Patologia molecular em cancro do pulmão: Evolução e contributos

Maria João Pina¹, Regina Pinto¹, Patrícia Domingues¹, Sara Silva¹, Luís Cirnes^{1,2}

¹ Ipatimup/i3s

² Escola Superior de Saúde Porto

INTRODUÇÃO

O diagnóstico molecular teve um crescimento sem precedentes nas últimas duas décadas devido aos avanços significativos na investigação em cancro, o que promoveu uma melhor compreensão da patogénese molecular de muitos tipos de tumores. Por esse motivo, a forma de tratamento dos doentes com cancro tem vindo a revolucionar-se, e inclui a incorporação da avaliação de biomarcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico, seleção de terapias dirigidas, monitorização de doenças, na prevenção e na sua deteção precoce¹.

O carcinoma de pulmão permanece como uma importante causa de mortalidade relacionada com o cancro em todo o mundo. Tradicionalmente, a classificação do cancro do pulmão tem por base a distinção morfológica entre carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC) e carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC), este último abrangendo a maioria das lesões malignas do pulmão (aproximadamente 85%). A identificação de marcadores moleculares para terapias dirigidas avançou rapidamente na última década, especialmente no CPNPC. Existe um

desafio diário na prática clínica para entender que pacientes beneficiarão mais de qual regime terapêutico. Atualmente, as recomendações em cancro do pulmão para decisões de tratamento têm por base o estadió tumoral, estado geral do paciente, achados histológicos e, para pacientes em fase avançada da doença, a presença de alterações genéticas do tumor²⁻⁴.

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR NA PRÁTICA CLÍNICA

Um dos melhores exemplos do início de uma nova era na medicina de precisão em cancro do pulmão foi descrito pela primeira vez em 2004, onde a presença de mutações activadoras no recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) predizem a resposta à terapia com os inibidores da tirosina cinase (TKI) direccionados ao EGFR, nomeadamente inibidores de primeira geração como o *erlotinib* e o *gefitinib*. Estas mutações somáticas ocorrem entre os exões 18 e 21, e localizam-se na sua maioria no exão 19 (deleções) e exão 21 (mutações pontuais, nomeadamente a L858R) no domínio da tirosina

cinase⁵⁻⁹. O *EGFR* é o segundo oncogene mais frequentemente mutado no adenocarcinoma de pulmão, e com maior incidência na população asiática e em não fumadores. Em contraste, mutações no gene *kirsten rat sarcoma (KRAS)* são as mais comuns em cancro do pulmão, e são frequentemente observadas em adenocarcinomas e em fumadores (constituindo cerca de 25% dos pacientes com CPNPC). No entanto, a presença de mutações neste gene, identifica pacientes que não irão beneficiar da terapia com os TKIs do *EGFR*, até ao presente momento¹⁰⁻¹⁴.

A ocorrência de mutações não constitui o único mecanismo molecular promotor do cancro do pulmão. A sobreexpressão de oncogenes também pode resultar da ativação de genes através de rearranjos cromossómicos. Foi no ano de 2007, que rearranjos envolvendo o gene da cinase do linfoma anaplásico (*ALK*) foram descritos pela primeira vez como um potencial alvo terapêutico em adenocarcinomas de pulmão com o inibidor da cinase oral, o *crizotinib*, e que, inicialmente, entrou em ensaios clínicos como inibidor do *MET*, para doentes com mutações ativadoras ou com amplificação do gene *MET*^{3,15}. O rearranjo mais comum no gene *ALK* é uma inversão no cromossoma 2, inv[2] (p21p23), resultando na fusão do domínio cinase do *ALK* com o gene *EML4* e a sua região promotora. Os pontos de quebra que ocorrem no gene *EML4* podem ser variáveis, no entanto, no caso do gene *ALK*, estes ocorrem quase sempre no exão 20^{16,17}. Deste facto, resultam múltiplas variantes do gene de fusão *EML4-ALK*, sendo conhecidas até ao momento 15 variantes^{17,18}. Além do gene *EML4* existem ainda outros parceiros de translocação com o *ALK* menos conhecidos. Mais tarde, rearranjos no gene da tirosina cinase do recetor c-ros oncogene 1 (*ROS1*) provaram também constituir um alvo terapêutico potencial com a administração de inibidores do

ALK em adenocarcinomas de pulmão. A homologia do local de ligação do *crizotinib* nos domínios tirosina-cinase do *ROS1* e do *ALK* é responsável por isso. Inúmeros parceiros de fusão com o *ROS1* foram identificados, sendo que os mais comuns incluem genes como: *CD74*, *SLC34A2*, *CCDC6* e *FIG*. O ponto de quebra ocorre na extremidade 5' dos exões 32, 34, 35 ou 36, ficando restrito ao domínio da cinase. A presença de rearranjos envolvendo os genes *ALK* ou *ROS1* foram aprovados na prática clínica, tornando-se biomarcadores fundamentais para o tratamento em cancro do pulmão. Os rearranjos nesses genes são raros, representando menos de 5% dos tumores pulmonares e quase exclusivamente observados em adenocarcinomas^{2,19-22}.

Independentemente dos avanços que resultam do uso de terapias dirigidas, todos os pacientes com CPNPC acabam por desenvolver resistência e progressão da doença. Os inibidores de segunda e terceira geração foram projetados para ter uma inibição mais eficaz do *EGFR* e prevenir o desenvolvimento de resistência adquirida ou superar a mesma, em doentes previamente tratados²³⁻²⁵. Encontra-se já bem estabelecido que em mais de 50% dos casos o mecanismo de resistência aos inibidores do *EGFR* resulta da aquisição da mutação T790M no exão 20 do gene *EGFR*. A presença da mutação T790M reduz a eficácia dos inibidores do *EGFR* de primeira geração, no entanto, inibidores de terceira geração (*osimertinib*) foram recentemente aprovados para superar essa mutação de resistência, possibilitando uma mudança na estratégia terapêutica²⁶⁻³¹. Adicionalmente, e ao contrário da maioria das mutações ativadoras que ocorrem no *EGFR*, a ocorrência de inserções no exão 20 deste gene estão também associadas a uma não resposta aos TKIs^{2,32,33}. A mutação p.A763_Y764insFQEA constitui uma rara exceção, estando associada

a doentes que vão beneficiar do tratamento com TKIs do EGFR³³. Neste sentido, é fundamental ter conhecimento da alteração molecular específica presente para uma melhor orientação terapêutica. *Floc'h et al.* demonstraram recentemente o potencial efeito anti-tumoral do *osimertinib* em linhas celulares de pulmão geneticamente modificadas. Decorre atualmente um ensaio clínico de fase II para avaliar este fármaco como um potencial agente para o tratamento de doentes CPNPC com inserções no exão 20 do gene *EGFR* (NCT03414814)^{32,34,35}.

A introdução da biópsia líquida na prática clínica em cancro do pulmão, através do estudo de ADN livre em circulação (cfDNA), traduziu-se na estratégia ideal para monitorização da resposta ao tratamento e deteção atempada do início dos mecanismos de resistência, nomeadamente, na identificação da mutação de resistência T790M. A possibilidade de identificar mecanismos de resistência durante o tratamento pode ajudar a identificar a progressão da doença mais cedo e, deste modo, melhorar a personalização do tratamento destes doentes^{36,37}.

O maior conhecimento dos mecanismos da farmacoterapia e a evolução da resistência molecular, levou a um incremento da lista de alterações genéticas associadas a um fármaco específico e, por isso, tornou-se uma parte crítica do processo de seleção de pacientes para o tratamento adequado. Desta forma, é possível uma maximização dos efeitos terapêuticos e aumento da sobrevivência geral no tratamento de doentes com cancro do pulmão, que dependem da presença ou ausência de alterações moleculares críticas^{10,38-40}. Essa evolução encontra-se refletida nas recomendações, recentemente atualizadas, do Colégio Americano de Patologistas (CAP), Associação Internacional para o Estudo do Cancro de Pulmão (IASLC) e Associação de Patologia

Molecular (AMP), onde o teste molecular em cancro de pulmão deve incluir o estudo de genes indispensáveis, *EGFR*, *ALK* e *ROS1*, mas que recomenda o uso de painéis multiplexados de sequenciação genética com a inclusão de um conjunto de potenciais alvos terapêuticos, nomeadamente, os genes *BRAF*, *RET*, *ERBB2* (*HER2*), *KRAS* e *MET*, permitindo assim identificar outras possíveis opções de tratamento⁴⁰. Atualmente, estes genes têm alterações moleculares bem conhecidas e específicas (como mutações, rearranjos e amplificações) com uma correlação com agentes terapêuticos específicos em CPNPC^{10,38,41-43}. Um exemplo é o estudo do gene *BRAF*, atualmente requerido em vários países após a aprovação dos inibidores do *BRAF* e *MEK*, para doentes com CPNPC que apresentem a mutação V600 no gene *BRAF*. De realçar que outras mutações, não localizadas no aminoácido 600, são observadas em CPNPC, e cujo impacto clínico ainda não se encontra bem elucidado^{2,40,43}. A inclusão do estudo do gene *NTRK* (1, 2 ou 3) é também recomendada após a aprovação na prática clínica dos fármacos *larotrectinib* e *entrectinib*, em doentes oncológicos com a presença de rearranjos envolvendo este gene^{2,44,45}.

Mais recentemente, estratégias de regulação do sistema imunitário, através da imunoterapia, demonstraram uma atividade anti-tumoral significativa e promissora numa variedade de tumores sólidos⁴⁶. No CPNPC, os inibidores da via PD-1 (proteína de morte celular programada 1) e seus ligandos (PD-Ls), entraram na prática clínica ao demonstrarem um benefício superior comparativamente à quimioterapia convencional em doentes previamente tratados^{47,48}. Os avanços neste âmbito demonstraram uma correlação entre a expressão do PD-L1 em células tumorais e o benefício clínico com agentes anti-PD-1 ou PD-L1. Um exemplo foi a aprovação do *pembrolizumab*.

mab, no tratamento de pacientes recentemente diagnosticados com CPNPC avançado, com expressão $\geq 50\%$ e $\geq 1\%$ do PD-L1, como terapia de primeira ou segunda linha, respetivamente. Contrariamente, os inibidores *nivolumab* e *atezolizumab*, não requerem teste do PD-L1 para administração numa segunda linha terapêutica^{43,48-51}.

O valor preditivo da expressão do PD-L1 é, no entanto, limitado. Menos de metade dos pacientes selecionados com este biomarcador apresenta benefício ao tratamento, além de que, em cerca de 10% dos pacientes com expressão PD-L1 negativa, observa-se algum benefício com a imunoterapia. Biomarcadores alternativos para uma melhor seleção dos pacientes que vão beneficiar com a imunoterapia têm sido estudados, entre eles, a determinação da carga mutacional do tumor (*Tumor Mutational Burden* – TMB), que se demonstrou, num ensaio clínico prospetivo, como sendo um biomarcador importante, independente do nível de expressão PD-L1 do tumor, em CPNPC avançado^{43,52}.

CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

Um fator crucial na terapia personalizada é o desafio de ter um diagnóstico preciso, rápido e confiável. Uma variedade de tecnologias com base no estudo de ácidos nucleicos foram desenvolvidas e utilizadas para a deteção de alterações genéticas, epigenéticas e de expressão génica em laboratórios de diagnóstico molecular. É fundamental ter em consideração as abordagens disponíveis e as vantagens e desvantagens de cada método, incluindo o desempenho em termos de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e tempo de resposta. A escolha de um método molecular deve considerar a multiplicidade de diferentes classes de alterações genómicas que

possam ocorrer (variantes de sequência e variantes estruturais) cuja identificação seja basilar, e que, na rotina diagnóstica o estudo dos biomarcadores é efetuado na sua maioria em material tumoral, geralmente, tecidos fixados em formalina neutra tamponada e incluídos em parafina (FFPE)^{1,38,53}. Hoje em dia, a análise por sequenciação de ADN e metodologias com base em *Polimerase chain reaction* (PCR) constituem os métodos mais frequentemente utilizados para determinar o perfil mutacional de uma amostra tumoral⁴¹.

Historicamente, a sequenciação direta pelo método de Sanger tem sido considerado como o método *gold-standard* para a deteção de mutações somáticas em amostras tumorais. Capaz de identificar todas as mutações possíveis num exão (desde substituições de base, pequenas inserções e deleções) esta metodologia possui, no entanto, uma sensibilidade limitada perante um baixo número de células tumorais, particularmente, em amostras limitadas como são a maioria das amostras pulmonares. De acordo com a nossa experiência, uma percentagem de pelo menos 20% de células tumorais é necessária para uma deteção reprodutível dos alelos mutados (presentes em cerca de 10% se mutação estiver em heterozigotia). De referir, que quando se estabeleceu a importância da deteção de mutações no gene *EGFR* para orientação terapêutica, o estudo molecular tinha por base a sequenciação direta dos exões 18 ao 21, previamente amplificados por PCR^{3,54,55}.

Tendo em conta a sensibilidade analítica comparativamente baixa da sequenciação de Sanger, várias outras plataformas metodológicas foram desenvolvidas, geralmente de fácil automatização, e que se tornaram mais promissoras para uso em larga escala e com alto rendimento em testes de diagnóstico. Técnicas de *High Resolu-*

tion Melting, PCR em Tempo-Real, *Restriction Fragment Length Polymorfism* (PCR – RFLP), *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) e Pirosequenciação constituem alguns exemplos e cujas sensibilidades se enquadram num intervalo de 1% a 20% de células tumorais⁵⁵⁻⁵⁹. Contudo, apesar de constituírem alternativas metodológicas mais simples, com grande sensibilidade analítica e tendencialmente menos morosas comparativamente às metodologias desenvolvidas pelos próprios laboratórios, possuíam como principais limitações, custos tipicamente mais elevados e o facto de se encontrarem, geralmente, restritos à deteção apenas das principais mutações activadoras no(s) gene(s) em estudo, implicando a perda de deteção de alterações raras^{3,54}.

No que se relaciona com o estudo de rearranjos genómicos, a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) surge, tradicionalmente, como o método de referência para a identificação de translocações no gene *ALK*, e mais tarde, no gene *ROS1*. A técnica de FISH para o estudo de translocações consiste na utilização de duas sondas, conjugadas com uma molécula fluorescente para a sua deteção, e que tem por base uma estratégia de separação de sinal (*break-apart*).⁶⁰ Apesar de alguma melhoria no desenvolvimento de sondas, que permitem a identificação de alguns parceiros de fusão, em muitos outros casos não é possível identificar qual o parceiro presente na fusão, e nem a variante presente na translocação. Por outro lado, este método apesar de se demonstrar robusto para amostras FFPE, requer recursos especializados (microscópio de fluorescência, espaço de laboratório protegido pela luz) e pessoal altamente treinado.

A imunohistoquímica (IHC) surge como um método alternativo tecnicamente mais fácil, de baixo custo e rápido tempo de resposta, a consi-

derar numa triagem, com posterior confirmação por FISH de casos considerados *borderline*. Esta técnica é, no entanto, bastante sensível a fatores pré-analíticos (nomeadamente, a fixação do tecido, artefactos de esmagamento e necrose), fatores analíticos (como sensibilidade do clone do anticorpo utilizado, otimização do protocolo pelos diferentes laboratórios com utilização de diferentes plataformas e reprodutibilidade da técnica), e fatores pós-analíticos (relacionados com a variabilidade inter-observador na avaliação e a definição de valores de *cut-off*). Os diversos métodos de IHQ permitem detetar a presença de fusões envolvendo o gene *ALK* ou *ROS1*, independentemente, de qual o parceiro. Desta forma, para a identificação específica do parceiro de translocação são necessárias outras técnicas, de que são exemplo, o PCR *Multiplex* com transcriptase reversa (RT-PCR) e metodologias de sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS).

De realçar que, atualmente, de acordo com as orientações publicadas pela CAP, IASLC e AMP, assim como pela *Food and Drug Administration* (FDA), o FISH e a IHQ constituem os métodos de referência para a pesquisa de translocações no gene *ALK/ROS1*. Estas orientações referem também que amostras com discrepâncias nos resultados, tanto por FISH como por IHQ, devem ser testados novamente por um outro método validado, tal como RT-PCR ou NGS^{40,61}. Todos estes procedimentos requerem o controlo de qualidade nos parâmetros pré-analíticos, assim como, o controlo da celularidade tumoral e da qualidade dos ácidos nucleicos isolados⁶².

A rápida evolução das recomendações de que biomarcadores devem ser testados, apenas se tornou possível pelos avanços a nível tecnológico, nomeadamente, na tecnologia de sequenciação. Através da tecnologia de NGS, o processo de

análise do perfil de alterações genéticas em cancro ficou facilitado. Com o emergir destas tecnologias, surgiu um grande potencial para aplicação da NGS na gestão de doenças e tratamento, aconselhamento genético e avaliação de risco. Numa perspetiva clínica, esta tecnologia veio revolucionar o diagnóstico molecular de tumores sólidos e redefinir o futuro da medicina personalizada, fundamentalmente, pelo melhor conhecimento da biologia dos tumores^{63,64}.

A utilização de NGS é um exemplo de uma metodologia capaz de detetar mutações em percentagens alélicas ínfimas e que quantifica os alelos mutantes presentes num ambiente de alelos *wild-type*. Para além das mutações, no mesmo ensaio, permite identificar fusões envolvendo genes conhecidos e, por vezes, com genes parceiros ainda não descritos. Apesar de, até ao momento, não existir nenhum método baseado em NGS aprovado pela FDA como primeira linha para a determinação do *status* do *ALK* e *ROS1*, esta metodologia tem alterado a área do diagnóstico molecular dramaticamente, sendo já especulado que os testes com base em NGS se tornarão métodos de primeira linha para a identificação de rearranjos, em conjunto com a identificação de muitas outras alterações genéticas, em cancro do pulmão^{40,61}. Contudo, a sua aplicabilidade a nível diagnóstico na deteção de alterações genéticas somáticas carece de validação, crucial em laboratórios acreditados.

Em 2013 publicámos o primeiro estudo em Portugal que resultou na validação e implementação de uma estratégia de diagnóstico molecular através de NGS para a identificação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em doentes com carcinoma da mama/ovário hereditário⁶⁵. O maior conhecimento da metodologia e formação técnica, a necessidade de acompanhar os avanços ao nível da medicina de precisão em cancro do

pulmão, bem como, a importância em manter um diagnóstico preciso, económico e célere culminou, mais tarde, na implementação e validação de uma estratégia de diagnóstico molecular eficaz em amostras tumorais em doentes com cancro do pulmão, deixando de fazer sentido o estudo sequencial *EGFR-ALK-ROS1* que até então prevalecia como a melhor abordagem molecular.

A implementação de metodologias de NGS na patologia molecular demonstrou vantagens, mas também alguns desafios. A adoção de um painel combinado, que vise o estudo de ADN e ARN, tem o potencial de oferecer uma melhor compreensão do perfil molecular deste tipo de tumores. Por sua vez, os custos associados podem ser elevados, mas com um planeamento do conjunto de genes e tipos de alterações a estudar (mutações, rearranjos e/ou amplificações), associado a um aumento do número de casos a sequenciar num mesmo ensaio, resultam numa relação custo-benefício satisfatória. Geralmente, o estudo molecular está direcionado para um conjunto de genes descritos com importância terapêutica, devendo incluir diferentes abordagens através de painéis mais específicos e outros mais abrangentes, de forma a responder às necessidades da prática clínica. Em contraste com um passado que impunha um algoritmo: estudo do *EGFR*, se negativo *ALK*, se por sua vez negativo *ROS1*, hoje, podemos estudar simultaneamente não só estes três genes, como também, incluir outros alvos terapêuticos não só para uma primeira linha de tratamento, mas também, para eventuais segundas linhas terapêuticas. Por outro lado, aliada à alta sensibilidade analítica, o facto de esta metodologia requerer uma baixa quantidade de material genético (ADN e/ou ARN) para o estudo molecular, torna-se bastante vantajosa, especialmente, em amostras de cancro do pulmão que são na sua maioria diminutas, e que pela sua

natureza (representativamente tecidos FFPE), possuem muitas vezes ADN/ARN altamente fragmentado. Questões como a “ausência de material” eram frequentes com o algoritmo passado que obrigava à realização de cortes histológicos em diferentes tempos, com um desmedido gasto de material biológico. Com esta evolução, além de um diagnóstico mais abrangente e mais célere é visível a poupança de material biológico. Por sua vez, a fase final de análise de dados bioinformáticos representa uma fase desafiante, especialmente na contextualização dos achados moleculares, nomeadamente, no que se relaciona com a relevância clínica de mutações raras que, comumente, não se encontra bem estabelecida. Em 2017 foram publicadas *guidelines* de consenso por um conjunto de especialistas da AMP, Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e CAP, para uma melhor orientação na interpretação e categorização das variantes genéticas identificadas em cancro⁶⁶.

A análise de cfDNA apenas se tornou possível com o desenvolvimento de metodologias altamente sensíveis. Os principais métodos utilizados na rotina diagnóstica incluem metodologias com base em PCR digital e NGS. A tecnologia de PCR digital é dirigida para uma alteração genética em específico. Ao permitir uma quantificação absoluta através da compartimentação do ADN em 20,000 poços, possibilita a deteção de frações alélicas a níveis de sensibilidade consideravelmente altos (até 0,001%). Sendo direcionada para uma determinada alteração em específico, é essencialmente utilizada para a deteção da mutação de resistência T790M no *EGFR*. Por sua vez, o uso de metodologias como o NGS na biópsia líquida, permitem uma visão mais ampla da dinâmica tumoral, permitindo descobrir variantes menos frequentes, mas com potencial terapêutico, nomeadamente, novos mecanismos de resis-

tência adquirida a terapias dirigidas. Um exemplo, é a identificação de mutações secundárias nos genes *ALK* ou *ROS1*, frequente mecanismo de resistência adquirida aos inibidores do ALK^{36,67,68}. Em reconhecimento à sensibilidade limitada dos testes em cfDNA (60% a 70%) comparativamente aos realizados em tecido, a especificidade é elevada (90 a 100%). A ausência de uma mutação específica, não detetada no cfDNA, não exclui a possibilidade de essa mutação estar presente no tecido tumoral, desta forma, perante um resultado negativo no cfDNA, a biópsia do tecido deve ser convenientemente considerada^{36,38,40}.

Os avanços decorrentes da Imunoterapia demonstraram o valor preditivo da expressão de PD-L1. O estudo IHQ é considerado o método de referência para a avaliação da expressão de PD-L1. Esta avaliação tem por base a percentagem de células neoplásicas com expressão membranar de PD-L1, que se traduz na percentagem de células tumorais viáveis que mostram marcação parcial ou completa da membrana, independentemente, da intensidade da marcação (os níveis de expressão podem variar de 0% a 100%)⁴¹. Atualmente, existe uma variedade de métodos de IHQ disponíveis comercialmente, e que são determinados pelo clone de anticorpo selecionado para detetar a presença da proteína PD-L1. É de salientar que diferentes clones de anticorpos terão como alvo diferentes epítomos, e que, diferentes plataformas também demonstram diferenças de marcação. O anticorpo 22C3 desenvolvido pela Dako, e o único aprovado pela FDA para a imuno-coloração de PD-L1 para a imunoterapia com *pembrolizumab*. *Ilie et al.* demonstraram a importância em estabelecer uma padronização dos protocolos para deteção da expressão de PD-L1 nas diversas plataformas disponíveis, que aliada a uma validação apropriada e cuidadosa por parte do laboratório, permite obter resultados

fidedignos e comparáveis com diferentes plataformas de marcação⁶⁹⁻⁷².

TIPOS E REQUISITOS DAS AMOSTRAS

Em pacientes com carcinoma avançado de pulmão, pequenas biópsias ou amostras de citologia são frequentemente o único material disponível para diagnóstico patológico e para os testes moleculares, além de que, a percentagem de células neoplásicas é frequentemente baixa e cujo enriquecimento tumoral pode ser complexo ou até mesmo inexequível. Pela importância do estudo molecular na gestão terapêutica destes doentes, um dos grandes desafios passa pela otimização do processo de diagnóstico anatomopatológico e análise molecular, de forma a garantir um uso preciso e racional do material. Nos últimos anos têm sido publicadas recomendações para a prática de patologia molecular em pulmão na tentativa de otimizar o processo de diagnóstico à medida que a tecnologia, o conhecimento científico e a prática clínica evoluem, onde se salienta a importância em preservar o material para estudo molecular e no esforço que deve ser tido em consideração por forma a minimizar a sua utilização^{2,40,54,73}.

Se fizermos um exercício de memória, rapidamente nos lembramos que em qualquer laboratório de anatomia patológica existem protocolos que preconizam a obtenção de mais que uma lâmina aquando do corte dos blocos parafinados, são exemplo, protocolos para biópsias do fígado. Desta forma, o técnico não só economiza tempo, mas também material. Neste sentido, podemos perguntar se existe a mesma rotina para os casos com suspeita de neoplasia do pulmão. É pertinente fazer esta pergunta, uma vez que se a resposta for um “sim”, então estaremos perante

um serviço que planeou qual ou quais os anticorpos que querará utilizar para classificar aquela lesão e, acima de tudo economizou material biológico que poderá seguir para estudos moleculares subsequentes. Também sabemos que, em certas situações, de facto o material é extremamente escasso e, para agravar a situação, por diversas razões o clínico não poderá repetir a biópsia. Neste tipo de situação, existem dois cenários possíveis: (I) o laboratório tem procedimentos devidamente validados para recorrer a material utilizado no diagnóstico anatomopatológico, como lâminas de arquivo coradas; ou (II) recorrer à biópsia líquida, que nestas situações tem-se demonstrado extremamente relevante, de acordo com a nossa experiência.

No que respeita à seleção de casos, atualmente todos os adenocarcinomas do pulmão, tumores mistos com um componente de adenocarcinoma, ou amostras pequenas onde o componente de adenocarcinoma não possa ser excluído, devem ser encaminhadas para análise molecular. Amostras citológicas são também adequadas para estudo molecular, sendo preferíveis as preparações do tipo citobloco (*cell-block*) em detrimento de esfregaços citológicos. Amostras provenientes de tecido ósseo, como metástases, podem ser problemáticas, uma vez que as soluções descalcificantes ácidas causam a fragmentação extensiva do ADN/ARN^{16,40}. A escolha entre lesão primária *versus* lesão metastática é primeiramente ditada pela qualidade da amostra (conteúdo tumoral e preservação), apesar de que, o local mais recente de metástase deve ser avaliado no caso de progressão após tratamento com inibidores de tirosina cinase.

A avaliação do conteúdo tumoral na amostra constitui um passo crucial para o estudo molecular. A proporção de quantidade tumoral deve ser documentada e, quando justificável, a área que

contenha a maior proporção de tumor deve ser demarcada na lâmina. O objetivo desta avaliação inicial é enriquecer e concentrar o mais possível a quantidade de células tumorais, que podem posteriormente ser isoladas, através da macrodisseção. A avaliação morfológica deve documentar também a presença de material mucinoso, necrótico, pigmentos e hemoglobina, pois estes podem inibir a reação de PCR. Apesar de a disponibilidade limitada de tecido ser uma questão importante, fatores pré-analíticos como a fixação, processamento, armazenamento por longo tempo em condições adversas, têm um grande impacto na integridade dos ácidos nucleicos do tumor. Por exemplo, durante o processamento histológico, a fixação inadequada e o pH baixo da formalina podem induzir a degradação e fragmentação do ADN/ARN, o que pode afetar substancialmente a obtenção de um resultado molecular¹⁶.

RELATÓRIO, VALIDAÇÃO DE TESTES E GARANTIA DA QUALIDADE

O relatório é uma parte essencial de qualquer teste de laboratório e deve por isso conter toda a informação necessária para que o médico requisitante, bem como, o paciente saiba exatamente que estudo foi realizado e qual o seu resultado. Os relatórios de patologia molecular devem incluir informação do paciente, do material biológico utilizado para a análise, da entidade requisitante do exame, descrição do método molecular utilizado (incluindo genes/exões estudados, sensibilidade e especificidade analítica), limitações do próprio método, resultados do teste, uma contextualização dos achados moleculares, bem como, comentário de algum aspeto pré-analítico, analítico ou pós-analítico, que possa influenciar a interpretação clínica dos resultados^{10,66}. Este deve conter uma linguagem clara, simples e direta, sem incluir quaisquer informações dúbias.

Cada laboratório de Patologia molecular deve garantir o desempenho dos seus exames com a maior qualidade possível, validando os seus procedimentos e participando em programas de controlo de qualidade. É fundamental garantir que os resultados são corretamente interpretados e o diagnóstico molecular efetuado com o rigor exigido. A participação em testes de proficiência, permite uma melhoria na validação dos procedimentos técnicos, minimizando, a ocorrência de erros que possam surgir numa qualquer fase do procedimento, e garantindo assim, a qualidade dos seus serviços. Na nossa rotina diagnóstica, desde cedo implementamos a realização destes controlos (controlos internos ou externos da qualidade) não só no âmbito do cancro do pulmão, mas de forma a abranger o máximo de áreas e processos no laboratório, um requisito primordial num laboratório acreditado. Estes testes devem ser realizados como qualquer outro exame, e nunca de forma pontual. De acordo com a política do laboratório estes testes devem ser realizados com a frequência necessária comparativamente à rotina usual do exame em causa.

Por fim, sempre que existir um problema em alguma das fases do processo, o laboratório deve ter uma política de qualidade que permita a investigação e análise de causas dos referidos problemas e que todos os colaboradores possam participar e ter acesso, quer na investigação levada a cabo, quer na implementação de medidas corretivas e/ou preventivas de forma a minimizar a sua recorrência.

PERSPETIVAS FUTURAS

A medicina de precisão tem-se demonstrado promissora na gestão do tratamento de doentes com cancro do pulmão, priorizando o diagnóstico

molecular. Os desenvolvimentos tecnológicos observados nos últimos anos trouxeram avanços significativos ao nível da caracterização dos tumores, com a identificação de biomarcadores específicos, cruciais e potenciais, para antecipar a progressão natural do tumor, a resposta a terapias personalizadas e a resistência ao tratamento. De acordo com entidades internacionais, como o NCCN, ESMO e CAP, vários outros alvos moleculares foram identificados com variantes somáticas com potencial terapêutico. Muito recentemente atualizadas, as diretrizes da NCCN, incluem agora no algoritmo para o estudo molecular em doentes com CPNPC, a identificação de mutações que levam ao *skipping* do exão 14 no gene *MET*, bem como, o estudo de rearranjos no gene *RET*². Biomarcadores preditivos emergentes para identificar novas terapias, incluem: a amplificação do gene *MET* e mutações no gene *HER2*, bem como, o TMB, que como referido anteriormente, poderá apresentar um papel relevante na decisão da imunoterapia^{2,43}. Perfilam-se outros futuros alvos terapêuticos, como por exemplo os genes: *PIK3CA*, *FGFR* e *AKT1*. Os inúmeros ensaios clínicos que decorrem mundialmente, abrangendo diferentes moléculas, irão contribuir para um maior conhecimento científico neste âmbito, e em consequência, resultar num incremento de mais opções terapêuticas para os doentes oncológicos. O cancro passa, cada vez mais, a ser visto como uma doença crónica. O exemplo do modelo no cancro do pulmão é talvez a melhor constatação que o dia de amanhã poderá ser bem diferente. A evolução observada nos últimos anos, com publicação de diretrizes, aprovação de fármacos de tratamento em terceira linha para uma primeira linha terapêutica, bem como, biofármacos utilizados num tipo de neoplasia com aprovação para outras neoplasias, detêm um impacto significativo na sobrevivência

destes doentes, em adição, a uma maior qualidade de vida.

Podemos afirmar que ao dia de hoje nada está estagnado e, certamente, teremos mais e melhores ferramentas para proporcionar a cada doente a sua terapia, verdadeiramente, personalizada. A nós, Laboratório de Patologia Molecular, compete-nos progredir de acordo com toda a evolução que nos rodeia para que a resposta seja, uma resposta de precisão.

BIBLIOGRAFIA

1. Roychowdhury S, & Van Allen, E. M. (Eds.). Precision Cancer Medicine: Challenges and Opportunities: Springer 2019.
2. NCCN. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Non-Small Cell Lung Cancer. 2020; Version 4.2020.
3. Leonard DGBE. Molecular Pathology in Clinical Practice. Springer. 2016.
4. NCCN. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Small Cell Lung Cancer. 2020; Version 3.2020.
5. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13306-11.
6. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-500.
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
8. Huang SF, Liu HP, Li LH, Ku YC, Fu YN, Tsai HY, et al. High frequency of epidermal growth factor

- receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8195-203.
9. Gu D, Scaringe WA, Li K, Saldivar JS, Hill KA, Chen Z, et al. Database of somatic mutations in EGFR with analyses revealing indel hotspots but no smoking-associated signature. *Hum Mutat.* 2007;28(8):760-70.
  10. Shim HS, Choi YL, Kim L, Chang S, Kim WS, Roh MS, et al. Molecular Testing of Lung Cancers. *J Pathol Transl Med.* 2017;51(3):242-54.
  11. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(10):2890-6.
  12. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2(4):327-43.
  13. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004;64(24):8919-23.
  14. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* 2005;2(1):e17.
  15. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-6.
  16. Khoo C, Rogers TM, Fellowes A, Bell A, Fox S. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(2):126-41.
  17. Sabir SR, Yeoh S, Jackson G, Bayliss R. EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients. *Cancers (Basel).* 2017;9(9).
  18. Su Y, Long X, Song Y, Chen P, Li S, Yang H, et al. Distribution of ALK Fusion Variants and Correlation with Clinical Outcomes in Chinese Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Crizotinib. *Target Oncol.* 2019;14(2):159-68.
  19. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2011;12(11):1004-12.
  20. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1693-703.
  21. Chin LP, Soo RA, Soong R, Ou SH. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(11):1625-30.
  22. 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.
  23. Romanidou O, Landi L, Cappuzzo F, Califano R. Overcoming resistance to first/second generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and ALK inhibitors in oncogene-addicted advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2016;8(3):176-87.
  24. Riely GJ. Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008;3(6 Suppl 2):S146-9.
  25. Reck M, Popat S, Reinmuth N, De Ruyscher D, Kerr KM, Peters S, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25 Suppl 3:iii27-39.
  26. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2016;9:34.
  27. Pirker R. Third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2016;28(2):115-21.
  28. Goss G, Tsai CM, Shepherd FA, Bazhenova L, Lee JS, Chang GC, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):1643-52.

29. Tan CS, Gilligan D, Pacey S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2015;16(9):e447-e59.
30. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med.* 2005;2(3):e73.
31. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352(8):786-92.
32. Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4:5.
33. Yasuda H, Park E, Yun CH, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo WL, et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med.* 2013;5(216):216ra177.
34. Masuzawa K, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, et al. Characterization of the efficacies of osimertinib and naxartinib against cells expressing clinically relevant epidermal growth factor receptor mutations. *Oncotarget.* 2017;8(62):105479-91.
35. Floc'h N, Martin MJ, Riess JW, Orme JP, Stanszewska AD, Menard L, et al. Antitumor Activity of Osimertinib, an Irreversible Mutant-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, in NSCLC Harboring EGFR Exon 20 Insertions. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(5):885-96.
36. Pasini L, Ulivi P. Liquid Biopsy for the Detection of Resistance Mechanisms in NSCLC: Comparison of Different Blood Biomarkers. *J Clin Med.* 2019;8(7).
37. Veldore VH, Choughule A, Routhu T, Mandloi N, Noronha V, Joshi A, et al. Validation of liquid biopsy: plasma cell-free DNA testing in clinical management of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl).* 2018;9:1-11.
38. Sholl L. Molecular diagnostics of lung cancer in the clinic. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(5):560-9.
39. Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummins OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol.* 2012;25(3):347-69.
40. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2018;20(2):129-59.
41. Domagala-Kulawik J. New Frontiers for Molecular Pathology. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:284.
42. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Correction to: "Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". *Ann Oncol.* 2019;30(5):863-70.
43. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
44. 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;21(2):271-82.
45. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731-9.
46. Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(5):551-64.
47. Somasundaram A, Burns TF. The next generation of immunotherapy: keeping lung cancer in check. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):87.
48. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-33.
49. Soo RA, Lim SM, Syn NL, Teng R, Soong R, Mok TSK, et al. Immune checkpoint inhibitors in epidermal growth factor receptor mutant non-small cell lung cancer: Current controversies and future directions. *Lung Cancer.* 2018;115:12-20.
50. Rossi S, Castello A, Toschi L, Lopci E. Immunotherapy in non-small-cell lung cancer: potential predic-

- tors of response and new strategies to assess activity. *Immunotherapy*. 2018;10(9):797-805.
51. Kazaz SN, Oztop I. Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced-Stage Non-small Cell Lung Cancer. *Turk Thorac J*. 2017;18(4):101-7.
  52. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *NEngl J Med*. 2018;378(22):2093-104.
  53. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S14-23.
  54. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-59.
  55. Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):4954-5.
  56. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM, Filipits M, Taron M, Gandara D, et al. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol*. 2010;5(10):1706-13.
  57. Pan Q, Pao W, Ladanyi M. Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J Mol Diagn*. 2005;7(3):396-403.
  58. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*. 2008;8:142.
  59. Dufort S, Richard MJ, Lantuejoul S, de Fraipont F. Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:57.
  60. Abbott Molecular I. Vysis ALK Break Apart FISH evaluation guide for NSCLC tissue specimens [Available from: https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/Vysis_ALK_Evaluation_Guide_Final.pdf.
  61. Tang Z, Wang L, Tang G, Medeiros LJ. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Detecting Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Rearrangement in Lung Cancer: Clinically Relevant Technical Aspects. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16).
  62. Garrido P, Conde E, de Castro J, Gomez-Roman JJ, Felip E, Pijuan L, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2019.
  63. de Biase D, Visani M, Malapelle U, Simonato F, Cesari V, Bellevisine C, et al. Next-generation sequencing of lung cancer EGFR exons 18-21 allows effective molecular diagnosis of small routine samples (cytology and biopsy). *PLoS One*. 2013;8(12):e83607.
  64. DiBardino DM, Saqi A, Elvin JA, Greenbowe J, Suh JH, Miller VA, et al. Yield and Clinical Utility of Next-Generation Sequencing in Selected Patients With Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2016;17(6):517-22 e3.
  65. Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, et al. Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting. *Hum Mutat*. 2013;34(4):629-35.
  66. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23.
  67. Ulivi P. Non-Invasive Methods to Monitor Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer: Where Do We Stand? *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
  68. Zhang Y, Xu Y, Zhong W, Zhao J, Chen MJ, Zhang L, et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR. *Oncotarget*. 2017;8(4):5861-73.

69. Udall M, Rizzo M, Kenny J, Doherty J, Dahm S, Robbins P, et al. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagn Pathol.* 2018;13(1):12.
70. Hendry S, Byrne DJ, Wright GM, Young RJ, Sturrock S, Cooper WA, et al. Comparison of Four PD-L1 Immunohistochemical Assays in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(3):367-76.
71. Dietel M, Savelov N, Salanova R, Micke P, Bigras G, Hida T, et al. Real-world prevalence of programmed death ligand 1 expression in locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: The global, multicenter EXPRESS study. *Lung Cancer.* 2019;134:174-9.
72. Ilie M, Khambata-Ford S, Copie-Bergman C, Huang LK, Juco J, Hofman V, et al. Use of the 22C3 anti-PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in multiple automated immunohistochemistry platforms. *Plos One.* 2017;12(8).
73. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.