

## **Actualización de las guías de estudio molecular para la selección de pacientes con cáncer de pulmón para terapias dirigidas con inhibidores de tirosina quinasa.**

### **Guías del Colegio Americano de Patólogos (CAP), Asociación Internacional para el Estudio de Cáncer de Pulmón (IASLC) y Asociación de Patología Molecular (AMP)**

Neal I. Lindeman, MD; Philip T. Cagle, MD; Dara L. Aisner, MD, PhD; Maria E. Arcila, MD; Mary Beth Beasley, MD; Eric Bernicker, MD; Carol Colasacco, MLIS, SCT(ASCP); Sanja Dacic, MD, PhD; Fred R. Hirsch, MD, PhD; Keith Kerr, MB, ChB; David J. Kwiatkowski, MD, PhD; Marc Ladanyi, MD; Jan A. Nowak, MD, PhD; Lynette Sholl, MD; Robyn Temple-Smolkin, PhD; Benjamin Solomon, MBBS, PhD; Lesley H. Souter, PhD; Erik Thunnissen, MD, PhD; Ming S. Tsao, MD; Christina B. Ventura, MPH, MT(ASCP); Murry W. Wynes, PhD; Yasushi Yatabe, MD, PhD

Publicacion original en ingles: J Thorac Oncol. 2018 Mar;13(3):323-358. doi: 10.1016/j.jtho.2017.12.001.

Traducción al español: Mercedes L. Dalurzo, Paola De la Iglesia, María José Labanca

Aceptado para publicacion el 29 de noviembre de 2017; publicado el 22 de enero de 2018

Figuras y datos suplementarios

Para acceder a las figuras y al material suplementario que acompañan este artículo, visitar la version online de *Journal of Thoracic Oncology* en: [www.jto.org](http://www.jto.org) y en: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.12.001>

De los Departamentos de Patología (Drs Lindeman and Sholl) y Medicina (Dr Kwiatkowski), Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts; del Departamento of Patología y Medicina Genómica, Houston Methodist Hospital, Houston, Texas (Dr Cagle); del Departamento of Patología, University of Colorado School of Medicine, Denver (Dr Aisner); del Laboratorio de Patología Molecular y Diagnóstica (Dr Arcila) y del Servicio de Diagnóstico Molecular (Dr Ladanyi), Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, New York; del Departamento de Patología y Medicina Pulmonar, Cuidados Críticos y Medicina del Sueño, New York, New York (Dr Beasley); del Programa de Investigación en Cancer, Houston Methodist Hospital, Houston, Texas (Dr. Bernicker) del Centro de Patología y Laboratorio de Calidad, Colegio Americano de Patólogos, Northfield, Illinois (Mss Colasacco and Ventura); del Departamento of Patología, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania (Dr Dacic); del Departamento de Medicina y Patología, University of Colorado, Denver (Dr Hirsch); del Departamento of Patología, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland (Dr Kerr); del Departamento of Patología Molecular, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York (Dr Nowak); de la División de Asuntos Clínicos y Científicos, Association for Molecular Pathology, Bethesda, Maryland (Dr Temple-Smolkin); del Laboratorio de Terapéutica y Biomarcadores Moleculares, Peter MacCallum Cancer Center, Melbourne, Australia (Dr Solomon); del Departamento of Patología, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands (Dr Thunnissen); del Departamento de Medicina de Laboratorio y Patobiología, Princess Margaret Cancer Center, Toronto, Ontario, Canada (Dr Tsao); de Asuntos Científicos, Asociación Internacional para el Estudio de Cancer de Pulmón, Aurora, Colorado (Dr Wynes); y del Departamento de Patología y Diagnóstico Molecular, Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan (Dr Yatabe). Dr Souter está en práctica privada en Wellanport, Ontario, Canada.

Este guía fue desarrollada a través de la colaboracion entre el Colegio Americano de Patólogos, la Aociación Internacional para el Estudio del Cancer de Pulmón y la Asociación de Patología Molecular y fue publicado conjuntamente por invitación y consentimiento en las revistas *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *Journal of Thoracic Oncology* y *Journal of Molecular Diagnostics*. Copyright 2018 Colegio Americano de Patólogos, Asociacion Internacional para el Estudio del Cancer de Pulmón, Asociación de Patología Molecular y Sociedad Americana para Patología de Investigación.

Las declaraciones de potenciales conflictos de intereses de los autores y sus contribuciones se encuentran en el Apéndice al final de este artículo. Las declaraciones de conflicto de interes de los autores están disponibles en la version en Ingles de este artículo.

Copias: Neal I. Lindeman, MD, Hospital Brigham and Women, Departamento de Patología, [75 Francis St](http://www.bwh.harvard.edu), Shapiro 5, Sala 020, Boston, MA 02115 (e-mail: [nlindeman@partners.org](mailto:nlindeman@partners.org)).

**Contexto:** En el año 2013 el colegio Americano de Patólogos (CAP), la Asociación Internacional para el Estudio de Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación de Patología Molecular (AMP) publicaron una guía basada en la evidencia destinada a establecer estándares para el análisis molecular del cáncer de pulmón para guiar las decisiones terapéuticas con inhibidores dirigidos a blancos moleculares. Las

nuevas evidencias disponibles han promovido la evaluación de técnicas de laboratorio adicionales, genes accionables, población de pacientes, y tipos tumorales para estudios moleculares.

**Objetivo:** Revisar sistemáticamente y actualizar la guía del año 2013 para afirmar su validez; evaluar la evidencia de nuevos descubrimientos genéticos, tecnologías y terapéuticas; y emitir una actualización basada en evidencia.

**Diseño:** El Colegio Americano de Patólogos (CAP), la Asociación Internacional para el estudio de Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación de Patología Molecular (AMP) convocaron un panel de expertos para desarrollar una guía basada en la evidencia para ayudar a definir las preguntas clave y términos de búsqueda bibliográfica, revisar resúmenes y artículos completos y efectuar un borrador de recomendaciones.

**Resultados:** Se redactaron dieciocho nuevas recomendaciones. El panel también actualizó tres recomendaciones de la guía del año 2013.

**Conclusiones:** La guía del año 2013 fue extensamente reafirmada con recomendaciones actualizadas que permiten estudiar muestras citológicas, requiere ensayos con mejor sensibilidad, y rechaza el uso de inmunohistoquímica para el estudio de EGFR. Las nuevas recomendaciones incluyen el estudio de *ROS1* para todos los pacientes con adenocarcinoma; la inclusión de genes adicionales (*ERBB2*, *MET*, *BRAF*, *KRAS* y *RET*) para laboratorios que realizan paneles de secuenciación de nueva generación (NGS); el uso de inmunohistoquímica como una alternativa a la hibridación in situ fluorescente (FISH) para el estudio de ALK y/o ROS1; el uso de ensayos con sensibilidad del 5% para mutaciones T790M de EGFR en pacientes con resistencia secundaria a inhibidores de EGFR; y el uso de ADN celular libre (cfDNA) para determinar mutaciones accionables cuando el tejido es limitado o difícil de obtener.

(J Thorac Oncol. 2018 Mar;13(3):323-358. doi: 10.1016/j.jtho.2017.12.001)

Los pacientes con carcinoma avanzado de pulmón tienen un pronóstico pobre con una sobrevida media de 1 año. No obstante, para muchos pacientes que poseen tumores con ciertas alteraciones moleculares específicas (ej. alteraciones activadoras en genes de *EGFR*, *ALK* y *ROS1*), particularmente en adenocarcinoma, las terapias dirigidas con inhibidores de tirosina quinasa otorgan mejoras significativas en sobrevida y calidad de vida. Como consecuencia, en los pacientes con estos tipos de carcinoma avanzado de pulmón en los cuales estas alteraciones moleculares accionables típicamente ocurren, deben realizarse los estudios moleculares necesarios para identificar las mismas y, de ese modo, recibir la terapia dirigida adecuada. Es importante destacar que este estudio debe extenderse más allá de las alteraciones moleculares para las cuales las terapias dirigidas son aprobadas por agencias reguladoras como la FDA (Food and Drug Administration de Estados Unidos) e incluir alteraciones moleculares en las que hay investigaciones con evidencia convincente de terapias dirigidas (y, más recientemente, inmunoterapias) eficaces en ensayos clínicos publicados.

En el año 2010, tres sociedades de profesionales- el Colegio Americano de Patólogos (CAP), la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación de Patología Molecular (AMP) – reclutaron profesionales especialistas en biología, diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón y formaron un grupo de trabajo conjunto para evaluar sistemáticamente la evidencia que sustenta la utilidad clínica del análisis molecular de muestras de cáncer de pulmón. En el año 2013, este grupo de trabajo publicó una guía basada en la evidencia<sup>1-3</sup> para el estándar de cuidado de la práctica clínica con respecto a qué pacientes con cáncer de pulmón y qué muestras deben estudiarse, qué genes deben estudiarse y cómo deben diseñarse, validarse y ejecutarse estos estudios. Esta guía fue posteriormente aprobada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica<sup>4</sup> y ha sido citada en guías desarrolladas por numerosas sociedades profesionales alrededor del mundo<sup>5-26</sup>. No obstante, este campo ha continuado avanzando rápidamente con el surgimiento de nuevos descubrimientos genéticos, de nuevas terapéuticas y de nuevas tecnologías, por lo que estas mismas tres organizaciones convocaron un segundo grupo de trabajo para evaluar sistemáticamente nuevas evidencias y emitir una revisión basada en evidencia de las guías de práctica de patología molecular de cáncer de pulmón.

La revisión se enfocó en nuevas recomendaciones relacionadas con el contenido específico de 5 áreas: (1) ¿Qué nuevos genes deben ser estudiados rutinariamente en cáncer de pulmón? (2) ¿Qué métodos son apropiados para el estudio en cáncer de pulmón?, con particular énfasis en inmunohistoquímica (IHQ) y secuenciación de nueva generación (NGS) (3) ¿Es necesario estudiar pacientes con carcinoma escamoso, carcinoma de células pequeñas u otros carcinomas de pulmón no-adenocarcinoma? (4) ¿Qué test deberían realizarse en pacientes con una alteración molecular accionable que ha progresado luego de una respuesta

inicial con la terapéutica dirigida adecuada?, (5) ¿Cuál es el rol del estudio con ADN celular libre circulante (cfDNA) en el manejo de pacientes con cáncer de pulmón?

Adicionalmente, fue revisada la nueva evidencia que sustenta a la guía del año 2013 y ésta fue utilizada tanto para modificar la fortaleza de esas recomendaciones como para cambiarlas totalmente. Finalmente, una sexta pregunta surgida durante el proceso de revisión estuvo relacionada con el fundamento acerca del rol de terapéuticas con inmunomoduladores (ej. PD-1 o PD-L1). Aunque este tema no fue objeto de una revisión sistemática de evidencia, el panel de expertos decidió emitir una declaración de opinión sobre este tema, conscientes de que actualmente se están realizando esfuerzos por separado para desarrollar recomendaciones basadas en la evidencia sobre el uso de biomarcadores para seleccionar pacientes para terapia con inmunomoduladores.

Un desafío particular para esta guía basada en la evidencia es el rápido ritmo de descubrimientos en este campo. En el tiempo entre la revisión de la literatura y la redacción de la guía, nuevos e importantes descubrimientos fueron publicados, así como avances en el tratamiento para los carcinomas *BRAF* mutados y para el uso de inmunoterapia. Esperamos que, a corto plazo, surgirán muchos avances adicionales en el campo de las terapias dirigidas, relacionadas con diagnóstico con cfDNA y con inmunoterapia.

Aunque nosotros realizamos fuertes recomendaciones para los biomarcadores moleculares en los que había buena evidencia en el momento que hicimos nuestro análisis, también reconocemos plenamente la importancia de biomarcadores emergentes para permitir la elección de pacientes con cáncer de pulmón para ensayos clínicos de terapias en investigación.

Por consiguiente, hemos estratificado los biomarcadores en esta guía en 3 categorías, en lugar de 2. Los primeros son los biomarcadores que “deben realizarse” y son el estándar de cuidado para todos los pacientes con cáncer de pulmón avanzado con un componente de adenocarcinoma que están siendo considerados para una terapia dirigida aprobada. En segundo lugar, son los marcadores que “deberían realizarse” para dirigir a los pacientes a los ensayos clínicos y que deben incluirse en cualquier panel amplio de secuenciación que se realice para pacientes con cáncer de pulmón, pero que no es requerido en laboratorios que solo realizan ensayos de un solo gen. Todos los posibles biomarcadores restantes son de investigación y no son apropiados para uso clínico en este momento

## **COMPOSICION DEL PANEL**

El Colegio Americano de Patólogos (CAP), la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación de Patología Molecular (AMP) convocaron a un panel de expertos que consiste en patólogos y oncólogos asistenciales y con experiencia en carcinoma de pulmón. CAP, IASLC y AMP aprobaron el nombramiento de los codirectores del proyecto y los miembros del panel de expertos. Además, un experto en metodología con experiencia en revisión sistemática y desarrollo de guías fue consultado por el panel a lo largo del proyecto

## **POLITICA DE CONFLICTO DE INTERES**

Antes de la aceptación del panel de expertos, los potenciales miembros completaron un proceso conjunto de declaración de conflictos de interés, cuya política y forma requieren la declaración del interés financiero material o del beneficio potencial de valor significativo por el desarrollo de la guía o sus recomendaciones.

Los miembros potenciales completaron el formulario de declaración de conflictos de intereses, enumerando cualquier relación que pudiera interpretarse como un conflicto real, potencial o aparente. Los conflictos potenciales fueron gestionados por los copresidentes. Se requirió que todos los miembros del panel de expertos y asesores declararan los conflictos antes del comienzo y de forma continua a lo largo de todo el cronograma del proyecto. Los conflictos declarados de los miembros del panel de expertos se enumeran en el Apéndice. El CAP, IASLC y AMP proporcionaron fondos para la administración del proyecto; no se usaron fondos de la industria en el desarrollo de la guía. Todos los miembros del panel ofrecieron voluntariamente su tiempo y no fueron compensados por su participación. Consultar el contenido digital suplementario (SDC) en [www.archivesofpathology.org](http://www.archivesofpathology.org) en la tabla de contenido de marzo de 2018 para obtener detalles completos sobre la política de conflicto de intereses

## **OBJETIVOS**

El panel de expertos estuvo encargado de la revisión y actualización de la guía de estudios moleculares CAP-IASLC-AMP para la selección de pacientes con cáncer de pulmón para inhibidores de tirosina quinasa de EGFR y ALK. El panel revisó los nuevos estudios que cambiarían o refutarían las declaraciones de la guía de 2013. Además, el panel también abordó preguntas clave adicionales:

1. ¿Qué nuevos genes deberían estudiarse en pacientes con cáncer de pulmón?
2. ¿Qué métodos deberían utilizarse para realizar las pruebas moleculares?
3. ¿Las pruebas moleculares son apropiadas para los cánceres de pulmón que no tienen un componente de adenocarcinoma?
4. ¿Qué pruebas están indicadas en pacientes que han recaído durante el curso de terapias dirigidas?
5. ¿Cuál es el papel de las pruebas de ADN libre circulante en pacientes con cáncer de pulmón?

Las preguntas clave 1 a 3 se relacionan con pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no escamoso no células pequeñas (CPNCP) de todos los estadios. Las preguntas clave se incluyen con todo detalle en el contenido digital complementario (SDC).

## **MÉTODOS:**

Una lista detallada de los métodos utilizados para crear esta guía se puede encontrar en SDC, incluidas las preguntas de alcance adicionales.

### **Revisión sistemática de literatura y análisis.**

Se completó una revisión sistemática de la literatura con 2 búsquedas exhaustivas. La primera búsqueda fue diseñada para evaluar las recomendaciones de la guía del año 2013 y se basó en la estrategia de búsqueda original. Incluyó títulos de temas médicos y palabras clave para abordar los conceptos de cáncer de pulmón, biomarcadores tumorales y pruebas de laboratorio. Se realizó en Ovid MEDLINE (Ovid Technologies, Inc, Nueva York, Nueva York) el 17 de mayo de 2015, para localizar los estudios publicados en inglés con fechas de publicación desde el 1 de enero de 2012 hasta el 17 de mayo de 2015. Se aplicaron filtros de publicación para identificar las guías, las revisiones sistemáticas, los metaanálisis (MA) y los ensayos clínicos aleatorizados. La búsqueda se volvió a ejecutar el 27 de junio de 2016, para identificar nueva literatura relevante publicada desde el 17 de mayo de 2015.

La segunda búsqueda se basó en nuevas preguntas clave que se centraron en biomarcadores adicionales no incluidos en la guía de 2013, con estrategias de búsqueda específicas diseñadas para cada pregunta clave. Todas las búsquedas se realizaron en Ovid MEDLINE y PubMed (Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU., Bethesda, Maryland) (28 de junio de 2015) y se limitaron a estudios en idioma inglés. Las búsquedas suplementarias se realizaron en Scopus (Amsterdam, Países Bajos) (25 de junio 2015) para identificar publicaciones relevantes no indexadas en MEDLINE. Se completó una búsqueda de ensayos clínicos relevantes utilizando el sitio web [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), y se realizaron búsquedas específicas en los sitios de repositorio de Guideline Revision (por ejemplo, [guideline.gov](http://guideline.gov), [g-i-.net](http://g-i-.net)) y los sitios web de las organizaciones para identificar publicaciones relevantes. En SDC se pueden encontrar más detalles sobre la búsqueda sistemática de literatura, incluidas las cadenas de búsqueda de Ovid.

### **Diseño de estudio elegible**

Los estudios no se limitaron a ensayos aleatorios controlados, sino que también incluyeron otros tipos de estudios como diseños de cohortes, series de casos, estudios de evaluación y estudios comparativos. A priori fueron excluidos cartas, comentarios, editoriales, revisiones narrativas, informes de casos, estudios en modelos de ratones, estudios in vitro, documentos de consenso, resúmenes y artículos en otros idiomas no inglés.

### **Criterios de inclusión**

Los estudios publicados fueron seleccionados para su inclusión en la revisión sistemática de evidencia si ellos eran textos completos revisados por pares que cumplieran con los siguientes criterios:

1: La población de estudio consistía en pacientes con carcinoma de pulmón no escamoso, no de células pequeñas, carcinoma de células pequeñas o carcinoma escamoso de cualquier estadio.

2: El estudio evaluó, prospectiva o retrospectivamente, sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo o valor predictivo positivo de los test para detección de mutaciones genéticas específicas, rearrreglos, translocaciones, amplificaciones, sobreexpresión, o respuesta a terapias dirigidas de los genes: *EGFR, ALK, KRAS, ROS1, RET, MET, BRAF o ERBB2 (HER2)*.

3: El estudio examinó el potencial algoritmo para el estudio molecular en carcinoma de pulmón no células pequeñas (CPNCP).

4: El estudio examinó la correlación del estado de *EGFR, ALK, KRAS, ROS1, RET, MET, BRAF o ERBB2 (HER2)* en tumores primarios o metastásicos de los mismos pacientes.

5: El estudio incluyó resultados primarios como precisión, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativos de los test y concordancia entre las plataformas para determinar estado o respuesta al tratamiento, solo o en combinación, para *EGFR, ALK, KRAS, ROS1, RET, MET, BRAF o ERBB2 (HER2)*.

### Evaluación de calidad

Se realizó una evaluación de calidad de la evidencia para todos los estudios seleccionados luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión. Usando este método los estudios considerados de baja calidad no serían excluidos, pero serían retenidos y las fortalezas y debilidades metodológicas discutidas cuando fueran relevantes. Cada recomendación de la guía incluye una clasificación de la fortaleza de la evidencia como se describe en la Tabla 1 (también Tabla 1 de SDC). El proceso utilizado para evaluar la calidad de base de la evidencia está totalmente detallado en la SDC.

• <b>Tabla 1. Grado de fortaleza de la Evidencia</b>		
• <b>Designación</b>	• <b>Descripción</b>	• <b>Calidad de evidencia</b>
• <b>Convincente</b>	• Alta confiabilidad de que la evidencia accesible refleja un hecho verdadero. Es poco probable que futuras investigaciones cambien la confianza en el efecto estimado	• Alta/intermedia calidad de evidencia
• <b>Adecuada</b>	• Moderada confiabilidad de que la evidencia accesible refleja un hecho verdadero. Investigaciones futuras puede que tengan un impacto importante en el grado de confiabilidad del hecho y pueden cambiar esta estimación.	• Calidad de evidencia de grado intermedio
• <b>Inadecuada</b>	• Poca confiabilidad de que la evidencia accesible refleja un hecho verdadero. Investigaciones futuras muy probablemente tengan un impacto importante en el grado de confiabilidad del hecho y es probable que cambien su estimación	• Calidad de evidencia baja o insuficiente y el panel de expertos utiliza un proceso de consenso formal para arribar a una recomendación
• <b>Insuficiente</b>	• La evidencia es insuficiente para discriminar un hecho preciso. Cualquier estimación de efecto (hecho) es muy incierta	• Evidencia insuficiente y el panel de expertos utiliza un proceso de consenso para arribar a una recomendación

\*Adaptado y traducido de J Clin Epidemiol.2011;64(4):401-406, Balshem H, Helfand M, Schunemann HI, et al. GRADE guidelines:3.Raring the quality of evidence, copyright 2011, con permiso de Elsevier.<sup>262</sup>

### Evaluación de la fortaleza de la recomendación

De forma de articular que las recomendaciones emitidas fueran claramente redactadas y fáciles de implementar, el panel de expertos utilizó la metodología GLIDES (Guidelines Into Decision Support) acompañado por el software BridgeWiz (Yale University, New Haven, Connecticut).<sup>27</sup> Esta metodología prioriza el uso de lenguaje activo, no obstante, en algunas situaciones, la persona responsable de garantizar la implementación de la guía depende de la organización de la clínica y/o del laboratorio. Para asegurar la claridad de la guía en estas situaciones el panel de expertos utilizo lenguaje en voz pasiva para enfatizar la acción recomendada. El desarrollo de recomendaciones requirió que el panel revise la evidencia identificada y realice una serie de juicios clave (utilizando procedimientos descritos en SDC). Esta guía utilizó un sistema

de tres niveles para calificar la fortaleza de la recomendación tanto como para la categoría de “sin recomendación” cuando la evidencia era insuficiente para fundamentar una recomendación. La tabla 2 (también tabla 2 en SDC) resume la fortaleza de la evidencia y beneficios y daños netos, tanto como el lenguaje obligatorio que fue utilizado para cada tipo de recomendación.

<b>Tabla 2. Fortaleza de la recomendación</b>		
<b>Designación</b>	<b>Recomendación</b>	<b>Fundamentación</b>
<b>Fuerte recomendación</b>	Recomendación para o en contra de una práctica de estudio molecular específica en cáncer de pulmón (puede incluir debe o debería)	Fundamentada en calidad de la evidencia convincente (alta) o adecuada (intermedia) y en un claro beneficio que supera cualquier daño
<b>Recomendación</b>	Recomendación para o en contra de una práctica de estudio molecular específica en cáncer de pulmón (puede incluir debería o puede)	Algunas limitaciones en la calidad de la evidencia, adecuada (intermedia) o inadecuada (baja), en el balance de beneficio y daño, valor, costo, pero el panel concluye que hay suficiente evidencia para informar una recomendación
<b>Opinión de panel de expertos</b>	Recomendación para o en contra de una práctica de estudio molecular específica en cáncer de pulmón (puede incluir: debería o puede)	Serías limitaciones en la calidad de evidencia: inadecuada (baja o muy baja) o insuficiente, balance de beneficio y daño, valor, costo, pero el consenso del panel opina que es necesaria una afirmación
<b>Sin recomendación</b>	Ninguna recomendación a favor o en contra acerca de una práctica de estudio molecular en cáncer de pulmón.	Insuficiente evidencia, confianza o acuerdo para proveer una recomendación

### **Revisión de la guía**

Esta guía será revisada cada cuatro años o antes, frente a la publicación de evidencias sustanciales y de alta calidad que podrían potencialmente alterar alguna recomendación de la guía original. Si fuera necesario, el panel completo de expertos se volverá a reunir para discutir cambios potenciales y, si está indicado, recomendar una revisión de la guía por CAP, IASLC y AMP.

### **Descargo de responsabilidad**

Las guías de práctica y las recomendaciones de consenso reflejan la mejor evidencia disponible y el consenso de expertos apoyados en la práctica. Están destinadas a ayudar a médicos y pacientes en la toma de decisiones clínicas e identificar preguntas y escenarios para futuras investigaciones. Con el rápido flujo de información científica, puede surgir nueva evidencia entre el momento en que una guía de práctica o la recomendación de consenso se desarrolla y cuando se publica o se lee. Las guías y recomendaciones no se actualizan continuamente y pueden no reflejar la evidencia más reciente. Las guías y recomendaciones solo abordan los temas específicamente identificados en el mismo y no son aplicables a otras intervenciones, enfermedades o etapas de enfermedades. Además, las guías y las recomendaciones de consenso no pueden dar cuenta de la variación individual entre los pacientes y no se pueden considerar incluidos todos los métodos de cuidado apropiados o exclusivos de otros tratamientos. Es responsabilidad del médico tratante u otro proveedor de atención médica, confiando en la experiencia independiente y en su conocimiento, determinar el mejor curso de tratamiento para el paciente. En consecuencia, el cumplimiento de cualquier guía de práctica o recomendación de consenso es voluntaria, siendo del médico tratante la decisión final con respecto a su aplicación, a la luz de las circunstancias y preferencias individuales de cada paciente. CAP, IASLC y AMP no ofrecen ninguna garantía, expresa o implícita, con respecto a guías y recomendaciones y excluyen específicamente cualquier garantía de comerciabilidad e idoneidad para un uso o propósito particular. CAP, IASLC y AMP no asumen ninguna responsabilidad por ninguna lesión o daño a personas o propiedad que surja o relacionado con el uso de estas recomendaciones o por cualquier error u omisión.

## **RESULTADOS**

Un total de 610 estudios cumplieron con los criterios de búsqueda para la reafirmación de las recomendaciones de la guía del año 2013. Luego de la revisión de los 610 resúmenes, fue revisado el texto completo de 77 estudios que cumplían los criterios de búsqueda y que podrían refutar o cambiar las recomendaciones del año 2013. Un total de 21 artículos fueron incluidos para la extracción de datos. Los artículos excluidos estaban disponibles para discusión o como referencias de fondo.

1654 artículos cumplieron los criterios de búsqueda requeridos para las preguntas clave. Basado en la revisión de estos resúmenes 488 artículos cumplieron los criterios de inclusión y siguieron la revisión de textos completos. Los artículos a los que dirigía cualquiera de las preguntas clave nuevas fueron llevados al segundo nivel de revisión de texto completo. Un total de 118 artículos fueron incluidos para esta extracción de datos. Los artículos excluidos estaban disponibles para discusión o como referencias de fondo.

El panel fue convocado 5 veces (3 veces por teleconferencia y 2 en reuniones presenciales) para desarrollar el alcance, redactar las recomendaciones, revisar y responder a los comentarios solicitados y evaluar la calidad de la evidencia que fundamentan las recomendaciones finales. El panel utilizó la técnica del grupo nominal para la toma de decisiones por consenso para alentar el aporte individual y una participación equilibrada entre los miembros del grupo. Desde el 28 de junio hasta el 2 de agosto del año 2016 se estableció un periodo abierto al público para comentarios en el que se publicaron la guía del año 2013 y el borrador de las nuevas recomendaciones y directrices. El periodo abierto para comentarios fue publicado en el sitio web de la AMP [www.amp.org](http://www.amp.org). Todas las recomendaciones del año 2013 recibieron un fuerte acuerdo (95%-99%) de los participantes en el periodo abierto de comentarios (para mayores detalles referirse a “Outcomes” en SDC). Hubo 20 nuevas recomendaciones con un fuerte acuerdo de los participantes del periodo abierto para comentarios, con un rango del 86% al 97%. Los miembros del panel de expertos, en pequeños grupos, fueron asignados para la revisión de los comentarios del público. El panel modificó el borrador de las recomendaciones y eliminó una opinión de consenso de expertos y una directriz de “sin recomendación” basado en la retroalimentación durante el proceso de juicio considerado. Las recomendaciones finales fueron aprobadas mediante voto por el panel de expertos. El panel consideró durante todo el proceso los beneficios y daños, recursos necesarios, factibilidad y aceptabilidad si bien no se realizó ningún análisis de costo ni de costo-efectividad. Una descripción de daños y beneficios de la implementación de las recomendaciones de la guía están incluidas en SDC (Table 3 SDC).

Cada organización instituyó un proceso de revisión para aprobar la guía. El CAP reunió un panel revisor independiente representando el Consejo de Asuntos Científicos para revisar y aprobar la guía. El panel revisor independiente estuvo oculto para el panel de expertos y fue examinado mediante los procesos de conflicto de intereses. El proceso de aprobación de la IASLC requirió la revisión y aprobación de la Junta de Directores de la IASLC. El proceso de aprobación de la AMP requirió la revisión de contenidos por un panel independiente de expertos en la materia, dirigido por el Jefe de Publicaciones y Comunicaciones con representación de líderes del Comité de prácticas Clínicas y la Subdivisión de Tumores Sólidos y aprobación de la organización por parte del Comité Ejecutivo de la AMP.

## **Enunciados de la Guía.**

### **Reafirmación de las recomendaciones del 2013**

La guía del año 2013 recomendó el estudio universal de los pacientes con cáncer de pulmón en estadio avanzado con componente de adenocarcinoma utilizando diagnóstico molecular para las mutaciones activadoras tipo “hot spot” en exones 18 a 21 del gen *EGFR* con al menos 1% de prevalencia (ej. Codones 709 y 719, delección 768 del exón 19, inserción 790, 858 y 861 del exón 20) y utilizando hibridación in situ fluorescente (FISH) para los rearrreglos que involucran al gen *ALK*. Cualquier metodología o algoritmo de estudio con sensibilidad analítica (habilidad de detectar mutaciones en muestras fijadas en formol con 50% o más de células malignas) y con un tiempo de respuesta adecuados (10 días entre la recepción de la muestra y el reporte de todos los resultados), además de una apropiada validación y desarrollo bajo el acta 2988 de Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA), fue aceptable.

La guía del año 2013 recomendaba en contra de la aplicación de parámetros clínicos (exposición al tabaco, edad, sexo, etnia) para la selección de pacientes para estudio molecular, o el estudio de carcinoma escamoso puro, o usar la negatividad de *KRAS* como determinantes de terapias anti-EGFR o usar inmunohistoquímica para EGFR o ALK o el uso de FISH para estudiar *EGFR*.

La guía del año 2013 dejó varias decisiones abiertas a las políticas de cada institución, como si estudiar o no pacientes en estadios tempranos, o estudiar o no pacientes con muestras muy pequeñas con diagnóstico de carcinoma escamoso en el que no se puede excluir un carcinoma mixto adenoescamoso o si utilizar un enfoque de estudio simultáneo o secuencial. La pregunta relacionada con el estudio de enfermedad en estadio temprano permanece abierta, y se esperan datos provenientes de más ensayos clínicos antes de que pueda ser realizada una recomendación basada en la evidencia. A pesar de que el Comité de guías de prácticas clínicas de la Asociación Americana de Oncología Clínica hace una consideración destacada del estudio de pacientes con estadio temprano de cáncer de pulmón,<sup>4</sup> nuestra opinión permanece en que cada institución debería establecer su propia política en relación al estudio de pacientes con estadio temprano de la enfermedad, equilibrando el beneficio de tener en el registro del paciente el resultado del estudio en muestras quirúrgicas de muy buena calidad para alteraciones que probablemente sean necesarias en el futuro al momento de progresión de la enfermedad cuando una muestra de muy buena calidad pueda ser difícil de obtener en contra del costo de estudiar pacientes de los cuales hay un grupo que se curará y nunca necesitará los resultados del test. De acuerdo a esto las siguientes recomendaciones se aplican a pacientes con estadio avanzado (estadios IIIB y IV) de cáncer de pulmón.

Luego de la revisión de la literatura publicada desde el año 2013, las recomendaciones fueron ampliamente confirmadas. Algunas recomendaciones han ganado fortaleza con la publicación de evidencia adicional de soporte. (SDC Tables 4<sup>a</sup>,4b y 5). Algunas recomendaciones justificaron una completa reevaluación en esta revisión y aparecerán posteriormente (Tabla 3); estas incluyen la inmunohistoquímica para ALK, el uso de paneles NGS de múltiples genes y la pregunta acerca de estudiar muestras de no adenocarcinoma.

<b>Tabla 3. Resumen de las recomendaciones actualizadas con fortaleza de recomendación <sup>a</sup></b>	
<b>Recomendación 2013</b>	<b>Recomendación 2017</b>
<b>Consenso de opinión de expertos:</b> Muestras de citología son también adecuadas para estudio de EGFR y ALK siendo preferible bloques de células sobre preparados de extendidos.	<b>Recomendación:</b> Los patólogos pueden usar tanto bloques de células u otras preparaciones de citología como muestras adecuadas para estudio de biomarcadores de cáncer de pulmón
<b>Consenso de opinión de expertos:</b> Los laboratorios deberían utilizar métodos de estudio de EGFR que sean capaces de detectar mutaciones en muestras con un contenido de al menos 50% de células tumorales, aunque los laboratorios son fuertemente impulsados a utilizar (o tener un laboratorio de referencia externo disponible) un test mas sensible que detecte mutaciones en muestras con hasta 10% de células tumorales	<b>Consenso de opinión de expertos:</b> Los laboratorios deberían utilizar, o tener disponible un laboratorio de referencia externo, pruebas de estudio molecular de biomarcadores clínicos de cáncer de pulmón que sean capaces de detectar alteraciones en muestras con hasta 20% de células tumorales
<b>Recomendación:</b> No está recomendado el uso de IHQ para EGFR total para la selección de terapias con inhibidores de tirosina quinasa de EGFR	<b>Fuerte recomendación:</b> Los laboratorios no deberían utilizar expresión por IHQ de EGFR para seleccionar pacientes para terapias con inhibidores de tirosina quinasa de EGFR

Abreviatura: IHQ: inmunohistoquímica.

<sup>a</sup> Tabla suplementaria 4b incluye la lista de las recomendaciones del año 2013 reafirmadas

En las restantes recomendaciones del 2013 se realizaron los siguientes cambios.

- 1. Cualquier muestra citológica con celularidad y preservación adecuada puede ser utilizada para estudio molecular.** - En la recomendación original se prefería bloques celulares sobre extendidos de células. Una revisión sistemática reciente <sup>28</sup> a través de una búsqueda bibliográfica indicó que han sido publicados numerosos estudios mostrando el excelente rendimiento de extendidos citológicos con lo que esta preferencia ya no es apropiada. Es incumbencia de cada laboratorio que realice las pruebas moleculares sobre muestras citológicas realizar por separado estudios apropiados de validación, diferentes de los realizados en tejido y muestras de sangre.
- 2. Los métodos analíticos deben ser capaces de detectar mutaciones en muestras que contengan 20% o más de células malignas.**- Aunque estudios originales demostraron respuesta terapéutica a inhibidores de tirosina quinasa de EGFR en cáncer de pulmón con *EGFR* mutados utilizando secuenciación Sanger no modificada con una sensibilidad límite de 50% de células tumorales, en la práctica esto es insuficiente porque muchas muestras de cáncer de pulmón son pequeñas y poseen una mayoría de células benignas estromales, además la mayor parte de los ensayos clínicos en fase III utilizaron para estudio de *EGFR* métodos basados en reacción de cadena de polimerasa (PCR) que son

más sensibles que la secuenciación Sanger no modificada. Dada la disponibilidad generalizada de tecnología capaz de detectar baja frecuencia de eventos mutacionales en muestras pequeñas no es mas apropiado ofrecer un test de baja sensibilidad que no pueda estudiar tumores con 20% a 50% de contenido celular tumoral y que requiera que los pacientes sean sometidos a procedimientos adicionales potencialmente más invasivos solamente para obtener una muestra con alto contenido celular tumoral.

3. **No es apropiado la utilización de inmunohistoquímica (IHQ) para el estudio de *EGFR*:** No tiene ningún rol en absoluto el uso de IHQ contra la proteína total de EGFR para determinar tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa de EGFR. Las mutaciones accionables dirigen la activación de la quinasa citoplasmática de esta proteína de transmembrana, pero no se traducen en la extensión de la expresión de la proteína de superficie que es lo que detecta la IHQ del total de EGFR. Aunque la expresión por IHQ de EGFR fue utilizada en algunos de los estudios iniciales de los inhibidores de tirosina quinasa de comienzos del siglo, la respuesta clínica fue observada en pacientes con mutaciones, pero con expresión por IHQ ausente o débil y respuesta terapéutica pobre fue observada en pacientes con intensa expresión por IHQ, pero con ausencia de mutaciones.

Luego del descubrimiento de las mutaciones de *EGFR*, fueron desarrollados anticuerpos para IHQ dirigidos a las formas de proteínas más frecuentemente mutadas: sustitución L858R y la delección ELREA 746 a 750. La guía original permitía la utilización de IHQ con anticuerpos contra las mutaciones específicas de EGFR en el contexto de una muestra para diagnostico muy limitada. A pesar de que la evidencia publicada para estos anticuerpos muestra buena precisión para la determinación de la mutación activadora L858R y para algunas deleciones del exón 19, estos anticuerpos tienen poca sensibilidad para otras deleciones del exón 19, no tienen sensibilidad para detectar mutaciones menos frecuentes (ej, mutaciones del codón 719) y dan resultados falso-positivos con inserciones del exón 20.<sup>29</sup> El rendimiento global es subóptimo para la detección fidedigna de mutaciones de *EGFR*. Dados los avances en la tecnología para diagnostico molecular que actualmente permite el análisis en muestras muy limitadas tanto como en DNA tumoral circulante (ver luego), en este momento no hay lugar para el rol del uso de la IHQ de las mutaciones específicas de *EGFR* en la práctica de rutina para determinar tratamiento anti EGFR en pacientes con cáncer de pulmón.

<b>Tabla 4: Resumen de las recomendaciones 2017</b>	
<b>Recomendaciones de la guía</b>	<b>Fortaleza de la recomendación</b>
<b>Pregunta clave 1: ¿Qué genes deberían ser estudiados en pacientes con cáncer de pulmón:</b>	
1. El estudio de <i>ROS1</i> debe ser realizado en todos los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma, independientemente de las características clínicas	Fuerte recomendación
2. La IHQ de ROS1 puede ser utilizado como método de screening, pero los resultados de IHQ positivos deben ser confirmados por métodos moleculares o citogenéticos	Opinión de consenso de expertos
3. El estudio molecular de <i>BRAF</i> no está actualmente indicado en la práctica de rutina como test aislado fuera del contexto de ensayos clínicos. Es apropiado incluir <i>BRAF</i> como parte del estudio con paneles amplios tanto inicialmente como cuando el estudio de rutina de EGFR, ALK y ROS1 son negativos	Opinión de consenso de expertos
4. El estudio molecular de <i>RET</i> no está actualmente indicado en la práctica de rutina como test aislado fuera del contexto de ensayos clínicos. Es apropiado incluir <i>RET</i> como parte del estudio con paneles amplios tanto inicialmente como cuando el estudio de rutina de <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> y <i>ROS1</i> son negativos	Opinión de consenso de expertos
5. El estudio molecular de <i>ERBB2 (HER2)</i> no está actualmente indicado en la práctica de rutina como test aislado fuera del contexto de ensayos clínicos. Es apropiado incluir <i>ERBB2 (HER2)</i> como parte del estudio con paneles amplios, tanto inicialmente como cuando el estudio de rutina de <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> y <i>ROS1</i> son negativos	Opinión de consenso de expertos
6. El estudio molecular de <i>KRAS</i> no está actualmente indicado en la práctica de rutina como test aislado fuera del contexto de ensayos clínicos. Es apropiado incluir <i>KRAS</i> como parte del estudio con paneles amplios tanto inicialmente como cuando el estudio de rutina de <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> y <i>ROS1</i> son negativos	Opinión de consenso de expertos
7. El estudio molecular de <i>MET</i> no está actualmente indicado en la práctica de	Opinión de consenso de

rutina como test aislado fuera del contexto de ensayos clínicos. Es apropiado incluir <i>MET</i> como parte del estudio con paneles amplios tanto inicialmente como cuando el estudio de rutina de <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> y <i>ROSI</i> son negativos	expertos
<p>Pregunta clave 2: ¿Qué métodos deberían ser utilizados para el estudio molecular?</p> <p>8. La IHQ es una alternativa equivalente para el estudio de ALK</p> <p>9. Se prefiere paneles de secuenciación genética multiplex sobre la secuenciación múltiple de genes únicos para identificar otras opciones de tratamiento más allá de <i>EGFR</i>, <i>ALK</i> y <i>ROSI</i></p> <p>10. Los laboratorios deberían asegurar la utilización o la resolución a través de un método o muestra alternativa ante la aparición de un resultado no esperado, discordante, equivoco o con otra causa de baja confiabilidad.</p>	<p>Recomendación Opinión de consenso de expertos</p> <p>Opinión de consenso de expertos</p>
<p>Pregunta clave 3: ¿Es apropiado el estudio molecular en cáncer de pulmón sin un componente de adenocarcinoma?</p> <p>11. Los médicos pueden utilizar estudios moleculares en pacientes sin componente de adenocarcinoma cuando las características clínicas indican una alta probabilidad de un “driver” oncogénico</p>	Opinión de consenso de expertos
<p>Pregunta clave 4: ¿Qué pruebas están indicadas para pacientes con mutaciones accionables que han recaído durante la terapia dirigida.</p> <p>12. En pacientes con adenocarcinoma de pulmón que poseen mutaciones sensibilizantes de EGFR y han progresado luego del tratamiento dirigido con inhibidores de tirosina quinasa de EGFR, el medico debe usar pruebas para la detección de la mutación T790M de <i>EGFR</i> en la selección de pacientes para tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa de tercera generación</p> <p>13. Los laboratorios que estudian mutación T790M de <i>EGFR</i> en pacientes con resistencia clínica secundaria a inhibidores de tirosina quinasa de EGFR deberían utilizar pruebas capaces de detectar mutaciones en muestras con hasta 5% de células tumorales viables.</p> <p>14. No hay actualmente suficiente evidencia para sustentar una recomendación a favor o en contra del estudio del estado mutacional de <i>ALK</i> en pacientes con adenocarcinoma con mutaciones sensibilizantes de <i>ALK</i> que han recaído luego del tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa de ALK</p>	<p>Fuerte recomendación</p> <p>Recomendación</p> <p>Sin recomendación</p>
<p>Pregunta clave 5: ¿Cuál es el rol del estudio molecular con ADN celular libre circulante en pacientes con cáncer de pulmón?</p> <p>15. Hay actualmente insuficiente evidencia que sustente la utilización de ADN celular libre circulante para el diagnóstico primario de adenocarcinoma</p> <p>16. En el contexto clínico en el cual la muestra de tejido es limitada y/o insuficiente para el estudio molecular el medico puede utilizar pruebas en ADN celular libre circulante para detectar mutaciones de <i>EGFR</i></p> <p>17. Los médicos pueden utilizar pruebas en ADN celular libre circulante para identificar mutación T790M de <i>EGFR</i> en pacientes con progresión o resistencia secundaria al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa de EGFR, se recomienda el estudio en tejido si el resultado en plasma es negativo</p> <p>18. Hay actualmente insuficiente evidencia que sustente la utilización del análisis molecular de células tumorales circulantes para el diagnóstico de adenocarcinoma, para la detección de mutaciones de <i>EGFR</i> o de otros genes ni para la detección de mutación T790M de <i>EGFR</i> en pacientes ante la aparición de resistencia a inhibidores de tirosina quinasa de EGFR</p>	<p>Sin recomendación</p> <p>Recomendación</p> <p>Opinión de consenso de expertos</p> <p>Sin recomendación</p>

Abreviaturas: FISH: hibridación in situ fluorescente. IHQ; inmunohistoquímica

**Tabla 5: Marcadores moleculares emergentes para estudios en cáncer de pulmón**

Proteína quinasa.quinasa1 mitógeno-activada (*MEK1/MAP2K1*)  
 Receptor de crecimiento fibroblástico 1-4 (*FGFR 1-4*)  
 Receptor de tirosina quinasa neurotrófica, tipo 1-3 (*NTRK1-3*)  
 Neuroregulina 1 (*NRG1*)  
 Semejante RAS sin CAAX 1 (*RIT1*)  
 Neurofibromina 1 (*NFI*)  
 Fosfatidil inositol-4,5 bifosfato 3 quinasa subunidad alfa catalítica (*PIK3CA*)  
 AKT serina/treonina quinasa 1 (*AKT1*)  
 Proto-oncogen NRAS, GTPasa (*NRAS*)  
 Objetivo mecánico de rapamicina (*MTOR*)  
 Esclerosis tuberosa 1 (*TSC1*)  
 Esclerosis tuberosa 2 (*TSC2*)

Receptor tirosina quinasa de proto-oncogen KIT ( <i>KIT</i> ) Receptor factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>PDGFRA</i> ) Receptor tirosina quinasa 2 de dominio discoidina ( <i>DDR2</i> )
--

## Nuevas recomendaciones

**Pregunta 1: ¿Qué nuevos genes deben ser estudiados en pacientes con cáncer de pulmón?** En la guía del año 2013 el estudio de los genes se situaba en dos categorías: el estudio es necesario (*EGFR*, *ALK*) o el estudio es para investigación. Un gen, *KRAS*, era considerado condicionalmente necesario en el contexto de algoritmos de estudio secuenciales, dada su facilidad de análisis y su característica mutuamente excluyente con *EGFR* y *ALK*. Para el 2018, sin embargo, consideramos que hay 3 categorías en las que los diferentes genes pueden ser incluidos. Un grupo de genes debe ser ofrecido para estudio por todos los laboratorios que estudian carcinomas de pulmón como un mínimo absoluto: *EGFR*, *ALK* y *ROS1*. Un segundo grupo puede ser incluido en cualquier panel ampliado ofrecido a pacientes con cáncer de pulmón: *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2* (*HER2*) y *KRAS* si hay material adecuado disponible. El estudio de *KRAS* puede ser ofrecido como estudio único para excluir a pacientes de la realización de paneles ampliados. Todos los demás genes, a la fecha de esta publicación, son considerados para fines de investigación.

En este contexto, las instituciones que proveen atención a pacientes con carcinoma de pulmón tienen dos opciones: a) ofrecer un panel amplio que incluya todos los genes de las primeras dos categorías (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2*, *KRAS* y *RET*) para todos los pacientes apropiados o b) ofrecer un panel con los genes que deben ser necesariamente estudiados (*EGFR*, *ALK* y *ROS1*) para todos los pacientes apropiados y un segundo estudio de panel ampliado con genes de la segunda categoría (*BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2* (*HER2*) y *KRAS*) a los pacientes con posibilidades de ingresar a algún ensayo clínico, posiblemente luego de realizar un estudio de *KRAS* como gen único para excluir de la realización de un panel ampliado a los pacientes *KRAS* mutados. La tabla 4 incluye la lista de recomendaciones con la fortaleza de cada recomendación.

1. **Fuerte recomendación:** El estudio de *ROS1* debe ser realizado en todos los pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadio avanzado independientemente de sus características clínicas.

Existe evidencia suficiente para recomendar el estudio molecular (PCR transcriptasa-reversa-RT-PCR- o secuenciación) o citogenético (FISH u otra hibridación in situ) para identificar rearrreglos de *ROS1*. La fortaleza de la evidencia que respalda el uso de cualquier característica clínica para identificar pacientes que deben realizar estudio de *ROS1* es adecuada. Esta recomendación está basada y respaldada por nueve estudios,<sup>30-38</sup> 6 de los cuales mostraron asociación entre la presencia de rearrreglo de *ROS1* y las características del tumor o de los pacientes<sup>30,31,34,37</sup> y consistieron en un estudio de cohorte prospectivo (ECP),<sup>35</sup> un estudio de cohorte prospectivo retrospectivo (ECPR)<sup>31</sup> y cuatro estudios de cohorte retrospectivos (ECR)<sup>30,34,36,37</sup>. Los 3 estudios restantes evaluaron la evolución clínica de pacientes tratados con la terapia dirigida para *ROS1* crizotinib<sup>32-33-38</sup> e incluyeron un ensayo clínico no randomizado<sup>33</sup> y tres ECR<sup>32,38</sup>. Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 6 SDC). Referirse a la tabla 7 de SDC para un resumen de los hallazgos que respaldan el uso de estudio molecular o citogenético de *ROS1* para la selección de pacientes para terapia dirigida anti *ROS1*.

Si bien es infrecuente, menos del 2% de los carcinomas pulmonares no células pequeñas (CPNCP)<sup>30,31,34</sup> y 2 a 3% de adenocarcinomas,<sup>30,34,35</sup> los rearrreglos estructurales que involucran al gen *ROS1* generan una fusión oncogénica que puede ser tratada exitosamente con terapia dirigida. Un ensayo clínico fase I con 50 pacientes con CPNCP demostró que la presencia de rearrreglo de *ROS1* por RT PCR o FISH predice la respuesta a la terapia con crizotinib con una tasa de respuesta del 72% y una media libre de progresión de 19.2 meses.<sup>33</sup> Basada en este estudio, la FDA aprobó en el año 2016 el uso expandido de crizotinib a pacientes con CPNCP con rearrreglos de *ROS1*. Un estudio europeo multi-institucional retrospectivo de 32 pacientes con CPNCP y rearrreglos de *ROS1* tratados con crizotinib mostró una tasa de respuesta del 80% y una sobrevida libre de progresión de 9.1 meses. La sobrevida global de pacientes con CPNCP con rearrreglo de *ROS1* pareciera ser más prolongada, independientemente del uso de terapias dirigidas, comparada con pacientes con otras mutaciones susceptibles de terapias dirigidas.<sup>38,39</sup>

Similar a *ALK*, la activación de *ROS1* es mediada por variantes estructurales, con varios genes compañeros (“partners”) que se fusionan con el extremo C- terminal de *ROS1* que contiene su dominio tirosina quinasa, activando la señalización en cascada a través de las vías *MAPK*, *JAK/STAT* y *PI3K*. Genes

“partner” frecuentes incluyen *SLC34A2*, *CD74* y *TPM3*, entre otros. El rol de ROS1 “wild-type” está todavía siendo dilucidado, pero comparte ciertas similitudes estructurales con *ALK*, aun con diferencias significativas, como la ausencia de dominio de dimerización, un dominio extracelular con algún grado de similitud a las moléculas de adhesión y ligandos no conocidos.

Los antecedentes de hábito tabáquico leve o ausente, de manera similar a las mutaciones de *EGFR* y al rearrreglo de *ALK*, se han asociado a un incremento de rearrreglos de *ROS1* en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.<sup>30,37</sup> Sin embargo, esta asociación no ha sido observada consistentemente entre estudios.<sup>34</sup> Otras características clínicas como edad joven, sexo femenino y etnia no asiática han sido asociadas a rearrreglos de *ROS1* en estudios aislados.<sup>30,31,35</sup> Es por esto que las características clínicas no deben ser utilizadas para seleccionar o excluir del estudio mutacional para *ROS1*. Los rearrreglos de *ROS1* ocurren de manera mutuamente excluyente con otras alteraciones oncogénicas como *EGFR*, *KRAS* y *ALK*. Dada la baja prevalencia de rearrreglos de *ROS1*, parece razonable el estudio de manera secuencial, primero de *EGFR* y *ALK* seguidos por *ROS1*. La frecuencia de rearrreglos de *ROS1* se enriquece llamativamente entre 5 a 10% en grupos de adenocarcinoma negativos para otras mutaciones driver (por ejemplo: *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *BRAF*).<sup>31,37</sup>

En Estados Unidos, la terapia dirigida con crizotinib para tumores con rearrreglo de *ROS1* no requiere el uso de un estudio acompañante (“companion diagnostic”) FDA aprobado. Se han publicado varios métodos para establecer la utilidad clínica de terapia dirigida anti-ROS1 en pacientes con rearrreglos de *ROS1*, principalmente FISH y RT PCR. Fuera de Estados Unidos, un estudio diagnóstico basado en RT PCR fue utilizado en un ensayo clínico internacional fase II para seleccionar pacientes con rearrreglo de *ROS1*,<sup>40</sup> principalmente en países de Asia del Este. Este estudio fue aprobado como diagnóstico “in vitro” (in vitro diagnostic) en Europa y China y puede ser reconocido como “companion diagnostic” en varios países. Si bien los ensayos con RT PCR pueden ser desafiantes, dada la variación en los puntos de ruptura de *ROS1* (típicamente entre los intrones 31 a 35) y sus genes “partner”, pueden utilizarse métodos de captura para RNA o DNA siempre y cuando hayan sido correctamente validados. En los Estados Unidos el método de FISH es el que más se ha publicado. La hibridación in situ fluorescente puede ser realizada con una sonda con diseño “break apart” dado los múltiples “partners” de fusión posibles y debe mostrar rearrreglo (definido como separación de al menos un diámetro de señal) en 15% o más de células tumorales.<sup>41</sup>

- **2. Opinión del consenso de expertos:** la inmunohistoquímica (IHQ) de ROS1 puede ser utilizada para el estudio de screening de *ROS1* en pacientes con CPNCP en estadio avanzado; no obstante, los resultados positivos por IHQ deben ser confirmados por un método citogenético o molecular.

La fortaleza de evidencia para recomendar el uso de IHQ para screening de ROS1 es inadecuada. Esta afirmación está basada y respaldada por 6 estudios<sup>42,47</sup> correspondientes a 2 ECPs,<sup>43,44</sup> 1 ECPR<sup>42</sup> y 3 ECR.<sup>45,47</sup> Cinco estudios compararon la IHQ de ROS1 con un estudio de referencia de FISH<sup>42-45-47</sup> y un estudio comparó IHQ de ROS1 con un estudio de referencia de RT-PCR.<sup>46</sup> Utilizando los valores reportados de verdaderos positivos, falsos positivos, falsos negativos y verdaderos negativos de estudios que comparan IHQ con FISH se realizó un meta análisis para determinar la sensibilidad y especificidad agrupada para la inmunohistoquímica para ROS1. (figura 1). Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (tabla 8 de SDC). Referirse a tabla 9 de SDC para un resumen de los hallazgos de estudios que respaldan el uso de IHQ para el screening molecular de *ROS1*.

En vistas de la relativa infrecuencia de los rearrreglos de *ROS1* en CPNCP, el screening con IHQ puede ser preferible al FISH o RT PCR en determinados escenarios. La interpretación de la IHQ de ROS1 puede ser desafiante, dado que la expresión puede ser de naturaleza parcheada y débil en hasta un tercio de los tumores que no tienen rearrreglos de *ROS1*.<sup>44-45-48</sup> Si bien algunos estudios sugieren que la expresión de ROS1 en ausencia de rearrreglos puede tener significado pronóstico,<sup>48</sup> la expresión focal o en parches rara vez está asociada con rearrreglos de *ROS1* y por ende es insuficiente para predecir respuesta a la terapia dirigida para ROS1. Asimismo, el patrón de tinción puede variar dependiendo del tipo de fusión, incluyendo tinción granular o globular en las fusiones *CD74-ROS1*, tinción débil de membrana en fusiones *EZR-ROS1* y localización vesicular en fusiones *GOPC-ROS1*.<sup>45</sup>

En todos los estudios publicados hasta la fecha, el clon utilizado ha sido el mismo y corresponde a D4D6 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). La mayoría de los estudios retrospectivos que utilizan la IHQ con el anticuerpo D4D6 muestran una sensibilidad de 100% en relación con FISH o RT PCR.<sup>32-42-47</sup> Los tumores que carecen de expresión de ROS1 pueden ser interpretados con seguridad como

carentes de fusión de ROS1. Sin embargo, la especificidad de la IHQ de ROS1 es más variable, con rangos reportados entre el 92 y el 100% utilizando diferentes métodos y puntos de corte.<sup>35-42-47</sup> Un metaanálisis de 5 estudios determinó una sensibilidad agrupada del 96% (intervalo de confianza 95%, 71-99%) y especificidad del 95% (intervalo de confianza 95%, 89-96%) para la inmunohistoquímica versus el FISH cuando se utiliza el clon D4D6 con una intensidad de tinción mayor a 2+ (definida por el estudio) (Figura 1). Se han propuesto diferentes puntos de corte utilizando intensidad o bien H score (intensidad x porcentaje de células teñidas). En la mayoría de los estudios, los casos confirmados por FISH o RT PCR presentaron al menos moderada intensidad de tinción para la proteína ROS1, sin embargo, la evidencia publicada aún es insuficiente para recomendar un punto de corte específico o un sistema de score,<sup>42-45</sup> y cada laboratorio debe validar su punto de corte interpretativo basado en muestras positivas y negativas conocidas.

Dada la especificidad y los desafíos relacionados a la interpretación de la expresión inespecífica, recomendamos que todos los casos positivos por IHQ para ROS1 sean confirmados por FISH u otro método molecular (RT-PCR, NGS) antes de considerarlo para terapia dirigida para ROS1. Sin embargo, dada la elevada sensibilidad de la IHQ, los tumores que carecen de tinción para ROS1 pueden ser interpretados como negativos para fusiones de *ROS1*.

## GENES ADICIONALES

De los genes recientemente incluidos en esta guía, solamente el estudio de *ROS1* debe ser ofrecido a todos los pacientes apropiados con CPNPC. El estudio de los siguientes genes debe ser incluido en cualquier panel ampliado de múltiples genes realizado en pacientes con carcinoma de pulmón sea o no ofrecido a todos los pacientes con carcinoma de pulmón, o bien como un segundo panel para pacientes *EGFR/ALK/ROS1* “wild type”, que busquen ingresar a ensayos clínicos.

**3. Opinión del consenso de expertos:** El estudio mutacional de *BRAF* no está indicado como rutina o como estudio único fuera del contexto de un ensayo clínico. Es apropiado incluir a *BRAF* como parte de un panel más grande realizado desde el inicio o luego de que los estudios de *EGFR*, *ALK* y *ROS1* han resultado negativos.

La fortaleza de la evidencia fue inadecuada para respaldar el uso de estudio molecular de *BRAF*. Esta afirmación está basada y respaldada por 9 estudios. 4 ECPs<sup>49-52</sup> y 3 ECRs,<sup>53-55</sup> todos los cuales informaron acerca de la asociación entre la mutación de *BRAF* y las características tumorales o de los pacientes<sup>49-55</sup> y 2 ensayos clínicos no randomizados adicionales que evaluaron la actividad de un inhibidor de BRAF en pacientes con mutación p.V600E.<sup>56-57</sup> Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 10 de SDC). Referirse a tabla 11 de SDC para un resumen de los hallazgos que avalan el uso del estudio molecular de *BRAF*.

Las mutaciones activadoras de *BRAF*, en particular p.V600E, llevan a una señalización oncogénica a través de la vía MAPK y constituyen mutaciones raras y recurrentes en el adenocarcinoma pulmonar, presentes en 0.5 al 4.9% de estos tumores.<sup>49-52-54</sup> En el carcinoma pulmonar, datos de un ensayo clínico de brazo único fase II<sup>56</sup> mostró que: 1) La terapia única en segunda línea con dabrafenib en pacientes estadio IV con CPNPC y mutación *BRAF* p.V600E, tuvo una respuesta parcial de 33% y una tasa de control de enfermedad del 58%, y que: 2) una combinación de dabrafenib/trametinib en segunda línea en pacientes estadio IV con CPNPC y mutación *BRAF* p.V600E tuvo una tasa de respuesta parcial del 63% y una tasa de control de enfermedad del 75%.

Basada en esta evidencia, la FDA le confiere la designación de “terapia Breakthrough” a la terapia combinada en CPNPC con mutación de *BRAF* p.V600E y fue aprobada por FDA en el año 2017. Es por ello, que esta ha sido la recomendación más controversial de este panel de trabajo. Si bien existe un fuerte acuerdo en el panel en cuanto a que el estudio mutacional de BRAF debe realizarse al momento del estudio molecular inicial en adenocarcinoma de pulmón, la evidencia publicada hasta la actualidad carece de estudios prospectivos controlados y, en consecuencia, carece de la fortaleza necesaria para emitir una recomendación internacional para el estudio de BRAF como gen único en todos los pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Anticipamos la publicación de mayor evidencia que respalde la utilidad de la inhibición de BRAF en pacientes *BRAF* mutados y nuestra opinión es que el estudio de *BRAF* en el futuro se demostrará como necesario. Nuestra expectativa es que en la próxima revisión de esta guía se incluirá la recomendación del estudio de *BRAF* como gen único, de forma similar a *EGFR*, *ALK* y *ROS1*, pero no estamos en condiciones de realizar esta recomendación en 2017. Si bien el estudio único de *BRAF* no está recomendado actualmente, en

caso de utilizar una estrategia de panel, ya sea inicial o en pacientes con *EGFR*, *ALK* y *ROSI* “wild type”, el estudio de *BRAF* debe ser incluido.

Así como en el caso de *EGFR* y *KRAS*, las mutaciones hot-spot de *BRAF* presentan un efecto oncogénico. El gen “V-ras murine sarcoma homolog” (*BRAF*) codifica a una serina treonina quinasa de la vía de MAPK quinasa, entre RAS y MEK. La mutación más frecuente en CPNCP es la mutación puntual c.1799T>A (p.V600E), que es la mutación predominante en otros tipos tumorales como melanoma, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma colorrectal, leucemia de células vellosas y ganglioglioma. Sin embargo, contrario a otros tumores, el carcinoma de pulmón presenta frecuentemente mutaciones no p.V600E, como otras mutaciones en el codón 600 (por ejemplo V600K) y codones adyacentes en el exón 15 y sustituciones en codones 466 y 469 en el exón 11.

Como muchos otros oncogenes susceptibles de terapia dirigida, las mutaciones de *BRAF* son más frecuentes en adenocarcinomas que en carcinoma de células escamosas. La mutación *BRAF* V600E en algunos estudios es más frecuente en mujeres<sup>52-54</sup> y no fumadores<sup>54</sup>, pero otros estudios no han podido reproducir esta asociación.<sup>49-50-53-58</sup> Una diferencia entre las mutaciones de *BRAF* y otros oncogenes susceptibles de terapia dirigida es que las mutaciones de *BRAF* no p.V600E (en particular las del exón 11) pueden coexistir con otras mutaciones en *KRAS*,<sup>49-52-53-59</sup> mientras que la mutación p.V600E es mutuamente excluyente con las alteraciones de *KRAS*, *EGFR* y *ALK*.

Los ensayos de gen único para *BRAF* son de uso más amplio para otros tumores, en particular para los pacientes con melanoma considerados para terapia dirigida, sin embargo, la mayoría de estos métodos no pueden detectar las mutaciones del exón 11 reportadas en cáncer de pulmón. Aunque la evidencia que respalda el estudio de *BRAF* está restringida a las mutaciones p.V600E, nuestra opinión es que el estudio de *BRAF*, incluido en un panel o para enrolamiento en ensayos clínicos debe usar una metodología que evalúe al menos los exones 15 y 11.

Un desafío similar surge respecto del uso de anticuerpos de IHQ mutación específicos para la proteína p.V600E mutada (VE1) que han sido ampliamente utilizados en melanoma. Los datos reportados en números pequeños de casos de cáncer de pulmón<sup>58-60</sup> demuestran que el clon VE1 detecta entre el 90 y el 100% de los adenocarcinomas p.V600E mutados. En uno de estos estudios todos los casos no V600E fueron negativos con IHQ<sup>61</sup> mientras que en otro con un solo caso no p.V600E mutado de 21 en total, con una inserción única en el codón 599 mostró tinción positiva por IHQ. Hasta la fecha no hay suficiente evidencia para respaldar una recomendación a favor o en contra del uso de IHQ para el estudio de *BRAF* p.V600E (VE1) en CPNCP.

**4. Opinión del consenso de expertos:** el estudio de *RET* no está recomendado como ensayo único en la rutina fuera de un contexto de ensayo clínico. Es apropiado incluir a *RET* como parte de un panel ya sea inicialmente o luego de que el estudio de *EGFR*, *ALK* y *ROSI* resultaron negativos.

La fortaleza de evidencia que respalda el estudio molecular de *RET* es inadecuada. Esta afirmación es basada en evidencia y respaldada por 3 estudios<sup>37-62-63</sup> que consisten en 1 ECP<sup>62</sup> y 2 ECRs.<sup>37-63</sup> Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 12 de SDC). Referirse a tabla 13 de SDC para un resumen de los hallazgos que avalan el uso del estudio molecular de *RET*.

Las variantes estructurales que causan fusiones de *RET* son infrecuentes, hallándose entre el 0.6 y el 0.9% de los CPNCP y en 1,2 a 2% de los adenocarcinomas.<sup>62-64-67</sup> El potencial para tratar a pacientes positivos para *RET* en ensayos clínicos con inhibidores de *RET* quinasa está siendo explorado por ensayos clínicos de fase II,<sup>68-69</sup> si bien series pequeñas y casos reportados han mostrado resultados alentadores.<sup>70-71</sup> Dada la rareza de los rearrreglos de *RET* y la limitada evidencia sobre el beneficio terapéutico, el estudio de *RET* como estudio único no está recomendado en todos los pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, cualquier panel de genes desarrollado para pacientes con carcinoma de pulmón debería incluir el estudio de *RET*, ya sea para estudio inicial o para pacientes *EGFR*, *ALK* y *ROSI* “wild type”.

Así como para los rearrreglos de *ALK* y *ROSI*, *RET* es activado por rearrreglos que fusionan el dominio tirosina quinasa de *RET* con los dominios de dimerización de uno de una variedad de genes “partner” recurrentes, que incluyen a *KIF5B* (el más frecuente, en un 90%),<sup>64-72-73</sup> *CCDC6*,<sup>65-74</sup> *NCOA4*<sup>62</sup> y *TRIM33*.<sup>72</sup> En carcinoma de pulmón los rearrreglos de *RET* son mutuamente excluyentes con las alteraciones de *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *HER2* y *BRAF*.<sup>62-64-65</sup>

Las fusiones de *RET* son más frecuentes en pacientes sin historia de tabaquismo que en fumadores<sup>37-62-64-66-72</sup>. Los pacientes con mutaciones de *RET* son más jóvenes que aquellos con mutaciones de *EGFR* y tienen similar distribución por sexo.<sup>67</sup> Las proteínas de fusión de *RET* se han detectado en adenocarcinoma<sup>37-62-64</sup> y en carcinoma adenoescamoso<sup>62</sup>. Los subtipos de adenocarcinoma descritos incluyen mucinosos o con células en anillo de sello y cribiformes<sup>37-62-65</sup> o sólidos.<sup>37-62</sup> Sin embargo, no deberían emplearse características

clínicas o histopatológicas (excepto carcinomas puramente pavimentosos) para seleccionar a un paciente para estudio de fusiones de *RET*.

Las fusiones de *RET* se han estudiado por diversos métodos, incluidos FISH break apart,<sup>75</sup> IHQ,<sup>37</sup> RT-PCR<sup>75</sup> y NGS.<sup>37</sup> El estudio de *RET* por FISH es particularmente desafiante, dado el poco espacio entre sondas descrito en los rearrreglos más frecuentes, y un patrón de separación tan pequeño como un diámetro de señal es interpretado como positivo.<sup>37</sup> De forma similar al estudio por FISH del gen *ALK* el punto de corte para la positividad para rearrreglo de *RET* es 15% de células con señales de separación o señales 3' únicas. En uno de los estudios, se utilizó un ensayo de *RET* de 4 colores,<sup>62</sup> las muestras se consideraron positivas para rearrreglo de *RET* o para la fusión *KIF5B-RET* si más del 20% de células tumorales presentaban señal de separación entre verdes y rojas o señales de fusión doradas-verdes respectivamente.

Un estudio retrospectivo reciente utilizó IHQ para *RET* (Anticuerpo anti *RET* ab134100, Abcam, Cambridge, Reino Unido) con tinción granular citoplasmática difusa y ocasionalmente de membrana o perinuclear con intensidad moderada a severa. Se reportó una sensibilidad de 100% y una especificidad del 88%,<sup>37</sup> sin embargo, no hay aun evidencia que corrobore estos resultados con suficiente fortaleza como para emitir una recomendación.

Si bien los estudios de RT-PCR multiplex pueden ser exitosos para detectar las fusiones más frecuentes que involucran *KIF5B-RET* y *CCDC6-RET*,<sup>75</sup> al igual que con *ALK* y *ROS* el estudio por RT-PCR dirigida solamente es insuficiente para detectar nuevos tipos de fusión o isoformas. Si bien la diversidad de rearrreglos de *ALK* y *ROS* susceptibles de tratamiento ha madurado suficientemente a través de años de estudio y ensayos clínicos de forma tal que ha permitido diseñar ensayos de RT-PCR para estos genes con sensibilidad adecuada, la diversidad de rearrreglos de *RET* tratables todavía está siendo explorada. Un ensayo de secuenciación basada en captura incluyendo ADN o ARN puede ser más sensible y más fácilmente integrado en un panel amplio de múltiples genes.<sup>76</sup>

5. *Opinión del consenso de expertos:* el estudio molecular de *ERBB2 (HER2)* no está indicado como gen único fuera del contexto de un ensayo clínico. Es apropiado incluir el estudio mutacional de *ERBB2 (HER2)* como parte de un panel de varios genes, ya sea inicialmente o luego de que el estudio de *EGFR*, *ALK* y *ROS1* resultaron negativos.

La fortaleza de evidencia es inadecuada para respaldar el estudio molecular de *ERBB2 (HER2)*. Es recomendación está basada en la evidencia y es respaldada por 10 estudios, 9 que han reportado la asociación entre *ERBB2 (HER2)* y las características tumorales o del paciente<sup>49-77-84</sup> y uno que evaluó el uso de terapia dirigida anti Her2 (dacomitinib)<sup>85</sup> en pacientes con mutaciones y amplificaciones de *ERBB2 (HER2)*. Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 14 de SDC). Referirse a tabla 15 de SDC para un resumen de los hallazgos que avalan el uso del estudio molecular de *ERBB2 (HER2)*.

Las alteraciones en el gen del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2, ERBB2*) han surgido como un driver oncogénico y como potencial blanco de terapia dirigida en el cáncer de pulmón.<sup>81-83-84-86</sup> Las alteraciones en la secuencia y la amplificación génica ocurren en este contexto y constituyen entre 2 al 3% y 2 a 5% de las alteraciones recurrentes reportadas respectivamente. La terapia dirigida al producto del gen *ERBB2 (HER2)* constituye un área de investigación activa en el presente. Los ensayos clínicos basados en la expresión por IHQ o amplificación del gen *ERBB2* por FISH no demostraron un claro beneficio.<sup>87-88</sup> Un ensayo clínico adicional de fase II utilizando mutaciones y amplificaciones de *ERBB2* para la selección de pacientes demostró respuestas perdurables a dacomitinib pero solamente en pacientes con mutaciones específicas de *HER2*.<sup>85</sup>

Las inserciones en el marco de lectura del exón 20 y las sustituciones en S310 son las mutaciones más frecuentemente encontradas y, típicamente, son mutuamente excluyentes con otras alteraciones recurrentes, incluidas las mutaciones en *EGFR*, *KRAS* y *BRAF* así como también rearrreglos de *ALK* y *ROS1*. Las inserciones en el exón 20 son variables, siendo la más frecuente una duplicación de 12 pares de bases de los codones 775-778 que codifican los aminoácidos YVMA y son más frecuentes en pacientes jóvenes sin historia de consumo de tabaco. La amplificación de novo de *ERBB2* puede ocurrir con o sin mutación de *ERBB2*,<sup>82-84-86</sup> con tasas reportadas muy variables que van del 0 al 87%.<sup>81-84-86</sup> Si bien las diferencias en los métodos y los criterios para definir amplificación pueden ser responsables de estas discrepancias y requieren estandarización, la prevalencia aumentada de amplificación de *ERBB2* independiente de mutación de *ERBB2* sugiere que la mutación y amplificación podrían representar diferentes marcadores y blancos terapéuticos en cáncer de pulmón.<sup>89</sup> La amplificación de *ERBB2* ha sido reportada raramente como evento secundario en pacientes con mutaciones sensibilizantes de *EGFR* y como un potencial mecanismo de resistencia al tratamiento con inhibidores de *EGFR*.<sup>90</sup>

En este contexto y con la evidencia disponible hasta el momento, el estudio de mutaciones de *ERBB2* como gen único no está indicada fuera de un ensayo clínico. No obstante, cuando se realiza un estudio de panel multiplex o NGS es apropiado incluir a *ERBB2* como parte del estudio ya que puede identificar pacientes que pueden ser dirigidos a ensayos clínicos - en este contexto, utilizar pruebas para estudio de las alteraciones en la secuencia de *ERBB2*, en particular inserciones y duplicaciones en el exón 20, que han sido asociadas a respuesta al tratamiento con inhibidores de ERBB2 en reportes de casos y series pequeñas.<sup>85-91</sup>

**6. Opinión del consenso de expertos:** el estudio de *KRAS* no está indicado como estudio de gen único como determinante para el uso de terapia dirigida. Es apropiado incluir a *KRAS* en el estudio molecular como parte de un panel de varios genes, ya sea inicialmente o luego de que los estudios de *EGFR*, *ALK* y *ROS1* resultaron negativos.

La fortaleza de evidencia fue adecuada para respaldar el uso del estudio molecular de *KRAS* en la selección de pacientes para el uso de terapia dirigida. La fortaleza de evidencia que respalda el uso de características clínicas para identificar pacientes que deberían ser estudiados para *KRAS* es inadecuada. Esta afirmación está basada en evidencia y respaldada por 7 estudios<sup>49-51-52-92-95</sup> que incluyen: 2 meta análisis (MA),<sup>93-94</sup> 4 ECP<sup>49-51-52-92</sup> y 1 ECR.<sup>95</sup> Cinco estudios buscaron identificar asociaciones entre las características del tumor o del paciente con el status mutacional de *KRAS*.<sup>49-52-92-93-95</sup> Dos MA<sup>93-94</sup> reportaron sobrevida global y tasa de respuesta a inhibidores de *EGFR* cuando los pacientes *KRAS* mutados fueron tratados con tratamiento estándar. Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 16 de SDC). Referirse a tabla 17 de SDC para un resumen de los hallazgos que avalan el uso del estudio molecular de *KRAS*.

Las mutaciones de *KRAS* se han reportado en el 20-30% de los adenocarcinomas de pulmón. Las mutaciones de *KRAS* son más frecuentemente encontradas en pacientes con historia de exposición al tabaco, pero también se han reportado en el 5% de los pacientes sin historia de exposición tabáquica. La mayoría de los estudios indican una mayor incidencia en hombres y etnia blanca o africana en comparación a mujeres y etnia asiática. Las mutaciones de *KRAS* ocurren más frecuentemente en el codón 12 y 13, con mucha menos frecuencia en el codón 61, rara vez en el codón 143 y pueden ser detectadas por ensayos de “hot spot” (por ejemplo de real time PCR, PCR digital “droplet” o pirosecuencia) que evalúen estos codones o bien como parte de un estudio de panel de genes. Las mutaciones de *KRAS* son mutuamente excluyentes con otras mutaciones driver como las mutaciones de *EGFR* o los rearrreglos de *ALK*.<sup>49-51-92-93-95-101</sup>

Las terapias dirigidas a mutaciones de *KRAS* no han demostrado ser clínicamente efectivas. Por ejemplo, si bien se obtuvieron resultados promisorios (37% de tasa de respuesta efectiva) en un ensayo clínico de fase II con selumetinib, un inhibidor de MEK (corriente abajo de *KRAS*), más docetaxel<sup>102</sup> en pacientes con cáncer de pulmón avanzado *KRAS* mutado, esta combinación no demostró beneficio en el ensayo clínico fase III Evaluación de Selumetinib como terapia de combinación-1 (SELECT-1)<sup>103</sup> y un estudio de fase II que combinó selumetinib + erlotinib en pacientes con cáncer de pulmón *KRAS* mutado no mostró respuesta a selumetinib independiente de erlotinib.<sup>104</sup> Sin embargo, persiste en la actualidad una intensa investigación en estrategias terapéuticas contra esta mutación y es apropiado incluir a *KRAS* en los paneles amplios de genes utilizados para dirigir pacientes a terapias en investigación.

Otra aplicación del estudio mutacional de *KRAS* es en un algoritmo de estudio secuencial, dado que un resultado positivo disminuye en gran medida la posibilidad de otra alteración molecular accionable. Si el estudio de *KRAS* es realizado previo al estudio de *EGFR*, *ALK* o *ROS1*, el laboratorio debe asegurarse que la cantidad de tumor disponible sea suficiente para el estudio de *EGFR*, *ALK* y *ROS1* en el marco de tiempo recomendado, especialmente en caso de un resultado negativo para *KRAS*. De forma similar, la presencia de mutación de *KRAS* hace improbable la presencia de alteraciones en otros oncogenes como *RET*, *ERBB2* (*HER2*) y *BRAF*. En este contexto, una evaluación rápida y dirigida de *KRAS* puede ayudar a determinar o no si un paciente *EGFR/ALK/ROS1* “wild type” puede verse beneficiado por el estudio de un panel ampliado de genes, dado que un panel amplio más probablemente beneficie a pacientes no mutados para *KRAS*. Sin embargo, en la medida que la tecnología evoluciona, este modelo podría cambiar más adelante ya que métodos nuevos ultrasensibles han mostrado co-ocurrencia de mutaciones driver que incluyen *KRAS* en subpoblaciones tumorales, algo que no había sido detectado por métodos menos sensibles.<sup>105-106</sup>

**7. Opinión del consenso de expertos:** el estudio de *MET* como estudio único no está indicado por fuera del contexto de un ensayo clínico. Es apropiado incluir a *MET* como parte de un panel de varios genes ya sea inicialmente o luego de que el estudio de *EGFR*, *ALK* y *ROS1* resultaron negativos.

La fortaleza de la evidencia que apoya el estudio de *MET* es inadecuada. Esta afirmación está basada en evidencia y respaldada por 7 estudios<sup>107-113</sup> que incluyen 1 MA,<sup>107</sup> un ensayo clínico fase II randomizado controlado,<sup>109</sup> 1 ECP<sup>110</sup> y 4 ECRs.<sup>111-112-113</sup> Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 18 SDC). Referirse a tabla 19 de SDC para un resumen de los hallazgos que avalan el uso del estudio molecular de *MET*.

Inicialmente reportada como un mecanismo de resistencia secundaria a la terapia con inhibidores tirosina quinasa de EGFR en pacientes con mutaciones de *EGFR*,<sup>114-115</sup> el entendimiento de los mecanismos de activación de *MET*, así como la utilidad de su estudio, han pasado por diferentes etapas. La ganancia de copias de *MET* fue inicialmente reconocida en asociación a la resistencia secundaria al uso de inhibidores de EGFR,<sup>114</sup> resultando en el desarrollo de terapias dirigidas que tuvieron resultados decepcionantes.<sup>116</sup> Más recientemente, el interés por las terapias dirigidas a *MET* se ha reavivado por el descubrimiento de mutaciones activadoras que podrían responder a terapia dirigida.

El gen *MET* codifica al receptor de factor de crecimiento hepatocitario (HGFR) y su activación tiene funciones pleotrópicas promoviendo la supervivencia celular, la proliferación, motilidad, invasión y transición epitelio-mesenquimática.<sup>117-120</sup> HGFR puede activarse y dirigir la oncogénesis a través de diferentes mecanismos que incluyen 1) la amplificación, resultando en una alta expresión del receptor,<sup>121-122</sup> (2) las mutaciones del dominio tirosina quinasa que resultan en una activación constitutiva del receptor,<sup>123</sup> y (3) las mutaciones de empalme que resultan en la omisión (mutaciones skipping) del exón 14 y pérdida de Y1003, el sitio de unión CBL (Casitas-b lymphoma proto-oncogene) requerido para la degradación de la proteína mediada por ubiquitina.<sup>124</sup> Si bien la mayoría de las mutaciones “exón skipping” involucran sitios canónicos de empalme algunas se sitúan más lejos hacia secuencias intrónicas y por ende pueden ser difíciles de interpretar o pueden no ser detectadas por ensayos que examinan solamente los exones y los sitios aceptores y dadores 3' y 5' inmediatamente adyacentes.

Las mutaciones activadoras de *MET* son inhibidas por crizotinib, un tratamiento para los carcinomas de pulmón con rearrreglo de *ALK* y *ROS1*. A pesar de la asociación reportada entre la amplificación de *MET* y la sobreexpresión de la proteína como un marcador de mal pronóstico y a estudios recientes, que muestran que los pacientes con amplificación de *MET* y mutaciones del exón 14 son sensibles a crizotinib en algunos casos, no hay terapias dirigidas aprobadas para tratar a pacientes con aberraciones genómicas de *MET*.<sup>126-130</sup> En este contexto, el estudio de rutina como gen único para aberraciones genómicas de *MET* o para el nivel de proteína de HGFR no está indicado fuera de un ensayo clínico. Sin embargo, estas aberraciones de *MET* deberían ser incluidas en las pruebas con paneles de genes, cuando se utiliza un estudio multiplex para detectar posibles drivers oncogénicos en cáncer de pulmón de manera inicial o bien luego de que *EGFR/ALK/ROS1* resultaron negativos,

Hasta la fecha, más de 100 mutaciones somáticas de sitio de empalme han sido descritas que resultan en la omisión (skipping) del exón 14 de *MET*. Las mutaciones exhiben una gran variedad de composición de secuencias, que van desde pequeñas inserciones, a inserciones y deleciones complejas y variantes de nucleótido único, que están principalmente ubicadas en sitios dadores y aceptores. Las mutaciones puntuales ubicadas más lejos en secuencias intrónicas no codificantes, adyacentes a los sitios aceptores, también han sido reportadas con cierta frecuencia, aunque muchos ensayos no evalúan estas regiones. En general, la incidencia global y el efecto de estas mutaciones menos frecuentes de empalme de exones no ha sido definido.

Dada la variabilidad y complejidad de las mutaciones que afectan al exón 14, los estudios exhaustivos de genes pueden ser desafiantes dependiendo del método utilizado. Los ensayos dirigidos basados en NGS que evalúan *MET* como parte de un panel de genes son de elección para fines de screening. Para estudios basados en DNA, el diseño debería ser tal que permita una secuenciación completa y adecuada del exón 14 y sus intrones adyacentes. Las mutaciones nuevas, en particular aquellas que afectan las regiones adyacentes a los sitios de empalme, pero más lejanas dentro de los intrones, pueden requerir confirmación con ensayos basados en RNA. De forma alternativa, también pueden utilizarse estudios basados en RNA que evalúan *MET* como parte de un panel mayor de genes diseñados para una evaluación exhaustiva de variantes estructurales o expresión génica.

La hibridación in situ fluorescente ha sido utilizada tradicionalmente para la detección de amplificación génica en la práctica clínica. En la actualidad, no hay guías que definan el punto de corte para *MET* en muestras de cáncer de pulmón. La amplificación de *MET* ha sido definida utilizando proporciones MET:CEP7 que han sido definidos como bajos (>1.8 a < 2.2), intermedios (>2.2 a <5) y altos (>5). Otros criterios de positividad para *MET* por FISH incluyen 5 o más señales por célula y proporción MET:CEP7 de 2 o más (Pathvysion, Abbott Park, Illinois). Los niveles bajos e intermedios de amplificación pueden ocurrir simultáneamente con otras mutaciones oncogénicas y rearrreglos de genes (*KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *ERBB2* [*HER2*], *ALK*, *ROS1*, *RET*) en hasta el 63% de los carcinomas de pulmón.<sup>133</sup> Esta superposición no ha sido

observada en tumores con alta amplificación de *MET* (proporción *MET*:*CEP7* mayor o igual a 5) sugiriendo que la amplificación de *MET* es probablemente un driver oncogénico verdadero.<sup>133</sup> Este grupo de tumores con altos niveles de amplificación han mostrado responder a crizotinib, mientras que aquellos con amplificaciones de niveles bajo e intermedio no lo han mostrado. Es importante recalcar que el 20% de los carcinomas con mutaciones “skipping” del exón 14 tienen amplificaciones concurrentes de alto nivel de *MET*, confundiendo la interpretación de cada uno.<sup>125-126-129</sup> Respecto del significado de la amplificación única, reportes de casos han mostrado respuesta a crizotinib.<sup>134-135</sup>

Lo mismos desafíos existen respecto de la definición de un punto de corte válido para *MET* en el contexto de resistencia adquirida a inhibidores de tirosina quinasa de *EGFR*. Un estudio reciente fase II mostró una tasa de respuesta de 40% en pacientes con resistencia adquirida a inhibidores de tirosina quinasa de *EGFR* y un número de copias de *MET* de 5 o más cuando fueron tratados con una combinación de gefitinib y capmatinib,; sin mostrar respuesta en el grupo con número de copias de *MET* menor a 5.<sup>136</sup>

La inmunohistoquímica para la proteína de *MET* realizada en tejido fijado en formol e incluido en parafina ha sido el método más frecuentemente usado en especímenes de cáncer de pulmón. Existen un número de anticuerpos comerciales mono y policlonales disponibles, dirigidos a varios epítomos de *MET* con sensibilidades y especificidades variables tanto para *MET* total como para *MET* fosforilado. Los procedimientos de inmunohistoquímica y de score para evaluar *MET* no han sido estandarizados hasta la fecha. Como resultado de esto, la sobre expresión de *MET* en casos de CPNCP no seleccionados ha sido reportado en un rango que va de 20 a 70%.<sup>137-138</sup> Un metaanálisis mostró que la expresión de *MET* por inmunohistoquímica en CPNCP es un factor de mal pronóstico en pacientes con CPNCP resecaados quirúrgicamente.<sup>107</sup> Un anticuerpo comercial frecuentemente utilizado, en particular en ensayos clínicos, es el CONFIRM antitotal *MET* (SP44), un anticuerpo primario monoclonal de conejo (Ventana Medical Systems, Tucson Arizona) dirigido contra un epítomo citoplasmático y de membrana de *MET*.<sup>109</sup> Al tiempo de esta publicación, todavía no es claro si la sobreexpresión de *MET* o *MET* fosforilada constituyen un indicador fiable de activación de *MET*. Tanto la IHQ como el FISH de *MET* no son predictivos de eficacia de onartuzumab combinado con erlotinib en pacientes con CPCNP avanzado.<sup>116</sup>

Otros genes: el espectro de alteraciones recurrentes de cáncer de pulmón continúa evolucionando y han sido reportadas varias alteraciones con resultados prometedores que no se han incluido en esta recomendación. Estas incluyen fusiones que involucran a los genes de la familia de *NTRK* y *FGFR*, ambos de los cuales tienen inhibidores blanco-experimentales con respaldo de evidencia in vitro y en reportes de casos. Ninguna guía puede estar completamente al día y los profesionales dedicados al cuidado de pacientes con cáncer de pulmón deben mantenerse actualizados de éstos y otros desarrollos. La tabla 5 incluye la lista de biomarcadores emergentes en el estudio molecular del cáncer de pulmón.

## **Pregunta 2. ¿Qué métodos deberían ser utilizados para realizar estudios moleculares?**

**8. Recomendación:** La inmunohistoquímica es un equivalente alternativo al FISH para el estudio de *ALK*.

La fortaleza de evidencia que respalda el uso de inmunohistoquímica para el estudio de *ALK* es adecuada. Esta recomendación está basada en evidencia y respaldada por 20 estudios<sup>61-111-139-156</sup> que incluyen 6 ECP,<sup>61-139-141-143-154</sup> 3 ECPR,<sup>140-146-155</sup> y 11 ECR.<sup>111-144-145-147-153-156</sup> De los 20 estudios, 19 utilizaron el FISH como test de referencia estándar para evaluar el potencial diagnóstico de la IHQ.<sup>111-145-147-153-156</sup> El estudio remanente utilizó la IHQ como estudio de referencia y el FISH como el estudio a evaluar.<sup>144</sup> Utilizando los valores reportados de verdadero positivo, falso positivo, verdadero negativo y falso negativo de 14 estudios que utilizaron el FISH como ensayo de referencia, se condujo un metaanálisis para definir la sensibilidad y especificidad agrupadas para la IHQ.(Figura 2) Todos los estudios fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 18 de SDC). Referirse a tabla 21de SDC para un resumen de los hallazgos que avalan el uso de inmunohistoquímica para evaluar *ALK*.

Al momento de la guía original, el único estudio con evidencia de utilidad clínica de estudios prospectivos que seleccionaron pacientes para el tratamiento con crizotinib era el FISH break apart, que se interpretaba como positivo si al menos el 15% de las células evaluadas mostraban señales de separación de al menos dos diámetros de señal o un patrón 3´único (con delección 5´). El ensayo de FISH de *ALK* puede ser técnicamente desafiante, en particular en los casos en los que se hallan cercanos al punto de corte del 15%. Los ensayos de FISH, en general, están limitados por su alto costo, necesidad de personal especializado para la interpretación, disponibilidad limitada de equipos, espacio y personal para el estudio. Sin embargo, la

inmunohistoquímica de ALK también puede tener variaciones en la tinción entre diferentes anticuerpos, protocolos e interpretación.

Por todas estas razones, se han propuesto diferentes enfoques para la identificación de rearrreglos de *ALK* en cáncer de pulmón. Muchos estudios se han enfocado en la inmunohistoquímica como un método difundido y costo efectivo. En el año 2013, la IHQ había mostrado resultados comparables al FISH en algunos estudios, pero variaciones significativas entre anticuerpos y métodos y una limitada disponibilidad en el mercado de los anticuerpos más específicos, que impidieron hacer una recomendación en ese entonces.

Para el año 2016, sin embargo, numerosas publicaciones<sup>61-111-139-156</sup> han establecido el rendimiento técnico de varios ensayos de inmunohistoquímica y su correlación con los resultados de FISH. Una observación temprana importante fue que la cantidad de expresión de la proteína de fusión en los CPNCP con rearrreglos de *ALK* es menor a la hallada en linfoma de células grandes anaplásico, de quien el gen obtuvo su nombre y para lo cual fueron desarrollados los primeros anticuerpos.<sup>157</sup> El anticuerpo ALK1 (monoclonal de conejo antihumano CD246 clon ALK1), típicamente utilizado para diagnosticar linfoma de células grandes anaplásico, falló en identificar un número significativo de casos de CPNCP con rearrreglo de *ALK* utilizando técnicas estándar.<sup>140-158-161</sup> Para superar este problema, se han aplicado diversos pasos técnicos como amplificación de tiramida y sistemas de detección basados en polímeros. A pesar de estos avances, a pesar de que el anticuerpo ALK1 tiene buena especificidad (91-99%), su sensibilidad es baja, con rangos de entre 67-100% y es por esto que no se recomienda su utilización para el screening de rearrreglos de ALK en CPNCP.

De manera subsecuente, los ensayos basados en dos anticuerpos comerciales, el monoclonal de ratón 5A4 (Novocastra, Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois) y el monoclonal de ratón D5F3 (Ventana), mostraron sensibilidades y especificidades clínicamente aceptables, con rangos entre el 95-100% cuando se compararon con resultados de FISH.<sup>61-11-139-141-156</sup> Los estudios también mostraron que la positividad por inmunohistoquímica para la expresión de la proteína también se correlaciona con la respuesta a inhibidores, aún en casos negativos para *ALK* por FISH.<sup>162</sup> En los Estados Unidos un ensayo que utiliza el anticuerpo D5F3 (Ventana) está aprobado por FDA para la selección de pacientes con cáncer de pulmón para recibir tratamiento con crizotinib.

Basado en la evidencia publicada, los ensayos de inmunohistoquímica correctamente validados que usen los clones 5A4 y D5F3 son una alternativa equivalente al uso de FISH para *ALK*. Un metaanálisis sobre 14 estudios que usaron FISH como referencia estándar determinó una sensibilidad agrupada de 97% (95% intervalo de confianza, 93-98%) y una especificidad agrupada de 99% (95% intervalo de confianza, 97-100%) para la inmunohistoquímica de ALK para ambos clones 5A4 y D5F3. (Figura 2) El laboratorio puede elegir el clon que desee basado en su precisión analítica, su sensibilidad y especificidad clínica en concordancia con los estándares publicados. La IHQ de ALK es una alternativa aceptable en relación al FISH y cuando los resultados son negativos o claramente positivos, ya sea con tinción granular intensa con o sin acentuación de membrana, pueden establecerse las decisiones de tratamiento; sin embargo, una tinción débil puede ser de difícil interpretación y cada laboratorio debe, durante el proceso de validación, determinar la especificidad del patrón de tinción débil en relación al FISH. Algunos casos pueden ser difíciles de interpretar debido a la heterogeneidad de fijación/preservación y/o artefactos de tinción específicos tales como tinción citoplásmica débil en macrófagos alveolares, células neurales, mucina extracelular, necrosis y epitelio glandular. En estas situaciones, estos casos deben ser evaluados por un método validado (ej. FISH, RT-PCR, NGS)<sup>141-146</sup>.

Aislados casos han sido descritos con resultados discordantes entre las determinaciones de ALK por FISH y por IHQ. En los ensayos con resultado discordante, con resultados de FISH positivo e IHQ negativo, se vio que estos mostraron un menor porcentaje de células tumorales con rearrreglo (15% -20%). En un caso que presente un bajo porcentaje de núcleos positivos para el rearrreglo, no se pueden descartar, con seguridad, errores técnicos. Estudios recientes sugieren que un patrón de delección 5' puede representar, más comúnmente, un resultado falso-positivo con resultado de IHQ discrepante que un caso con patrón de FISH de señal dividido.<sup>163-165</sup> Sin embargo, es importante destacar, que los resultados clínicos de pacientes con resultados discrepantes de FISH e IHQ no han mostrado un patrón consistente de superioridad de un método sobre el otro.<sup>156, 166</sup>

Los métodos de RT-PCR y NGS, cuando están diseñados para la detección de la mayoría de las fusiones, han demostrado resultados comparables con la IHQ para determinar el status de *ALK* y son una práctica estándar en muchos otros países<sup>163-165,167</sup>, sin embargo, al momento de escribir esta guía no han sido aprobados en Estados Unidos por FDA como métodos de primera línea en la selección de pacientes para terapia con inhibidores de ALK.<sup>163-165</sup> Estos métodos son altamente específicos para la mayoría de las fusiones,<sup>97, 168, 169</sup> y los pacientes con resultados positivos deben ser tratados con un inhibidor de ALK, no obstante, los pacientes con resultados negativos podrían beneficiarse de un método más sensible para excluir la posibilidad de una variante de fusión. De manera similar, los análisis de ADN por NGS basados en amplicón pueden igualmente

no detectar todas las variantes de fusión, y por lo tanto, se prefiere para el estudio de *ALK* por NGS un método de captura de ADN o ARN. Los datos actuales son todavía demasiado limitados para desarrollar una recomendación específica a favor o en contra del uso de NGS para las fusiones de *ALK* como único determinante de la terapia con inhibidores de ALK.

## Secuenciación de Nueva Generación (Next-Generation Sequencing)

**9. Opinión del consenso de expertos.** -- Para la identificación de otras opciones terapéuticas más allá de *EGFR*, *ALK* y *ROSI*, es preferible utilizar los paneles de secuenciación genética multiplex a la realización de múltiples pruebas de un gen único.

La fortaleza de evidencia que respalda el uso de paneles de secuenciación genética multiplex en comparación con las pruebas de un gen único es inadecuada. Esta afirmación está basada en la evidencia y respaldada por 5 estudios, <sup>169-173</sup>, que comprenden 1 ECP, 172 2 ECRP, <sup>171,173</sup> y 2 ECR. <sup>169,170</sup>. Todos los estudios incluidos fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 22 del MS). Referirse a la tabla 23 del MS para un resumen de los hallazgos de los estudios que avalan el uso de paneles de secuenciación genética multiplex.

La rápida y reciente aparición de la llamada NGS, o secuenciación masiva en paralelo, ha cambiado considerablemente la práctica de los diagnósticos moleculares en cáncer de pulmón y en otros contextos. Esta tecnología implica la separación espacial de moléculas de ADN individuales de una muestra, la amplificación por PCR (con o sin una etapa previa de captura de hibridación) de regiones predeterminadas del genoma, y la secuenciación en paralelo mediante la síntesis de cada molécula de ADN amplificada a gran escala, seguida por el procesamiento computacional de datos para recombinar e identificar las secuencias y proporcionar una visualización digital de las características genómicas de cada muestra. Esta tecnología permite la evaluación de múltiples regiones genómicas de una vez, incluyendo todo el genoma, de manera sensible y específica. Los recursos necesarios para la implementación clínica de NGS son considerables y los ensayos son complejos en cuanto al diseño, rendimiento e interpretación. En consecuencia, esta tecnología no se implementa de manera universal. No obstante, múltiples instituciones académicas y compañías privadas han utilizado esta tecnología para la evaluación de las mutaciones genéticas del cáncer a escala en comparación con la realización de análisis múltiples de un gen único proporcionando un método de ADN relativamente costo-efectivo. En la primera guía, esta tecnología era nueva y experimental, pero actualmente se encuentra bien desarrollada. A principios del año 2017 se publicaron guías de práctica profesional sobre la validación <sup>174</sup>, interpretación y reporte <sup>17</sup> de los ensayos de NGS para el cáncer.

NGS permite la evaluación simultánea de los 3 genes de "prueba obligatoria" en el cáncer de pulmón -*EGFR*, *ALK*, *ROSI*- así como de cada uno de los genes sugeridos para su inclusión en un panel más grande -*BRAF*, *RET*, *ERBB2 (HER2)*, *KRAS*, *MET*- y de cientos a miles de otros genes que pueden tener un papel potencial en el desarrollo del cáncer. Además de pequeñas mutaciones, los ensayos NGS pueden detectar fusiones / reordenamientos y cambios en el número de copias en los genes dirigidos, siempre que estos sean diseñados teniendo en cuenta estas alteraciones.

Numerosos estudios <sup>169-173</sup> han demostrado la excelente sensibilidad de los métodos de NGS en relación con los ensayos dirigidos de un gen-único, particularmente para las mutaciones de sustitución de un solo nucleótido.

Los métodos de secuenciación de nueva generación típicamente requieren menos ADN y pueden utilizar muestras más pequeñas con concentraciones más bajas de células malignas, y, aunque típicamente requieren más tiempo que un ensayo de un gen único, pueden a menudo realizarse con mayor rapidez que los ensayos secuenciales de múltiples genes individuales <sup>175, 176</sup>. Otro beneficio del uso de pruebas con paneles es la disminución de la necesidad de la retoma de biopsia.

En oncología molecular se utilizan dos diseños básicos de ensayos NGS: unos basados en amplicones y otros basados en la captura híbrida. Ambos diseños generan, utilizando una de varias plataformas de secuenciación, una "biblioteca" de ADN amplificado que es secuenciado como moléculas individuales. Para generar la biblioteca, la secuenciación de amplicones utiliza múltiples reacciones de PCR y generalmente resulta más sencilla, rápida y es capaz de detectar mutaciones a frecuencias alélicas más bajas (ej poblaciones sub clonales). Sin embargo, resulta más adecuada para ensayos menos complejos, que requieran un menor número de genes, y típicamente se utiliza para el análisis de "hotspots" de oncogenes o pequeñas regiones seleccionadas de genes de interés. En su forma básica, no permite detectar de manera confiable fusiones o variaciones en el número de copias. La alta sensibilidad analítica de este método lo hace adecuado para muestras muy pequeñas o heterogéneas. Por el contrario, los métodos basados en capturas utilizan la

hibridación para generar la biblioteca, son más complejos e implican un mayor número de pasos, requiriendo mayor tiempo del estudio, no obstante, son mejores cuando se quiere evaluar un conjunto más grande de genes o regiones genómicas, sin embargo, estos métodos suelen ser menos sensibles en muestras muy heterogéneas o pequeñas. En general, los métodos basados en captura pueden ser preferibles para los estudios iniciales de muestras de cáncer de pulmón con el fin de detectar reordenamientos, como en *ALK* y *ROS1*, así como un rango más amplio de marcadores genéticos potenciales. Para el monitoreo durante la resistencia clínica secundaria (ej, *EGFR*) donde se necesita un rango más estrecho de mutaciones posibles y se puede contar con muestras más pequeñas o más heterogéneas, se puede preferir la secuencia de amplicones; sin embargo, cualquiera de los métodos puede diseñarse e implementarse con éxito para cualquiera de las aplicaciones.

**10. Opinión del consenso de expertos.** Los laboratorios deben garantizar que los resultados de las pruebas que son inesperados, discordantes, equívocos o de poca confianza se confirmen o resuelvan con un método o muestra alternativa.

La fortaleza de la evidencia que respalda el uso rutinario de métodos ortogonales para confirmar los resultados de cualquiera de los marcadores moleculares es insuficiente. Sin embargo, nuestra opinión es que una buena práctica de laboratorio para las alteraciones somáticas es realizar pruebas confirmatorias para resultados que son inusuales, subóptimos o inconsistentes con otros hallazgos de laboratorio o información clínica.

Todos los ensayos deben validarse adecuadamente antes de ofrecerse para uso clínico. Esto generalmente incluye evaluación de la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, además de otras características de desarrollo, tal como lo exigen la mayoría de las autoridades que certifican los laboratorios. Las características de rendimiento de los ensayos basados en secuenciación se pueden determinar fácilmente para las alteraciones más comunes. La confiabilidad de las mutaciones infrecuentes o de categorías específicas de alteraciones cromosómicas pueden ser más difíciles de documentar, y los laboratorios que usan esas tecnologías deben contar con procedimientos establecidos para verificar cualquier resultado que sea inesperado, discordante con otros resultados, equívoco o de seguridad comprometida, con el fin de proporcionar un resultado óptimo para el cuidado del paciente y comprender mejor cualquier limitación intrínseca del test. La corroboración de estos resultados cuestionables se puede buscar mediante la evaluación de una muestra representativa de otra área de la misma lesión, pruebas de confirmación en otro laboratorio o evaluación mediante una metodología ortogonal.

**Pregunta 3: ¿Las pruebas moleculares son apropiadas para los cánceres de pulmón que no tienen un componente de adenocarcinoma?**

**11. Opinión del consenso de expertos.** -- Cuando las características clínicas indican una alta probabilidad de un driver oncogénico, los médicos pueden utilizar las pruebas de biomarcadores moleculares en tumores con histologías diferentes de adenocarcinoma.

La fortaleza de la evidencia que apoya el uso de pruebas de biomarcadores moleculares en cánceres de pulmón que carecen de un componente de adenocarcinoma es insuficiente. Esta declaración se basa en opinión del consenso de expertos.

Luego de una revisión sistemática, no hay evidencia nueva establecida para la utilización de las pruebas moleculares de rutina de ningún gen para el carcinoma de células escamosas típico, el carcinoma de células pequeñas u otros tumores neuroendocrinos de pulmón. Aunque pequeños estudios han reportado mutaciones raras de *EGFR* en biopsias de carcinoma de células escamosas, estos pueden haber pertenecido a un muestreo parcial de tumores adenoescamosos y no se han confirmado en muestras correspondientes a resecciones completas con histología escamosa confirmada.<sup>177</sup> La evidencia de estudios controlados y correctamente desarrollados, que respaldan la utilidad clínica de las pruebas moleculares de cánceres de pulmón para la selección de terapias dirigidas, permanece confinada a los carcinomas de pulmón no escamosos-no células pequeñas, predominantemente adenocarcinomas o cánceres mixtos con un componente de adenocarcinoma. Sin embargo, el uso de criterios estrictos en la categorización histológica de adenocarcinomas puede ocasionalmente excluir a algunos pacientes que no tienen un diagnóstico definitivo de adenocarcinoma (ej., carcinoma de pulmón no células pequeñas, sin especificar) y podrían beneficiarse de la terapia dirigida, particularmente para biopsias pequeñas que representan parcialmente un tumor más grande. Aunque se han informado mutaciones accionables en biopsias con subtipos no-adenocarcinoma-no células pequeñas, la frecuencia de tales hallazgos es lo suficientemente baja por lo que no se recomienda analizar todas las muestras de biopsias pequeñas con histología no-adenocarcinoma. En este contexto, es apropiado realizar el

estudio molecular en cánceres de pulmón con características histológicas no células pequeñas diferentes de adenocarcinoma cuando las características clínicas son atípicas y/o consistentes con una mayor probabilidad de la presencia de una mutación dirigida. Los principales factores clínicos que pueden indicar una mayor probabilidad de la presencia de un driver oncogénico accionable en el contexto de una histología no-adenocarcinoma son: la edad joven y la ausencia de exposición al tabaco. En las histologías no-adenocarcinoma-no células pequeñas, el hallazgo de alteraciones de *EGFR*, *ALK* o *ROS1* han sido notificados más comúnmente en situaciones en las que los pacientes tenían un mínimo (1-10 paquetes por año) o ningún antecedente de exposición al tabaco.<sup>30,159-161,178-214</sup> Por lo tanto, en todo el espectro de carcinomas de pulmón, la exposición al tabaco leve o ausente debe ser una razón suficiente para realizar rápidamente las pruebas, independientemente de la metodología de muestreo o de la completa exclusión del componente de adenocarcinoma.

De manera similar, algunos estudios han sugerido asociaciones entre la presencia de alteraciones de *ALK* o *ROS1* y edad más joven del paciente.<sup>30,35,181,215,216</sup> Aunque otros estudios han indicado que estos hallazgos pueden reflejar un sesgo de las pruebas,<sup>217</sup> la documentación de una asociación entre la edad más joven del paciente y un biomarcador accionable es otra consideración en la selección de pacientes para estudio molecular. Sin embargo, el límite entre jóvenes y no jóvenes no está bien definido, y no se puede establecer para esta guía un límite claro basado en la evidencia. La revisión sistemática de la guía original (año 2013)<sup>1</sup> demostró que los pacientes con adenocarcinoma con mutaciones de *EGFR* tenían una edad media significativamente menor que los pacientes sin mutaciones (56 versus 63, P=.03), aunque la diferencia entre las edades medias para los pacientes con y sin fusiones *ALK* no fue significativa (60 versus 66), ni la diferencia en las edades medias para los pacientes con y sin fusiones *ROS1* de esta revisión (65 versus 62), y la diferencia en los promedios no capta completamente la distribución de las edades y, en consecuencia, la sensibilidad y especificidad de cualquier límite de edad determinado. En ausencia de evidencia publicada, nuestra opinión es que una estrategia razonable sería evaluar a pacientes menores de 50 años con histología de no-adenocarcinoma.

Es de destacar que los algoritmos de pruebas reflejas (reflex test) iniciados y/o llevados a cabo por patólogos deben adaptarse a las complejidades del manejo clínico, lo que puede ser un desafío, ya que a menudo, no está disponible la información clínica suficiente para que los patólogos la incluyan en su evaluación. El desarrollo de un programa para pruebas moleculares reflejas de muestras de cáncer de pulmón debe ser una decisión institucional, y debería incluir un diálogo abierto entre los patólogos y los equipos de oncología, a fin de establecer una estrategia óptima. No obstante, una vez que el equipo establece esas prácticas, las pruebas reflejas iniciadas por el patólogo son razonables.

Por último, en el contexto del uso creciente de pruebas basadas en paneles / basadas en NGS, podría ser innecesario identificar marcadores específicos de interés en situaciones clínicas específicas, en lugar de identificar situaciones clínicas en las que las pruebas basadas en paneles podrían ser beneficiosas.

#### **Pregunta 4: ¿Qué pruebas están indicadas en pacientes con mutaciones accionables que han recaído durante el curso de terapias dirigidas?**

**12. Fuerte recomendación.** En pacientes con adenocarcinoma de pulmón que albergan mutaciones de *EGFR* sensibles y que han progresado luego del tratamiento con una TKI dirigida contra EGFR, las pruebas mutacionales de *EGFR* T790M deben utilizarse para guiar la selección del tratamiento con inhibidores de EGFR de tercera generación.

La fortaleza de la evidencia fue adecuada para apoyar el uso de la prueba de mutación *EGFR* T790M al momento de seleccionar pacientes para terapia de tercera generación dirigida a EGFR. Esta afirmación está basada en la evidencia y respaldada por 5 estudios<sup>218-222</sup>, incluidos 1 MA,<sup>222</sup> 2 ensayos clínicos no aleatorizados de fase 1 de una rama,<sup>220,221</sup> 1 ECP,<sup>219</sup> y 1 ECR.<sup>218</sup> Todos los estudios incluidos fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (tabla 24 del MS). Referirse a la tabla 25 del material suplementario para obtener un resumen de los hallazgos de los estudios que respaldan el uso de la prueba de mutación *EGFR* T790M cuando se seleccionan pacientes para la terapia dirigida contra-EGFR de tercera generación.

**13. Recomendación.** Los laboratorios que realizan las pruebas de la mutación del *EGFR* T790M en pacientes con resistencia clínica secundaria a los inhibidores de la quinasa dirigidos contra EGFR deben implementar ensayos capaces de detectar mutaciones del *EGFR* T790M en tan solo el 5% de los alelos de *EGFR*.

La fortaleza de la evidencia que apoya esta recomendación es insuficiente. Esta recomendación está basada en la sensibilidad analítica del ensayo de PCR en tiempo real alelo-específico utilizado en ensayos clínicos que

establecieron la utilidad de los inhibidores de EGFR de tercera generación dirigidos contra la proteína mutante T790M.

El principal mecanismo de resistencia clínica secundaria a la primera generación de inhibidores TK de EGFR, erlotinib y gefitinib, es el desarrollo de la mutación T790M en el mismo alelo de *EGFR* que alberga la mutación sensibilizante original, bloqueando la inhibición de la proteína mutante por estos TKIs. En este contexto, la detección de la mutación de *EGFR* T790M se ha vuelto clínicamente necesaria debido al desarrollo de TKIs de EGFR de tercera generación, como osimertinib, los cuales son activos en presencia de esta mutación.<sup>223, 224</sup> Sin embargo, aunque se han reportado raras respuestas a inhibidores de tercera generación en la enfermedad negativa para la mutación de *EGFR* T790M,<sup>225</sup> tales casos pueden albergar otros mecanismos de resistencia tales como la amplificación *MET* o *ERBB2*,<sup>90,114,226</sup> que pueden ser accionados más eficazmente por otros agentes. Por lo tanto, determinar la terapia apropiada en el contexto de resistencia clínica secundaria a un inhibidor de EGFR requiere el conocimiento de la presencia o ausencia de la mutación T790M.

Es importante destacar que los mecanismos genéticos de resistencia clínica secundaria surgen de manera subclonal ya que confieren resistencia a la subpoblación de células en las que está presente, y ese sub-clon se expande gradualmente bajo la presión selectiva de inhibidores TKI de EGFR. Estudios experimentales han demostrado que la presencia de una mutación de *EGFR* T790M en una pequeña proporción de una población de células tumorales (tan pequeño como 5%), a menudo indetectable por secuenciación de Sanger, puede conducir a un incremento del crecimiento a pesar del tratamiento con inhibidores de EGFR.<sup>225,227</sup> La detección es aún más desafiante cuando las biopsias contienen una alta proporción de células no tumorales. Estas consideraciones nos llevan a recomendar que los laboratorios deben tener disponible un ensayo de alta sensibilidad para la detección de la mutación de *EGFR* T790M en biopsias post-tratamiento de pacientes que presentan progresión o recaída después de una respuesta inicial a EGFR TKIs.

Los ensayos clínicos<sup>221,228-230</sup> que establecieron la utilidad clínica de las pruebas T790M para predecir la respuesta a osimertinib utilizaron un ensayo comercial de PCR en tiempo real alelo específico con un límite inferior de detección de fracción de alelo mutante del 5%.<sup>231</sup> Varios estudios<sup>232,233</sup> han mostrado una sensibilidad analítica comparable, sino superior, con la PCR digital “droplet”, y los métodos NGS<sup>234,235</sup> también pueden proporcionar este nivel de sensibilidad, dado el diseño de ensayo apropiado. Sin embargo, es importante reconocer que la secuenciación de Sanger no modificada, la cual era un método aceptable en la guía original del año 2013<sup>1</sup>, no proporciona la sensibilidad adecuada para esta aplicación. Independientemente del método elegido, se debe realizar una validación cuidadosa para establecer la sensibilidad adecuada.

Finalmente, se debe señalar que actualmente se están realizando estudios para evaluar el valor de estos inhibidores de EGFR de tercera generación como tratamiento de primera línea del adenocarcinoma de pulmón con *EGFR* mutado.<sup>220, 221, 236</sup> Están surgiendo datos<sup>237</sup> de que una segunda mutación de resistencia adquirida, C797S, puede aparecer en tumores que han progresado después del tratamiento con osimertinib para la enfermedad T790M, pero estos casos son hasta ahora, raros y esta mutación ha sido poco estudiada y no es tratable en la actualidad, por lo que, por el momento, no se recomienda la prueba de C797S para el estudio de rutina.

**14. Sin recomendación.** -- Actualmente no hay suficiente evidencia para respaldar una recomendación a favor o en contra de la prueba de rutina para el estado mutacional de *ALK* para pacientes con adenocarcinoma de pulmón con mutaciones *ALK* sensibilizantes que han progresado después del tratamiento con un inhibidor TKI dirigido contra- *ALK*.

La evidencia fue insuficiente para informar una recomendación sobre la asociación entre el pretratamiento o el descubrimiento de la resistencia secundaria a *ALK* en una re-biopsia y los resultados clínicos.

Varios grupos han reportado un conjunto diverso de mutaciones secundarias en *ALK* que confieren resistencia adquirida a crizotinib (ej., L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, L1198P, D1203N y G1269A)<sup>238</sup>. Para los inhibidores de *ALK* de segunda línea, también se han informado otras mutaciones adquiridas (G1202R, G1202del, V1180L, S1206Y, E1201K).

Sin embargo, aunque algunos estudios<sup>238</sup> han sugerido que diferentes mutaciones secundarias de *ALK* pueden mostrar sensibilidad o resistencia a diferentes inhibidores de *ALK*, estos datos son aún limitados e insuficientes para guiar la selección del tratamiento en el contexto de la resistencia adquirida. Además, los inhibidores de *ALK* de segunda generación también muestran actividad en CPNCP sin mutaciones de resistencia a *ALK*, lo que sugiere que una proporción significativa de carcinomas de pulmón con el reordenamiento de *ALK* se vuelven resistentes a crizotinib debido a una supresión inadecuada de *ALK*.

En consecuencia, la práctica actual es administrar uno de varios inhibidores de ALK de segunda generación (ceritinib, brigatinib, lorlatinib y alectinib) que han recibido aprobación de la FDA para el tratamiento de CPNCP con rearrreglo de *ALK* y refractario a crizotinib, sin realizar las pruebas para mutaciones secundarias de *ALK*.

A medida que más pacientes experimentan resistencia y reciben inhibidores de segunda generación, anticipamos la maduración de los datos para fortalecer la asociación entre la mutación secundaria y la sensibilidad/resistencia a diferentes inhibidores.

Por ahora, sin embargo, creemos que la utilidad clínica es insuficiente para justificar la realización de pruebas de detección de mutaciones secundarias de *ALK* en pacientes que han recaído después de la respuesta inicial a un inhibidor de ALK.

**Pregunta 5: ¿Cuál es el papel de las pruebas de ADN celular libre circulante (cfDNA) para pacientes con cáncer de pulmón?**-- Numerosos estudios recientes<sup>99,100,239</sup> han demostrado que las células de cáncer de pulmón vierten su ADN a la circulación en niveles que son detectables con varias tecnologías modernas, tales como la PCR digital “droplet”, PCR alelo específica y NGS. Este evento permite la prueba del ADN celular libre circulante obtenido a partir de muestras de sangre periférica, al menos en algunos casos, como una alternativa a una muestra de biopsia, para identificar mutaciones que ocurren en el cáncer de pulmón tanto en el diagnóstico como durante el curso de la enfermedad.

Una ventaja teórica de estos ensayos es la derivación de ADN tumoral circulante a partir de múltiples sitios de la enfermedad y, por lo tanto, puede representar una medida integradora de todos los sitios de la enfermedad. Aunque no está probado formalmente, esta ventaja potencial del cfDNA es particularmente importante en el contexto de la resistencia clínica secundaria<sup>236</sup>, para permitir un amplio muestreo de diferentes sub-clones tumorales<sup>232,240,241</sup>.

Los métodos analíticos para cfDNA tienen una alta especificidad analítica, con tasas muy bajas (<5% -20%) de falsos positivos,<sup>232,234,235,242,243</sup> de manera que la demostración de una mutación, en el contexto clínico apropiado, puede usarse para guiar el tratamiento con un inhibidor específico. Sin embargo, la sensibilidad del análisis de cfDNA es menor (60%-70%),<sup>232,234,235,242,243</sup> por lo que la ausencia de hallazgo de mutación no excluye la posibilidad de una mutación.

También es importante entender que, a pesar de la promesa que brinda esta tecnología, aún se desconoce mucho sobre la dinámica de la liberación de ADN a partir de las células cancerosas. Los factores que aumentan o disminuyen la liberación de ADN de las células, su vida media en la circulación y los mecanismos de eliminación son poco conocidos.<sup>244-246</sup> Sin embargo, existe una correlación general entre la carga de la enfermedad (tanto el volumen como la cantidad de sitios metastásicos) y la prevalencia de mutaciones en cfDNA.

Finalmente, se pueden aplicar otros métodos de análisis a muestras de sangre. Las células tumorales circulantes se pueden aislar de la sangre, al igual que los exosomas que contienen ADN que han sido liberados por las células cancerosas. El análisis de estas últimas 2 muestras es más desafiante desde el punto de vista técnico y no ha sido suficientemente estudiado en el cáncer de pulmón como para justificar su consideración en esta guía. De modo similar, están surgiendo datos sobre el análisis de cfDNA en otros fluidos corporales, en particular orina, pero son igualmente insuficientes para justificar una recomendación en este momento. La mayoría de los datos hasta la fecha, y el tema de los comentarios que siguen, se aplican al cfDNA plasmático.

**15. Sin recomendación.** --Actualmente no hay evidencia suficiente para apoyar el uso de los métodos moleculares para cfDNA circulante plasmático para establecer un diagnóstico primario de adenocarcinoma de pulmón.

La evidencia fue insuficiente para informar una recomendación sobre el uso de cfDNA para el diagnóstico de adenocarcinoma primario pulmonar.

Teóricamente, debido a que las mutaciones sensibilizantes en *EGFR* son alteraciones características y específicas en cánceres de pulmón, uno podría cuestionar si la combinación de un resultado de cfDNA que muestra dicha mutación en un contexto clínico apropiado, con evidencia radiográfica de una lesión pulmonar, podría permitir un diagnóstico de cáncer de pulmón mutado para *EGFR* sin necesidad de un diagnóstico anatómico-patológico. Sin embargo, ningún estudio en la literatura médica ha evaluado rigurosamente esta aproximación en forma prospectiva.

**16. Recomendación.** --En determinadas situaciones clínicas en las que el tejido es limitado y/o insuficiente para realizar las pruebas moleculares, los médicos pueden usar un ensayo de cfDNA para identificar mutaciones de *EGFR*.

La fortaleza de la evidencia que apoya el uso de cfDNA para determinar el estado de la mutación de *EGFR* en situaciones donde el tejido es limitado o insuficiente es adecuado. Esta afirmación está basada en la evidencia y respaldada por 6 estudios,<sup>232,234,235,242,243,247</sup> que comprenden 2 MA,<sup>243,247</sup> 2 PCS,<sup>235,242</sup> y 2 PRCS.<sup>232,234</sup>

Los estudios identificados utilizaron varios métodos de detección de *EGFR*, pero todos verificaron los resultados de cfDNA con los resultados obtenidos del tejido tumoral. Utilizando datos reportados de verdadero positivo, falso positivo, verdadero negativo y falso negativo de 4 estudios, se realizó un metaanálisis para determinar una estimación agrupada de sensibilidad y especificidad para la detección de la mutación de *EGFR* en cfADN (Figura 3). Todos los estudios incluidos fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (SDC tabla 26). Referirse a la tabla 27 del material complementario para obtener un resumen de los hallazgos de los estudios que respaldan el uso de cfDNA para determinar el estado mutacional de *EGFR* en situaciones en las que el tejido es limitado o insuficiente.

El análisis de cfDNA para mutaciones de *EGFR* tiene sensibilidad intermedia (66,4%, IC 95%, 62,7% - 69,9%) y alta especificidad (95,6%, IC 95%, 83,3% -99,0%) en adenocarcinoma de pulmón (Figura 3). En algunos escenarios clínicos en los que el material de biopsias de tejidos no está disponible o es insuficiente y no es factible la re-biopsia, por lo que no se puede realizar un análisis de *EGFR* basado en tejido, se puede realizar, como procedimiento alternativo de diagnóstico molecular, un ensayo de cfDNA para una mutación activadora de *EGFR*. Debido a que la sensibilidad de este ensayo es inferior al 80% en todos los informes, se debe reconocer que no todos los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con mutación de *EGFR* tendrán la mutación detectada en su cfDNA, por lo que un resultado negativo mediante el análisis de cfDNA no presenta una evidencia confiable de que no hay una mutación de *EGFR* en el cáncer de un paciente determinado. En este contexto, los médicos deberían renovar los esfuerzos para obtener una muestra de tejido adecuada para el análisis.

**17. Opinión del consenso de expertos.**--Los médicos pueden utilizar métodos de cfDNA plasmático para identificar mutaciones de *EGFR* T790M en pacientes con adenocarcinoma de pulmón con progresión o resistencia clínica secundaria a TKI dirigidas a EGFR; se recomienda el testeo en la muestra del tumor si el resultado del plasma es negativo. La fortaleza de la evidencia que apoya el uso de métodos de cfDNA para identificar la mutación *EGFR* T790M es inadecuada. Esta afirmación está basada en la evidencia y respaldada por 4 estudios,<sup>233,236,248,249</sup> que comprenden 2 ECPs<sup>233,236</sup> y 2 ECRs.<sup>248,249</sup> Todos los estudios incluidos fueron revisados para evaluar su calidad y no se hallaron fallas metodológicas que pudieran cuestionar los resultados del estudio (Tabla 28 de SDC). Referirse a la tabla 29 de SDC para obtener un resumen de los resultados de los estudios que respaldan el uso de los métodos de cfDNA para identificar la mutación *EGFR* T790M.

Las pruebas moleculares para la mutación *EGFR* T790M se deben realizar en pacientes con adenocarcinoma de pulmón con mutaciones *EGFR* sensibilizantes cuya enfermedad progresa o muestra resistencia clínica secundaria a TKI EGFR.

Tal prueba es particularmente apropiada porque los inhibidores de EGFR de tercera generación (por ejemplo, osimertinib) han demostrado tener un beneficio significativo para los cánceres mutantes T790M<sup>221</sup> y han sido aprobados para esta indicación por las autoridades sanitarias de todo el mundo. El análisis de cfDNA o el análisis de una nueva biopsia de tejido es apropiado para la detección de *EGFR* T790M. El ADN libre de células puede preferirse para los pacientes que no desean o no pueden someterse a una biopsia en el momento de la progresión; además, como la progresión puede representar procesos sub-clonales, las pruebas de cADN pueden representar un muestreo más global de la enfermedad en comparación con una biopsia de tejido. Sin embargo, el análisis de cfDNA para *EGFR* T790M tiene una sensibilidad intermedia (0,40-0,78) y una alta especificidad.<sup>233,236,248,249</sup> Por lo tanto, un resultado negativo no excluye la posibilidad de que la mutación *EGFR* T790M sea el mecanismo de resistencia al tratamiento con TKI, y se debe considerar una nueva biopsia de tejido de un sitio de enfermedad progresiva si el resultado de cfDNA es de tipo “wild type”.

Obsérvese que las mutaciones de T790M adquiridas son, a menudo, sub-clonales, y una muestra de cfADN podría mostrar la mutación original de *EGFR* sensibilizante (p. Ej., L858R) y aun así tener un resultado falso negativo para T790M, requiriendo, por lo tanto una muestra de tejido o citología para la confirmación; implícito en esto está el beneficio de incluir la mutación sensibilizante original (p. ej., eliminación del exón 19, L858R) en el ensayo para confirmar que el ADN del tumor se está vertiendo a la circulación, aunque esto puede no ser práctico para mutaciones sensibilizantes menos comunes. Por otro lado, debido a la alta especificidad del cfDNA, un hallazgo positivo de T790M en cfDNA es equivalente a un hallazgo de T790M en la biopsia de tejido<sup>236</sup> y puede usarse para guiar la terapia con osimertinib.

**18. Sin recomendación.** -- Actualmente no hay pruebas suficientes para apoyar el uso del análisis molecular de células tumorales circulantes para el diagnóstico de adenocarcinoma primario de pulmón, la identificación

de *EGFR* u otras mutaciones, o la identificación de mutaciones de *EGFR* T790M en el momento de la resistencia a inhibidores de *EGFR*.

La evidencia fue insuficiente para informar una recomendación sobre el uso de células tumorales circulantes para el diagnóstico de adenocarcinoma primario pulmonar.

### **¿Cuál es el rol de las pruebas para la selección de pacientes para el tratamiento con terapias inmunomoduladoras?**

**Opinión--** Debe preservarse el tejido para posibilitar la realización de pruebas para terapias inmunomoduladoras.

**Evidencia.--** Tópico de próximas guías.

Desde la publicación de la última guía, la inmunoterapia en el cáncer de pulmón ha evolucionado rápidamente para convertirse en parte del estándar de cuidado para muchos pacientes con CPNCP avanzado. Cuando se realizan tratamientos con estos agentes, se han demostrado, en estudios recientes <sup>250-254</sup>, beneficios significativos en un subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Las agencias regulatorias gubernamentales han aprobado a las terapias inmunomoduladoras como agentes de segunda línea para pacientes con cáncer de pulmón avanzado, <sup>255-257</sup>, así como terapia de primera línea para pacientes con alto nivel de expresión de PD-L1 y ausencia de mutaciones sensibilizantes de *EGFR* o rearrreglos de *ALK*. Para algunos de estos agentes, se requiere de un “companion diagnostic” para la selección de pacientes, <sup>258</sup> para otros se recomienda un estudio complementario, <sup>259-261</sup> y para algunos no está indicada la selección de biomarcadores. Los presuntos biomarcadores que predicen la respuesta a estos agentes y los métodos utilizados para evaluarlos son variados y aún no han sido estandarizados.

El principio de las terapias inmunomoduladoras es su capacidad para interrumpir la señalización inhibitoria entre las células tumorales y las inmunes (típicamente las células T), que ocurre cuando las células tumorales expresan proteínas que inducen tolerancia inmunológica y evitan que el sistema inmune ataque al tumor. Normalmente, este mecanismo se usa para controlar la respuesta inmune y prevenir la enfermedad autoinmune. Existen varios mecanismos de señalización inhibitoria, aunque el mayor progreso en la terapia clínica en cáncer de pulmón involucra la interacción entre el PD-L1 expresado en células tumorales y “*el receptor-1 de muerte programada*” (PD-1) presente en las células T. Esta interacción silencia efectivamente la respuesta de células T a un tumor.

Al bloquear PD-1 con los llamados inhibidores de punto de control inmune (checkpoin inhibitors), las células T son habilitadas para reconocer y responder a los antígenos extraños presentes en las células cancerosas. Debido a que la mayoría de las células de cáncer de pulmón contienen muchas mutaciones más allá de sus “drivers” oncogénicos, expresan típicamente un gran número de proteínas mutantes, algunas de las cuales pueden mostrarse en la superficie celular a través de moléculas de antígenos leucocitarios humanos como “neoantígenos ajenos”. A mayor número de mutaciones en una célula, mayor probabilidad de que se expresen los neoantígenos, y mayor probabilidad de que el sistema inmunitario destruya las células, siempre que los mecanismos de tolerancia, como PD-L1 / PD-1, no estén activados. La expresión de PD-L1 por las células tumorales (o macrófagos locales), la expresión de PD-1 por los linfocitos intratumorales, el número de mutaciones y neoantígenos y la presencia de un infiltrado inmune (“tumor inflamado”) representan todos candidatos a predecir respuesta a estos tratamientos. También pueden estar involucradas otras vías de señalización inhibitorias, tales como la interacción entre la “proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos” (CTLA-4) y CD80 / 86, la cual es un blanco terapéutico del agente inmunomodulador ipilimumab típicamente administrado a pacientes con melanoma. Los resultados del tratamiento con estos agentes han sido impresionantes, <sup>250-254</sup> con algunos pacientes que experimentan respuestas sostenidas que han durado años. Sin embargo, a diferencia de las terapias dirigidas, la frecuencia con la que los pacientes responden, incluso en poblaciones definidas por biomarcadores, es de alrededor del 20% a 30% para la segunda línea y 50% para la primera línea (en comparación con el 80% para las terapias dirigidas), <sup>252-254</sup> no obstante hay que tener en cuenta que la respuesta radiológica puede no ser el mejor indicador de la eficacia de una terapia inmunomoduladora debido al impacto de la inflamación activa sobre el tamaño de un tumor. En este sentido, los biomarcadores disponibles definidos como “companion diagnostic” no responden a la necesidad de determinar clínicamente de manera sensible y específica, quiénes deben recibir estos fármacos por lo que son necesarios mejores biomarcadores.

Complicando esto aún más se disponen de diferentes biomarcadores basados en diferentes metodologías, desarrolladas en paralelo por distintas compañías para distintos fármacos, por lo cual no existe un mensaje claro, basado en la evidencia, respecto de cuáles de estos deben estudiarse y cómo deben llevarse a cabo las diferentes pruebas.

Actualmente se están realizando estudios para comparar una variedad de posibles marcadores e intentar armonizar diferentes ensayos orientados a cada biomarcador (ej, diferentes métodos de IHQ para PD-L1).

No podemos establecer recomendaciones basadas en la evidencia con respecto a las pruebas para estos medicamentos en esta guía debido a la falta de evidencia firme que avale la metodología o los agentes específicos. Se está planificando una guía de práctica focalizada específicamente en la evaluación, basada en la evidencia, de los métodos para seleccionar pacientes para recibir terapias inmunomoduladoras.

A pesar de que esta revisión sistemática de la bibliografía excluye esta problemática, es nuestra opinión que las muestras deben ser preservadas para la evaluación de los biomarcadores que predicen la respuesta a terapias inmunomoduladoras, en concordancia con los requisitos de los fármacos considerados. Es importante destacar que, a menudo, la selección de la muestra ideal obtenida de un tumor para este estudio es diferente del que se requiere para pruebas moleculares. Para las pruebas moleculares, especialmente para secuenciación, una muestra de cáncer ideal incluye casi exclusivamente “puro tumor” con escaso estroma o inflamación adyacentes. En teoría, la evaluación de los biomarcadores para terapias inmunomoduladoras debe realizarse sobre un corte de tumor que contenga estroma interpuesto y adyacente, en particular si este es rico en infiltrados de células T; sin embargo, no existen guías de recomendaciones al respecto ni ha sido estudiado en forma prospectiva. Se ha demostrado que la respuesta a algunas drogas 250 se asocia más con la naturaleza de las células inflamatorias dentro de un tumor que con las células tumorales en sí mismas.

Con las implicancias operativas de requerir, potencialmente, la identificación y realización de 2 nuevas secciones de cada tumor (1 para pruebas moleculares y 1 para la evaluación de IHQ de moléculas inmunoregulatoras), esta distinción es esencial para que entiendan los patólogos quirúrgicos y los laboratorios de histología.

Para la mayoría de las aplicaciones clínicas, la IHQ para PD-L1 es el análisis necesario, sin embargo, para los diferentes tratamientos, varían tanto el anticuerpo exacto, como el protocolo de tinción que se utiliza y los criterios de interpretación. Pueden requerirse otros candidatos de biomarcadores de IHQ, así como la caracterización de las poblaciones de células reactivas dentro de un tumor. La validez potencial y la utilidad de los cálculos de la carga mutacional (mutaciones / pares de bases de la secuencia genómica total) evaluados por los paneles de NGS se están explorando como un biomarcador de investigación, como lo son los algoritmos de predicción de neoantígenos derivados de los datos obtenidos de la secuenciación completa del exoma.

## Conclusiones

Los diagnósticos moleculares para el cuidado de los pacientes con cáncer de pulmón continúan desarrollándose con gran rapidez. En el año 2015 se reconsideraron varias de las recomendaciones publicadas en la guía del año 2013 para la práctica clínica. De la misma manera, es probable que la presente guía sufra modificaciones en el corto plazo. Depender de los estudios prospectivos publicados que sirvan de base para las recomendaciones de la práctica siempre estará a la zaga de los últimos descubrimientos y el avance de la atención que se presenta en las reuniones de las sociedades profesionales. Los médicos de hoy, y los que hacemos recomendaciones, nos enfrentamos al desalentador desafío de equilibrar la oncología de precisión, considerando que cada paciente tiene una combinación única de factores que deberían incorporarse en la determinación de los planes de tratamiento individuales, con medicina basada en la evidencia, y las decisiones de tratamiento apropiadas deben basarse en grandes estudios de intervención de pacientes con similares características. Esto se debe a que, en la actualidad, las poblaciones definidas por los análisis genómicos a gran escala son cada vez más pequeños, por lo que el diseño de grandes estudios intervencionistas controlados sea excepcionalmente difícil. Cuando se observa una respuesta clínica muy marcada en el 0.5% de los pacientes con una determinada afección -incluso una condición común como el cáncer de pulmón-, ¿cómo reclutamos a un número suficiente de pacientes en un estudio para comprobar que esa respuesta clínica muy marcada es una verdad general que debería cambiar la práctica? y, ¿cómo decidimos si todos los pacientes deberían hacerse la prueba que puede determinar si se encuentran en ese 0.5%?

Hemos actualizado las recomendaciones del 2013 para reconocer los cambios que han superado ese umbral: la importancia de las pruebas de *ROSI*, el valor de IHQ para ALK y la importancia del estudio de las mutaciones de T790M en pacientes que progresan con la terapia anti EGFR. Además, presentamos las alteraciones moleculares más novedosas y prometedoras -alteraciones en *BRAF*, *MET*, *ERBB2 (HER2)* y *RET*- las cuales se hallan "1 escalón más abajo" y anticipamos que en poco tiempo superarán esta barrera y creemos que deberían incluirse en análisis más amplios que son posibles debido a la aparición de la tecnología NGS. También vemos los indicios y los resultados obtenidos con las terapias inmunomoduladoras y esperamos una revisión sistemática que se llevará a cabo para identificar y recomendar las mejores prácticas para la selección

de pacientes para estas terapias. A medida que la tecnología, el conocimiento científico y la práctica clínica progresan, esperamos la evolución continua en el diagnóstico y la atención de los pacientes con cáncer de pulmón.