



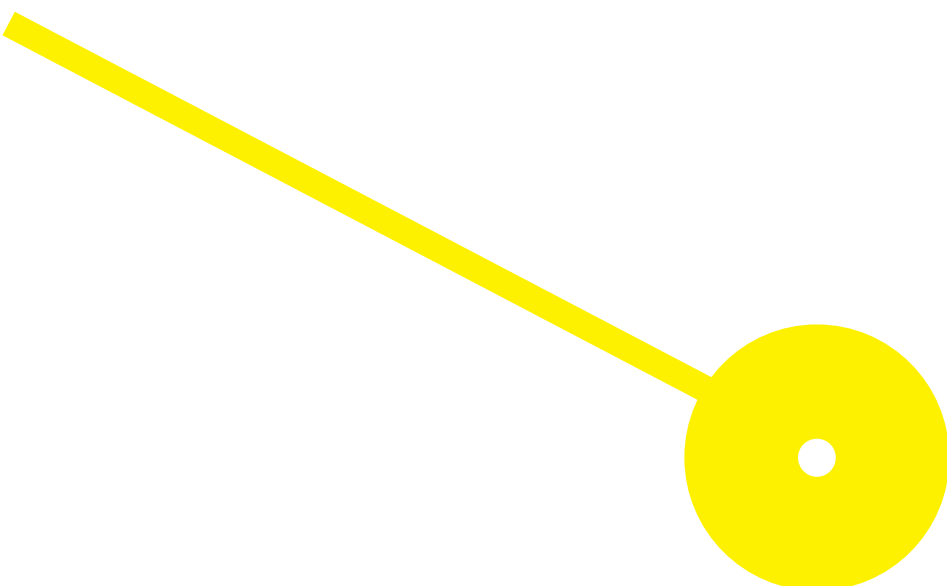
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA – ÁREA DE ESPECIALIZAÇÃO EM PATOLOGIA
MOLECULAR

Fusão do gene *ALK* em CPNPC – deteção por RT-qPCR

Jéssica Sofia Gomes Lopes

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Fusão do gene *ALK* em CPNPC –detecção por RT-qPCR

Autor

Jéssica Sofia Gomes Lopes

Orientadores

Prof. Luís Cirnes Cardoso – Ipatimup Diagnósticos, Escola Superior de Saúde do Instituto
Politécnico do Porto

Prof. Doutora Regina Silva – Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** – Área de Especialização em **Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Devo começar por agradecer ao meu orientador, Prof. Luís Cirnes, por ter apostado em mim desde o início.

À Professora Regina Silva, pela ajuda prestada ao longo do percurso académico, e em especial nos últimos dois anos.

À Maria João, por todo o tempo dispensado para me apoiar neste projeto. Mesmo estando longe, e tendo ela em mãos um “projeto” ainda maior, foi o meu braço direito e foi essencial no desenvolvimento deste projeto. Obrigada pela orientação, Mary!

Às minhas meninas do LDG, sem exceção. Trabalhamos juntas, rimos juntas, reclamamos juntas, crescemos juntas: não pedia que fosse de outra forma!

À Paulinha e à Tânia, pela ajuda essencial no arranque inicial e fase final (e pela boa disposição diária). Um “obrigada” do coração!

Aos meus amigos – a família que escolhi – pela amizade, compreensão e incentivo que nunca falham.

Ao Luís, pelo apoio, amizade e companheirismo. E por aturares tanto.

Aos meus pais, à minha irmã e ao Danilo: não há palavras suficientes para expressar a minha gratidão. Por serem a melhor família que poderia ter, pelo amor e apoio, e por fazerem de mim quem eu sou.

Resumo

O cancro do pulmão é a neoplasia com a maior taxa de mortalidade mundialmente, e aproximadamente 5–7% dos pacientes com carcinoma pulmonar de não pequenas células apresentam rearranjo ou fusão do gene *Anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*), sendo elegíveis para tratamento com inibidores de tirosina quinase (TKIs). A deteção desta alteração é realizada por técnicas como FISH, IHQ, RT-qPCR e NGS, e a obtenção de resultados fiáveis é crucial para a melhoria do prognóstico destes pacientes. Assim, há uma necessidade crescente da otimização e aplicação de novas metodologias para garantir uma melhor performance dos métodos para a deteção de fusões do gene *ALK*.

Este estudo visa a otimização e validação de uma técnica de RT-qPCR para a deteção de fusões do gene *ALK*, utilizando *primers* específicos para as extremidades 5' e 3' do gene *ALK*, e confirmação dos resultados obtidos por comparação aos adquiridos pela técnica NGS, nomeadamente nos casos cujo parceiro da fusão não foi identificado.

Com uma taxa de sucesso de 86%, o RT-qPCR apresentou uma sensibilidade e especificidade de 94,7% e 97,1%, respetivamente. Demonstrou elevada concordância com os resultados previamente obtidos, e permitiu a confirmação da presença de fusão em 8 de 15 casos (53%) cujo NGS não identificou o parceiro de fusão.

A técnica de RT-qPCR otimizada apresentou elevada taxa de concordância com os resultados da metodologia NGS, podendo ser utilizada como método de deteção da presença de fusão, com potencial benefício nos casos que suscitam dúvida na análise por NGS.

Palavras-chave:

Cancro do pulmão, rearranjo *ALK*, inibidores tirosina-quinase, RT-qPCR, NGS

Abstract

Lung cancer is the malignancy with the highest mortality rate worldwide, and approximately 5–7% of patients with non-small cell lung carcinoma show a rearrangement or fusion of the Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene and are eligible for treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKIs). The detection of this alteration is carried out by techniques such as FISH, IHQ, RT-qPCR and NGS, and obtaining reliable results is crucial for improving the prognosis of these patients. Thus, there is a growing need to optimize and apply new methodologies to ensure better performance of methods for detecting *ALK* gene fusions.

This study aims to optimize and validate an RT-qPCR technique for the detection of *ALK* gene fusions, using specific primers for the 5' and 3' ends of the *ALK* gene, and to confirm the results obtained by comparison with those obtained by the NGS technique, particularly in cases where the fusion partner was not identified.

With a success rate of 86%, RT-qPCR presented a sensitivity and specificity of 94.7% and 97.1%, respectively. It showed high concordance with the results previously obtained, and allowed confirmation of the presence of a fusion in 8 out of 15 cases (53%) where NGS did not identify the fusion partner.

The optimized RT-qPCR technique showed a high concordance rate with the results of the NGS methodology and can be used as a method for detecting the presence of fusion, with potential benefit in cases that are doubtful in the NGS analysis.

Keywords:

Lung cancer, *ALK* rearrangement, tyrosine kinase inhibitors, RT-qPCR, NGS

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	O cancro do pulmão	1
1.1.1.	Rastreio, diagnóstico e estadiamento	2
1.1.2.	Avaliação do <i>status</i> molecular	4
1.1.3.	Gene <i>ALK</i> e proteína ALK	5
1.1.4.	Proteína de fusão ALK no CPNPC	6
1.1.5.	Terapia dirigida para CPNPC positivo para fusão do gene <i>ALK</i>	8
1.2.	Métodos de deteção de rearranjos <i>ALK</i>	10
1.2.1.	IHQ	11
1.2.2.	FISH	11
1.2.3.	RT-qPCR	12
1.2.4.	NGS	12
2.	Objetivos.....	15
3.	Materiais e Métodos	16
3.1.	Amostra	16
3.2.	Métodos.....	16
3.2.1.	Controlo Morfológico.....	16
3.2.2.	Extração e quantificação.....	16
3.2.3.	Sequenciação de nova geração (NGS).....	17
3.2.4.	RT-qPCR.....	18
3.2.4.1.	Otimização da RT-qPCR.....	20
3.2.5.	Análise estatística.....	21
4.	Resultados.....	22
4.1.	Caraterização da amostra.....	22
4.2.	Concentração e percentagem tumoral	22
4.3.	Deteção de fusão do gene <i>ALK</i> por NGS.....	23
4.4.	Deteção da fusão <i>ALK</i> por RT-qPCR	24
4.4.1.	Otimização da técnica RT-qPCR	24
4.4.2.	Validação da técnica RT-qPCR.....	25
4.5.	Comparação entre método NGS versus RT-qPCR.....	27

5. Discussão.....	29
6. Conclusão.....	33
Referências Bibliográficas.....	34

Lista de Abreviaturas

ACTB – Actina beta

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

ALK – *Anaplastic lymphoma kinase*

ALK+ – Positivo para fusão do gene *ALK*

ALK3 – Sonda para extremidade 3' do gene *ALK*

ALK5 – Sonda para extremidade 5' do gene *ALK*

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CNV – *Copy number variations*

CP – Cancro do pulmão

CPCP – Carcinoma pulmonar de células pequenas

CPNPC – Carcinoma pulmonar de não pequenas células

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

EML4 – *Echinoderm microtubule associated protein like 4*)

EU – União europeia

FDA – *Food and Drug Administration*

FFPE – Amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina

FISH – Hibridação *in situ* por fluorescência

HE – Hematoxilina-eosina

HELP – *Motif* hidrofóbico do gene *EML4*

IHQ – Imunohistoquímica

KD – Domínio quinase

LPM – Laboratório de Patologia Molecular

NCCN – *National comprehensive cancer network*

NELSON – *Nederland-leuven longkanker screenings onderzoek*

NGS – Sequenciação de nova geração

NLST – *National lung screening trial*

NTC – *Non-template control*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFS – *Progression free survival*

qPCR – PCR quantitativo

RNA – Ácido ribonucleico

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa

SNC – Sistema nervoso central

TC – Tomografia computadorizada

TCBD – Tomografia computadorizada de baixa dose

TD – Domínio de trimerização

TK – Tirosina quinase

TKI – *Tyrosine-kinase inhibitor* /inibidor da tirosina quinase

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IDT – *Integrated DNA Technologies*

TM – Domínio transmembranar

WD – Repetições de ácido triptofano–aspártico

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição da mistura para a síntese de DNA complementar	19
Tabela 2 – Sequências dos <i>primer-probes</i> PrimeTime qPCR Assay utilizados	20
Tabela 3 – Mistura de reação utilizada para a realização do RT-qPCR.....	20
Tabela 4 – Distribuição dos casos de CPNPC selecionados por faixa etária e por gênero	22
Tabela 5 – Detecção de fusão do gene <i>ALK</i> por NGS e distribuição por gênero e idade	24
Tabela 6 – Valores da mediana dos ciclos de amplificação para cada sonda testada, diferença entre o ciclo de amplificação <i>ALK5-ALK3</i> , <i>IQR</i> e <i>cut-off</i> , em casos NGS-negativos.....	26
Tabela 7 – Distribuição das variantes das fusões obtidas por NGS e resultado obtido por RT-qPCR	27
Tabela 8 – Características das amostras dos casos discrepantes (concentração e percentagem tumoral) e detalhes dos resultados obtidos por RT-qPCR e por NGS.....	28

Índice de Figuras

Figura 1 – Incidência e Mortalidade dos 15 cânceres mais frequentes na população mundial (A) e portuguesa (B) em 2022	1
Figura 2 – Subtipos histológicos do Câncer do Pulmão e respetivas percentagens de incidência na população global.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 3 – Expressão da proteína ALK nos diversos tecidos humanos.....	5
Figura 4 – Esquema representativo da fusão <i>EML4-ALK</i> e o seu papel no desenvolvimento de CPNPC (A), e papel do gene <i>ALK</i> no desenvolvimento neuronal normal (B)	7
Figura 5 – Representação das diversas variantes da fusão <i>EML4-ALK</i> e os seus pontos de rutura	8
Figura 6 – Inibidores de tirosina quinase disponíveis e data de aprovação pela FDA para o tratamento de 1ª linha de CPNPC ALK+ (círculos azuis)	10
Figura 7 – Gráficos representativos da distribuição de casos pela percentagem de células tumorais presente nos cortes histológicos (A) e por concentração do RNA extraído das amostras (B) (n=85)	23
Figura 8 – Detecção da fusão do gene <i>ALK</i> por NGS.	23
Figura 9 – Imagens representativas dos resultados das corridas com cDNA controlo (dil1:1000)	25
Figura 10 – Resultados obtidos por RT-qPCR (A). Representação gráfica de um caso positivo (B) e negativo (C).....	26
Figura 11 – Representação gráfica da dispersão dos valores de $\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ dos casos NGS-negativos.	27

1. Introdução

1.1. O cancro do pulmão

De acordo com dados fornecidos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 2022, o cancro do pulmão (CP) foi considerado o cancro com maior incidência e mortalidade na população masculina global, enquanto nas mulheres é precedido pelo cancro da mama (Figura 1). Em Portugal, o panorama é semelhante e, apesar de ser a segunda neoplasia mais incidente, precedida pelo cancro da mama nas mulheres e da próstata nos homens, é a que evidencia pior prognóstico, uma vez que apresenta a maior mortalidade em ambos os géneros (Figura 1)(1–3).

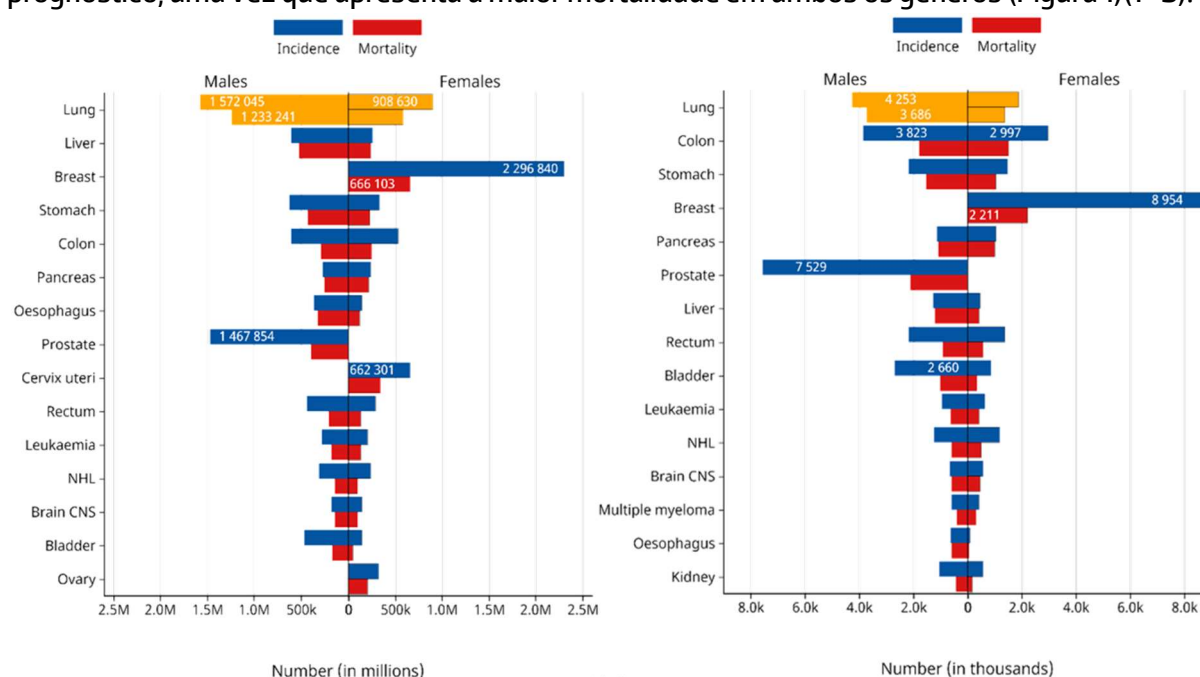


Figura 1 – Incidência e Mortalidade dos 15 cancros mais frequentes na população mundial (A) e portuguesa (B) em 2022. Fonte: Cancer Today – Global Cancer Observatory (1)

O fator de risco mais significativo associado ao desenvolvimento de CP é o consumo de tabaco, sendo atribuídos cerca de 85% de todos os casos a esta causa(4). Apenas 15 a 20% dos homens com CP são não-fumadores, por sua vez, a população feminina não-fumadora é cerca de 50%(5). O consumo de tabaco de forma passiva e a exposição a asbestos, radon e outras substâncias tóxicas são também fatores de risco a ser considerados(4). A presença de doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPOCs) ou bronquite crónica (devido à desregulação imunológica e microambiental, incluindo stress oxidativo, respostas imunitárias anormais e inflamação crónica (6,7)), bem como história familiar da doença, podem resultar num aumento da probabilidade de desenvolver CP(8).

Apesar dos mecanismos para o desenvolvimento de CP não estarem ainda totalmente esclarecidos, supõe-se que estão envolvidos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. As alterações genéticas perturbam o equilíbrio entre a divisão celular e a apoptose, resultando num crescimento desregulado(7,9,10). Por sua vez, os mecanismos epigenéticos como a metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), as modificações das histonas que alteram a estrutura da cromatina, e a variação na expressão de microRNAs desempenham papéis cruciais no silenciamento de genes envolvidos nas funções celulares, contribuindo para a progressão da neoplasia(10). Em adição, as alterações nas vias de sinalização promotoras do crescimento (*EGFR/Ras/PI3K*), vias inibitórias do crescimento (*p53/Rb/P14ARF*), vias apoptóticas (*Bcl-2/Bax/Fas/FasL*), e de reparação do DNA são também fundamentais no desenvolvimento do cancro do pulmão(9). Desta forma, a compreensão destes mecanismos biológicos é crucial para o delineamento de estratégias de deteção precoce e de terapias direcionadas para o CP.

1.1.1. Rastreio, diagnóstico e estadiamento

Os sintomas mais comuns associados ao CP podem incluir tosse, fadiga, dispneia, hemoptise, dor torácica, rouquidão, entre outros(11,12). Este quadro clínico corresponde frequentemente a uma fase tardia da doença, resultando numa percentagem elevada (75%) de casos de CP diagnosticados em fase avançada ou até metastática e, consequentemente, numa elevada taxa de mortalidade e uma reduzida taxa de sobrevivência aos 5 anos (15%)(2,11).

Com o objetivo de diminuir a taxa de mortalidade associada a esta neoplasia, a União Europeia (EU) recomenda a adoção de duas estratégias fundamentais: a cessação tabágica (como principal fator de risco da doença) e a definição de um programa de rastreio para o CP. Em Portugal, o rastreio já começa a ser prática em algumas instituições, e é direcionado para os grupos de risco, nomeadamente indivíduos com idades compreendidas entre os 50 e 75 anos e com exposição a tabaco (superior a vinte maços de cigarros por ano)(13,14).

Inicialmente, o rastreio era realizado através de radiografia torácica ou análise de expetoração, mas sem evidência de benefício sobre a taxa de mortalidade(15). Atualmente, o rastreio pode ser realizado por tomografia computadorizada (TC), que fornece imagens de maior resolução do que a radiografia, ou por tomografia de baixa dose (TCBD), que fornece informação sobre a localização e o tamanho de nódulos em estadios iniciais da doença, e com menor emissão de radiação face à TC(7,11,16).

Diversos ensaios clínicos comprovaram que a utilização da TCBD como rastreio resulta na diminuição da mortalidade associada ao CP. O ensaio de rastreio *National Lung Screening Trial* (NLST) mostrou uma diminuição da taxa de mortalidade em 20% com a TCBD e o ensaio *Nederland-Leuven Longkanker Screenings Onderzoek* (NELSON) mostrou uma redução cumulativa de mortalidade em 10 anos de 24% nos homens e 33% nas mulheres(13,15). Atualmente, a TCBD é considerada a técnica de deteção mais eficaz e globalmente utilizada no cancro do pulmão(11).

No que concerne ao diagnóstico do CP, inicialmente, era realizado através de diversas técnicas, como radiografia torácica, ressonância magnética, e análise de produtos biológicos(7,11).

Através destes meios, o clínico pode identificar a presença de uma lesão e averiguar sobre o seu tamanho e a forma. Para confirmação dos achados imagiológicos, é frequentemente solicitada a colheita de material tecidual (biópsia ou citologia), que permite o diagnóstico histológico e, quando necessário, a sua caracterização molecular. Assim, várias revisões da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) foram realizadas para que esta reflita perfis histológicos e moleculares recentemente identificados(17).

O CP é uma neoplasia essencialmente categorizada em dois tipos histológicos principais: carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC corresponde a 85% das neoplasias pulmonares), e carcinoma pulmonar de células pequenas (CPCP corresponde a 15% de todas as neoplasias pulmonares). O CPNPC pode ser subclassificado como: adenocarcinoma (40%), carcinoma de células escamosas (30%) e carcinoma de células grandes (15%) (Figura 2)(17).

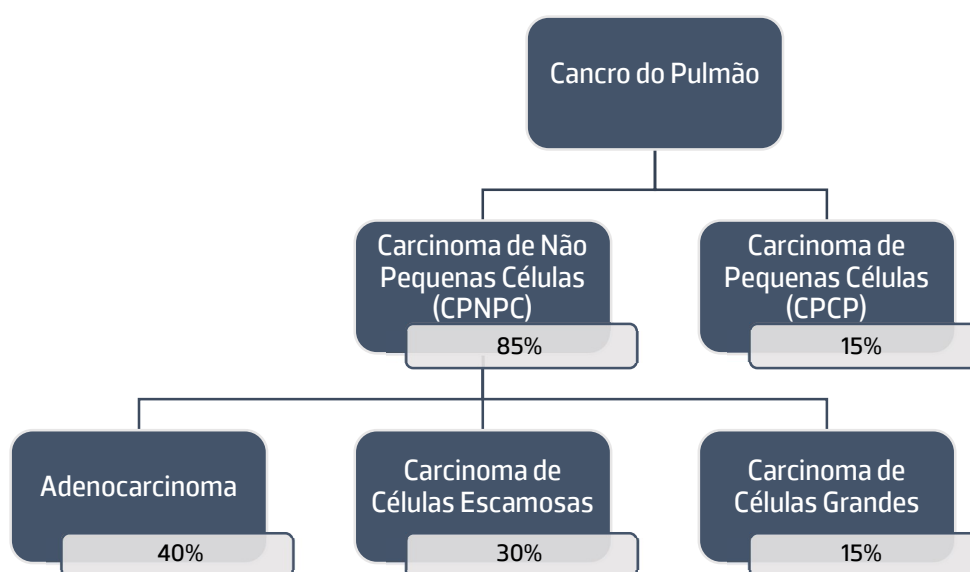


Figura 2 – Subtipos histológicos do Cancro do Pulmão e respetivas percentagens de incidência na população global. Adaptado de Global Cancer Observatory, IARC(1)

De acordo com a OMS, identificar as características histológicas do CP, avaliar o grau de invasão e o modo de disseminação de um tumor é crucial para caracterizar o estadiamento da doença, bem como estabelecer um prognóstico e as taxas de sobrevivência e de morbidade(7).

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) formulou uma classificação para estadiamento – o sistema TNM(18). Este sistema categoriza os tumores em estádios com base na sua extensão, recorrendo a informações como o tamanho do tumor primário (T), a disseminação para gânglios linfáticos (N) e a presença/ausência de metástases à distância (M)(11,18,19).

Em suma, os fundamentos do diagnóstico do CP são achados imagiológicos, biópsia tecidual, achados histológicos e estadiamento tumoral. Atualmente, seguindo os princípios da medicina de precisão, a criação de perfis moleculares em pacientes com CPNPC avançado torna-se crucial para o delineamento de um esquema terapêutico mais eficaz(20).

1.1.2. Avaliação do *status* molecular

A patologia do pulmão tem sido uma das mais estudadas a nível molecular no que diz respeito ao estudo dos genes envolvidos na sua carcinogénese(7,11,20). Estando, atualmente, identificados vários genes considerados alvos implicados para as decisões terapêuticas em doentes com neoplasias pulmonares(11).

As alterações somáticas mais frequentemente associadas ao desenvolvimento de CPNPC podem ser categorizadas em variantes, incluindo mutações pontuais, inserções, deleções e amplificações (maioritariamente nos genes *KRAS*, *EGFR*, *PIK3CA*, *BRAF*, *MEK*, *ERBB2(HER2)*, *MET*), ou rearranjos (nos genes *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK*, *NRG1*). A *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) considera obrigatória a avaliação do *status* molecular destes genes, em casos de CPNPC; e recomenda a mesma avaliação em casos de carcinoma pulmonar escamoso (opcional)(21).

As mutações pontuais são as variantes mais frequentes e resultam, geralmente, num ganho de função(22). O gene *KRAS* é um dos oncogenes mais frequentemente mutados nos casos de CPNPC (cerca de 30%)(23). Por sua vez, as mutações somáticas no gene *EGFR* estão reportadas em cerca de 20% dos casos de CPNPC, e este foi um dos primeiros alvos terapêuticos a ser implementado no tratamento do CP(24). Assim, geralmente o estudo molecular de rotina é a avaliação do *status* dos genes *KRAS* e *EGFR* e, quando o resultado é negativo, procede-se à

pesquisa de fusões no gene *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)* e no recetor *c-ros* oncogene 1 (*ROS1*), que surge em cerca de 3% dos casos do CP(25).

O rearranjo do gene *ALK* é o mais frequentemente associado ao CPNPC, cerca de 3 a 7%, e foi reportado maioritariamente em casos de adenocarcinomas, em pacientes jovens do género feminino e não fumadores(17). As mutações pontuais nos genes *KRAS* ou *EGFR* e a fusão do gene *ALK* são geralmente mutuamente exclusivas em casos de CPNPC(7,26,27).

1.1.3. Gene *ALK* e proteína *ALK*

O gene *ALK* é um proto-oncogene que codifica um recetor de tirosina-quinase (TK) transmembranar, membro da família de recetores de insulina, e é altamente oncogénico(28,29). A proteína *ALK*, como os restantes recetores de TK, é composta por três domínios: domínio de ligação com ligandos extracelulares; domínio de extensão transmembranar (TM); e domínio citoplasmático de tirosina quinase(30).

Em circunstâncias normais, após a ativação da *ALK* por ligandos exógenos, dois monómeros de *ALK* são fosforilados para formar um dímero *ALK* com atividade quinase(28,31). A *ALK* tem a capacidade de iniciar várias vias de sinalização que regulam o ciclo celular (Figura 4-B), incluindo as vias da proteína quinase ativada por mitogénio (*MAPK*), PI3K/proteína quinase B (*AKT*), MEK/ERK quinase 2/3 (*MEKK2/3*) e Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (*JAK/STAT3*)(30,32). Assim, esta proteína desempenha um papel crucial durante a embriogénese, nomeadamente no desenvolvimento neuronal. A expressão da proteína *ALK* é observada apenas no período da embriogénese e, num adulto saudável, apresenta expressão restrita ao sistema nervoso central (SNC) (Figura 3)(28,33).

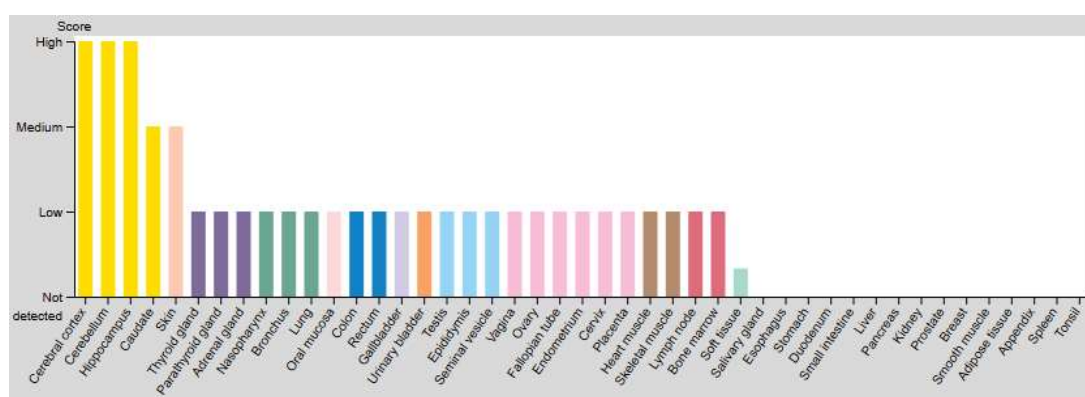


Figura 3 - Expressão da proteína *ALK* nos diversos tecidos humanos. Expressão evidente nos tecidos neuronais, nomeadamente o córtex cerebral, cerebelo e hipocampo. Fonte: The Human Protein Atlas (33)

1.1.4. Proteína de fusão ALK no CPNPC

Fatores como o *stress* celular, a desregulação dos mecanismos de reparação do DNA e eventos de recombinação e proximidade espacial têm o potencial de iniciar processos de rearranjo do DNA, que levam à formação de genes de fusão, amplificações e mutações pontuais(27,32). Em casos de CPNPC, foram observadas translocações e inversões recíprocas, resultando em fusões gênicas que levam à produção de proteínas com funções alteradas. As translocações recíprocas são mais comuns no CP do que as inversões(27).

Em 2007 foi descoberto por Soda *et al.*, num subgrupo de pacientes com CPNPC, um rearranjo resultado de uma inversão no braço curto do cromossoma 2, que junta a extremidade 5' do gene *EML4* (do inglês *echinoderm microtubule associated protein like 4*) (N-terminal) com a extremidade 3' do gene *ALK* (C-terminal)(31,34). A quinase resultante desta fusão leva à ativação das vias de sinalização independente de ligandos exógenos, induzindo um aumento da proliferação e do metabolismo celular, a remodelação do citoesqueleto, a migração, a sobrevivência celular e a inibição da apoptose (Figura 4-A)(28,34,35).

Diversas variantes *EML4::ALK* têm vindo a ser identificadas, variando entre si nos pontos de rutura do gene *EML4* (exões 2,6,13,14,15,18 e 20), havendo preservação do domínio quinase (KD) citoplasmático da *ALK* (exão 20 do gene *ALK*)(36). Assim, no contexto de CPNPC positivo para fusão *EML4::ALK*, a expressão da proteína de fusão é regulada pelo promotor do gene parceiro de fusão(30).

A fusão do gene *ALK* com o gene *EML4* é a mais frequente – as variantes *EML4::ALK*-1, -2, -3a/b constituem aproximadamente 90% de todos os casos de CPNPC (Figura 5)(36). Atualmente, estão descritas diversas variantes de fusões do gene *ALK*(17) tendo sido identificados outros genes parceiros da fusão como *TFG*, *KIF5B*, *KLC1*, *STRN*, *TPR*, *HIP1*, *GCC2*, *DCTN1*, *SQSTM1*, *LMO7*, *BIRC6*, *PHACTR1* e *PTPN3*(36).

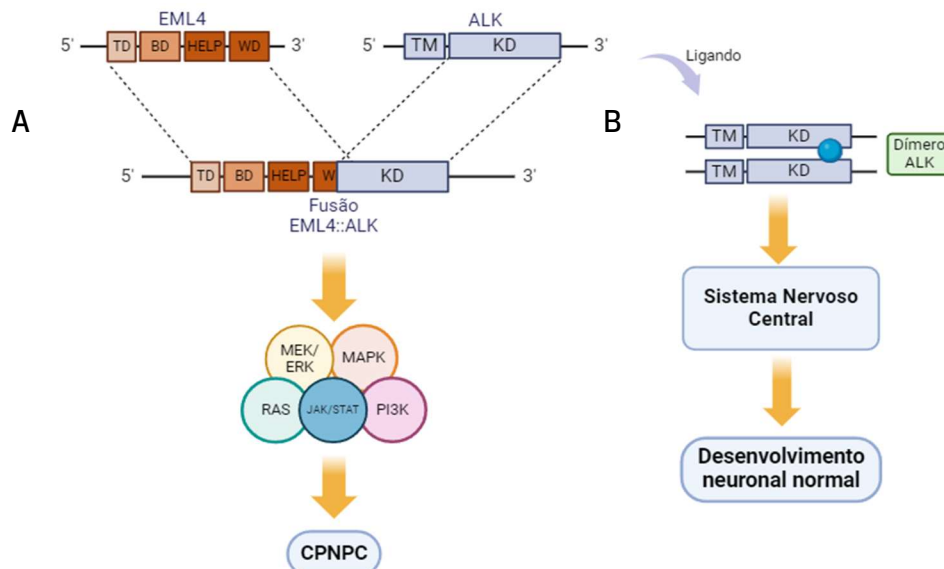


Figura 4 – Esquema representativo da fusão EML4::ALK e o seu papel no desenvolvimento de CPNPC (A), e papel do gene ALK no desenvolvimento neuronal normal (B). Adaptado de Lei, et al. (31)

Legenda: TD – domínio de trimerização; BD – domínio básico; HELP – motif hidrofóbico; WD – repetições de ácido triptofano-aspártico; TM – domínio transmembranar; KD – domínio quinase

Alguns estudos sugerem que as diferentes variantes do *EML4::ALK* podem ter um significado biológico e clínico variável no CPNPC, uma vez que variantes mais curtas (que não mantêm todos os domínios do gene *EML4*) apresentam maior estabilidade e interação com o citoesqueleto, levando a um sinal oncogénico mais forte e menor sensibilidade a fármacos dirigidos(29,36,37).

A ativação da proteína de fusão ALK pode ser causada por diversas características desta alteração molecular, nomeadamente pela: i) a presença de regiões reguladoras/promotoras do gene parceiro (inicia a transcrição do RNA de fusão levando à sua sobreexpressão); ii) domínios únicos na proteína do parceiro que alteram a localização da proteína de fusão; iii) dimerização da proteína de fusão e ativação desregulada do domínio quinase da ALK (fosforilação independente de ligandos e mediada por domínios funcionais do gene parceiro); e iv) estrutura do parceiro que são os principais mediadores da oligomerização das proteínas (a maioria têm uma estrutura em superhélice, logo apresentam maior estabilidade e têm um maior potencial oncogénico)(30,38).

O ensaio clínico de fase I para um inibidor específico da fusão *EML4::ALK*, conduzido por Soda *et al*, demonstrou que as proteínas resultantes de rearranjos com o gene *ALK* constituem um alvo terapêutico(29,34,39). Mais concretamente, esse estudo evidenciou que a expressão desta proteína de fusão em tecido pulmonar, em ratinhos transgênicos, causou o crescimento de múltiplos adenocarcinomas, e que o tratamento com inibidores da tirosina quinase (TKI, do inglês *tyrosine-kinase inhibitors*) específicos da ALK permitiram a sua regressão(34,39).

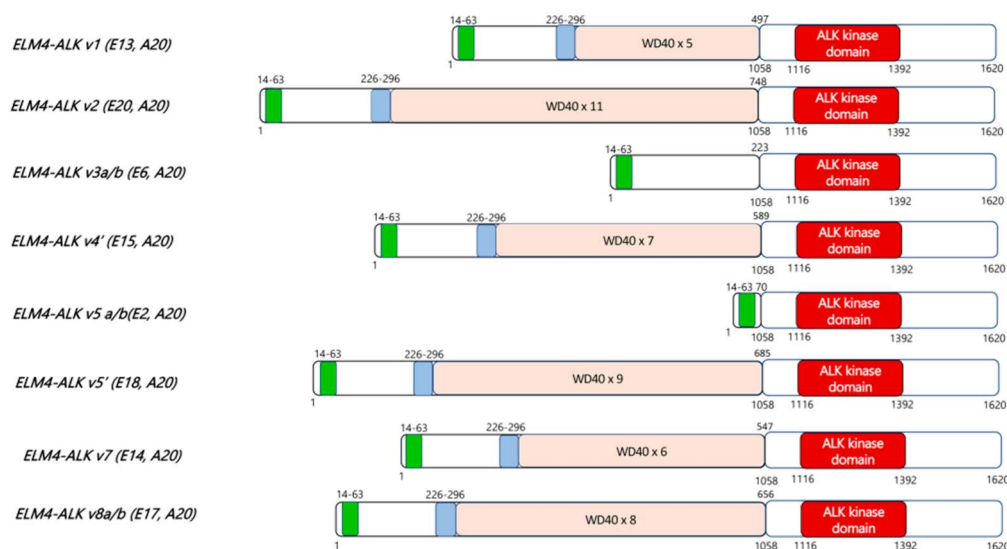


Figura 5 – Representação das diversas variantes da fusão *EML4-ALK* e os seus pontos de rutura. Fonte: Zhang S, et al. (36)

1.1.5. Terapia dirigida para CPNPC positivo para fusão do gene *ALK*

A identificação de alterações como a fusão do gene *ALK* levou ao desenvolvimento de uma série de TKIs altamente eficazes, que demonstraram um benefício clínico significativo em doentes com tumores positivos para a fusão do gene *ALK* (ALK+). Assim, foram realizados diversos ensaios clínicos aleatórios e controlados em grande escala para determinar a eficácia destes inibidores e a sua segurança quando utilizados em primeira linha em casos ALK+ sem tratamento prévio, e em comparação com a quimioterapia convencional – a maioria dos estudos demonstrou uma melhor eficácia clínica, maior penetração no SNC e perfil de segurança(40–42).

O inibidor da ALK de primeira geração, *crizotinib*, foi o primeiro avanço neste domínio. Este é um inibidor de pequenas moléculas que tem como alvo as tirosina quinases ALK, ROS1 e MET. Diversos ensaios clínicos – PROFILE 1001 (fase I), 1005 (fase II), 1007 e 1014 (fase III) – demonstraram que o *crizotinib* pode atingir elevadas taxas de resposta objetiva (61%), bem como a evidente diminuição da massa tumoral, melhor controlo dos sintomas e aumento da qualidade geral de vida, prolongando a sobrevida livre de progressão (PFS, do inglês *progression free*

surviva) em comparação com a quimioterapia convencional(43,44). Posteriormente, um estudo em pacientes que não foram sujeitos a quimioterapia corroborou os dados obtidos em ensaios prévios. Assim, em 2011, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprova o *crizotinib* para o tratamento de primeira linha em casos de CPNPC ALK+ avançado(44).

No entanto, o aparecimento de resistência ao referido fármaco reforçou a necessidade de desenvolver novos inibidores capazes de atuar em quadros de resistência ao *crizotinib*. Em casos em que, perante a presença de fusão do gene *ALK*, não é evidente uma resposta inicial ao inibidor administrado, pode existir uma resistência primária. Esta resistência pode ser devida a: i) características de *folding* próprias da proteína de fusão, que explica a heterogeneidade de resposta ao fármaco; ii) rearranjos que não resultam numa proteína funcional; iii) mutações secundárias em genes não envolvidos no alvo(31,38,44,45).

Nos casos em que se verifica o desenvolvimento de resistência, frequentemente no período de um ano, após tratamento com resposta inicial, trata-se de uma resistência adquirida. Tal pode ser devida a alterações no gene *ALK* (amplificação ou mutações pontuais); ativação de vias de sinalização alternativas que leva à inibição dos efeitos do fármaco (*bypass track activation*), e possivelmente alterações epigenéticas(38,43).

Para ultrapassar estes mecanismos de resistência e a incapacidade do primeiro fármaco penetrar a barreira hematoencefálica, foram desenvolvidos inibidores da ALK de segunda geração como o *alectinib*(2015), o *ceritinib*(2014) e o *brigatinib*(2017)(19,43). Estes agentes são mais eficazes e seletivos para a quinase ALK e demonstraram elevada eficácia em doentes com doença resistente ao *crizotinib*(42).

O *alectinib*, fármaco altamente seletivo para a ALK, resultou numa menor percentagem de pacientes com progressão da doença, quando comparado com pacientes sujeitos a *crizotinib*, e apresentou efeitos adversos em menor grau(21). A sua elevada capacidade de penetração da barreira hematoencefálica e atividade intracraniana, torna este fármaco uma opção preferencial para pacientes com metástases cerebrais. Desta forma, é considerado, desde 2017, fármaco de primeira linha para CPNPC ALK+(32,43).

Por sua vez, o *ceritinib* e *brigatinib* também demonstraram benefícios clínicos significativos tanto no CPNPC ALK+ sem tratamento prévio como em casos de resistência ao *crizotinib*. O *ceritinib* foi aprovado pela FDA para pacientes intoleráveis ao *crizotinib*, ou que apresentaram progressão com o mesmo, e é considerado primeira linha de tratamento desde 2017, apesar de não ser a primeira opção recomendada devido aos efeitos secundários inerentes(21,25).

O *brigatinib* mostrou contornar as resistências aos fármacos de primeira e segunda geração referidos, e apresentou elevada atividade anti-tumoral, especialmente em casos de metástases no SNC(25).

Mais recentemente, foram desenvolvidos inibidores da ALK de terceira geração para combater a resistência que pode surgir com a utilização de inibidores de segunda geração(25). Sensivelmente metade das resistências a fármacos de segunda geração são devidas a mutações secundárias no domínio quinase da ALK(32). O *lorlatinib* é um TKI de terceira geração, com maior estabilidade metabólica, que demonstrou atividade em doentes com metástases cerebrais que progrediram com ALK TKIs anteriores. Este fármaco foi aprovado em 2021 como tratamento de 1ª linha, após um estudo *lorlatinib vs. crizotinib* ter comprovado o seu benefício no PFS(21,32,43). A Figura 6 sumariza os fármacos disponíveis para o tratamento de CPNPC ALK+, data de génese e a respetiva data da aprovação pela FDA.

Nos casos de mutações de resistência aos TKIs, de acordo com a literatura, a terapêutica poderá ser ajustada alterando o fármaco, mediante a identificação da mutação de resistência, uma vez que se registam diferentes afinidades de ligação dos diferentes fármacos disponíveis

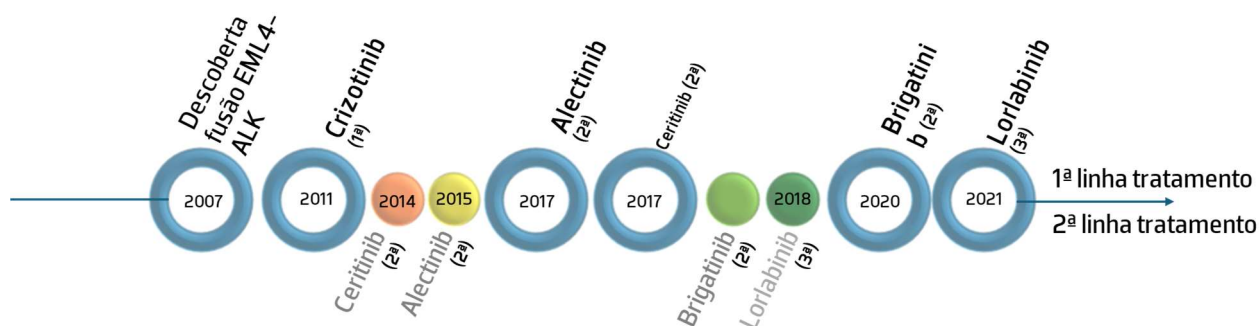


Figura 6 - Inibidores de tirosina quinase disponíveis e data de aprovação pela FDA para o tratamento de 1ª linha de CPNPC ALK+ (círculos azuis). Adaptado das guidelines da National Comprehensive Cancer Network (18)

face à mutação presente, e desta forma contornar o mecanismo de resistência(19).

1.2. Métodos de deteção de rearranjos *ALK*

Atualmente, existem diversas metodologias disponíveis para a deteção de rearranjos, seja de forma direta ou indireta(46). Os rearranjos do gene *ALK* podem ser detetados ao nível da proteína, através de imunohistoquímica (IHQ). A nível do DNA, através de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) ou por sequenciação de nova geração (NGS). A nível do RNA, através de

técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) com transcriptase reversa (RT) e PCR digital, ou NGS baseada em RNA(46,47).

1.2.1. IHQ

A técnica de imunohistoquímica é vastamente utilizada em laboratórios devido ao facto de ser uma técnica rápida, simples e de custos reduzidos. A expressão da ALK no tecido de CPNPC é habitualmente citoplasmática e difusa com intensidade moderada a forte(46,48). No entanto, a análise dos resultados é altamente subjetiva e dependente do observador. Como exemplo, a presença de marcação do anticorpo é bastante frequente em casos de adenocarcinoma mucinoso, o que pode levar a um falso-positivo devido à inespecificidade. Para além disso, imunomarcação fraca ou distribuição heterogénea do sinal leva também a incerteza na interpretação dos resultados, pelo que a formação dos profissionais para a análise e interpretação dos resultados obtidos em estudos imunohistoquímicos deve ser padronizada(48).

Diversos estudos realizados com anticorpos monoclonais comerciais, comprovam uma elevada sensibilidade e especificidade da técnica(48). Assim, a IHQ é uma das técnicas consideradas de referência para a deteção da fusão do gene *ALK*, sendo frequente a realização da confirmação do resultado obtido por uma técnica molecular.

1.2.2. FISH

A FISH é um método bem estabelecido para a identificação de rearranjos *ALK*. Esta abordagem envolve, geralmente, a utilização de duas sondas de DNA marcadas com fluorocromo diferentes (sondas *break-apart*) que se ligam à extremidade 3' e 5' do gene *ALK*, respetivamente, permitindo a deteção de alterações cromossómicas através da relação posicional dos sinais de cada sonda(31,49).

As vantagens associadas à FISH incluem a sua compatibilidade com amostras fixadas em formol tamponado a 10% e incluídas em parafina (FFPE) e o facto de requerer pouca quantidade de amostra. Por outro lado, este método pode potencialmente ignorar rearranjos mais complexos e não distinguir os parceiros de fusão distintos. Adicionalmente, a interpretação dos resultados FISH pode ser subjetiva e, por tal, deve ser feita por profissionais experientes(46). Embora tenha sido o primeiro método validado para a deteção de rearranjos do gene *ALK*, e considerado método de referência, este método é frequentemente utilizado em conjunto com imunohistoquímica.

1.2.3. RT-qPCR

A RT-qPCR é uma técnica molecular baseada na PCR quantitativo com transcriptase reversa, que permite a monitorização em tempo real da amplificação de sequências específicas de cDNA, recorrendo a marcadores fluorescentes que são incorporados no produto de PCR, durante a sua síntese.

A reação de amplificação do RT-qPCR mostra duas fases: uma fase exponencial seguida de um *plateau*. A fase exponencial representa a quantidade do produto PCR (amplificações), que duplica a cada ciclo. Com o decorrer da reação, os componentes da reação são consumidos e, por fim, um ou mais componentes tornam-se limitantes (fase de plateau). Inicialmente, a fluorescência produzida não é suficiente para produzir um sinal detetável, apesar de ocorrer a reação. A partir de um dado número de ciclos, o produto PCR acumulado é suficiente para produzir um sinal de fluorescência detetável – o número de ciclos em que ocorre a deteção do sinal é designado por ciclo limiar (ct)(50).

Uma das principais vantagens da utilização da RT-qPCR é a sua elevada sensibilidade e especificidade. Este método é altamente sensível para a deteção de níveis baixos de transcrições da fusão ALK em amostras de tecido tumoral dos pacientes. Esta sensibilidade é essencial para identificar com precisão os doentes com CPNPC ALK+, que podem responder a terapias dirigidas(46,51).

Além disso, a RT-qPCR oferece uma elevada especificidade, o que significa que os falsos positivos são minimizados, garantindo que os doentes são corretamente identificados como positivos para a fusão ALK(46,52).

Apesar das suas vantagens, este método também tem algumas limitações que devem ser consideradas. Os problemas inerentes à amostra, tais como a baixa qualidade ou quantidade do RNA obtido após a extração (como é frequente em FFPE)(52), podem conduzir a resultados imprecisos. De realçar que, sendo esta uma técnica relativa, necessita, para a sua validação, a inclusão de genes de referência que são usados para normalizar o ensaio de RT-qPCR(50). É essencial abordar estas limitações para garantir a fiabilidade dos resultados da RT-qPCR na prática clínica.

1.2.4. NGS

A NGS abrange num só ensaio a avaliação mutacional de vários biomarcadores moleculares em simultâneo, que são alvos terapêuticos. Desta forma, e por apresentar uma alta sensibilidade, permite a obtenção de resultados a partir de amostras com baixa concentração de ácidos nucleicos(53).

Existem diversas plataformas de NGS disponíveis com características diferentes, sendo as mais comumente utilizadas a Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) e Ion Torrent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ambas as plataformas apresentam um *workflow* otimizado em quatro etapas principais: preparação de bibliotecas, preparação de um *template*, sequenciação e análise de dados(54,55).

A preparação da biblioteca compreende a normalização das amostras a analisar, a conversão das amostras de RNA em cDNA, a fragmentação da amostra e, por fim, a ligação de adaptadores (*barcoding*) aos fragmentos. De seguida, a preparação do *template* consiste na amplificação das bibliotecas, e difere entre as duas casas comerciais: Illumina MiSeq procede à amplificação da biblioteca “em ponte” numa *flow cell*; Ion Torrent utiliza uma técnica em que a biblioteca é amplificada em microesferas magnéticas por PCR de emulsão(54,56).

Posteriormente, para a sequenciação, a plataforma Illumina MiSeq recorre à adição de nucleótidos marcador com fluorocromos, enquanto a Ion Torrent avalia a alteração de pH derivada da incorporação de nucleótidos durante a síntese de DNA(55,56).

A técnica de NGS realizada no Laboratório de Patologia Molecular do Ipatimup (LPM) recorre à tecnologia *Ion Torrent™*.

Este método conta com inúmeras vantagens, particularmente a possibilidade de sequenciar simultaneamente um grande número de amostras e examinar diversos genes, rentabilizar o uso de amostras limitadas; e gerar resultados com alta sensibilidade. Por sua vez, apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a necessidade de investimento em plataformas de *software* para a análise de dados e equipamentos especializados, o tempo de resposta e os custos elevados quando comparado com outras técnicas, como com a IHQ, FISH e RT-qPCR.

Relativamente ao tipo de amostras, sendo o RNA geralmente menos estável do que o DNA, a qualidade da amostra nem sempre satisfaz os requisitos da técnica(46,57). A deteção de fusões ao nível do RNA fornece provas diretas de que estas fusões são efetivamente transcritas, o que aumenta a confiança no resultado(46,57).

Nesta metodologia podem ser testadas várias fusões e diversos genes parceiros simultaneamente. No que concerne a avaliação do *status* do gene *ALK*, a metodologia recorre ao

cálculo do desequilíbrio (ou *imbalance*) da expressão das extremidades 3'/5' do gene *ALK* e à identificação do gene parceiro por sequenciação(53,54). Porém, foi detetado que em alguns casos, apesar de apresentar *imbalance* 3'/5', o gene parceiro não é identificado. No LPM, a atual estratégia para esses casos é a repetição de todo o processo laboratorial da técnica, de forma a excluir uma potencial falha na preparação da biblioteca.

2. Objetivos

O objetivo deste estudo é implementação de um método (RT-qPCR) que permita a confirmação da fusão do gene *ALK* em amostras FFPE. Para tal será realizada:

- A otimização da técnica de RT-qPCR
- A validação da técnica de RT-qPCR com amostras FFPE

Neste estudo será ainda avaliado o benefício do uso das duas técnicas (RT-qPCR e NGS) face ao surgimento de casos com *imbalance 3'/5'* do gene *ALK* detetado, mas sem gene parceiro identificado por NGS.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostra

Foram pré-selecionadas 110 amostras de RNA extraído, de peças/biópsias de pulmão FFPE, recebidas no LPM para diagnóstico molecular no âmbito do CP, no período de junho de 2023 até dezembro de 2023. Para a seleção das amostras, a inexistência de material extraído foi considerada um critério de exclusão. Foram recolhidos os dados relativos à idade e género dos pacientes, percentagem de células tumorais presentes na amostra tecidual e concentração inicial do RNA da amostra extraída.

3.2. Métodos

3.2.1. Controlo Morfológico

São recebidos, no LPM, cortes de tecido de amostras FFPE aderidos a lâminas de vidro (cortes colados) a 10µm e um corte final a 3–4µm corado por hematoxilina-eosina (HE), para avaliação de presença de células neoplásicas. O objetivo do controlo morfológico é confirmar a presença de células neoplásicas e concentrar a maior parte do tecido tumoral a ser extraído, podendo ser necessário proceder à delimitação da natureza tumoral da amostra recebida e efetuar a macrodisseção.

O controlo morfológico é executado por uma Técnica de Anatomia Patológica Citológica e Tanatológica com experiência em microscopia ou por um Médico Patologista.

Quando é necessário, perante amostras naturalmente limitadas (biópsias/citologias/líquido pleural), procede-se à coloração dos cortes para a extração de forma a averiguar a existência de uma percentagem mínima de células neoplásicas para se realizar o estudo molecular.

3.2.2. Extração e quantificação

A extração das amostras foi realizada segundo o procedimento de rotina estabelecido no laboratório - protocolo semiautomático com o *kit Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, Wisconsin)*. O protocolo consiste numa primeira etapa manual que é dependente do profissional e uma segunda etapa automatizada, realizada no equipamento *Maxwell® RSC Instrument (Promega, Wisconsin)*.

Inicialmente, a área selecionada para extração é raspada das lâminas e transferida para tubos *ependorfestéreis* com o auxílio de óleo mineral. Após a adição de mistura de tampão de lise celular, proteínase K e corante azul (que permite a visualização da solução que contém a amostra), as amostras são colocadas a 56°C durante 30 minutos (onde ocorre a lise da membrana e digestão das proteínas indesejadas), e posteriormente a 80°C durante 4 horas para término da digestão. Por último, é adicionada mistura com base de DNase, para digestão de moléculas de DNA presentes na amostra, que é então transferida para os cartuchos do equipamento.

Nos cartuchos, a amostra é colocada em contacto com partículas magnéticas revestidas com sílica (que apresentam afinidade para as moléculas de RNA em condições de alta concentração de sal e pH levemente ácido), passando por diversas soluções de lavagem e, por fim, é eluída em 40µl de H₂O *nuclease-free* (que quebra as ligações entre as partículas magnéticas e o RNA, devido ao seu pH neutro e baixa concentração de sais) e transferida para novos tubos *ependorfestéreis*, prontas a ser quantificadas.

As amostras são quantificadas no fluorómetro *Qubit Flex (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham)*, seguindo as instruções do *kit Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) Assay*. A cada amostra, é adicionada uma solução de tampão e fluorocromo, que emite fluorescência quando ligado a moléculas de RNA presentes na amostra. O equipamento procede à deteção de fluorescência emitida, comparando-a com uma curva de *standards* de concentração conhecida.

3.2.3. Sequenciação de nova geração (NGS)

Para a preparação das bibliotecas é utilizado o painel *Oncomine™ Focus Assay (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 4480441)*, seguindo o protocolo manual fornecido pela casa comercial, começando com a normalização das amostras de RNA para um *input* de 7ng. Por sua vez, a síntese de cDNA é conseguida através do *kit SuperScript VILO cDNA Synthesis (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Cat. No. 11754050)*.

Para a preparação de bibliotecas, a amostra é submetida a uma digestão para produzir fragmentos mais curtos (~200 pb) antes de serem associados a um "código de barras" molecular único (*barcode*), permitindo a identificação individual de cada amostra. Desta forma, torna-se possível a sequenciação simultânea de múltiplas amostras presentes numa só solução. Após a purificação das bibliotecas com esferas magnéticas e etanol, as bibliotecas são quantificadas por qPCR (PCR quantitativo) com o *kit Ion Library TaqMan™ Quantitation (ThermoFisher Scientific,*

Cat. no. 4468802), normalizadas para uma concentração de 50pM e combinadas numa só biblioteca para uma concentração de 15pM.

Antes da sequenciação, a biblioteca criada é submetida a uma amplificação clonal, formando micro-esferas para aumentar o sinal detetável de cada alvo durante a sequenciação, no instrumento *Ion Chef™* (*ThermoFisher Scientific, Waltham*). A sequenciação é realizada nos instrumentos *Ion S5™* e *Ion S5™ XL* (*ThermoFisher Scientific, Waltham*), que utilizam a deteção elétrica da libertação de iões de hidrogénio para a determinação da sequência de cada biblioteca.

Concluída a sequenciação, é realizada uma análise da qualidade das bibliotecas obtidas, através do software *Torrent Suite Server v5.12.3* (*ThermoFisher Scientific, Waltham*), onde se analisa o carregamento do *chip*, número de leituras e o tamanho médio dos fragmentos obtidos. Para cada caso é verificado um número total de leituras superior a 20.000 leituras. Garantidos os parâmetros de qualidade (amplificação de pelo menos três controlos internos, de um total de cinco), as amostras são analisadas no *software Ion Reporter v. 5.16* (*ThermoFisher Scientific, Waltham*), que oferece ferramentas informáticas para anotar as variantes, as *copy number variations* (CNVs) e detetar fusões.

No caso da pesquisa de fusões, a tecnologia *Ion Torrent™* (*ThermoFisher Scientific, Waltham*) utiliza o cálculo do *imbalance 3'/5'*. Os valores de *imbalance* indicam a diferença de expressão entre a extremidade 5' e a extremidade 3' de um gene *driver*. As amostras que contêm uma fusão do gene *ALK* apresentam uma expressão mais elevada da extremidade 3' do gene *ALK* em comparação com a extremidade 5' do mesmo (53).

Os rearranjos são considerados quando: a sequência da fusão (gene *ALK* e respetivo gene parceiro) apresenta no mínimo de 20 leituras; e quando o gene parceiro não é identificável, e apresenta um *imbalance 5'/3' ≥ 0,0015*. Nestes últimos casos, o resultado é confirmado pela repetição de todo o procedimento acima descrito.

3.2.4. RT-qPCR

A primeira etapa da técnica RT-qPCR foi a conversão das amostras de RNA em cDNA, realizada com o *kit SuperScript VILO cDNA Synthesis* (*Invitrogen, cat. 11,754,050, Waltham*), respeitando o protocolo indicado pela casa comercial e a composição da reação (Tabela 1). A mistura de reação VILO é uma solução otimizada para a realização de RT-qPCR que contém *random primers*, $MgCl_2$ e dNTPs; a *Superscript* é uma transcriptase reversa geneticamente modificada para uma atividade de RNase H minimizada e elevada termoestabilidade. No

termociclador, as amostras são submetidas a 25°C durante 10 minutos, seguida de uma incubação a 42°C durante 1 hora, e 5 minutos a 85°C para desativação da enzima.

Tabela 1 – Composição da mistura para a síntese de DNA complementar

Conversão em cDNA	
Reagente	Volume (para 20 µl)
5X <i>VILO™ Reaction Mix</i>	4 µl
10X <i>SuperScript® Enzyme Mix</i>	2 µl
RNA (up to 2.5 µg)	x µl
H2O DNase e RNase-free	até 20 µl

A amplificação por RT-qPCR foi realizada no equipamento CFX96 Touch™ (BioRad, Hercules), sendo utilizados todos os consumíveis adequados, como as placas de 96 poços e película selante. Os reagentes necessários para o RT-qPCR foram produzidos pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA): *PrimeTime® Gene Expression Master Mix*; *PrimeTime® Std qPCR Assay primer-probes* pré-desenhados para cada uma das extremidades 3' e 5' do gene *ALK*; e *PrimeTime® Std qPCR Assay primer-probe* para o gene *ACTB* (gene de referência interno). A utilização de um gene de referência interna é essencial para monitorizar a eficiência da reação, uma vez que a ausência de amplificação de uma das sondas pode ser explicada pela presença de fusão do gene em causa.

Os *primers* referidos foram diluídos em 500µL de tampão de eluição, seguindo as recomendações da casa comercial para o tipo de ensaio desenvolvido. As sequências dos respetivos *primers* estão descritas na Tabela 2. A escolha dos *primers* teve em consideração, além da otimização da temperatura de fusão (T_m) dos *primer-probes*, os critérios bioinformáticos que evitam polimorfismos de nucleótido único (SNPs; com base nas versões NCBI RefSeq) e a amplificação *off-target*, bem como o reconhecimento de variantes de *splice* e previsões da estrutura secundária.

A temperatura de fusão (T_m) de cada *primer* foi confirmada recorrendo à ferramenta disponibilizada pela própria casa comercial – *OligoAnalyzer* (IDT, Coralville, IA) – e tendo-se optado pela temperatura de *annealing* de 60°C.

Tabela 2 – Sequências dos primer-probes Prime Time qPCR Assay utilizados (IDT, USA)

Primer	Sequência dos primers	Sequência da probe
PrimeTime® Std qPCR Assays ACTB	5'-ACAGAGCCTCGCCTTG-3' 5'-CCTTGACATGCCGGAG-3'	5'-/56FAM/TCATCCATG/ZEN/GTGAGCTGGCGG/3IABkFQ/-3'
PrimeTime® Std qPCR Assays ALK3'	5'- GTCAGTATTTGGAGGAAAACCAC- 3' 5'-ATCCCGAAGTCTCCAATCTTG- 3'	5'-/56FAM/AGAACTGC/ZENCTCTTGACCTGTCCAG/3IABkFQ/-3'
PrimeTime® Std qPCR Assays ALK5'	5'-ATGCTGTACATCCTGTTGG-3' 5'- TCTTCTATCACATTGTTCTCTCCA- 3'	5'-/56FAM/CCTGCCCA/ZEN/GTACAAACCAGTTAATCC/3IABkFQ/-3'

3.2.4.1. Otimização da RT-qPCR

Para a preparação da reação foram utilizadas as quantidades contempladas no folheto informativo que acompanha a *MasterMix (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)*, para um volume total de reação de 20µl, onde estão incluídos: 10µl de *MasterMix*, 1µl de *qPCR Assay*, e até 5µl de amostra (Tabela 3). Para cada reação, foram realizadas duas réplicas técnicas de cada amostra. No termociclador, as amostras são sujeitas a ativação da polimerase durante 3 minutos a 95°C, seguida de ciclos de desnaturação de 15 segundos a 95°C, e *annealing*/extensão de 1 minuto a 60°C (com registo da fluorescência no final de cada ciclo).

As condições da reação foram testadas inicialmente com uma amostra de RNA controlo sintético com concentração de 1mg, sujeita a diluições seriadas, que foram posteriormente convertidas em cDNA, e amplificadas segundo as condições referidas.

Tabela 3 – Mistura de reação utilizada para a realização do RT-qPCR

Protocolo RT-qPCR	
Reagente	Volume
<i>PrimeTime Gene Expression Master Mix (2x)</i>	10 µl
<i>PrimeTime qPCR Assay (20x)</i>	1 µl
cDNA(3pg a 100ng)	2-5 µl
H2O DNase e RNase- free	Até 20 µl

Uma vez que as amostras a testar são FFPE e com concentrações relativamente baixas, foram testados os números de ciclos a incluir, através da realização de três ensaios com a amostra controlo com 40, 45 e 50 ciclos, respetivamente.

Os resultados foram registados e analisados recorrendo ao *software* BioRad CFX Maestro (BioRad, Hercules). Em cada ensaio foi incluído um *non-template control* (NTC), sem evidência de amplificação para cada sonda. Em cada amostra foi verificada a presença de amplificação da sonda do gene interno *ACTB* e, reunidas estas condições, foram estudadas as curvas respetivas às sondas das extremidades 3' e 5' do gene *ALK*.

Casos que apresentam curvas de amplificação de ambas as sondas do gene *ALK* com um valor de Ct de cada sonda próximo são considerados negativos; quando a amplificação da sonda da extremidade 5' do *ALK* (ALK5) é mais tardia em relação à sonda da extremidade 3' (ALK3), evidencia presença da fusão. Neste estudo foram considerados como "inválidos" casos em que uma ou mais sondas não evidenciaram amplificação.

Para a definição da diferença de ciclos entre a amplificação de cada uma das sondas do gene *ALK* (Δ ctALK5-ALK3), a partir do qual um caso é considerado positivo (*cut-off*), foram analisados os valores deste parâmetro correspondentes aos casos NGS-negativos. O valor *cut-off* deverá ser baixo (ou até um valor negativo), idealmente o mais próximo de 0, uma vez que na ausência da fusão as duas extremidades do gene *ALK* são amplificadas na mesma proporção.

A definição de um valor *cut-off*, foi obtida através dos valores da mediana e intervalo interquartil (IQR) do Δ ctALK5-ALK3, utilizando a seguinte fórmula: $cut-off = MED\Delta ctALK5-ALK3 + 2IQR$.

3.2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao Microsoft Excel TM2016 versão 16.0, onde foram obtidos os gráficos e tabelas que contém os dados necessários para a análise e apresentação dos resultados obtidos.

A média e mediana foram utilizadas para a caracterização da população incluída neste estudo. Parâmetros como a sensibilidade e especificidade foram utilizadas para a avaliação da acurácia da técnica RT-qPCR testada. Por sua vez, o cálculo dos quartis e da amplitude interquartil foi usado juntamente com a mediana para a definição do *cut-off* de positividade da técnica.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Das 110 amostras de RNA extraído, de peças/biópsias de pulmão FFPE, recebidas no LPM para diagnóstico molecular no período de junho de 2023 até dezembro de 2023, foram rejeitadas 25 amostras devido à inexistência de material extraído, sendo este estudo realizado apenas com 85 casos.

Nesta amostragem, 52 casos (61%) são homens e 33 (39%) são mulheres. A idade dos pacientes desta amostragem varia entre os 28 e os 89 anos, sendo o valor médio e mediano das idades de 67,5 anos e 64,5 anos, respetivamente. No que diz respeito a cada género, estes valores não demonstram alterações significativas entre os dois. Na população feminina, a maioria dos casos encontram-se entre os 70 e 79 anos e os 80 e 89 anos, enquanto na população masculina, a maioria dos casos encontram-se distribuídos de igual forma nas faixas etárias dos 60-69anos e 70-79 anos, como evidente na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos casos de CPNPC selecionados por faixa etária e por género

Casos/Género, N(%)			
Faixa Etária	F	M	Total
<30	1	0	1
30-39	2	1	3
40-49	3	5	8
50-59	7 (21,2)	7 (13,4)	14 (16,4)
60-69	4 (12,1)	16 (30,7)	20 (23,5)
70-79	9 (27,2)	16 (30,7)	25 (29,4)
80-89	7 (21,2)	4 (7,7)	11 (12,9)
NI	0	3	3
Total Geral	33 (39)	52 (61)	85 (100)

4.2. Concentração e percentagem tumoral

A distribuição do número de casos por percentagem tumoral está representada na Figura 7-A. Apenas 11 amostras (12,9%) apresentam percentagem de células neoplásicas abaixo dos 20%, e 12 amostras (14,1%) apresentam uma percentagem de células tumorais acima dos 80%.

No LPM, como descrito na literatura, tem-se em consideração que a percentagem de células tumorais <20% pode resultar numa diminuição da sensibilidade na deteção algumas alterações(52).

A concentração de RNA extraído das amostras incluídas neste estudo está compreendida entre 0,2ng/μl e os 380ng/μl, sendo evidente que a maioria (76,4%) apresenta uma concentração entre 0,2ng/μl e 19,9ng/μl (Figura7-B).

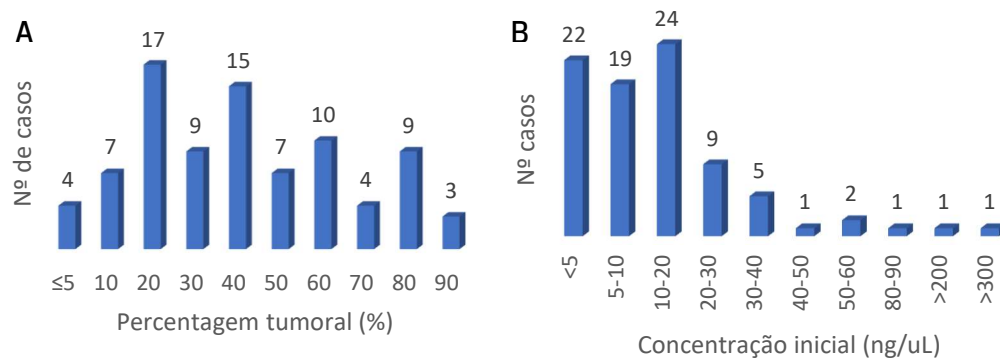


Figura 7 – Gráficos representativos da distribuição de casos pela percentagem de células tumorais presente nos cortes histológicos (A) e por concentração do RNA extraído das amostras (B) (n=85)

4.3. Deteção de fusão do gene *ALK* por NGS

Relativamente à amostragem deste estudo, os resultados obtidos por NGS encontram-se sumarizados na Figura 8. Os casos negativos para a fusão do gene *ALK* compreendem 46% da totalidade dos casos (n=39), e os casos positivos para a fusão do gene *ALK* (n=46) encontram-se divididos por variantes: *EML4(13)::ALK(20)* variante 1 (n=17); *?::ALK* ou fusão com gene parceiro desconhecido (n=15); *EML4(6)::ALK(20)* variante V3a/b (n=9); *EML4(20)::ALK(20)* variante 2

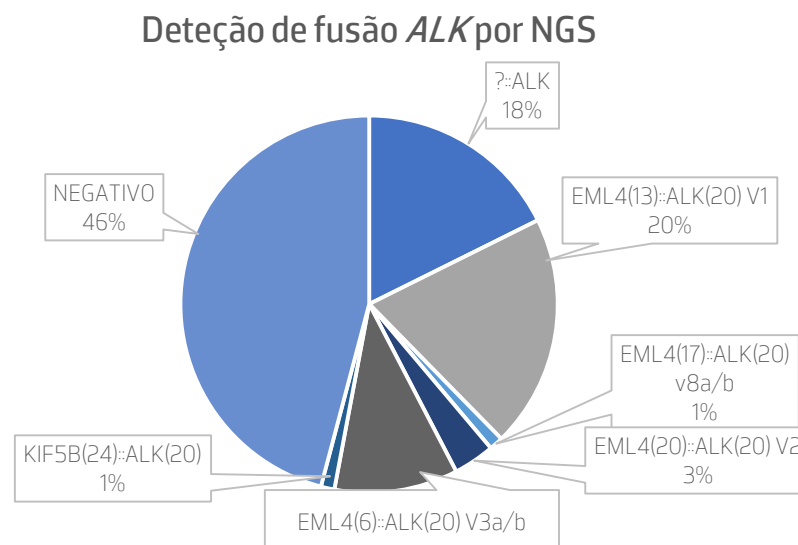


Figura 8 – Deteção da fusão do gene *ALK* por NGS.

(n=3); *EML4*(17)::*ALK*(20) variante V8a/b (n=1); *EML4*(17)::*ALK*(20) (n=1) e *KIF5B*(24)::*ALK*(20) (n=1).

Os casos positivos estão distribuídos igualmente entre homens e mulheres, enquanto cerca de 74% dos casos negativos são referentes à população masculina. Quanto à faixa etária, na população feminina, cerca de 60% dos casos positivos (14 em 23 casos) encontram-se distribuídos equitativamente nas faixas 50–59 anos e 70–79 anos. Na população masculina, os casos positivos encontram-se mais dispersos, ainda assim cerca de 50% (12 em 23 casos) encontram-se no grupo etário entre os 60 e 79 anos (Tabela 5).

Tabela 5 – Detecção de fusão do gene ALK por NGS e distribuição por género e idade

Feminino								
Resultado NGS	Idade							Total
	<30	30–39	40–49	50–59	60–69	70–79	80–89	
POSITIVO	1	2	3	7	1	7	2	23 (27%)
NEGATIVO					3	2	5	10 (11,8%)
Masculino								
Resultado NGS	Idade							Total
	NI	30–39	40–49	50–59	60–69	70–79	80–89	
POSITIVO	2	1	4	3	6	6	1	23 (27%)
NEGATIVO	1		1	4	10	10	3	29 (34,2%)

4.4. Detecção da fusão *ALK* por RT-qPCR

4.4.1. Otimização da técnica RT-qPCR

As diluições seriadas obtidas a partir da amostra de RNA sintético, foram amplificadas nas mesmas condições a que foram posteriormente sujeitas as amostras de teste, a fim de ser calculada a taxa de eficiência da reação (E). Idealmente, uma reação de PCR deve apresentar uma taxa e eficiência de 100% (podendo variar entre 90% a 110%), significando que o produto PCR duplica a cada ciclo, para ser considerada uma reação eficiente. A taxa de eficiência da amplificação foi calculada para cada sonda utilizada (*ACTB*, *ALK3* e *ALK5*), resultando numa eficiência de 105%, 100% e 110%, respetivamente.

Na amplificação realizada com 40 ciclos (Figura 9-A), as curvas não apresentavam o aspeto de exponencial desejado. Com o aumento do número de ciclos, as curvas apresentaram uma fase de *plateau* mais pronunciada (Figura 9-B,C). Desta forma, foi decidido proceder ao teste das amostras com 50 ciclos de amplificação (Figura 9-C).

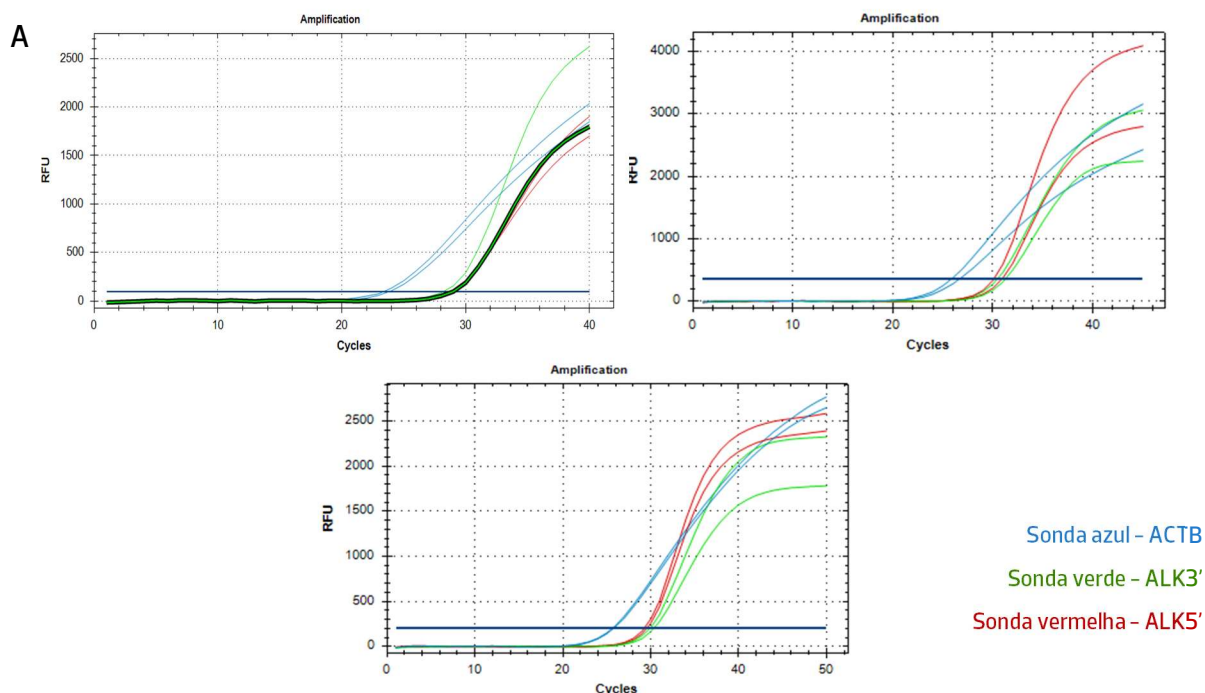


Figura 9 - Imagens representativas dos resultados das corridas com cDNA controlo (dil1:1000). A - Corrida com 40 ciclos; B - corrida com 45 ciclos; C - corrida com 50 ciclos

4.4.2. Validação da técnica RT-qPCR

Dos casos testados, 36 (42%) foram considerados negativos para a fusão; 37 (44%) foram considerados positivos para a fusão, e 12 (14%) “inválidos” (Figura 10). Destes últimos, seis são casos NGS-positivos em que o gene parceiro não foi identificado; quatro são casos NGS-negativos e dois são NGS-positivos com parceiro. Nos casos NGS-positivos, verifica-se a falha na amplificação apenas da sonda ALK5 (n=8); nos casos NGS-negativos está evidente falha na amplificação das sondas ALK3 e ALK5 (n=3), e apenas na sonda ALK5 (n=1).

A mediana (MED) do valor de diferença entra o Ct das sondas ALK5 e ALK3 dos casos NGS-negativos apresenta o valor expectável (MED=0), apesar de se encontrar um *outlier* ($\Delta\text{CtALK5-ALK3}=5,2$), uma vez que este parâmetro não é tão sensível a valores divergentes como a média (Figura 11).

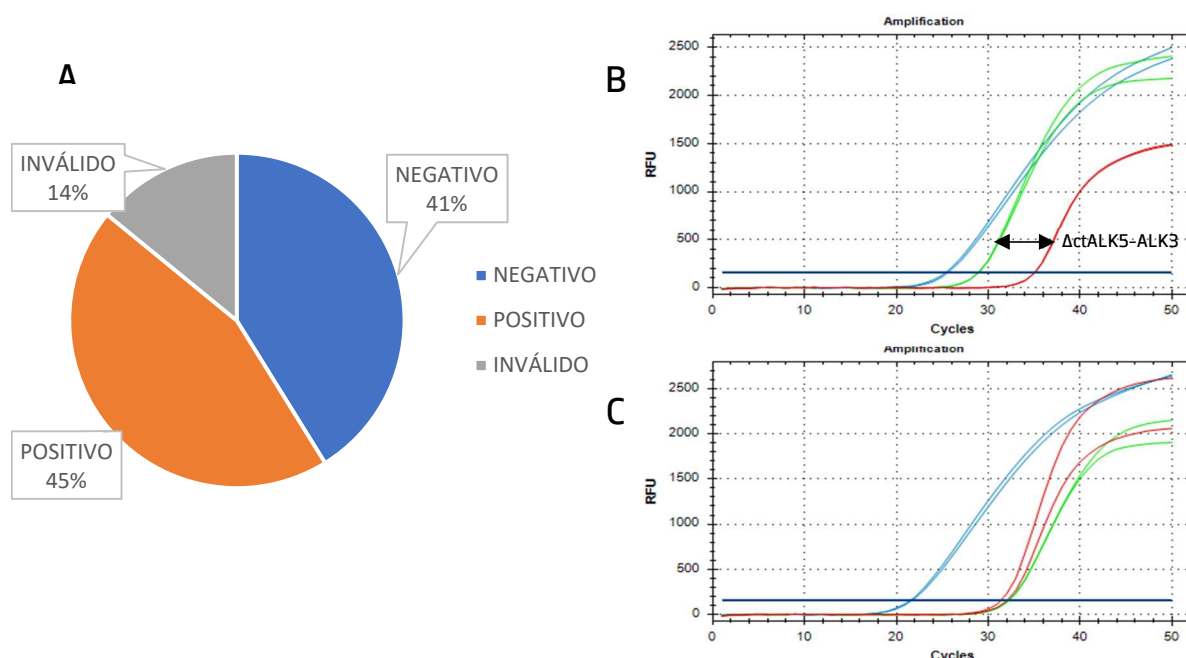


Figura 10 – Resultados obtidos por RT-qPCR (A). Representação gráfica de um caso positivo (B) e negativo (C). Legenda: azul = sonda ACTB; verde = sonda ALK3; vermelho = sonda ALK5

Os valores referentes à mediana do Ct de cada sonda por casos positivos e negativos, mediana do $\Delta\text{CtALK5-ALK3}$ e amplitude interquartil dos casos NGS-negativos estão discriminados na Tabela 7. Pela análise do valor mediano de Ct de cada sonda, é evidente a diferença de Ct nos casos positivos, ao contrário dos casos negativos.

Tabela 6 – Valores da mediana dos ciclos de amplificação para cada sonda testada, diferença entre o ciclo de amplificação ALK5-ALK3, IQR e cut-off, em casos NGS-negativos.

	Ct ACTB	Ct ALK3	Ct ALK5
Mediana de Ct	NGS -	34,3	34,3
	NGS +	29,6	36,0
MED $\Delta\text{CtALK5-ALK3}$ (NGS -)	0		
IQR $\Delta\text{CtALK5-ALK3}$	1,91		
Cut-off	3,83		

Através da fórmula que combina a mediana e a amplitude interquartil, foi obtido um valor *cut-off* de 3,83. Assim, casos com $\Delta\text{CtALK5-ALK3} \geq 3,83$ são considerados positivos, e $\Delta\text{CtALK5-ALK3} < 3,83$ são considerados negativos. A Figura 11 é uma representação gráfica dos valores de ciclos de amplificação das sondas do gene *ALK* em casos NGS-negativos e NGS-

positivos (a e b) e da dispersão dos valores de $\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ dos casos NGS-negativos (c): a amplitude interquartil (1,91), que está representada pela caixa do gráfico, a mediana (0) pela linha horizontal dentro da caixa; os valores máximo (3,9) e mínimo (-2,0) que correspondem às linhas verticais; o valor de *cut-off* pela linha tracejada; e o *outlier* (5,2) indicado pelo ponto.

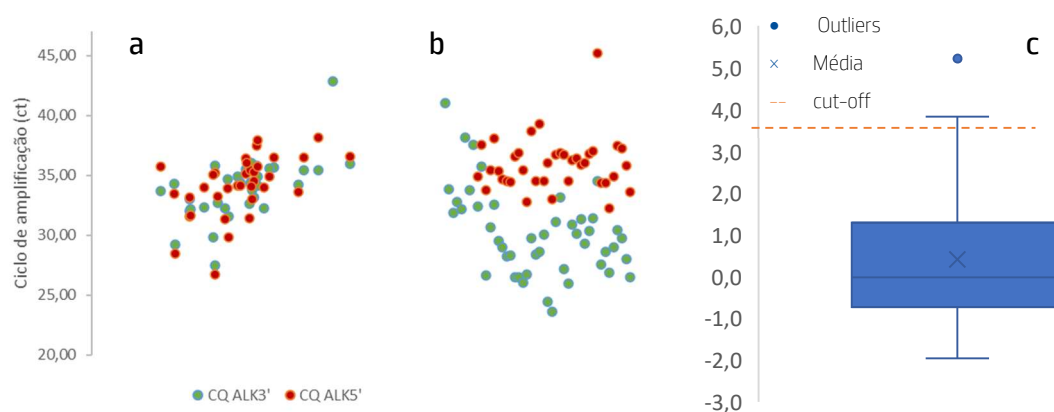


Figura 11 – Representação gráfica da dispersão dos valores de ciclo de amplificação das sondas ALK3 (verde) e ALK5 (vermelho) nos casos NGS-negativos (a) e NGS-positivos (b) e representação gráfica da dispersão dos valores de $\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ dos casos NGS-negativos (c).

4.5. Comparação entre método NGS versus RT-qPCR

Quando comparados com os resultados do NGS, a RT-qPCR apresenta uma sensibilidade de 94,7% (36/38) e especificidade de 97,1% (34/35) – desta estatística foram excluídos os casos categorizados como “inválidos”. Dos 35 casos NGS-negativos, apenas 34 foram considerados negativos por RT-qPCR; dos 38 casos NGS-positivos apenas 36 foram considerados positivos por RT-qPCR.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados obtidos por RT-qPCR em comparação com NGS. A vermelho, estão destacados os casos discordantes.

Tabela 7 – Distribuição das variantes das fusões obtidas por NGS e resultado obtido por RT-qPCR

		Deteção fusão <i>ALK</i> por RT-qPCR			
		Negativo (n=36)	Positivo (n=37)	Inválido (n=12)	
Deteção fusão <i>ALK</i> por NGS	NEGATIVO	34	NEGATIVO 1	NEGATIVO	4
	POSITIVO	2	POSITIVO 36	POSITIVO	8

São evidentes três resultados discordantes entre as duas técnicas – um falso positivo e dois falsos negativos, cujos detalhes dos resultados obtidos por RT-qPCR e por NGS estão sumarizados na Tabela 8.

Os casos considerados negativos por RT-qPCR (61 e 64) apresentam diferença entre os Ct das sondas ALK5 e ALK3 abaixo do *cut-off* definido (2,54 e 1,92, respectivamente). Em comparação com os demais casos NGS-positivos, estes casos apresentam amplificação tardia de ambas as sondas (a partir dos ~32 ciclos) – este parâmetro sugere baixa quantidade de produto PCR amplificado. No NGS, os casos apresentaram leituras totais do RNA de ~100 000 e ~200 000, respectivamente.

No caso 61, o parceiro não foi identificado (mesmo após a repetição); no caso 64 apenas na repetição foi possível a identificação da variante da fusão com poucas leituras (124x). Apesar dos dois casos apresentarem uma percentagem tumoral considerável (30 e 40%, respectivamente), o baixo número de leituras obtidas pelo NGS sugere baixa quantidade da fusão sequenciada.

Por sua vez, o terceiro caso discordante, o caso 24, apresentou um $\Delta\text{ctALK5-ALK3}=5,22$, qualificando como resultado positivo por RT-qPCR; no NGS apresenta leituras totais do RNA baixas quando comparadas com as restantes amostras (~47000 leituras), que pode sugerir baixa quantidade de amostra, apesar da percentagem tumoral nesta amostra ser de 40%.

Tabela 8 – Características das amostras dos casos discrepantes (concentração e percentagem tumoral) e detalhes dos resultados obtidos por RT-qPCR e por NGS.

Caso	Concentração RNA (ng/uL)	Percentagem tumoral (%)	RT- qPCR	$\Delta\text{ctALK5-}$ ALK3	NGS	Leituras/CQ/res ultado 1ª corrida NGS	Leituras/CQ/res ultado 2ª corrida NGS
24	7	40	POSITIVO	5,22	NEGATIVO	47545x Negativo	-
61	24,6	30	NEGATIVO	2,54	POSITIVO	229092x S/parceiro	231582x S/parceiro
64	7,74	40	NEGATIVO	1,92	POSITIVO	116875x 4/5 CQ S/parceiro	111746x EML4(13) – ALK(20)v1 124x

5. Discussão

O carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) representa, atualmente, a principal causa de morte por cancro no mundo em ambos os géneros (1,3). Neste estudo, a maioria dos casos de CPNPC concentra-se nas faixas etárias dos 60-69anos e os 70-79anos. A idade mediana desta população é de 67,5 anos, sendo a idade média de 64,5 anos devido à inclusão de um caso com idade ao diagnóstico de 28 anos. A população masculina (61%) detém uma percentagem de casos ligeiramente mais alta que a população feminina (39%), mostrando-se de acordo com o que está exposto na literatura(3).

Nos últimos anos, a identificação de alterações genéticas num conjunto de gene bioacionáveis tornou-se um aspeto fulcral do diagnóstico e estadiamento de cancro e das estratégias de tratamento dirigido. Entre essas alterações, destacam-se como alvos de interesse deste estudo as fusões do gene *ALK*, que têm merecido atenção significativa devido ao seu papel em 3 a 7% dos casos de cancro do pulmão de não pequenas células. Por esse motivo, a deteção da fusão do gene *ALK* constitui um alvo crucial para a decisão terapêutica, e por essa razão, foram estudadas diversas técnicas para a deteção da alteração(26,45).

A FISH e a IHQ foram os primeiros métodos estabelecidos como técnicas de referência para a deteção destes rearranjos, porém exigem frequentemente a confirmação do seu resultado com uma segunda técnica (geralmente molecular)(58).

Tendo em consideração o crescente número de biomarcadores que podem constituir alvos para tratamento, surge a necessidade de uma ferramenta mais eficaz na análise do maior número de genes. O NGS não só oferece uma abordagem mais abrangente à medicina personalizada no CPNPC *ALK*+, como também fornece perspetivas sobre o panorama em constante mudança das variantes de fusão *ALK*. Em casos de doentes que apresentam progressão após tratamento, a reanálise por NGS permite identificar possíveis mecanismos de resistência adquirida (28,46).

A literatura descreve que a presença da fusão do gene *ALK* é mais frequente em casos de pacientes jovens do sexo feminino e não fumadores(28,31). Na amostra deste estudo, confirma-se uma maior percentagem de positividade para a fusão na população feminina (69% das mulheres apresentam fusão), em comparação com a população masculina (44% dos homens apresentam fusão). Por outro lado, apesar de não ter acesso a informação sobre os hábitos tabágicos dos pacientes incluídos neste estudo, a média da idade dos casos positivos para a fusão não evidencia diferença entre a população feminina e masculina (64,6 anos). Neste aspeto,

a população deste estudo não se enquadra totalmente com os dados expostos na literatura, o que se pode dever também ao número reduzido da amostra.

As variantes EML4::ALK v1, v2, v3a/b constituem a maioria dos casos de CPNPC, sendo que a variante 1 apresenta uma frequência de cerca de 33%, seguida da variante 3a/b com frequência de cerca de 29% (36,59). Nas amostras deste estudo, o panorama é semelhante, porém é evidente uma diferença maior entre as frequências, sendo que 57% dos casos positivos para a fusão EML4::ALK correspondem à variante 1, e apenas 30% são casos com a variante 3a/b, o que se pode dever à amostragem reduzida.

O RT-qPCR demonstrou ser uma técnica mais simples quando comparada ao NGS, com boa relação custo-benefício, uma elevada sensibilidade e especificidade para a deteção deste tipo de alterações, levando ao aumento da precisão no diagnóstico, como técnica confirmatória em amostras ALK+ (52,60).

A técnica RT-qPCR desenvolvida no presente estudo evidenciou elevada concordância nos resultados obtidos em comparação com os resultados da técnica de NGS utilizada por rotina, demonstrando elevada sensibilidade (94,7%) e especificidade de (97,1%), bem como a redução do tempo para a obtenção de um resultado.

Através da análise dos valores medianos de Ct dos casos testados obtidos (Tabela 6) foi possível concluir que, embora não se verifique uma diferença significativa na amplificação da sonda ALK5, a sonda ALK3 apresenta uma amplificação mais precoce nos casos NGS-positivos (mediana de ct=29,6) do que nos casos NGS-negativos (mediana ct=34,3). Nos gráficos de dispersão da Figura 11, é possível a visualização desta diferença de amplificação entre as sondas entre casos NGS-negativos e NGS-positivos. Este facto sugere que, nos casos positivos, como descrito na literatura, existe maior quantidade de transcrito da extremidade 3' do gene *ALK* amplificado em relação à extremidade 5', enquanto nos casos negativos para a fusão tal diferença não é significativa (51,52).

No presente estudo, no global, a técnica de RT-qPCR otimizada e validada apresenta uma taxa de sucesso de 86% (73/85), tendo sido identificados doze resultados inválidos, que correspondem a: seis casos positivos cujo parceiro de fusão não foi identificado no NGS (?::*ALK*), quatro casos negativos e dois casos positivos com gene parceiro identificado.

Inicialmente, no NGS, os casos ?::*ALK* levantam dúvidas: a suspeita de se tratar de novos genes parceiros não contemplados no painel utilizado, a qualidade da amostra, mas não se exclui a possibilidade de uma falha no procedimento da técnica, pelo que nestes casos a estratégia é a

repetição da preparação da biblioteca do início. No RT-qPCR, a amplificação tardia da sonda ALK5 permite corroborar a presença de fusão com um gene. Porém nos casos inválidos, apesar da não amplificação da sonda ALK5 também sugerir rearranjo do gene *ALK*, não se pode excluir falhas na execução da técnica, uma vez que foi desenvolvida como *singleplex*. Esta característica, além de tornar o procedimento prático menos simples do que um *multiplex*, exige que a reação de cada sonda seja realizada em poços individuais, o que impede a exclusão de falhas do operador ao longo do procedimento (a falha da amplificação de uma das sondas pode dever-se à falha na adição de um dos componentes da reação, por exemplo).

Dois casos NGS-positivos, considerados negativos no RT-qPCR (com $\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ de 1.92 e 2.5, respetivamente), tratam-se de casos positivos para fusão ALK e cujo parceiro não foi determinado através do NGS. Destes casos, apenas um (caso 64), quando repetido, revelou ser positivo para a fusão *EML4(13)::ALK(20)* v1 com apenas 124 leituras. Uma vez que a percentagem tumoral (40%), a concentração inicial da amostra (7.7ng/ μL) e a presença da totalidade dos controlos de qualidade no NGS não indicam baixa qualidade da amostra, este caso sugere baixa expressão génica da fusão. Em adição, a literatura reporta que a heterogeneidade intratumoral da expressão do rearranjo *ALK*, é uma das possíveis causas que pode impactar os resultados obtidos, especialmente em amostras limitadas, como biópsias(58,61).

Como foi referido anteriormente, o valor ideal do *cut-off*, definido a partir do $\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ dos casos NGS-negativos, deveria ser mais próximo de 0 – significando que as duas sondas do gene *ALK* amplificam na mesma proporção, logo, encontram-se na mesma concentração na amostra. Tendo em consideração que foi definido através de uma amostragem relativamente reduzida, torna-se sensível aos valores mais elevados presentes (*outliers*). Assim, é possível associar a inconformidade dos casos NGS-positivos que foram considerados negativos por RT-qPCR ao facto do *cut-off* ser mais elevado do que o esperado em teoria.

Por outro lado, um caso NGS-negativo (caso 24) foi considerado positivo por RT-qPCR por apresentar um valor de $\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ mais elevado que o *cut-off* definido ($\Delta\text{ctALK5-ALK3}$ =5.22). Pela técnica de NGS, apesar da análise dos parâmetros de qualidade não sugerir degradação, este caso apresenta leituras ligeiramente abaixo do limite mínimo definido no painel utilizado, o que pode sugerir baixa qualidade da sequenciação por NGS.

Com foco nos casos que o NGS não conseguiu identificar o gene parceiro (n=15), além do caso divergente e dos seis casos inválidos, o RT-qPCR testado permitiu corroborar o *imbalance* calculado pelo NGS em oito casos (~53%), e assim confirmar a presença de fusão. Sendo este um

foco do objetivo do projeto, é essencial aumentar a amostragem de casos *ALK* para garantir uma percentagem de concordância com maior confiança.

Uma vez que o material extraído das amostras iniciais é reduzido, não foi possível proceder à repetição dos casos discordantes ou inválidos– isto constitui uma das limitações deste estudo. No futuro, pode ser possível proceder à extração de mais material e a repetição dos mesmos com o RT-qPCR. A avaliação da expressão génica seria um aspeto interessante a incluir, mas apenas viável no caso de RT-qPCR *multiplex*.

Adicionalmente, seria de interesse testar por IHQ ou FISH, os casos que geraram dúvida ao longo deste estudo. Os casos que permanecem sem parceiro identificado podem ser submetidos a 5'RACE (5'-*rapid amplification cDNA end*) – técnica que permite a amplificação e sequenciação do gene parceiro desconhecido, recorrendo a amplificação com *primers* universais(62). Como já foi referido, seria pertinente aumentar a amostragem do estudo, para a definição de um *cut-off* mais adequado (e menos sensível aos casos *outliers*).

Em comparação com a técnica *standard* no LPM, a técnica testada não permite a identificação da variante de fusão ou do gene parceiro, para tal seria necessário o desenho de *primers* específicos. Por outro lado, o RT-qPCR revelou ser uma técnica mais simples (apenas duas etapas RT-qPCR *vs* quatro etapas principais NGS) e mais célere para obtenção de resultados (2h30mins RT-qPCR *vs* quatro dias NGS).

6. Conclusão

A técnica de RT-qPCR otimizada e validada apresentou elevada taxa de concordância entre os resultados previamente obtidos pela técnica NGS, podendo ser utilizada como método de detecção da presença de fusão do gene *ALK*, em conjunto com a metodologia validada no LPM. Para os casos que suscitam dúvidas na análise de NGS, pode ser considerada a realização da RT-qPCR em poucas horas e com obtenção de resultado no próprio dia, antes da repetição de todo o procedimento de NGS.

A perspectiva futura será principalmente avançar para um panorama *multiplex*, eliminando assim variáveis como falhas técnicas do operador, de modo a reduzir a ocorrência de casos "inválidos". Nos casos que mantêm dúvidas com as duas técnicas comparadas, a realização de uma confirmação por um terceiro método poderá ser empregue, bem como aumentar a amostragem para a obtenção de resultados mais precisos.

Referências Bibliográficas

1. IARC. <https://gco.iarc.who.int>. 2022. Cancer Today.
2. Guerreiro T, Forjaz G, Antunes L, Bastos J, Mayer A, Aguiar P, et al. Lung cancer survival and sex-specific patterns in Portugal: A population-based analysis. *Pulmonology* [Internet]. 2023 Dec;29:S70–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531043721001902>
3. GUERREIRO T, ANTUNES L, BASTOS J, MAYER A, FORJAZ G, ARAUJO A, et al. Lung cancer: A nationwide study to characterize sex differences, incidence, and spatial patterns in Portugal. *In Vivo (Brooklyn)*. 2020 Sep 1;34(5):2711–9.
4. Zou K, Sun P, Huang H, Zhuo H, Qie R, Xie Y, et al. Etiology of lung cancer: Evidence from epidemiologic studies. Vol. 2, *Journal of the National Cancer Center*. Chinese National Cancer Center; 2022. p. 216–25.
5. Dubin S, Griffin D. Lung Cancer in Non-Smokers. *Mo Med*. 2020;117(4):375–9.
6. Forder A, Zhuang R, Souza VGP, Brockley LJ, Pewarchuk ME, Telkar N, et al. Mechanisms Contributing to the Comorbidity of COPD and Lung Cancer. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
7. Siddiqui F, Vaqar S, Siddiqui AH. Lung Cancer. *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine*, Second Edition [Internet]. 2023 May 8 [cited 2024 Apr 20];605–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
8. Alexander M, Kim SY, Cheng H. Update 2020 Management of Non-Small Cell Lung Cancer. 2020;
9. Chrysanthakopoulos NA. Molecular and Biological Basis of Lung Cancer-Part I. *Global Journal of Cancer Case Reports*. 2020;01(02).
10. Zhang S, Xiao X, Yi Y, Wang X, Zhu L, Shen Y, et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. Vol. 9, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2024.
11. Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).
12. European Lung Foundation. Cancro do pulmão [Internet]. 2021 [cited 2023 May 30]. Available from: <https://europeanlung.org/pt-pt/information-hub/factsheets/cancro-do-pulmao/>

13. Fernandes MGO, Dias M, Santos R, Ravara S, Fernandes P, Firmino-Machado J, et al. Recommendations for the implementation of a national lung cancer screening program in Portugal—A consensus statement. *Pulmonology*. 2024;
14. Estevinho F, Parente B, Barata F, Magalhães I, França M, Fidalgo P, et al. Rastreio do Cancro do Pulmão em Portugal: Um Projeto Piloto da PULMONALE. *Acta Med Port* [Internet]. 2024 Aug 5; Available from: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/136>
15. Field J k., Vulkan D, Davies MPA, Brain KE, Devaraj A, Eisen T, et al. Lung cancer mortality reduction by LDCT screening: UKLS randomised trial results and international meta-analysis. Vol. 10, *The Lancet Regional Health – Europe*. Elsevier Ltd; 2021.
16. Peixoto MA, Marques MC. Tumores do pulmão, novos meios de diagnóstico e terapêutica. [Lisboa]: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa ; 2023.
17. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol*. 2017 Aug 28;7(AUG).
18. Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? Vol. 155, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Mosby Inc.; 2018. p. 356–9.
19. Almodovar MT. 100 perguntas-chave no Cancro do pulmão. 3rd ed. PERMANYER PORTUGAL; 2021.
20. Pina M, Pinto R, Domingues P, Silva S, Cirnes L. Patologia molecular em cancro do pulmão: Evolução e contributos. *Revista do Grupo de Estudos do Cancro do Pulmão* [Internet]. 2020 Oct 20;17(1). Available from: https://www.gecp.pt/revistas_GECP/2020/07_Revista_GECP_17-1_Patologia_molecular_em_cancro_do_pulmao.pdf
21. Riely GJ, Wood DE, Ettinger DS, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al. Non–Small Cell Lung Cancer, Version 4.2024. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2024 May 1;22(4):249–74.
22. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*. 2014;511(7511):543–50.
23. Teixeira MR, Oliveira J, Borralho P, Fernandes MGO, Almodovar T, Fernandes I, et al. Portuguese Consensus Recommendations for Next-Generation Sequencing of Lung

- Cancer, Rare Tumors, and Cancers of Unknown Primary Origin in Clinical Practice. *Acta Med Port.* 2022;35(13):1–15.
24. 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 [Internet]. Vol. 21, *n engl j med*. 2004. Available from: www.nejm.org
 25. Zia V, Lengyel CG, Tajima CC, de Mello RA. Advancements of ALK inhibition of non-small cell lung cancer: a literature review. Vol. 12, *Translational Lung Cancer Research*. AME Publishing Company; 2023. p. 1563–74.
 26. Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, et al. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. Vol. 154, *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2021. p. 161–75.
 27. Di Marco MV, Voena C. Review: biological implications of oncogenic rearrangements in non-small cell lung cancer. Vol. 5, *Precision Cancer Medicine*. AME Publishing Company; 2022.
 28. Rosas G, Ruiz R, Araujo JM, Pinto JA, Mas L. ALK rearrangements: Biology, detection and opportunities of therapy in non-small cell lung cancer. Vol. 136, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2019. p. 48–55.
 29. Du X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*. 2018 Apr 1;9(4):423–30.
 30. Ducray SP, Natarajan K, Garland GD, Turner SD, Egger G. The transcriptional roles of ALK fusion proteins in tumorigenesis. Vol. 11, *Cancers*. MDPI AG; 2019.
 31. Lei Y, Lei Y, Shi X, Wang J. EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer (Review). Vol. 24, *Oncology Letters*. Spandidos Publications; 2022.
 32. Peng L, Zhu L, Sun Y, Stebbing J, Selvaggi G, Zhang Y, et al. Targeting ALK Rearrangements in NSCLC: Current State of the Art. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
 33. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171094-ALK>. 2024. ALK.
 34. 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 Aug 2;448(7153):561–6.

35. Vavalà T, Mariniello A, Novello S. Anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Transl Cancer Res.* 2019;8(Suppl 1):S48–54.
36. Zhang SS, Nagasaka M, Zhu VW, Ou SHI. Going beneath the tip of the iceberg. Identifying and understanding EML4-ALK variants and TP53 mutations to optimize treatment of ALK fusion positive (ALK+) NSCLC. Vol. 158, *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2021. p. 126–36.
37. Elsayed M, Christopoulos P. Therapeutic sequencing in alk+ nscl. Vol. 14, *Pharmaceuticals*. MDPI AG; 2021. p. 1–18.
38. Wu W, Haderk F, Bivona TG. Non-canonical thinking for targeting ALK-fusion onco-proteins in lung cancer. Vol. 9, *Cancers*. MDPI AG; 2017.
39. Cognigni V, Pecci F, Lupi A, Pinterpe G, De Filippis C, Felicetti C, et al. The Landscape of ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer: A Comprehensive Review of Clinicopathologic, Genomic Characteristics, and Therapeutic Perspectives. Vol. 14, *Cancers*. MDPI; 2022.
40. Jiang J, Zhao C, Zhang F, Liu Z, Zhou K, Ren X, et al. ALK inhibitors in ALK-rearranged non-small cell lung cancer with and without brain metastases: systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open.* 2022 Sep 19;12(9).
41. Chuang CH, Chen HL, Chang HM, Tsai YC, Wu KL, Chen IH, et al. Systematic review and network meta-analysis of anaplastic lymphoma kinase (Alk) inhibitors for treatment-naïve alk-positive lung cancer. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
42. Ando K, Manabe R, Kishino Y, Kusumoto S, Yamaoka T, Tanaka A, et al. Comparative Efficacy of ALK Inhibitors for Treatment-Naïve ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Central Nervous System Metastasis: A Network Meta-Analysis. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
43. Friedlaender A, Banna G, Patel S, Addeo A. Diagnosis and Treatment of ALK Aberrations in Metastatic NSCLC. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(10).
44. Ricciuti B, De Giglio A, Mecca C, Arcuri C, Marini S, Metro G, et al. Precision medicine against ALK-positive non-small cell lung cancer: beyond crizotinib. Vol. 35, *Medical Oncology*. Humana Press Inc.; 2018.
45. Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: Precision medicine takes on drug resistance. Vol. 7, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2017. p. 137–55.
46. Matter MS, Chijioke O, Savic S, Bubendorf L. Narrative review of molecular pathways of kinase fusions and diagnostic approaches for their detection in non-small cell lung

- carcinomas. Vol. 9, Translational Lung Cancer Research. AME Publishing Company; 2020. p. 2645–55.
47. Thakur SK, Singh DP, Choudhary J. Lung cancer identification: a review on detection and classification. Vol. 39, Cancer and Metastasis Reviews. Springer; 2020. p. 989–98.
 48. Li W, Zhang J, Wang Z, Li L, Ma J, Zhou X, et al. Guidelines for clinical practice of ALK fusion detection in non-small-cell lung cancer: a proposal from the Chinese RATICAL study group. *Journal of the National Cancer Center*. 2021;1(4):123–31.
 49. Lu S, Lu C, Xiao Y, Zhu W, He Q, Xie B, et al. Comparison of EML4–ALK fusion gene positive rate in different detection methods and samples of non-small cell lung cancer. *J Cancer*. 2020;11(6):1525–31.
 50. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
 51. Tong Y, Zhao Z, Liu B, Bao A, Zheng H, Gu J, et al. 5' / 3' imbalance strategy to detect ALK fusion genes in circulating tumor RNA from patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):1–8.
 52. Kuang Y, Xu P, Wang J, Zheng Y, Sun X, Li Z, et al. Detecting ALK Rearrangement with RT-PCR: A Reliable Approach Compared with Next-Generation Sequencing in Patients with NSCLC. *Mol Diagn Ther* [Internet]. 2021;25(4):487–94. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00532-8>
 53. Heydt C, Wölwer CB, Velazquez Camacho O, Wagener-Rydzek S, Pappesch R, Siemanowski J, et al. Detection of gene fusions using targeted next-generation sequencing: a comparative evaluation. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2021;14(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00909-y>
 54. ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>. [cited 2024 Sep 1]. Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology. Available from: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>
 55. Illumina. <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>. [cited 2024 Jul 31]. Introduction to SBS

- technology. Available from: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>
56. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012 Jul 24;13(1).
 57. Tabbò F, Muscarella LA, Gobbini E, Trombetta D, Castellana S, Rigutto A, et al. Detection of ALK fusion variants by RNA-based NGS and clinical outcome correlation in NSCLC patients treated with ALK-TKI sequences. *Eur J Cancer*. 2022 Oct 1;174:200–11.
 58. Sepúlveda-Hermosilla G, Freire M, Blanco A, Cáceres J, Lizana R, Ramos L, et al. Concordance Analysis of ALK Gene Fusion Detection Methods in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer from Chile, Brazil, and Peru. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2021 Sep 1;23(9):1127–37.
 59. Sabir SR, Yeoh S, Jackson G, Bayliss R. EML4-ALK variants: Biological and molecular properties, and the implications for patients. Vol. 9, *Cancers*. MDPI AG; 2017.
 60. Zhang X, Zhou JG, Wu HL, Ma H, Jiang ZX. Diagnostic accuracy of PCR for detecting ALK gene rearrangement in NSCLC patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(43):75400–10.
 61. Marino FZ, Liguori G, Aquino G, Mantia E La, Bosari S, Ferrero S, et al. Intratumor heterogeneity of ALK-rearrangements and homogeneity of EGFR-mutations in mixed lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015 Sep 30;10(9).
 62. Chen YL, Chen WL, Cheng YC, Lin MC, Yang SC, Tsai HW, et al. Development of a novel ALK rearrangement screening test for non-small cell lung cancers. *PLoS One*. 2021 Sep 1;16(9 September).