucosecreção
04- Variantes do adenocarcinoma invasivo	- Adenocarcinoma mucinoso invasivo (antigo CBA mucinoso) - Coloide - Fetal (baixo e alto grau) - Entérico - Cistadenocarcinoma mucinoso
05- Carcinoma de células escamosas	- Papilar - Células claras - Células pequenas - Basalóide
06- Carcinoma de células pequenas	- Carcinoma de células pequenas combinado
07- Carcinoma de células grandes	- Carcinoma neuroendócrino de células grandes - Carcinoma neuroendócrino de células grandes, combinado / - Carcinoma Basalóide
08- Carcinoma linfoepitelioma-*like*	--
09- Carcinoma de células claras	--
10- Carcinoma de células grandes com fenótipo rabdóide	--
11- Carcinoma adenoescamoso	--
12- Carcinoide	- Típico - Atípico

Fonte: Travis et al. (2015).

Além do reconhecimento de diferentes subtipos histológicos, a descrição de genes condutores recorrentemente alterados em alguns subgrupos de tumores permitiu a realização de uma classificação molecular do CPCNP, criando um melhor entendimento da doença e abrindo um leque de novos tratamentos para o câncer de pulmão avançado (Li et al. 2013). A Figura 2 demonstra a evolução da classificação do CPCNP.



Fonte: Li et al. (2013).
Figura 2 - Evolução da classificação do CPCNP.

1.1.2 Tratamento

Em pacientes diagnosticados com CPCNP os resultados do tratamento padrão são ruins, exceto para os cânceres mais localizados. Dessa forma, todos os pacientes recém-diagnosticados com CPCNP são candidatos potenciais para estudos que avaliam novas formas de tratamento (Okita et al. 2017).

O tratamento de CPCNP é específico em cada estágio da doença. Pacientes em estágio I a IIIA devem ser tratados com ressecção cirúrgica completa quando não houver contraindicação (Pöttgen et al. 2007; Howlader et al. 2020). Pacientes não cirúrgicos devem ser considerados para radioterapia convencional ou estereotática, combinada ou não à quimioterapia. Os procedimentos de ablação térmica percutânea como ablação por radiofrequência, micro-ondas e crioablação constituem opções úteis de tratamento no contexto de terapia de resgate pós-cirúrgico, radioterapia ou quimioterapia ou para tratamento paliativo em pacientes com CPCNP avançado (Duma et al. 2019).

Já os pacientes diagnosticados com doença metastática recebem tratamento sistêmico paliativo com intuito de controle de sintomas e retardar a progressão da doença, uma vez que não há possibilidade de cura nesse cenário (Gridelli et al. 2015).

A imunoterapia (IO) isolada ou combinada à quimioterapia se tornaram a base do tratamento para pacientes com CPCNP metastático sem *drivers* acionáveis (Santos 2020).

A identificação de mutações no câncer de pulmão levou ao desenvolvimento de terapia molecular direcionada para melhorar a sobrevida de subgrupos de pacientes com doença metastática (Pao e Girard 2011).

Em particular, as anomalias genéticas nas vias de sinalização *EGFR, MAPK* e *PI3K* em pacientes com CPCNP podem definir mecanismos de sensibilidade a drogas e resistência primária ou adquirida aos TKI (Howlader et al. 2020).

Atualmente, existem vários subtipos moleculares de CPCNP identificados que têm terapias direcionadas aprovadas para seu tratamento: tumores com mutações no gene *EGFR* e rearranjos do gene *ALK*, por exemplo. Tumores com essas alterações genéticas respondem bem a inibidores específicos de tirosina-quinase. Rearranjos do gene *ROS1* são observados em até 2% dos pacientes com CPCNP e respondem ao tratamento com crizotinibe e entrectinibe (Bergethon et al. 2012). Além de *EGFR*, *ALK* e *ROS1*, outros oncogenes importantes no CPCNP incluem *MET, KRAS, ERBB2, BRAF, RET* e *NTRK* (Jordan et al. 2017).

A Tabela 2 apresenta os alvos acionáveis em câncer de pulmão e as terapêuticas disponíveis.

Tabela 2 - Alvos acionáveis em câncer de pulmão e as terapêuticas disponíveis

Biomarcadores estratégicos	Frequência em CPCNP	Terapias aprovadas e investigadas	Toxicidades	Terapia de linha de frente preferida
EGFR	10-50%	*Osimertinibe, Erlotinibe, Gefitinibe, Afatinibe, Dacomitinibe*	Cutânea (erupção acneiforme), gastrointestinal (diarreia)	*Osimertinibe*
ALK	1-7%	*Crizotinibe, Ceritinibe, Alectinibe, Brigatinibe, Lorlatinieb*	Gastrointestinal (náuseas, diarreia), transaminite, alterações visuais, pneumonite	*Alectinibe, brigatinibe ou lorlatinibe*
ROS1	1-2%	*Crizotinibe, Ceritinibe, Entrectinibe, Lorlatinibe*	Gastrointestinal (náuseas, diarreia), transaminite, alterações visuais, pneumonite	*Crizotinibe* ou *Entrectinibe*
MET	3-6%	*Crizotinibe, Capmatinibe, Tepotinibe, Telisotuzumabe-vedotin*	Gastrointestinal (náuseas, diarreia), transaminite	*Crizotinibe* ou *Capmatinibe*
RET	1-2%	*Cabozantinibe, Vandetanibe, Sunitinibe, Pralsetnibe (BLU-667)* *Selpercatinibe (LOXO-292)*	Fadiga, transaminite, hipertensão, diarreia	*Selpercatinibe*
NTRK	3-4%	*Larotrectinibe, Entrectinibe, Loxo-195*	Fadiga, edema, tontura, prisão de ventre, diarreia, anormalidades hepáticas	*Larotrectinibe* ou *Entrectinibe*
BRAF	7%	*Dabrafenibe, Trametinibe, Vemurafenibe*	Erupção cutânea, febre, dor de cabeça, diarreia	*Dabrafenibe+Trametinibe*
Expressão PD-L1	-22%-47% (Dietel et al. 2018)	*Pembrolizumabe Nivolumabe, Ipilimumabe, Atezolizumabe, Durvalumabe*	Toxicidades imunomediadas, incluindo pulmonar e gastrointestinal	Várias opções de combinação de quimioterapia e imunoterapia ou imunoterapia de agente único

Fonte: Modificado de Rajurkar et al. (2020).

1.1.3 Sobrevida dos pacientes com CPCNP

Entre os homens, a incidência de CPCNP diminuiu gradualmente em 1,9% ao ano de 2001 a 2008 e, de forma mais acentuada, 3,1% ao ano, de 2008 a 2016. A mortalidade baseada em incidência diminuiu 3,2% ao ano de 2006 a 2013, depois passou para 6,3% ao ano de 2013 a 2016. A sobrevida passou de 26% em 2001 para 35% em 2014 (Howlader et al. 2020).

Entre as mulheres, a incidência de CPCNP apresentou um redução de 1,5% a ano no período de 2006 a 2016. Em contraste, a mortalidade baseada na incidência diminuiu em 2,3% ao ano, no período de 2006 a 2014 e, em seguida, a uma taxa de 5,9% ao ano no período de 2014 a 2016 (Howlader et al. 2020).

A redução na mortalidade do CPCNP foi associada aos avanços no tratamento – particularmente o uso de terapias direcionadas – e a redução de incidência em decorrência da redução do consumo de tabaco. A evolução da sobrevida entre as mulheres foi observada em padrões semelhantes aos dos homens, em todas as raças e grupos étnicos. A melhora observada na sobrevida não é devida a mudanças de estágio, porque esses pacientes passaram de estágios desconhecidos para categorias de estágios específicas (como resultado da disponibilidade de melhores imagens) (Howlader et al. 2020).

1.1.4 O gene ROS1 em CPCNP

O oncogene *ROS1* foi descoberto pela primeira vez como produto oncogênico de um vírus de RNA do sarcoma aviário (Rikova et al. 2007; Shaw et al. 2014, 2019) e é ativado por rearranjo cromossômico em uma variedade de cânceres humanos, incluindo o CPCNP (Shaw et al. 2014). Os rearranjos do gene *ROS1* foram associados inicialmente ao câncer humano em 1987 (Birchmeier et al. 1997), quando foram descobertos numa linhagem de células de glioblastoma e, posteriormente, em 2007, em uma linhagem celular derivada de um paciente com CPCNP (Rikova et al. 2007).

O rearranjo leva à fusão de uma porção do gene *ROS1,* que inclui todo o domínio de tirosina-quinase, com 1 de 12 genes parceiros diferentes (Rossi et al. 2017; Drilon et al. 2020). As quinases de fusão resultantes são constitutivamente ativadas e conduzem à transformação celular. Não se sabe se as várias quinases de fusão podem ter propriedades oncogênicas diferentes (Shaw et al. 2014).

Rearranjos de *ROS1* ocorrem em aproximadamente 1-2% dos CPCNP (Takeuchi et al. 2012; Shaw et al. 2014; Kohno et al. 2015; Facchinetti et al. 2017; Kato et al. 2018; Luk et al. 2018; Joshi et al. 2019). A incidência do rearranjos *ROS1* é baixa no CPCNP, mas seu

diagnóstico oferece aos pacientes a oportunidade de receber terapias direcionadas altamente eficazes (Suryavanshi et al. 2017).

De 1,5 milhão de novos casos estimados de CPCNP em todo o mundo a cada ano, aproximadamente 15.000 podem ser causados por fusões oncogênicas de *ROS1*. Assim como nos rearranjos do gene *ALK*, os rearranjos de *ROS1* são mais comumente encontrados em pacientes que nunca fumaram ou têm histórico de tabagismo leve e que possuem características histológicas de adenocarcinoma. No nível genético, os rearranjos de *ALK* e *ROS1* raramente ocorrem no mesmo tumor, cada um definindo um subgrupo molecular único de CPCNP (Shaw et al. 2014).

Devido às semelhanças entre os oncogenes *ALK* e *ROS1,* lições inferidas de rearranjos de *ALK* podem ser aplicadas ao CPCNP com rearranjos de *ROS1*. Contudo, existem disparidades entre as doenças dominadas por esses dois genes. Na ausência de alterações genéticas mais comumente detectadas em CPCNP, tais como mutações em *EGFR* e *KRAS* e fusões do gene *ALK*, a busca por rearranjos do gene *ROS1* é essencial. Os diagnósticos moleculares dedicados devem ser padronizados, confiando em algoritmos práticos e eficientes, compreendendo a imuno-histoquímica e a hibridação *in situ* por fluorescência (Facchinetti et al. 2017).

1.1.5 Diagnóstico do rearranjo de *ROS1*

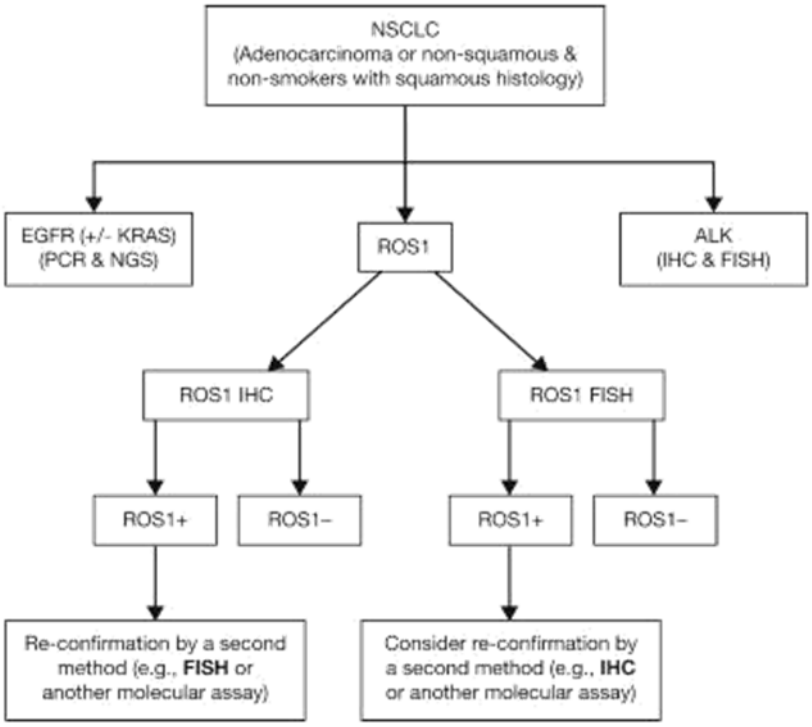
É clinicamente importante detectar pacientes que podem se beneficiar de tratamentos direcionados à rearranjos do gene *ROS1* (Shaw et al. 2014; Bubendorf et al. 2016). Em pacientes com CPCNP, o método de FISH tem sido relevante para a confirmação do diagnóstico de rearranjos *ROS1* (Bubendorf et al. 2016; Lim et al. 2017). Um problema na seleção desses pacientes é o número reduzido de amostras de biópsia para uma investigação molecular extensa (Lim et al. 2017).

Luk et al. (2018) revisaram o papel da imuno-histoquímica na avaliação dos rearranjos de *ALK* e *ROS1* no câncer de pulmão, enfatizando questões práticas em comparação com outras modalidades como a hibridização *in situ* por fluorescência. Concluíram que, embora a hibridização *in situ* por fluorescência continue a ser o padrão-ouro (Luk et al. 2018) para a detecção dos rearranjos de *ALK* e *ROS1* no CPCNP, a imuno-histoquímica desempenha um papel importante e pode ser um método de rastreamento eficaz para a detecção dessas alterações genéticas, ou um teste de diagnóstico no contexto de *ALK*. Ambos os métodos, contudo, desempenham papéis importantes na identificação de adenocarcinomas pulmonares com fusões

de *ALK* e *ROS1,* e é fundamental que os patologistas compreendam os pontos fortes e as limitações das diferentes técnicas para otimizar o diagnóstico de cada paciente.

Antes da realização do método de FISH, um teste de imuno-histoquímica de primeira linha é recomendado para pré-selecionar pacientes ROS1 positivos. Com uma pontuação igual a zero como resultado da imuno-histoquímica para ROS1 não é necessário realizar mais testes pelo método de FISH (Ginestet et al. 2018). No entanto, para resultados de imuno-histoquímica com ROS1 fraco a forte (pontuação 1+, 2+ e 3+) é necessário realizar o teste pelo método de FISH para confirmar a presença de rearranjos de *ROS1,* e posterior adoção de alguma terapia direcionada (Bubendorf et al. 2016; Ginestet et al. 2018).

A Figura 3 apresenta um fluxograma para investigação do rearranjo de *ROS1*.



Fonte: Budendorf et al. (2016)

Figura 3 - Fluxograma para investigação do rearranjo de *ROS1*

Para identificação de rearranjos de *ROS1* o limite de, pelo menos, 15% dos núcleos do tumor com sinais reorganizados são considerados positivos pelo método de FISH (Bubendorf et al. 2016; Ginestet et al. 2018). No entanto, alguns resultados do método de FISH podem permanecer ambíguos em torno do limite de 15%, nesse caso, Uguen et al. (2015) e Uguen e De Braekeleer (2016) sugerem a realização de testes pelo método de FISH adicionais com diferentes sondas para auxiliar na interpretação desse status.

O *Next Generation Sequencing* (NGS) consiste numa tecnologia de sequenciamento de DNA que pode realizar o sequenciamento completo ou parcial de múltiplos genes em paralelo numa única reação. Em pacientes oncológicos, o NGS pode fornecer a base do tratamento personalizado para os pacientes, com o objetivo de identificar mutações em tumores que podem ser alvos de drogas específicas (Slatko et al. 2018). Clavé et al. (2019) comparando a eficácia de NGS e FISH para detecção de rearranjos de ALK e ROS1 demonstraram uma melhor capacidade destes eventos, como menor frequência de falsos positivos, com o emprego do NGS.

1.1.6 Tratamento do CPCNP com rearranjo de *ROS1*

Bergethon et al. (2012) analisaram as características clínicas e os resultados do tratamento de pacientes com CPCNP com rearranjos *ROS1*. Foi utilizado o método de FISH para a seleção de 1.073 pacientes com CPCNP e para atribuição do status de rearranjo do gene *ROS1* com características clínicas, sobrevida global e, quando disponível, rearranjos de *ALK*. Eles também realizaram ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade de resposta das células com rearranjos de *ROS1* ao crizotinibe. Dos 1.073 tumores examinados, 18 (1,7%) apresentaram rearranjos de *ROS1* e 31 (2,9%) foram classificados como tumores com rearranjos de *ALK* de acordo com o método de FISH. Em comparação com o grupo *ROS1*-negativo, os pacientes *ROS1*-positivos foram significativamente mais jovens e não fumantes. Todos os tumores positivos para *ROS1* eram adenocarcinomas, com tendência a apresentarem maior grau histológico. Os grupos *ROS1* positivos e negativos não apresentaram diferenças em sobrevida global (Bergethon et al. 2012).

Em 2012, uma triagem de um grande painel de amostras de CPCNP identificou quatro novos parceiros de fusão do gene *ROS1*: *TPM3, SDC4, EZR* e *LRIG3*, além de *SLC34A2* e *CD74*. Por meio de um sistema integrado de rastreamento, baseado em histopatologia, foi realizada uma triagem para fusões de *ALK* e *ROS1* em 1.529 cânceres de pulmão e identificaram-se 44 carcinomas positivos para rearranjos de *ALK* e 13 de *ROS1,* incluindo casos com parceiros de fusão, até então, não identificados para *ROS1*. A resposta clínica de pacientes com CPCNP com rearranjos de *ROS1* ao crizotinibe foi investigada como parte de uma coorte expandida de um estudo de fase I. A maior parte dos pacientes tratados com crizotinibe apresentou regressão do tumor. Os autores concluíram que o rearranjo do gene *ROS1* define um subconjunto de CPCNP com características clínicas distintas que são semelhantes às observadas em pacientes com CPCNP com rearranjo do gene *ALK* (Takeuchi et al. 2012).

Devido à baixa prevalência de rearranjos *ROS1,* a realização de estudos de fase III que comparam os diferentes inibidores de tirosina-quinase à quimioterapia é improvável, o que

dificulta o estabelecimento formal definitivo da superioridade dos inibidores de *ROS1* em relação à quimioterapia (Dagogo-Jack e Shaw 2017).

Shaw et al. (2019) avaliaram pacientes com idade ≥18 anos com diagnóstico de CPCNP localmente avançado ou metastático, confirmado histologicamente, positivo para rearranjos de *ROS1*. Foram incluídos na análise 53 pacientes, sendo 50 pacientes na coorte de expansão de CPCNP positivo para *ROS1* e 3 pacientes em uma coorte de CPCNP ALK-negativo que foram retrospectivamente determinados como positivos para rearranjos de *ROS1*. O status do gene *ROS1* foi determinado por FISH ou Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa. Os pacientes foram inscritos em um estudo de fase I, avaliando crizotinibe, que incluiu uma fase inicial de escalonamento de dose seguida por uma fase de expansão na qual o RP2D foi avaliado em coortes de pacientes definidas molecularmente (PROFILE 1001). Todos os pacientes receberam crizotinibe na dosagem inicial de 250 mg duas vezes ao dia. Após um acompanhamento por um período mediano de 62,6 meses, a sobrevida global mediana em pacientes com CPCNP avançado *ROS1*-positivo que receberam crizotinibe foi de 51,4 meses, a mais longa observada até aquela data com uma terapia orientada para *ROS1*. Esses achados servem como uma nova referência para a sobrevida global em pacientes com CPCNP avançado *ROS1*-positivo e continuam a apoiar o uso do crizotinibe no tratamento desses pacientes.

Segundo Rossi et al. (2017), uma vez estabelecido o papel de *ROS1* no CPCNP, e a melhora clínica obtida com o crizotinibe, a detecção de rearranjos *ROS1* é fundamental.

Até 50% dos tumores pulmonares que abrigam genes de fusão *ROS1* tratados com crizotinibe desenvolvem uma mutação secundária, G2032R, no domínio da quinase. Vários inibidores *ROS1* de última geração foram desenvolvidos para pacientes com câncer de pulmão *ROS1*-positivo. O inibidor de MET/VEGFR2/RET/*ROS1*/AXL, cabozantinibe, já foi aprovado para uso em pacientes com carcinoma de células renais avançado e ensaios clínicos foram realizados para câncer de pulmão com genes de fusão de *RET* ou *ROS1* (NCT01639508). Por conseguinte, o cabozantinibe pode ser um medicamento clinicamente relevante para superar a resistência ao crizotinibe em câncer do pulmão que contenha genes de fusão *ROS1* (Kato et al. 2018).

Outro medicamento desenvolvido recentemente para o tratamento do CPCNP é o entrectinibe que induz controle durável da doença em pacientes com CPCNP com rearranjos de *ROS1* e apresenta perfil de segurança bastante administrável (Doebele et al. 2020; Drilon et al. 2020; Lassen 2020).

O entrectinibe é um potente inibidor da tirosina quinase com atividade contra ALK, *ROS1* e NTRK. Esse medicamento foi estudado em três ensaios de fase 1 e 2 de pacientes com

tumores sólidos de fusão de genes ALKA-372-001, STARTRK-1 e STARTRK-2 (Lassen 2020). Os estudos publicados por Drilon et al. (2020) e Doebele et al. (2020) apresentaram resultados encorajadores com a análise integrada de todos os três ensaios em tumores sólidos com fusões gênicas.

1.2 EXPRESSÃO DE PD-L1 EM CPCNP

Recentemente, os esforços de imunoterapia contra o câncer têm-se concentrado no uso de inibidores de *checkpoints* imunes. A ativação das células T é um processo fortemente regulado que envolve um equilíbrio entre sinais co-estimulatórios e co-inibitórios (Herzberg et al. 2017). Os sinais co-inibitórios (*checkpoints* imunes) servem para manter o estado de auto-tolerância e evitar a destruição do tecido normal do hospedeiro durante uma resposta imune contra patógenos. Essa característica tem formado a base para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos monoclonais direcionados a proteínas co-inibitórias (Herzberg et al. 2017). Os *checkpoints* imunes mais caracterizados e mais clinicamente relevantes até o momento são: CTLA-4 e PD-1, sendo o segundo o ponto de interesse para o presente estudo.

O PD-1 é uma proteína de membrana tipo I, com 268 aminoácidos, pertencente à família de moléculas reguladoras de células T, denominada CD28/B7, codificada pelo gene *PDCD1*, com domínio extracelular IgV, seguido de uma região transmembrana e uma cauda intracelular, contendo dois sítios de fosforilação. Essa proteína é expressa na superfície de células T ativadas, células B e macrófagos, sugerindo que ela é capaz de inibir a resposta imune celular de forma mais ampla. Sua principal função é regular a ativação de linfócitos efetores durante a resposta imune nos tecidos periféricos nos quais as células T podem entrar em contato com os ligantes de PD-1, PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC), que são expressos por células tumorais, células do estroma, ou ambas (Zandberg e Strome 2014; Sui et al 2018).

O PD-L1 está intrinsecamente ligado à modulação da resposta imune no câncer (Zandberg e Strome 2014). Atualmente, sabe-se que pode existir superexpressão de PD-L1 como um mecanismo de escape à resposta imune adaptativa em tumores malignos sólidos de diversas localizações anatômicas. Vários tipos de células que infiltram o estroma dos tumores podem expressar o PD-L1, tais como macrófagos, células supressoras mieloides, células endoteliais, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B (Okita et al. 2017).

O PD-L1 está presente no citoplasma e na membrana plasmática das células tumorais, mas não é expresso necessariamente em todas as células dentro de um tumor. A expressão de PD-L1 é induzida por múltiplas moléculas pró-inflamatórias, incluindo os interferons de tipo I

e II, TNF-α, LPS, GM-CSF e VEGF, bem como as citocinas IL-10 e IL-4, sendo o IFN- γ o seu indutor mais potente (He et al. 2015).

A avaliação por imuno-histoquímica de PD-L1 possui um inegável valor preditivo de resposta às terapias anti-PD-1 e anti-PD-L1 disponíveis. O resultado da expressão de PD-L1 pode ser determinado pelo percentual de células tumorais com imunocoloração de membrana (completa ou basolateral) de qualquer intensidade ou pelo percentual de células imunes associadas ao tumor, com imunocoloração de qualquer intensidade, de acordo com o tipo de neoplasia em análise (Chen 2017).

A terapia anti-PD-1/anti-PD-L1 é considerada um importante avanço no tratamento de CPCNP (Chen 2017). Recentemente, estudos clínicos demonstraram atividade antitumoral significativa de agentes anti-PD-1 e PD-L1 em CPCNP (Topalian et al. 2012; Herbst et al. 2014; Garon et al. 2015; Grigg et al. 2016; Barbier et al. 2021), e melhora significativa na sobrevida global de pacientes com CPCNP avançado, em comparação com o docetaxel como agente único em segunda linha (Horn et al. 2017; Borghaei et al. 2021).

A expressão de PD-L1 nas células tumorais está significativamente associada a presença de linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) (Velcheti et al. 2014), sugerindo que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no crescimento e progressão do tumor. Em um esforço para prever os pacientes que responderão ao bloqueio PD-1/PD-L1, foi proposto que os tumores podem ser classificados em quatro grupos com base na expressão de PD-L1 e presença ou ausência de TILs (Taube et al. 2012; Teng et al. 2015). Estes quatro grupos são: tipo I: PD-L1 positivo com TILs, refletindo resistência imune adaptativa; tipo II: PD-L1 negativo sem TILs, indicando ignorância imunológica; tipo III: PD-L1 positivo sem TIL, indicando indução constitutiva de PD-L1; e tipo IV: PD-L1 negativo com TIL, indicando o papel de outros supressores na promoção da tolerância imunológica (Teng et al. 2015).

A avaliação da expressão PD-L1 no momento do diagnóstico patológico inicial, antes de qualquer tratamento antitumoral, é a melhor maneira de avaliar a expressão PD-L1 em CPCNP, sobretudo durante o tratamento de primeira linha (Lee et al. 2019).

Semelhantemente as mutações de *EGFR* e os rearranjos de *ALK*, os CPCNP com rearranjos de *ROS1* estão associados à má resposta à imunoterapia (Lim et al. 2017; Ginestet et al. 2018).

O PD-L1 é o principal ligante de PD-1 e apresenta ampla expressão normal em células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células T, células B, células endoteliais e epiteliais (Sharpe et al. 2007; Jiang et al. 2017). No ambiente tumoral, a expressão de PD-L1 é ectopicamente regulada para cima em TC, bem como em células imunes infiltrantes de tumor (Jiang et al.

2017). A análise de expressão de PD-L1 por imuno-histoquímica é usada para seleção de terapias de primeira linha em adenocarcinomas de pulmão. A intensidade de marcação de PD-L1 por imuno-histoquímica pode ser preditiva de resposta ao inibidor de PD1 e de PD-L1 (Rangachari et al. 2017).

Vários estudos clínicos em CPCNP demonstraram uma correlação entre o aumento da expressão de PD-L1 em CPCNP TC e/ou infiltração de tumor IC com eficácia aprimorada de imunoterapias anti-PD-1/PD-L1 (Garon et al. 2015; Herbst et al. 2014; Jiang et al. 2017). Entretanto, há uma escassez de informação sobre a expressão de PD-L1 em tumores com rearranjos do gene *ROS1*.

Neste contexto, a realização do presente estudo é relevante pela prevalência de CPCNP, sendo fundamental a identificação de biomarcadores relacionados a esse tipo de câncer para ampliar as opções de tratamento. Assim, a identificação de rearranjos de *ROS1* pelo método FISH em pacientes com CPCNP é essencial para a adoção de uma terapêutica mais promissora para o paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência do rearranjo do gene *ROS1* em pacientes portadores de CPCNP não escamoso diagnosticados na Região da Foz do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina (SC), Brasil, no período de 02/01/2019 a 27/07/2020.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência de pacientes com CPCNP não escamoso ou carcinoma adenoescamoso de pulmão com rearranjo do gene *ROS1*;
- Descrever as características clínicas dos pacientes incluídos na coorte estudada;
- Avaliar a expressão do PD-L1 nos tumores dos pacientes incluídos na coorte estudada bem como entre os tumores com rearranjos de *ROS1* e descrever a frequência de rearranjos de *ALK* e mutação de *EGFR*;
- Descrever a frequência de expressão de ROS1 por imuno-histoquímica em CPCNP;
- Analisar a frequência de rearranjo do gene *ROS1* pelo método de FISH nos pacientes com imuno-histoquímica positiva para a proteína ROS1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo observacional, retrospectivo e prospectivo, descritivo e analítico.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

Região da Foz do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, Brasil, análises anatomopatológicas centralizadas no Laboratório de Patologia INFOLAUDO, nas unidades de Itajaí e Balneário Camboriú (SC).

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes com CPCNP não escamoso ou carcinoma adenoescamoso de pulmão atendidos na Região da Foz do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, Brasil, com análises anatomopatológicas centralizadas no Laboratório de Patologia INFOLAUDO, nas unidades de Itajaí e Balneário Camboriú (SC).

O Estado de Santa Catarina conta com uma população estimada para 2020 de 7.252.502 pessoas. A Região do Vale do Itajaí possui uma população estimada para 2020 de 1.007.789 pessoas, representando 13,9% da população do Estado. Já a Região da Foz do Rio Itajaí conta com uma população estimada para 2020 de 731.766 pessoas, que corresponde a 72,6% da população do Vale do Itajaí e a 10,09% da população do Estado de SC (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE 2020), distribuída entre onze municípios: Balneário Camboriú, Balneário Piçarras, Bombinhas, Camboriú, Ilhota, Itajaí, Itapema, Luiz Alves, Navegantes, Penha, Porto Belo, totalizando uma população estimada para 2020 de 731.766 pessoas (Figura 3).

Tabela 3 - Municípios da Foz do Rio Itajaí, Vale do Itajaí, Estado de Santa Catarina, população estimada para 2020.

Município	População estimada para 2020			
	n	% Foz do Rio Itajaí	% Vale do Itajaí	% Estado Santa Catarina
Balneário Camboriú	145.796	19,9%	14,47%	2,01%
Balneário de Piçarras	23.772	3,2%	2,36%	0,33%
Bombinhas	20.335	2,8%	2,02%	0,28%
Camboriú	85.105	11,6%	8,44%	1,17%
Ilhota	14.359	2,0%	1,42%	0,20%
Itajaí	223.112	30,5%	22,14%	3,08%
Itapema	67.338	9,2%	6,68%	0,93%
Luiz Alves	13.107	1,8%	1,30%	0,18%
Navegantes	83.626	11,4%	8,30%	1,15%
Penha	33.284	4,5%	3,30%	0,46%
Porto Belo	21.932	3,0%	2,18%	0,30%
TOTAL	731.766	100,0%	72,61%	10,09%

Fonte: IBGE (2020).

A estimativa para o Estado de Santa Catarina, em 2020, foi de 1.770 novos casos de câncer do pulmão. O Laboratório de Patologia INFOLAUDO, nas unidades de Itajaí e Balneário Camboriú (SC), realizou o diagnóstico de 587 casos de câncer do pulmão no período de 02/01/2019 a 27/07/2020, entre os pacientes da Região da Foz do Rio Itajaí, representando 33,2% do total estimado para o Estado de Santa Catarina em 2020.

3.4 PERÍODO DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA (COLETA DE DADOS)

De 02/01/2019 a 27/07/2020.

3.5 SELEÇÃO DOS PACIENTES

3.5.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico histopatológico de CPCNP não escamoso ou carcinoma adenoescamoso de pulmão, recrutados consecutivamente, no período de 02/01/2019 a 27/07/2020 em qualquer estádio, na Região da Foz do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, Brasil.

3.5.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com tumores não epiteliais de pulmão;
- Pacientes sem material biológico disponível para análise.

3.6 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

As amostras de tumor empregadas neste estudo foram identificadas no laboratório INFOLAUDO, nas unidades localizadas em Itajaí e Balneário Camboriú, que representam a Região da Foz do Rio Itajaí, no Estado de Santa Catarina (SC), Brasil.

As análises histológicas para diagnóstico, assim como a avaliação de PD-L1, *EGFR*, *ALK* e *ROS1* foram realizadas no Laboratório de Patologia INFOLAUDO. As análises pelo método de FISH foram realizadas no Laboratório Studart Ltda., situado em Fortaleza, Ceará, Brasil, pelo Dr. Rodrigo Guimarães Andrade.

3.6.1 Variáveis analisadas

- Frequência de rearranjos de *ROS1;*
- Expressão PD-L1;
- Frequência de mutação no gene *EGFR*;
- Frequência de casos *ALK* positivos;
- Sexo;
- Idade;
- Tabagismo;
- Estadiamento;
- Tipo de adenocarcinoma.

3.7 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A expressão dos marcadores *ROS1* e PD-L1 por imuno-histoquímica foi analisada utilizando-se o microscópio Olympus CX31. Apenas os pacientes negativos para mutação em *EGFR* e para rearranjos de *ALK* foram submetidos a esta análise.

Os recursos utilizados para análise no INFOLAUDO foram:

- BechMark Ultra: O BechMark Ultra é um sistema de coloração de lâminas para imuno-histoquímica (apenas sistema automatizado de imuno-histoquímica),

totalmente automatizado da *Roche Tissue Diagnostics*, que oferece recursos projetados para fornecer um diagnóstico de confiança.

- Autostainer Link 48: O Autostainer Link 48 fornece opções de *software* e conectividade que visam melhorar a gestão da carga de trabalho e relatórios em laboratórios, mantendo a qualidade nos resultados de coloração de imuno-histoquímica (utilizado para análise PD-L1).

A reação de imuno-histoquímica foi realizada por meio da plataforma automatizada BenchMark ULTRA *staining instrument* (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) para as análises de ROS1 e ALK.

O ALK foi avaliado por imuno-histoquímica VENTANA ALK (D5F3) IHC (Roche 2015):

- Positivo para ALK: apresenta coloração citoplasmática granular forte em células tumorais. Devem excluir-se determinados artefatos de coloração, como: pontilhado citoplasmático ligeiro em macrófagos alveolares; células de origem neuronal; coloração epitelial glandular; e células linforreticulares dispersas com infiltrado linfocítico. Também pode apresentar alguma coloração de fundo na mucosa normal em CPCNP (incluindo mucina) e em áreas tumorais necróticas, que devem ser excluídas da avaliação clínica.
- Negativo para ALK: ausência de coloração citoplasmática granular forte em células tumorais.

O gene *EGFR* foi analisado por PCR-ARMS (*amplification refractory mutation system*). Esse é um dos métodos de PCR mais comumente usados para análise *EGFR* e baseia-se na atividade diferencial da enzima Taq DNA-polimerase durante a amplificação de sequências que têm pontos de incompatibilidade na extremidade 3'. Os *primers* (iniciadores) usados na reação de ARMS, ao se emparelharem com sequências que sofreram mutação, apresentam pontos de não-pareamento, possibilitando a detecção de mutações por meio da identificação de diferenças nos padrões de bandas gerados (Lopes et al. 2015).

As amostras tumorais seguiram rotinas internas de cuidados pré-analíticos, incluindo a fixação com formol tamponado 10%, durante período de seis a 12 horas. Após processamento histológico, as amostras foram cortadas com espessuras de 5,0 μm. O anticorpo utilizado foi o ROS1 (clone SP384), pré-diluído, pronto para uso. Ao anticorpo primário monoclonal foi aplicado o *OptiView DAB IHC Detection Kit* e *OptiView Amplification Kit*, seguindo instruções do fabricante (*Kit optview amplification* Ref 6396518001).

Foi usado pneumócito II de pulmão normal como controle positivo da reação imuno-histoquímica para ROS1 (Figura 4).

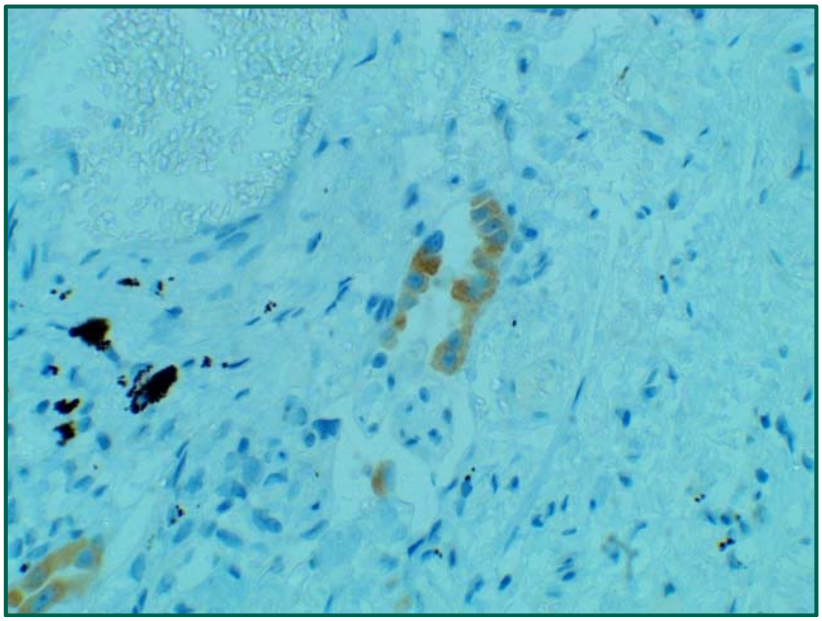


Figura 4 - Marcação imuno-histoquímica para ROS1 observada em pneumócito II (coloração acastanhada) em pulmão normal, usada como controle positivo. Fotomicrografia obtida em Microscópio Olympus CX31. Anticorpo monoclonal de coelho (Clone SP384).

Na imuno-histoquímica para ROS1 foi utilizado um sistema de pontuação semi-quantitativa de intensidade de expressão. Foram considerados positivos as amostras com expressão moderada e forte, independente do percentual de células marcadas (Figura 5).

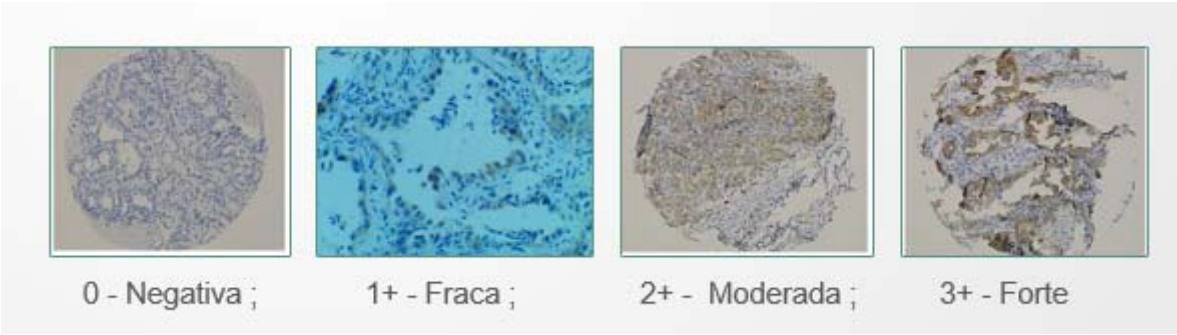


Figura 5 - Análise imuno-histoquímica da marcação para ROS1 com microfotografias mostrando o agrupamento das intensidades de marcação.

A coloração foi graduada de forma semiquantitativa (Sholl et al. 2013):

0 (zero) para expressão ausente ou apenas expressão nuclear;

- 1+ para colorações citoplasmáticas fracas, coloração quase imperceptíveis, que não excedam o fundo em nenhuma porcentagem de células;
- 2+ para coloração citoplasmática excedendo o fundo em 0 a 50% das células tumorais; e
- 3+ para coloração citoplasmática excedendo o fundo em >50% das células tumorais.

Os casos positivos demonstram um padrão de expressão citoplasmática granular e difusa, frequentemente de intensidade variável na população de células tumorais (Sholl et al. 2013). Nesta pesquisa foram considerados apenas os resultados classificados como 3+.

Os tumores com imuno-histoquímica positiva para a proteína ROS1 foram testados, posteriormente, pelo método de FISH.

A avaliação do PD-L1 foi realizada apenas nas células tumorais, sendo observada a expressão na membrana celular, independente da sua intensidade. Para fins de interpretação e correlação.

Os tumores com imuno-histoquímica positiva para a proteína ROS1 foram testados, posteriormente, pelo método de FISH, utilizando-se uma sonda de DNA para o gene *ROS1* do tipo *break-apart* (*Abbott Molecular*).

A avaliação do PD-L1 foi realizada apenas nas células tumorais, sendo observada a expressão na membrana celular, independente da sua intensidade. Para fins de interpretação e correlação com demais variáveis, a expressão PD-L1 foi tanto avaliada como variável contínua, com pontos de corte de 1%, 5%, 10% e daí em diante com acréscimo de 10% até 100%, quanto dividida em três categorias de interpretação, seguindo padrões já estabelecidos pela literatura, sendo elas: sem expressão, aonde menos de 1% das células tumorais são positivas para esta proteína, baixa expressão, onde essa positividade é observada entre 1% e 49% destas células e alta expressão, em que mais de 49% das células são PD-L1 positivas.

A técnica empregada foi baseada no PD-L1 IHC 22C3 pharmDX que contém reagentes otimizados e o protocolo necessário para a execução dos procedimentos de marcação de imuno-histoquímica de amostras embebidas em parafina e fixadas em formalina (FFPE) usando Autostainer link 48. Após a incubação com o anticorpo monoclonal primário anti-PD-L1 ou o reagente de controle negativo (NCR), as amostras foram incubadas utilizando um anticorpo de vinculação específico às espécies hospedeiras do anticorpo primário e, em seguida, foram incubadas com reagente de visualização pronto para uso, composto por moléculas de anticorpo

secundário e moléculas de perioxidase de raiz forte ligadas à espinha dorsal de um polímero dextrano. A conversão enzimática do cromogênio adicionado posteriormente resulta na precipitação de um produto de reação visível no local do antígeno. A cor da reação cromogênica é modificada por um reagente cromogênico de realce. A amostra pode, então, ser contrastada e recoberta com vidro.

A leitura das lâminas foi realizada pela equipe do INFOLAUDO. Os resultados foram interpretados pelo pesquisador, comparados com os achados na revisão de literatura e apresentados neste estudo. Quanto à expressão PD-L1, a Figura 6 demonstra os resultados observados considerando os seguintes pontos de corte: sem expressão (menos de 1%); baixa expressão (de 1 a 49%); e alta expressão (mais de 49% das células são PD-L1 positivas).

3.8 MÉTODO DE FISH

Os pacientes com imuno-histoquímica positiva para a proteína *ROS1* foram testados pelo método de FISH, utilizando-se uma sonda de DNA para o gene *ROS1* do tipo *break-apart* (Abbott Molecular).

Foi utilizada uma sonda de DNA para o gene *ROS1* do tipo *break-apart* (Abbott Molecular) – Sonda de Separação de duas cores.

As duas extremidades do gene *ROS1* são separadas e a porção contendo o domínio tirosina quinase é fundida com outro parceiro para criar um gene de fusão.

Parte 3’ centromérica – Verde e parte 5’ Telomérica – Laranja.

A – Padrão convencional – apresenta dois sinais separados.

B – Padrão atípico – apresenta o sinal 3 (Verde) Isolado.

A porção com sinal verde é a que contém o domínio quinase.

O critério de avaliação de rearranjo do gene *ROS1* pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), realizado com sonda de dupla marcação (*dual probe assay*) nas células neoplásicas é que se segue:

- Positivo para rearranjo do gene *ROS1*: quando apresentar valores >15% de células positivas;
- Negativo para rearranjo do gene *ROS1*: quando apresentar valores <15% de células positivas.

Foram considerados positivos os resultados que apresentaram:

- Coloração forte e difusa (3+);
- FISH Positivo – Sinais vermelhos e verdes separados.

A imagem da Figura 6 representa um resultado positivo para rearranjo do gene *ROS1*.

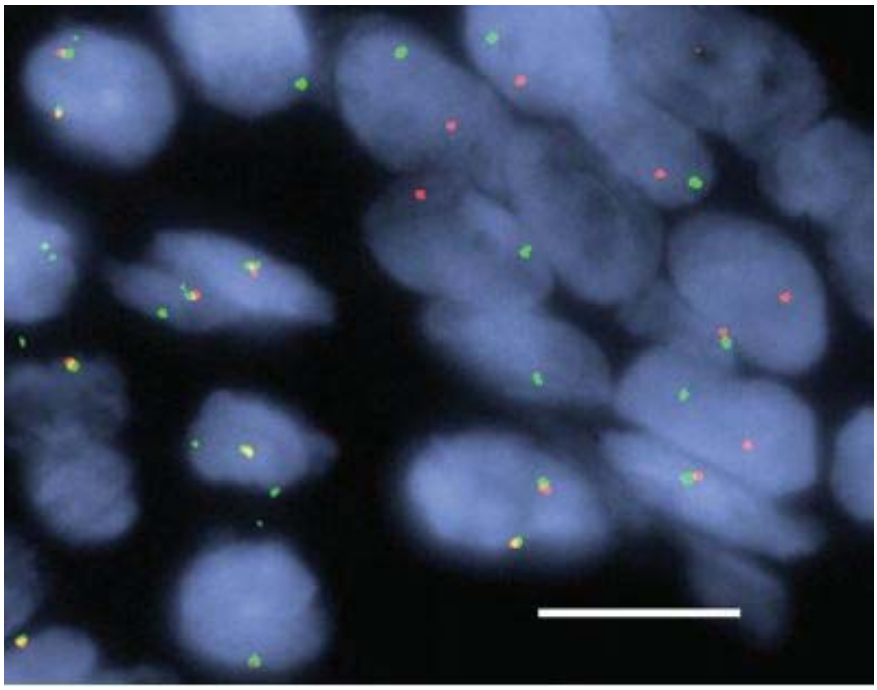


Figura 6 - Amostra de tumor com FISH positivo para rearranjo do gene *ROS1*. Imagem mostra células com os sinais correspondentes as sondas fluorescentes (vermelho e verde) separados, sugerindo que houve um rearranjo cromossômico.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência de mutação de *EGFR* e de rearranjo de *ALK* foi calculada em toda a amostra com diagnóstico de carcinoma de pulmão de células não pequenas não escamosos. Entretanto, a análise descritiva se restringiu a amostra de pacientes com tumores sem mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK*, e os resultados foram apresentados em números absolutos e porcentagens, representados por tabelas e discutidos a partir de uma comparação com a revisão de literatura relacionada ao tema.

Os valores estatísticos foram calculados em relação as variáveis sexo e idade. O teste de qui-quadrado (χ^2) de Pearson foi empregado para comparação das frequências entre os grupos analisados. Comparações com $p<0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Empregou-se o programa estatístico *Action Stat* para todas a análises.

3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo obedeceu aos preceitos éticos do Conselho Nacional de Saúde (CNS), incluídos na resolução n. 466/2012 (autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade). Foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa-CEP da instituição e os dados foram coletados após liberação do Parecer Consubstanciado, aprovado pelo Parecer nº. 3.412.642 (Anexo 1).

Os pacientes ou seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE para participação no presente estudo (Apêndice 1).

4 RESULTADOS

4.1 PROCESSO DE SELEÇÃO DE PACIENTES

A coorte analisada contou com 587 pacientes diagnosticados com câncer de pulmão na Região da Foz do Rio Itajaí, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 02/01/2019 a 27/07/2020. Desta coorte foram excluídos 110 (18,7%) pacientes diagnosticados com carcinoma de pulmão de células escamosas.

Entre os 477 (81,3%) pacientes restantes com diagnóstico histopatológico de CPCNP não escamoso ou carcinoma adenoescamoso de pulmão foi analisada a frequência de mutação no gene *EGFR* e de expressão de ALK. Destes, 92 (19,3%) foram identificados como *EGFR* positivos e 29 (6,1%) como *ALK* positivos, totalizando 121 (25,4%) pacientes que foram analisados apenas quanto às características clínicas, mas excluídos das análises por imuno-histoquímica e FISH, restando 356 pacientes para análise subsequente. A frequência da expressão PD-L1 foi 70,4% (336 de 477), sendo 153 (32,1%) entre 1% a 49% e 183 (38,4%) ≥50%.

Dos 356 pacientes, apenas 95 (26,7%) pacientes possuíam material de biópsia suficiente e adequado para novas análises e foram incluídos no estudo; os outros 261 (73,3%) pacientes que não possuíam material de biópsia suficiente para novas análises foram analisados apenas quanto às características clínicas para comparação com os 95 pacientes da amostra e dos pacientes *EGFR* positivo e *ALK* positivo, como demonstra o fluxograma apresentado na Figura 7.

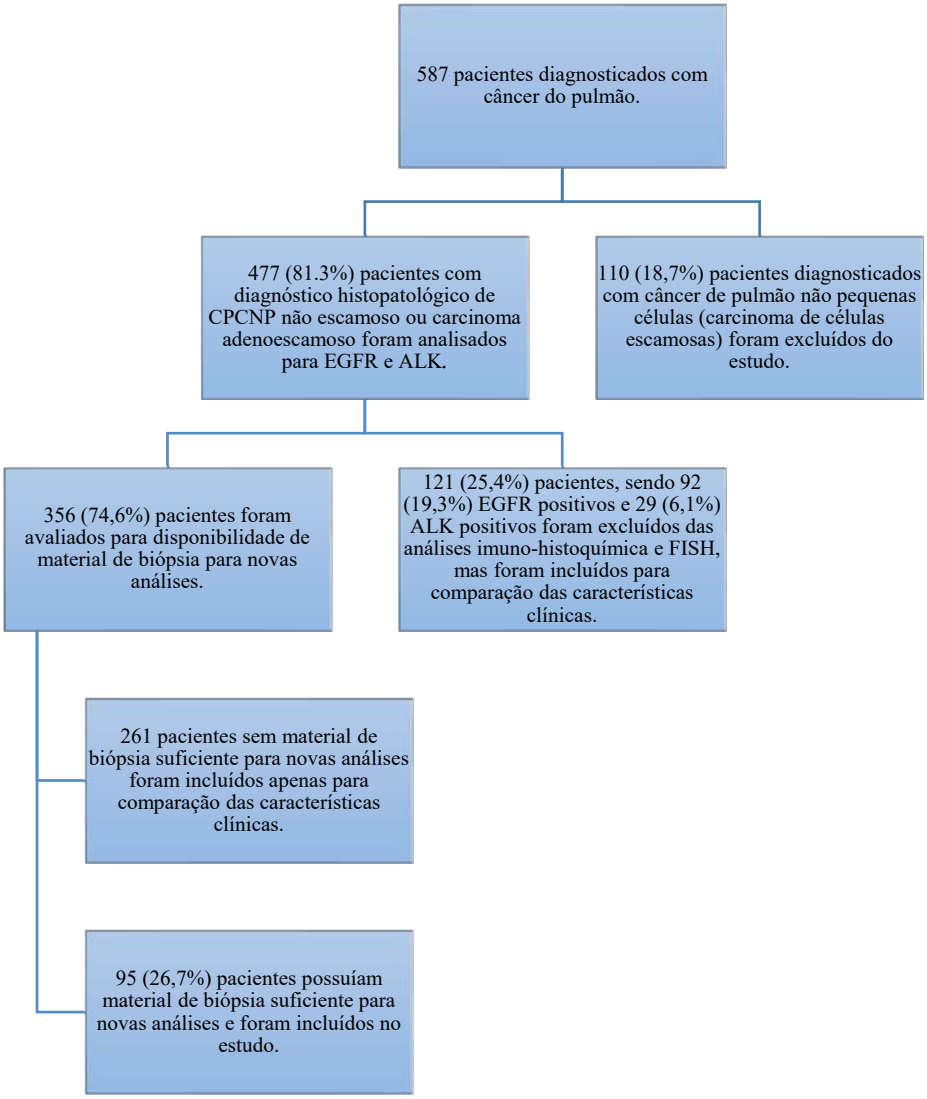


Figura 7 - Fluxograma de seleção de amostras em cada etapa do estudo.

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES

Os resultados abrangem 95 pacientes diagnosticados com CPCNP não escamoso ou carcinoma adenoescamoso (adenocarcinoma), com material de biópsia suficiente para análises propostas.

Esses 95 pacientes representam 16,2% do total de 587 pacientes diagnosticados com câncer de pulmão, 19,9% dos 477 pacientes diagnosticados com CPCNP não escamoso ou carcinoma adenoescamoso (adenocarcinoma) e 26,7% dos 356 pacientes sem mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK*.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram as características clínico-demográficas dos 477 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ou carcinoma

adenoescamoso de pulmão, sendo: 121 pacientes *EGFR* e *ALK* positivos; 261 pacientes *EGFR* e *ALK* negativos sem material de biópsia suficiente para novas análises e 95 pacientes da amostra submetida à pesquisa de rearranjo de *ROS1* (*EGFR* e *ALK* negativos com material de biópsia suficiente para novas análises).

Tabela 4 - Características clínico-demográficas dos 477 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma ou carcinoma adenoescamoso de pulmão. Os grupos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. Comparações com p<0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

Característica	Amostra do estudo (N=95)	Pacientes *EGFR*+ e ALK+ (N=121)	Pacientes sem material arquival (N=261)	Total	p
Sexo					
Masculino	50	36	138*	224	<0,001
Feminino	45	85	123+	253	
Idade					
< 60 anos	17	23	53*	93	0,86
≥ 60 anos	78	98	208*	384	
Tabagismo					
Sim	52	0	0	52	
Não	43	0	0	43	
Estadiamento					
IB	8	0	9-	17	0,06
IIA	7	7	16-	30	
IIB	12	14	32*	58	
IIIA	10*	27	38	75	
IIIB	20	32	69*	121	
IV	38	41	97*	176	-
PD-L1					
0%	41	50	108*	199	0,13
1-49%	26	43	64-	133	
≥50%	28	28	89*	145	

* valor significativamente diferente dos demais
\+ todos diferem significativamente
\- não diferem entre si

Entre os 95 pacientes da amostra submetida à pesquisa de ROS1, observamos um percentual maior de indivíduos com idade ≥ 60 anos, estádio IV e com tumores com expressão PD-L1=0%.

Entre os 121 pacientes *EGFR*+ e *ALK*+, observamos mais indivíduos do sexo feminino, com idade ≥60 anos, e com estádio IV.

Já entre os 261 pacientes sem material de biópsia para novas análises, verificamos maior número de indivíduos com idade ≥60 anos, em estádio IV, e cujo tumor apresentava expressão de PD-L1 ==0%.

Para as demais variáveis analisadas não foram observadas diferenças significativas.

A Tabela 5 apresenta as características clínico-demográficas da amostra estudada (95 pacientes). A idade média dos pacientes foi 65,10 anos e a idade mediana foi 64 anos (menor

35 anos; maior 84 anos). Desses 95 pacientes, 45 (47,4%) pertenciam ao sexo feminino, com idade média de 63,68 anos e idade mediana de 63 anos (menor 35 anos; maior 81 anos); os outros 50 (52,6%), pertenciam ao sexo masculino com idade média de 66,38 anos e idade mediana de 64 anos (menor 50 anos; maior 84 anos).

Cinquenta e quatro por cento (54,7%) dos pacientes eram tabagistas ou ex-tabagistas. Quarenta por cento dos pacientes foram diagnosticados como doença metastática. As características clínicas e demográficas da população submetida a análise de *ROS1* estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características clínico-demográficas dos pacientes da amostra analisada para presença de expressão de ROS1 (N=95).

Característica	N (%)	IC (95%)
Sexo		
Masculino	50 (52,6%)	42,7 – 62,4
Feminino	45 (47,4%)	37,6 – 57,3
Idade		
< 60 anos	17 (17,9%)	11,5 – 26,8
≥ 60 anos	78 (82,1%)	73,2 – 88,5
Tabagismo		
Sim	52 (54,7%)	44,7 -64,3
Não	43 (45,3%)	35,6 – 55,3
Estadiamento		
IB	8 (8,4%)	4,3 – 15,7
IIA	7 (7,4%)	3,6 – 14,4
IIB	12 (12,6%)	7,4 – 20,8
IIIA	10 (10,5%)	5,8 – 18,3
IIIB	20 (21,1%)	14,1 – 30,3
IV	38 (40,0%)	30,8 – 50,0

A associação entre a expressão de ROS1 e as características demográficas, clínicas e expressão de PD-L1 são apresentadas na tabela 2. Sobre a análise imuno-histoquímica para ROS1, os valores são descritos como positivos (≠ zero) ou negativos (= zero).

Dos 95 pacientes analisados nesta etapa, 10 pacientes (10,5%) apresentaram resultados positivos para ROS1 por imuno-histoquímica e foram selecionados para análise pelo método de FISH. Não se observou associação entre sexo, idade, história de tabagismo ou expressão de PD-L1 e a expressão de ROS1 avaliada por imuno-histoquímica (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação entre expressão de ROS1 avaliada por imuno-histoquímica e características clínico-demográficas e expressão de PD-L1 (N=95). Os grupos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. Comparações com p<0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

Característica	ROS1 negativo N (%)	ROS1 positivo N (%)	p
Sexo			0,860
Feminino	40 (42,1%)	5 (5,3%)	
Masculino	45 (47,4%)	5 (5,3%)	
Idade			0,491
<60 anos	16 (16,8%)	1 (1,1%)	
≥60 anos	69 (72,6%)	9 (9,5%)	
Tabagismo			0,534
Sim	47 (49,5%)	5 (5,3%)	
Não	38 (40,0%)	5 (5,3%)	
PD-L1			0,523
0%	35 (36,8%)	6 (6,3%)	
1-49%	24 (25,3%)	2 (2,1%)	
≥50%	26 (27,4%)	2 (2,1%)	

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS E PATOLÓGICAS E PRESENÇA DE REARRANJO DO GENE *ROS1* AVALIADO POR FISH

A idade média dos 10 pacientes (10,5%) selecionados para pesquisa de alteração de *ROS1* por FISH foi 68,6 anos e a idade mediana foi de 69 anos (menor 56 anos; maior 80 anos); sendo 5 (50%) pacientes pertencentes ao sexo feminino, com idade média de 68,6 anos e idade mediana de 68 anos (menor 60 anos; maior 80 anos); e 5 (50%) pacientes pertencentes ao sexo masculino, com idade média de 68,6 anos e idade mediana de 70 anos (menor 56 anos; maior 80 anos). A Tabela 7 apresenta a associação entre rearranjo *ROS1* e características clínico-demográficas, expressão de ROS1 e expressão de PD-L1.

Tabela 7 - Associação entre rearranjo de *ROS1* e características clínico-demográficas, expressão de *ROS1* e expressão de PD-L1 (N=10). Os grupos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. Comparações com p<0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

Característica	Rearranjo de *ROS1* presente N (%)	Rearranjo de *ROS1* ausente N (%)	p
Sexo			0,414
Feminino	3 (30,0%)	2 (20,0%)	
Masculino	4 (40,0%)	1 (10,0%)	
Idade			0,014
<60 anos	1 (10,0%)	0	
≥60 anos	6 (60,0%)	3 (30,0%)	
Tabagismo			0,414
Sim	3 (30,0%)	2 (20,0%)	
Não	4 (40,0%)	1 (10,0%)	
PD-L1			
0%	3 (30,0%)	3 (30,0%)	*
1-49%	2 (20,0%)	0	
≥50%	2 (20,0%)	0	
ROS1 (IHQ)			*
Positivo	7 (70,0%)	3 (30,0%)	
Negativo	0	0	
Subtipo histológico			*
Adenocarcinoma sólido	0	1 (10,0%)	
Adenocarcinoma mucinoso	2 (20,0%)	0	
Adenocarcinoma papilar	3 (30,0%)	1 (10,0%)	
Adenocarcinoma lepídico	1 (10,0%)	0	
Adenocarcinoma acinar	1 (10,0%)	1 (10,0%)	

* Não foi possível realizar a comparação para PD-L1, ROS1 (IHQ) e subtipos de adenocarcinoma devido aos valores iguais a zero.

A análise pelo método FISH mostrou uma prevalência de 7,4% para rearranjos do gene *ROS1*.

5 DISCUSSÃO

Observamos um predomínio de pacientes do sexo masculino, com idade ≥60 anos e estádio IV ao diagnóstico na população inicial de 477 pacientes com adenocarcinoma de pulmão que avaliamos. Esses resultados replicam os achados da literatura, que descreve uma maior prevalência de CPCNP entre pacientes com idade ≥65 anos (Midthun 2017; ACS 2019) e diagnosticados em estágios mais avançados da doença (Pöttgen et al. 2007; Howlader et al. 2020). O mesmo foi observado para os 261 pacientes excluídos das análises finais devido a indisponibilidade de material arquival de tumor.

Entre os 121 pacientes com tumores *EGFR*+ ou *ALK*+ observou-se maior frequência de mulheres, com idade ≥60 anos com doença avançada (estádio IV). Os pacientes com tumores com mutação de *EGFR* e *ALK* positivos representaram 19,3% e 6,1%, respectivamente, da amostra inicial de 477 pacientes. Nos estudos realizados por Gelatti et al. (2020) e Mascarenhas et al. (2021) em pacientes brasileiros diagnosticados com CPCNP, a frequência de casos de CPCNP com mutação de *EGFR* foi de 11,31% e 22,5%, respectivamente. No presente estudo, o percentual de pacientes com tumores com mutação no gene *EGFR* positivo foi semelhante ao encontrado no estudo de Mascarenhas et al. (2021). De maneira semelhante, a frequência de pacientes com tumores ALK positivos a frequência de casos positivos para ALK foi de 6,1%, similar a encontrada no estudo realizado por Gelatti et al. (2020), de 3,64%, e no estudo de Mascarenhas et al. (2021), de 5,4%. Esses dados estão comparados na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação da frequência de EGFR e ALK encontrada neste estudo com outros estudos realizados no Brasil.

AUTOR, DATA	N	Mutação de *EGFR*	ALK POSITIVO
Presente estudo	477	19,3%	6,1%
Gelatti et al. 2020	1512	11,31%	3,64%
Mascarenhas et al. 2021	513	22,5%	5,4%

A amostra de 95 pacientes com CPCNP, com *EGFR* e *ALK* selvagens, avaliada para presença de rearranjo do gene *ROS1*representou 26,7% dos 356 pacientes sem mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK*. Resolvemos empregar a estratégia de pré-selecionar a população a ser testada em vista da limitação de recursos e de estudos prévios indicarem que, na ausência

de mutações *EGFR* e rearranjos de *ALK*, existe um enriquecimento de casos com rearranjo do gene *ROS1,* facilitando a sua identificação (Scheffler et al. 2015; Rossi et al. 2017).
A idade média foi dos 95 pacientes avaliáveis para *ROS1* foi de 65,10 anos, sendo a maioria do sexo masculino (52,6%) e tabagistas ou ex-tabagistas (54,7%). A frequência de idade já era esperada de acordo com a literatura, mas a frequência de tabagistas ou ex-tabagistas foi menor esperado nessa população (Xu et al. 2020; Bergethon et al. 2012; Park et al. 2018).

Quanto ao estadiamento do tumor, a maioria (40,0%) apresentou estadiamento IV, corroborando dados da literatura que afirmam que o CPCNP geralmente é diagnosticado em estágios avançados (Pöttgen et al. 2007; Midthun 2017; ACS 2019).

A expressão de PD-L1 ≥50% foi identificada em 29,5% dos pacientes com CPCNP sem mutação de *EGFR* ou rearranjo de *ALK,* sendo que 27,4% dos pacientes com PD-L1 ≥50% eram ROS1 negativos e 2,1% eram ROS1 positivos.

No estudo realizado por Lee et al. (2019), demonstrou-se que a alta expressão de PD-L1 frequentemente se sobrepõe ao rearranjo de *ROS1* (35,7%), enquanto se correlaciona negativamente com mutações do gene *EGFR*. Apesar disso, esses tumores são invariavelmente não responsivos à terapia com inibidores de *checkpoint* imune (Drilon et al. 2016). Havíamos programado inicialmente realizar também uma avaliação do infiltrado imune nesses tumores para uma melhor caracterização do microambiente tumoral, entretanto, em vista de limitações de recursos, tais análises não foram realizadas.

Na análise imuno-histoquímica para ROS1, 10 (10,5%) pacientes apresentaram resultados positivos (≠zero). Os estudos realizados por Conde et al. (2019), Bubendorf et al. (2016) e Ginestet et al. (2018) descrevem a análise imuno-histoquímica como um importante instrumento de triagem para a seleção de pacientes para análise pelo método de FISH. O ponto de corte sugerido por Conde et al. (2019) para seleção de casos para realização de FISH é de expressão de ROS1 em ≥70% das células do tumor. Nesta pesquisa, 3 (42,9%) pacientes que apresentaram resultados, na análise imuno-histoquímica, de expressão de ROS1 em <70% das células do tumor foram diagnosticados com rearranjos *ROS1* pelo método FISH. Estes resultados sugerem que todos os pacientes diagnosticados na análise imuno-histoquímica como ROS1 positivo (independente da intensidade) deveriam ser encaminhados para análise pelo método de FISH (Bubendorf et al. 2016; Ginestet et al. 2018).

Não se observou associação entre sexo, idade, histórico de tabagismo, expressão PD-L1 ou subtipos de adenocarcinoma com a expressão de ROS1 por imuno-histoquímica.

Neste estudo, observamos uma prevalência de 7,4% para rearranjos *ROS1* pelo método de FISH. Esta prevalência é superior a descrita na literatura que varia de 1,5% a 2,9% (Rikova

et al. 2007; Takeuchi et al. 2012; Kohno et al. 2015; Facchinetti et al. 2017; Suryavanshi et al. 2017; Kato et al. 2018; Luk et al. 2018).

Nos estudos realizados por Bergethon et al. (2012) e Wiesweg et al. (2017), com pacientes com CPCNP em populações caucasianas, os valores encontrados para rearranjos de *ROS1* variaram de 1,7% a 2,5%. Na população asiática, os valores variaram de 1,59% a 2,59% (Rimkunas et al. 2012; Zeng et al. 2018; Zhang et al. 2019); já no estudo realizado por Xu et al. (2020), a prevalência encontrada para rearranjos de *ROS1,* em pacientes chineses com CPCNP, foi de 4,17% (72/1726). Estudos realizados na Índia, que utilizaram análise pelo método FISH, demonstraram prevalência de 2,9% (Suryavanshi et al. 2017) e 4,1% (Joshi et al. 2019) para rearranjos de *ROS1* em pacientes com CPCNP. O estudo realizado por Mascarenhas et al. (2021) com uma coorte brasileira, sem pré-seleção da amostra, utilizando NGS, descreveu uma prevalência de 2,2% de rearranjos do gene *ROS1* em adenocarcinoma de pulmão.

Uma possível explicação para os resultados deste estudo é a pré-seleção com a exclusão de tumores *EGFR* negativos e *ALK* negativos, aumentando as chances de se encontrar resultados positivos para rearranjos do gene *ROS1,* já que essas alterações são mutuamente exclusivas. Vários estudos encontraram frequências semelhantes em populações selecionadas. No estudo realizado por Mescam-Mancini et al. (2014), em uma população caucasiana com amostra pré-selecionada *EGFR* e *ALK* negativos, a prevalência de rearranjos *ROS1* por FISH foi de 7,4%. O estudo realizado por Kim et al. (2013) encontrou uma frequência de 5,7% (6/105) entre pacientes *EGFR/KRAS/ALK*-negativos e concluiu que a frequência de rearranjos de *ROS1* em pacientes pré-selecionados é superior à frequência encontrada em pacientes não selecionados. De modo semelhante, o estudo realizado por Suryavanshi et al. (2017), que contou com uma amostra de 105 pacientes, também apresentou valores superiores aos encontrados na literatura, entretanto estes autores também incluíram apenas casos sem mutação do gene *EGFR* ou rearranjo do gene *ALK*. No estudo realizado por Xu et al. (2020), em pacientes com CPCNP negativos para mutação em *EGFR* e para rearranjos de *ALK,* a taxa geral observada de rearranjos de *ROS1* foi de 9,51% (56/589). O estudo realizado por Joshi et al. (2019), que também excluiu aqueles pacientes com mutação *EGFR* ou rearranjos *ALK*, encontrou uma prevalência de 4,1% para rearranjos de *ROS1* (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de rearranjos *ROS1* em tumores de pacientes com CPCNP descrita em diversas coortes previamente selecionadas de mutação no gene *EGFR*, rearranjo de *ALK* ou mutação de *KRAS* e em uma coorte brasileira não pré-selecionada para comparação.

AUTOR, DATA	COORTE	N	PRÉ-SELEÇÃO DA AMOSTRA	FREQUÊNCIA DE REARRANJOS ROS1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
Resultados deste estudo	Brasileira	95	Duplo- negativo (*EGFR; ALK*)	7,4%	Homens; tabagistas ou ex-tabagistas, com mediana de idade de 65 anos, e com doença metastática ao diagnóstico.
Kim et al. 2013	Coreana	105	Triplo-negativo (*EGFR; KRAS; ALK*)	5,7%	Adenocarcinoma; não fumantes.
Mescam-Mancini et al. 2014	Francesa	121	Triplo-negativo (*EGFR; KRAS; ALK*)	7,4%	Estágios Avançados; fumantes leves ou não fumantes.
Xu et al. 2020	Chinesa	589	Duplo-negativo (*EGFR; ALK*)	9,51%	Mulheres jovens; nunca fumantes e estágio avançado.
Mascarenhas et al. 2021	Brasileira	513	**Não selecionada**	2,2%	Homens, idade média 64 anos.

Observamos entre os pacientes com rearranjo *ROS1* uma maior frequência de homens (57,1%), com 60 anos ou mais (85,7%), não-tabagistas (57,1%), e de tumores com expressão PD-L1 igual a zero (42,9%). Destes, 28,6% apresentavam diagnóstico histológico de adenocarcinoma mucinoso, 42,9%, de adenocarcinoma papilar, 14,3%, de adenocarcinoma lepídico, e 14,3%, de adenocarcinoma acinar, entretanto não conseguimos avaliar se há diferença na distribuição em decorrência do número de casos. Observamos um número semelhantes de indivíduos tabagistas/ex-tabagistas e não tabagistas entre os pacientes com rearranjos de *ROS1*, contrariando o que é classicamente descrito, de que os rearranjos de *ROS1* são mais comumente encontrados em pacientes que nunca fumaram ou com histórico de tabagismo leve (Shaw et al. 2014). Interessantemente também, 2 de 7 pacientes com rearranjo do gene *ROS1* apresentaram expressão de PD-L1 acima de 50%, correspondendo a uma frequência de alto-expressores de PD-L1 nesse subgrupo de semelhante àquela descrita em populações não selecionadas de CPCNP não-escamoso (Jiang et al. 2017).

Os dados encontrados nesta pesquisa são importantes para aumentar a compreensão sobre a biologia tumoral em pacientes com CPCNP por meio da avaliação dos biomarcadores *ROS1* e PD-L1 na coorte brasileira analisada. Com implicação direta na prática clínica, sugerindo de que todos os pacientes identificados como ROS1 positivo na análise imuno-

histoquímica devem ser submetidos à avaliação pelo método de FISH ou NGS para identificação de rearranjos de *ROS1* para o manejo terapêutico adequado.

Uma das maiores dificuldades encontradas para a realização deste estudo foi a disponibilidade de material de biópsia dos pacientes diagnosticados com CPCNP adequado para realização de novas análises, esse problema também foi descrito no estudo realizado por Lim et al. (2017). Devido ao pequeno tamanho das biópsias e dos múltiplos testes realizados tanto para classificação histológica quanto para avaliação molecular, não é infrequente haver esgotamento da amostra nos blocos de parafina.

Uma possível solução para a escassez de material para novas análises seria a adoção da biópsia líquida (Rolfo et al. 2018), que pode ser considerada no momento do diagnóstico inicial em todos os pacientes que necessitam de um perfil tumoral molecular, mas é particularmente recomendada quando o tecido tumoral é escasso, não está disponível, ou quando é esperado um atraso significativo potencialmente superior a duas semanas na obtenção do tecido tumoral. Outra solução é montar-se um fluxo entre o radiologista intervencionista e o serviço de anatomia patológica, de forma que se colham múltiplas amostras do tumor (3 a 5 amostras é o ideal), que tais amostras sejam embocadas separadamente, sejam realizados poucos cortes para imuno-histoquímica diagnóstica e pesquisa de PD-L1 (3 a 4 cortes apenas), e sistematicamente já se separem cortes não corados para análise de alterações genômicas somáticas, empregando preferencialmente NGS, o que resulta na economia de material da biópsia.

6 CONCLUSÃO

A amostra de 95 pacientes com CPCNP analisada quanto à presença de rearranjo de *ROS1* caracterizou-se por ter um discreto predomínio de homens tabagistas ou ex-tabagistas, com mediana de idade de 65 anos, e com doença metastática ao diagnóstico.

Expressão de PD-L1 ≥50% foi observada em 29,5% dos casos analisados. A expressão de PD-L1 ≥50% foi observada em 28,6% (2/7) dos casos com rearranjo de *ROS1*.

Quanto a expressão de ROS1 por imuno-histoquímica, 10,5% dos pacientes analisados apresentaram resultados positivos. Não se observou associação entre sexo, idade, histórico de tabagismo ou expressão PD-L1 e a expressão de ROS1 por imuno-histoquímica. Estes pacientes foram submetidos à análise de rearranjo do gene *ROS1* pelo método de FISH e 7 (7,4%) apresentaram resultados positivos.

Esse valor é superior ao encontrado na literatura com populações não selecionadas, contudo, em populações pré-selecionadas para mutações *EGFR* e rearranjos de *ALK*, a prevalência de rearranjos *ROS1* apresenta resultados semelhantes.

Os resultados desta pesquisa sugerem que todos os pacientes identificados como ROS1 positivo na análise imuno-histoquímica devem ser submetidos à avaliação por um método complementar (FISH ou NGS) para identificação de rearranjos de *ROS1*.

7 REFERÊNCIAS

American Cancer Society-ACS. Non-small cell lung cancer. Disponível em: https://bit.ly/3uFIPpP. [2019 jun 12].

Barbier MC, Pardo E, Panje CM, Gautschi O, Lupatsch JE, Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). A cost-effectiveness analysis of pembrolizumab with or without chemotherapy for the treatment of patients with metastatic, non-squamous non-small cell lung cancer and high PD-L1 expression in Switzerland. Eur J Health Econ. 2021 Mar 21. Epub ahead of print.

Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. *ROS1* rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol. 2012;30(8):863-70.

Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(24):9270-4.

Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, Chow LQM, Burgio MA, de Castro Carpeno J, et al. Five-year outcomes from the randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2021 Mar 1;39(7):723-33.

Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for *ROS1* in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. Virchows Arch. 2016;469(5):489-503.

Cai W, Li X, Su C, Fan L, Zheng L, Fei K, et al. *ROS1* fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 2013;24(7):1822-7.

Chen YM. Immune checkpoint inhibitors for non-small cell lung cancer treatment. J Chin Med Assoc. 2017;80(1):7-14.

Clavé S, Rodon N, Pijuan L, Díaz O, Lorenzo M, Rocha P, et al. Next-generation sequencing for ALK and ROS1 rearrangement detection in patients with non-small-cell lung cancer: implications of FISH-positive patterns. Clin Lung Cancer. 2019 Jul;20(4):e421-e9.

Conde E, Hernandez S, Martinez R, Angulo B, De Castro J, Collazo-Lorduy A, et al. Assessment of a new *ROS1* immunohistochemistry clone (SP384) for the identification of *ROS1* rearrangements in patients with non-small cell lung carcinoma: the ROSING Study. J Thorac Oncol. 2019;14(12):2120-32.

Dagogo-Jack I, Shaw AT. Expanding the Roster of *ROS1* Inhibitors. J Clin Oncol. 2017 Aug 10;35(23):2595-7.

Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and targeting *ROS1* gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18(17):4570-9.

Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. Lancet Oncol. 2020 Feb;21(2):271-82.

Drilon A, Somwar R, Wagner JP, Vellore NA, Eide CA, Zabriskie MS, et al. A Novel Crizotinib-Resistant Solvent-Front Mutation Responsive to Cabozantinib Therapy in a Patient with *ROS1*-Rearranged Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2016;22(10):2351-8.

Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, Barlesi F, Krebs MG, Shaw AT, et al. Entrectinib in *ROS1* fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1-2 trials. Lancet Oncol. 2020 Feb;21(2):261-70.

Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc. 2019 Aug;94(8):1623-40.

Facchinetti F, Rossi G, Bria E, Soria JC, Besse B, Minari R, et al. Oncogene addiction in non-small cell lung cancer: Focus on *ROS1* inhibition. Cancer Treat Rev. 2017;55:83-95.

Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: *ROS1* and RET fusions. Oncologist. 2013;18(7):865-75.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2015 May 21;372(21):2018-28.

Gelatti ACZ, Cordeiro de Lima VC, Freitas H, Werutsky G, Gaiger AM, Klock C, et al. Real-world prevalence of PD-L1 expression among tumor samples from patients with non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2020 Nov;21(6):e511-e515.

Ginestet F, Lambros L, Le Flahec G, Marcorelles P, Uguen A. Evaluation of a Dual *ALK*/*ROS1* fluorescent in situ hybridization test in non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2018 Sep;19(5):e647-e653.

Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. Nat Rev Dis Primers. 2015 May 21;1:15009.

Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? J Immunother Cancer. 2016;4:48.

He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer. Sci Rep.. 2015;5:13110.

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 2014;515(7528):563-7.

Herzberg B, Campo MJ, Gainor JF. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. Oncologist. 2017;22(1):81-8.

Horn L, Spigel DR, Vokes EE, Holgado E, Ready N, Steins M, et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer: two-year outcomes from two randomized, open-label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). J Clin Oncol. 2017 Dec 10;35(35):3924-33.

Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al. The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. N Engl J Med. 2020 Aug 13;383(7):640-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Santa Catarina, Brasil. IBGE Cidades. Disponível em: https://bit.ly/2S1zHi3. [2020 dez 12].

Jiang L, Su X, Zhang T, Yin X, Zhang M, Fu H, et al. PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). Oncotarget. 2017 Apr 18;8(16):26845-57.

Jordan EJ, Kim HR, Arcila ME, Barron D, Chakravarty D, Gao J, et al. Prospective comprehensive molecular characterization of lung adenocarcinomas for efficient patient matching to approved and emerging therapies. Cancer Discov. 2017 Jun;7(6):596-609.

Joshi A, Pande N, Noronha V, Patil V, Kumar R, Chougule A, et al. *ROS1* mutation non-small cell lung cancer-access to optimal treatment and outcomes. Ecancermedicalscience. 2019 Jan 29;13:900.

Kato Y, Ninomiya K, Ohashi K, Tomida S, Makimoto G, Watanabe H, et al. Combined effect of cabozantinib and gefitinib in crizotinib-resistant lung tumors harboring *ROS1* fusions. Cancer Sci. 2018;109(10):3149-58.

Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E, et al. The frequency and impact of *ROS1* rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. Ann Oncol. 2013 Sep;24(9):2364-70.

Kim MH, Shim HS, Kang DR, Jung JY, Lee CY, Kim DJ, et al. Clinical and prognostic implications of *ALK* and *ROS1* rearrangements in never-smokers with surgically resected lung adenocarcinoma. Lung Cancer. 2014;83(3):389-95.

Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, et al. Beyond *ALK*-RET, *ROS1* and other oncogene fusions in lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2015;4(2):156-64.

Lassen U. Entrectinib for *ROS1* fusion-positive NSCLC and NTRK fusion-positive solid tumours. Lancet Oncol. 2020 Feb;21(2):193-4.

Lee J, Park CK, Yoon HK, Sa YJ, Woo IS, Kim HR, et al. PD-L1 expression in *ROS1*-rearranged non-small cell lung cancer: A study using simultaneous genotypic screening of *EGFR*, *ALK*, and *ROS1*. Thorac Cancer. 2019;10(1):103-10.

Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. J Clin Oncol. 2013 Mar 10;31(8):1039-49.

Lim SM, Chang H, Cha YJ, Liang S, Tai YC, Li G, et al. Validation of *ALK*/*ROS1* Dual Break Apart FISH Probe probe in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2017 Sep;111:79-83.

Lopes GL, Vattimo EFQ, Castro Junior G. Identificação de mutações ativadoras no gene EGFR: implicações no prognóstico e no tratamento do carcinoma pulmonar de células não pequenas. J Bras Pneumol. 2015;41(4):365-75.

Luk PP, Selinger CI, Mahar A, Cooper WA. Biomarkers for *ALK* and *ROS1* in lung cancer: immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(8):922-8.

Mascarenhas E, Gelatti AC, Araújo LH, Baldotto C, Mathias C, Zukin M, et al. Comprehensive genomic profiling of Brazilian non-small cell lung cancer patients (GBOT 0118/LACOG0418). Thorac Cancer. 2021 Mar;12(5):580-7.

Mathias C, Prado GF, Mascarenhas E, Ugalde PA, Zimmer Gelatti AC, Carvalho ES, et al. Lung cancer in Brazil. J Thorac Oncol. 2020 Feb;15(2):170-5.

Mescam-Mancini L, Lantuéjoul S, Moro-Sibilot D, Rouquette I, Souquet PJ, Audigier-Valette C, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. Lung Cancer. 2014 Feb;83(2):168-73.

Midthun DE. Overview of the initial evaluation, treatment and prognosis of lung cancer. Uptodate. 2017. Disponível em: https://bit.ly/3c53P2E. [2019 jun 12]

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.

Okita R, Maeda A, Shimizu K, Nojima Y, Saisho S, Nakata M. PD-L1 overexpression is partially regulated by *EGFR*/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. Cancer Immunol Immunother. 2017 Jul;66(7):865-76.

Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. Lancet Oncol. 2011 Feb;12(2):175-80.

Park S, Ahn BC, Lim SW, Sun JM, Kim HR, Hong MH, et al. Characteristics and outcome of ROS1-positive non-small cell lung cancer patients in routine clinical practice. J Thorac Oncol. 2018 Sep;13(9):1373-82.

Pöttgen C, Eberhardt W, Grannass A, Korfee S, Stüben G, Teschler H, et al. Prophylactic cranial irradiation in operable stage IIIA non-small-cell lung cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy: results from a German multicenter randomized trial. J Clin Oncol. 2007 Nov 1;25(31):4987-92.

Rajurkar S, Mambetsariev I, Pharaon R, Leach B, Tan T, Kulkarni P, Salgia R. Non-small cell lung cancer from genomics to therapeutics: a framework for community practice integration to arrive at personalized therapy strategies. J Clin Med. 2020 Jun 15;9(6):1870.

Rangachari D, VanderLaan PA, Shea M, Le X, Huberman MS, Kobayashi SS, et al. Correlation between classic driver oncogene mutations in EGFR, ALK, or ROS1 and 22C3-PD-L1 ≥50% expression in lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 2017 May;12(5):878-83.

Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell. 2007;131(6):1190-203.

Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, Hu Y, Kelly ME, Gu TL, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase *ROS1*-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-*ROS1* fusion. Clin Cancer Res. 2012;18(16):4449-57.

Roche. Ventana anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Guia de Consulta Rápida para carcinoma do pulmão de não pequenas células (NSCLC). VENTANA anti-ALK (D5F3). Ventana Medical Systems, Inc., 2015. Disponível em: https://bit.ly/2RbRh2v. [2020 jan 12]

Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. J Thorac Oncol. 2018 Sep;13(9):1248-68.

Rossi G, Jocollé G, Conti A, Tiseo M, Zito Marino F, Donati G, et al. Detection of *ROS1* rearrangement in non-small cell lung cancer: current and future perspectives. Lung Cancer (Auckl). 2017;8:45-55.

Santos ES. Treatment options after first-line immunotherapy in metastatic NSCLC. Expert Rev Anticancer Ther. 2020 Mar;20(3):221-8.

Scheffler M, Schultheis A, Teixido C, Michels S, Morales-Espinosa D, Viteri S, et al. *ROS1* rearrangements in lung adenocarcinoma: prognostic impact, therapeutic options and genetic variability. Oncotarget. 2015;6(12):10577-85.

Sequist LV, Neal JW. Personalized, genotype-directed therapy for advanced non-small cell lung cancer. Uptodate. 2017. Disponível em: https://bit.ly/2TyxA5J. [2020 jan 12]

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol. 2007 Mar;8(3):239-45.

Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in *ROS1*-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2014;371(21):1963-71.

Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, Kim DW, Camidge DR, Solomon BJ, et al. Crizotinib in *ROS1*-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. Ann Oncol. 2019 Jul 1;30(7):1121-6.

Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Jänne PA, et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. Am J Surg Pathol. 2013 Sep;37(9):1441-9.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020 Jan;70(1):7-30.

Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of next-generation sequencing technologies. Curr Protoc Mol Biol. 2018 Apr;122(1):e59.

Song Z, Su H, Zhang Y. Patients with *ROS1* rearrangement-positive non-small-cell lung cancer benefit from pemetrexed-based chemotherapy. Cancer Med. 2016;5(10):2688-93.

Sui H, Ma N, Wang Y, Li H, Liu X, Su Y, et al. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies. J Immunol Res. 2018 Aug 8;2018:6984948.

Suryavanshi M, Panigrahi MK, Kumar D, Verma H, Saifi M, Dabas B, et al. *ROS1* rearrangement and response to crizotinib in Stage IV non-small cell lung cancer. Lung India. 2017;34(5):411-4.

Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, *ROS1* and *ALK* fusions in lung cancer. Nat Med. 2012;18(3):378-81.

Tang Y, He Z, Zhu Q, Qiao G. The 2011 IASLC/ATS/ERS pulmonary adenocarcinoma classification: a landmark in personalized medicine for lung cancer management. J Thorac Dis. 2014;6(Suppl 5):S589-S96.

Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med. 2012; 4(127):127ra37.

Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015 Jun 1;75(11):2139-45.

Thomas KW, Gould MK. Overview of the initial evaluation, diagnosis, and staging of patients with suspected lung cancer. Uptodate. 2017. Disponível em: https://bit.ly/3uD2YwE. [2020 jun 12]

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2443-54.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. J Thorac Oncol. 2015;10(9):1240-2.

Uguen A, De Braekeleer M. *ROS1* fusions in cancer: a review. Future Oncol. 2016 Aug;12(16):1911-28.

Uguen A, Marcorelles P, De Braekeleer M. Searching for *ROS1* rearrangements in lung cancer by fluorescent in situ hybridization: the importance of probe design. J Thorac Oncol. 2015 Aug;10(8):e83-5.

Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. Lab Invest. 2014;94(1):107-16.

Wiesweg M, Eberhardt WEE, Reis H, Ting S, Savvidou N, Skiba C, et al. High prevalence of concomitant oncogene mutations in prospectively identified patients with *ROS1*-positive metastatic lung cancer. J Thorac Oncol. 2017;12(1):54-64.

Xu Y, Chang H, Wu L, Zhang X, Zhang L, Zhang J, et al. High prevalence of *ROS1* gene rearrangement detected by FISH in *EGFR* and *ALK* negative lung adenocarcinoma. Exp Mol Pathol. 2020;117:104548.

Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. *ROS1*-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. Am J Surg Pathol. 2013;37(4):554-62.

Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol. 2014;50(7):627-32.

Zeng L, Li Y, Xiao L, Xiong Y, Liu L, Jiang W, et al. Crizotinib presented with promising efficacy but for concomitant mutation in next-generation sequencing-identified *ROS1*-rearranged non-small-cell lung cancer. Onco Targets Ther. 2018;11:6937-45.

Zhang Q, Wu C, Ding W, Zhang Z, Qiu X, Mu D, et al. Prevalence of *ROS1* fusion in Chinese patients with non-small cell lung cancer. Thorac Cancer. 2019;10(1):47-53.

Zhong E, Huang H. Crizotinib in *ROS1* rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC), from response to resistance. BMJ Case Rep. 2016 Oct 26;2016:bcr2016217322.

Zugazagoitia J, Enguita AB, Nuñez JA, Iglesias L, Ponce S. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects. J Thorac Dis. 2014;6(Suppl 5):S526-36.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ-UNIVALI / SANTA CATARINA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência do rearranjo do gene ROSI em pacientes com CPCNP não escamoso:análise de uma coorte brasileira.

Pesquisador: VLADMIR CLAUDIO CORDEIRO DE LIMA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09411319.8.0000.0120

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Itajaí

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.253.558

Apresentação do Projeto:

Trabalho centrado no fenômeno do câncer do pulmão, cujo objetivo é O objetivo geral deste estudo é avaliar a prevalência do rearranjo do gene ROS1 em pacientes com CPCNP não escamoso em uma coorte brasileira, no Sul do país. Trata-se de um estudo descritivo, observacional, prospectivo. Os participantes serão selecionados em uma clínica médica e serão convidados Pacientes com diagnóstico histopatológico de CPCNP não escamoso ou adenoescamoso, independente do estádio. Os pacientes com imuno-histoquímica positiva para a proteína ROS1 serão testados pelo método FISH, utilizando-se uma sonda de DNA para o gene ROS1 do tipo break-apart (Abbott Molecular). As análises das peças serão realizadas no Laboratório INFOLAUDO. Os resultados serão interpretados pelo pesquisador, comparados com os achados na revisão de literatura e apresentados em sua tese de doutorado. Será realizada uma análise descritiva da amostra, e os resultados serão apresentados em números absolutos e porcentagens, representados por gráficos e tabelas e discutidos a partir de uma comparação com a revisão de literatura relacionada ao tema.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar a frequência do rearranjo do gene ROS1 em pacientes portadores de CPCNP não escamoso

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

ITAJAI, 09 de Abril de 2019

Assinado por:
Mark Anderson Caldeira
(Coordenador(a))

Endereço: URUGUAI 402/99998
Bairro: CENTRO **CEP:** 88.302-202
UF: SC **Município:** ITAJAI
Telefone: (47)3341-7738 **Fax:** (47)3341-7744 **E-mail:** etica@univali.br

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Título do estudo PREVALÊNCIA DO REARRANJO DO GENE ROS1 EM CARCINOMA DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS NÃO ESCAMOSO, EGFR E ALK NEGATIVO: ANÁLISE DE UMA COORTE BRASILEIRA

Investigador: Pedro A. Cabral Filho

Endereço do Centro de Estudo:

Número do telefone:

INTRODUÇÃO

Você foi convidado a participar deste estudo porque tem um câncer de pulmão em investigação. Para iniciar sua participação nós pedimos que você forneça uma amostra de tumor e permita que um laboratório realize testes nela. Essa amostra pode ser de arquivo de tumor, que foi coletada antes da sua participação neste estudo, ou uma amostra de biópsia de tumor fresca, coletada especificamente para este estudo. Leve o tempo que precisar para ler este termo e para fazer todas as perguntas que você julgue necessárias antes de decidir se você quer participar. Este termo de consentimento pode conter palavras que você não compreende; peça ao médico ou à equipe do estudo para explicar quaisquer palavras ou informações que você não compreender claramente. Este documento complementa as informações verbais que você recebeu do médico do estudo ou do seu designado. Você pode conversar sobre sua decisão com seus amigos, sua família e seu médico particular. Uma vez que você entender o estudo e as outras opções disponíveis, e desejar participar, será solicitado que você assine este termo. Você não deve assinar este termo se tiver quaisquer dúvidas que não foram esclarecidas.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido você está concordando com a sua participação no presente estudo (fornecimento da amostra do tumor para testes). Os resultados da análise da amostra serão fornecidos aos pacientes e também as instituições envolvidas; e serão utilizados no presente estudo da seguinte forma: será realizada uma análise descritiva da amostra, e os resultados serão apresentados em números absolutos e porcentagens, representados por gráficos e tabelas e discutidos a partir de uma comparação com a revisão de literatura relacionada ao tema. A associação entre as variáveis de interesse e variáveis clínico-patológicas e demográficas será estabelecida pelo método exato de Fisher e considerada estatisticamente significativa quando p menor que 0,05. O projeto obedecerá aos preceitos éticos do Conselho Nacional de Saúde (CNS), incluídos na resolução n. 466/2012 (autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade). Será submetida ao Comitê de Ética e Pesquisa da instituição e os dados serão coletados após liberação do Parecer Consubstanciado, aprovado.

Caso você escolha participar deste estudo, você e o médico do estudo (ou seu designado) irão rubricar todas as páginas do documento e assinar duas vias deste termo de consentimento livre e esclarecido – uma será fornecida a você e a outra ficará com o médico do estudo.

OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar a prevalência do rearranjo do *ROS1* em pacientes com CPCNP não escamoso em uma coorte brasileira, no Sul do país.

O motivo que nos leva a propor este estudo é identificar pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPCNP) *ROS1* positivo, uma vez que não existe atualmente um estudo similar sendo realizado no Brasil.

RESUMO DO ESTUDO

DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS: A sua participação neste estudo pode gerar algum tipo de desconforto quanto a angústia relacionada ao fornecimento do material biológico (biópsias do pulmão) para análise que está sujeita aos seguintes riscos potenciais: uso da amostra para novas pesquisas sem autorização do sujeito; estigmatização a partir da divulgação dos resultados; descarte inadequado do material; invasão de privacidade; divulgação de dados confidenciais. Contudo, o pesquisador deste estudo se compromete a: usar a amostra somente para fins deste estudo acadêmico, com a devida autorização dos pacientes por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); não identificar as clínicas individualmente ou seus pacientes de modo a manter o sigilo das informações e a privacidade dos pacientes; descartar os materiais biológicos adequadamente de acordo com as normas da ANVISA; não divulgar, a qualquer tempo, dados confidenciais das clínicas ou de seus pacientes. Os benefícios esperados estão relacionados a identificação dos pacientes com CPCNP *ROS1* positivo, que permitirá estimar a prevalência desta patologia no sul do país e ampliar as possibilidades de novos tratamentos para esses pacientes.

Rubrica do participante/testemunha: _____ Rubrica do pesquisador: _____

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: o paciente poderá ter acesso aos resultados das análises realizadas com sua biópsia de pulmão, e o pesquisador se compromete a prestar quaisquer esclarecimentos sobre os resultados e as possibilidades de tratamento. Após o término da pesquisa os pacientes serão informados e poderão ter acesso aos resultados.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você poderá solicitar esclarecimento sobre a pesquisa em qualquer etapa do estudo. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação na pesquisa a qualquer momento, seja por motivo de constrangimento e/ou outros motivos. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados das análises das biópsias de pulmão serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este consentimento está impresso e deve ser assinado em duas vias, uma será fornecida a você e a outra ficará com o pesquisador responsável. Se houver mais de uma página, tanto o pesquisador quanto o participante devem rubricar todas as páginas. O pesquisador está disponível, a qualquer tempo, para os esclarecimentos das dúvidas dos pacientes que concordaram em participar da pesquisa por meio do telefone apresentado na primeira página deste termo.

E SE NOVAS INFORMAÇÕES RELEVANTES FOREM DISPONIBILIZADAS?
O médico do estudo informará a você, assim que possível, sobre quaisquer informações descobertas durante o desenvolvimento do estudo que possam fazer com que você mude de ideia sobre participar do estudo.

CONFIDENCIALIDADE
A confidencialidade e o sigilo de seus dados e registros de saúde relacionados serão garantidos de acordo com a legislação em vigor no Brasil. As informações sobre a sua saúde coletadas no escopo deste Estudo serão usadas pelos pesquisadores, pelo patrocinador e pelo investigador e/ou pelos indivíduos envolvidos na pesquisa em seus papéis específicos, tais como auditores e associados da pesquisa clínica do patrocinador, obedecendo aos critérios de sigilo e confidencialidade em pesquisa clínica. Suas informações pessoais serão mantidas anônimas pelo seu médico ou equipe do estudo, para assegurar que o sigilo e a confidencialidade sejam mantidos. Isso significa que os dados não conterão suas informações de identificação e serão reconhecidos unicamente por meio de um código. A ligação entre o código e suas informações pessoais será mantida no centro clínico e não será compartilhada com o patrocinador ou com os seus representantes. O patrocinador protegerá suas informações pessoais, e seu nome não aparecerá em nenhum formulário, relatório, publicação ou divulgação futura fora da metodologia clínica e dos critérios deste Estudo. Caso você se retire do estudo, suas informações não serão mais compiladas. As informações já coletadas serão utilizadas em conformidade com os fins da pesquisa e tratadas como sigilosas e confidenciais.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO: A participação no estudo, não acarretará custos para você. A sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você terá a garantia do seu direito de indenização e ressarcimento, quando apropriado e nos termos da lei. A participação no estudo não implicará em nova coleta de material biológico, apenas na análise daquele material já coletado pela clínica. Os custos das análises utilizadas para a presente pesquisa serão financiados pelo pesquisador.

EU SEREI PAGO PARA PELA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?
Você não receberá qualquer pagamento por participar deste estudo.

QUEM REVISOU O ESTUDO?
Este estudo foi revisado e aprovado por um comitê de ética no Brasil.
O CEP é um comitê formado por integrantes médicos / científicos e não científicos, cuja responsabilidade é garantir a proteção de direitos, da segurança e do bem-estar dos participantes envolvidos em estudos clínicos. O CEP aprova o estudo e monitora sua condução.
Se você precisar de mais informações sobre seus direitos como participante do estudo e tiver quaisquer perguntas relacionadas à ética no estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética (CEP) da instituição:
Conselho de Ética e Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI – Santa Catarina
Rua Uruguai 402/99998, Centro, Itajaí – SC; CEP: 88302-202
Telefones: (47)3341-7738; e-mail: etica@univali.br
Você também pode entrar em contato com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), se ainda tiver qualquer consideração ou dúvida sobre a ética no estudo ou sobre seus direitos como participante de pesquisa, pelo telefone (61) 3315 – 5878, das 08h às 18h, ou pelo e-mail conep@saude.gov.br. A CONEP está diretamente relacionada ao Conselho Nacional de Saúde e é um comitê estabelecido para proteger os direitos dos participantes de pesquisa.
Rubrica do participante/testemunha: _____ Rubrica do pesquisador: _____

OUTRAS INFORMAÇÕES E DETALHES DE CONTATO

O investigador/médico responsável pelos procedimentos do pelo estudo é o Dr. Pedro A. Cabral Filho, telefone: (47) 9977-0706.

Se você precisar saber mais sobre os procedimentos antes de decidir participar, ou a qualquer outro momento, você pode entrar em contato com ele pelo seguinte telefone: (47) 9977-0706.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li este documento, e seu conteúdo foi explicado para mim. Entendo o objetivo desses procedimentos como parte do estudo e o que acontecerá comigo. Eu forneço voluntariamente meu consentimento para que análises moleculares específicas sejam realizadas na minha amostra de arquivo de tumor para os objetivos deste estudo, conforme foi descrito para mim neste documento. Entendo que assinarei 2 vias e que 1 via será fornecida para mim.

Assinatura do participante	Data	Nome completo do participante em letra de forma
Assinatura da testemunha	Data	Nome completo da testemunha em letra de forma

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR

Eu, o signatário, certifico que, no melhor de meu conhecimento, o participante que assina este termo de consentimento recebeu uma explicação completa e cuidadosa sobre o estudo e entende claramente a natureza, os riscos e os benefícios da participação neste estudo.

Eu expliquei o estudo ao participante e esclareci todas as suas dúvidas. Eu estou em conformidade com a Resolução 466/12 do CNS e com outras exigências brasileiras.

	15/04/21	Pedro Alves Cabral Filho
Assinatura do Pesquisador	Data	Nome completo do pesquisador em letra de forma

Rubrica do participante/testemunha: _____ Rubrica do pesquisador: _____