

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER

# ATLAS DE PRUEBAS MOLECULARES PARA TERAPIAS DIRIGIDAS EN CÁNCER DE PULMÓN DE LA IASLC

EDITADO POR

Lynette M. Sholl, MD

Wendy A. Cooper, BSc(Med), MBBS, PhD, FRCPA

Keith M. Kerr, BSc(Hons), MBChB, FRCPath

Daniel SW Tan, BSc(Hons), MBBS, MRCP, PhD

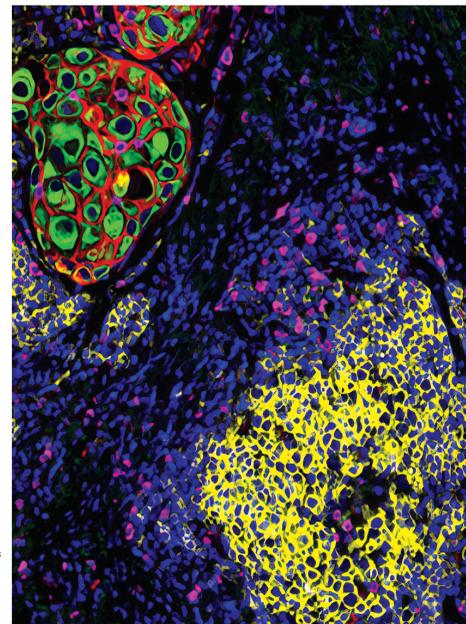
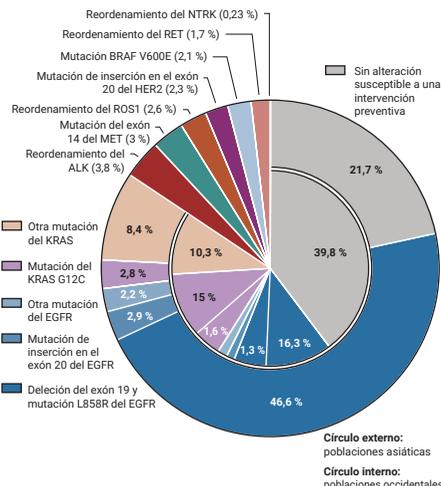
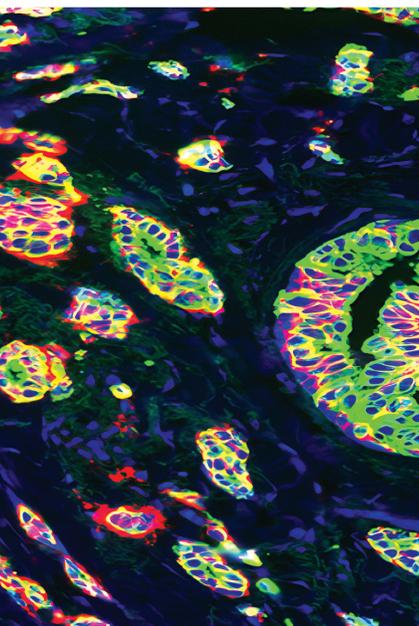
Ming-Sound Tsao, MD, FRCPC

James Chih-Hsin Yang, MD, PhD

IASLC



Combatiendo los cánceres torácicos en todo el mundo





# ATLAS DE PRUEBAS MOLECULARES PARA TERAPIAS DIRIGIDAS EN CÁNCER DE PULMÓN DE LA IASLC



La Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC) y los editores de este atlas valoran sus comentarios. Escanee el código QR para realizar una breve encuesta sobre su experiencia utilizando el *Atlas de pruebas moleculares para terapias dirigidas en cáncer de pulmón de la IASLC* como herramienta educativa.

*International Association for the Study of Lung Cancer*, Denver, CO, EE. UU.

Editores:

Lynette M. Sholl, MD

Wendy A. Cooper, BSc(Med), MBBS, PhD, FRCPA

Keith M. Kerr, BSc(Hons), MBChB, FRCPath

Daniel SW Tan, BSc(Hons), MBBS, MRCP, PhD

Ming-Sound Tsao, MD, FRCPC

James Chih-Hsin Yang, MD, PhD

Oficina de la IASLC:

IASLC, 999 17th Street, Suite 200, Denver, Colorado 80202, USA

[www.iaslc.org](http://www.iaslc.org)

Febrero del 2023

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ISBN: 979-8-9878292-0-2

Copyright © 2023 *International Association for the Study of Lung Cancer*

Todos los derechos reservados

Sin perjuicio de los derechos de autor reservados anteriormente, queda prohibido reproducir, almacenar o ingresar cualquier parte de esta publicación en un sistema de recuperación, o transmitirla de cualquier forma o por cualquier medio, sin permiso previo por escrito.

Si bien la información contenida en este libro se considera verdadera y precisa a la fecha de su publicación, ni la IASLC ni los editores ni la editorial asumen responsabilidad legal alguna por los errores u omisiones que se podrían cometer. La editorial no ofrece garantía alguna, expresa o implícita, en relación con el material que contiene este libro.

# ATLAS DE PRUEBAS MOLECULARES PARA TERAPIAS DIRIGIDAS EN CÁNCER DE PULMÓN DE LA IASLC

## EDITADO POR

Lynette M. Sholl, MD

Wendy A. Cooper, BSc(Med), MBBS, PhD, FRCPA

Keith M. Kerr, BSc(Hons), MBChB, FRCPATH

Daniel SW Tan, BSc(Hons), MBBS, MRCP, PhD

Ming-Sound Tsao, MD, FRCPC

James Chih-Hsin Yang, MD, PhD

# Agradecimientos

La *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) agradece el generoso apoyo proporcionado por

AstraZeneca

Pfizer

Amgen

Novartis

Janssen Pharmaceuticals

Eli Lilly & Company

Genentech

Con patrocinio adicional de

Daiichi Sankyo

Takeda

Merck KGaA

Los coeditores y colaboradores también agradecen la ayuda de Casey Connolly, MPH, especialista de asuntos científicos de la IASLC por la coordinación del proyecto; Murry Wynes, Ph. D., asesor científico senior de la IASLC, por la conceptualización inicial; la ayuda editorial de Terese Platten; la ayuda de Stephen Adams en materia de imágenes y composición; y el apoyo editorial de Jane Olivier, presidenta de *Glacier Publishing Services*, por la publicación de este texto.

# Contenido

Prólogo .....	vii
Colaboradores.....	ix
Abreviaturas .....	xv
<b>1</b> Introducción .....	1
<b>2</b> Relevancia clínica de las pruebas de biomarcadores en el cáncer de pulmón.....	7
<b>3</b> Adquisición de muestras y consideraciones preanalíticas .....	21
<b>4</b> Biopsia líquida: adquisición de la muestra, estrategias de prueba y funciones clínicas.....	39
<b>5</b> Tecnologías para la detección de biomarcadores .....	55
<b>6</b> Una perspectiva global de las guías sobre pruebas moleculares y sus prácticas .....	75
<b>7</b> EGFR.....	89
<b>8</b> ALK .....	105
<b>9</b> ROS1.....	117
<b>10</b> BRAF.....	125
<b>11</b> NTRK.....	133
<b>12</b> RET .....	139
<b>13</b> MET.....	145
<b>14</b> KRAS.....	159
<b>15</b> HER2.....	169
<b>16</b> NRG1 .....	177
<b>17</b> Nuevas dianas y tecnologías .....	181
<b>18</b> Resultados de las pruebas moleculares y papel de las juntas multidisciplinares de tumores moleculares.....	191
<b>19</b> Algoritmos para las pruebas de biomarcadores moleculares .....	197
<b>20</b> Resumen y perspectivas futuras.....	205



# Prólogo

Cuando se fundó la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) hace 50 años, la visión era crear una organización que reuniera a personas dedicadas a la comprensión y el tratamiento del cáncer de pulmón. La IASLC ha crecido hasta convertirse en una sólida organización multidisciplinaria a nivel mundial que facilita la colaboración entre sus miembros y proporciona oportunidades para avanzar en este campo. Uno de los comités más fuertes y activos de la IASLC es el de patología, conocido por su increíble trabajo en el establecimiento de los criterios de estadificación del cáncer de pulmón y otras neoplasias malignas torácicas y por la publicación de estándares sobre temas patológicos clave, como las pautas de pruebas integrales para la positividad de la ALK en el entorno del cáncer de pulmón y la comparación de modalidades para estandarizar las pruebas de ligando 1 de muerte programada (Programmed death-ligand 1, PD-L1). Recientemente, el *Atlas de inmunohistoquímica diagnóstica de la IASLC del 2020* resumió los avances más vanguardistas en inmunohistoquímica (IHQ). Este nuevo atlas se adentra en el área de diagnóstico molecular con una junta editorial verdaderamente internacional de expertos reconocidos mundialmente que han guiado el trabajo de una increíble lista de autores.

Dado que la IASLC ha crecido a lo largo de los años para incluir voces destacadas de la comunidad de defensores de los pacientes, es apropiado que este atlas incluya un capítulo sobre la relevancia clínica de las pruebas de biomarcadores con puntos de vista de los defensores de los pacientes, lo que nos ayuda a recordar cómo los conocimientos de este atlas proporcionan directamente beneficios a los pacientes que viven con cáncer de pulmón.

En el fondo, este libro es una guía práctica para los médicos que trabajan en el mundo del cáncer de pulmón. No se puede debatir la evaluación de las muestras patológicas sin revisar las mejores técnicas de adquisición de muestras, por lo que el segundo capítulo es de gran utilidad con puntos de vista de neumólogos, cirujanos, radiólogos intervencionistas y patólogos. Este atlas también proporciona un capítulo destacado sobre la biopsia líquida, cada vez más crítica en el manejo óptimo de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, sobre todo cuando el tejido es escaso y difícil de obtener. Los autores examinan los puntos de vista globales sobre las pruebas moleculares tomando como referencia otras pautas publicadas. La mayor parte del atlas se desglosa por genes concretos de interés, como *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS* y otros, y por dianas emergentes como *NRG1*. Los autores terminan centrándose en los algoritmos de pruebas moleculares y en los puntos de vista futuros.

Este *Atlas de pruebas moleculares para terapias dirigidas en cáncer de pulmón de la IASLC* es una referencia increíble, que pone al alcance de los lectores los últimos avances en pruebas moleculares. Una terapia óptima para el cáncer de pulmón requiere un conocimiento actualizado de los últimos avances en los fundamentos moleculares del cáncer de pulmón, así como la forma de comprender esas alteraciones y su relevancia clínica, de modo que se pueda utilizar la información para proporcionar la mejor atención posible a los pacientes. Este atlas es una guía concisa y práctica para todos los patólogos, neumólogos, cirujanos, radiólogos intervencionistas, oncólogos médicos, profesionales de atención de la salud aliados, defensores y demás personas que trabajan para proporcionar una atención óptima a los pacientes con cáncer de pulmón.

—Heather Wakelee, MD, FASCO, Presidenta de la IASLC  
División de oncología  
Departamento de Medicina  
*Stanford Cancer Institute*  
Facultad de Medicina de la Stanford University  
Stanford, California, Estados Unidos

# Colaboradores

## Editores



**Lynette M. Sholl, MD**

Catedrática asociada, Patología, Facultad de Medicina de Harvard  
Patóloga asociada, Departamento de Patología,  
*Brigham and Women's Hospital*  
Boston, Massachusetts, Estados Unidos



**Wendy A. Cooper, BSc(Med), MBBS, PhD, FRCPA**

Catedrática asociada  
Patología tisular y diagnóstico oncológico  
*NSW Health Pathology*  
*Royal Prince Alfred Hospital*  
Camperdown, Nueva Gales del Sur, Australia



**Keith M. Kerr, BSc(Hons), MBChB, FRCPath**

Patólogo asesor, Departamento de Patología, *Aberdeen Royal Infirmary*  
Profesor de Patología Pulmonar, Facultad de Medicina de Aberdeen University  
Aberdeen, Escocia, Reino Unido



**Daniel SW Tan, BSc(Hons), MBBS, MRCP, PhD**

Asesor senior, Oncología Médica  
Departamento de Oncología Médica  
*National Cancer Centre* en Singapur  
Singapur



**Ming-Sound Tsao, MD, FRCPC**

Patólogo, científico senior y catedrático  
Departamento de Patología  
*Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network*  
*University of Toronto*  
Toronto, Ontario, Canadá



**James Chih-Hsin Yang, MD, PhD**

Director, Instituto de Posgrado de Oncología, *National Taiwan University*  
Director, Departamento de Oncología, *National Taiwan University Hospital*  
Taipéi, Taiwán

**Autores**

**Myung-Ju Ahn, MD, PhD**

División de Hematología-Oncología  
Departamento de Medicina  
*Samsung Medical Center*  
Facultad de Medicina de la  
*Sungkyunkwan University*  
Seúl, República de Corea

**Maria E. Arcila, MD**

Departamento de Patología  
*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*  
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Lyudmila Bazhenova, MD**

División de Hematología Oncología  
Departamento de Medicina  
*Moore's Cancer Center*  
*University of California*  
La Jolla, California, Estados Unidos

**Mary Beth Beasley, MD**

Facultad de Medicina de Icahn  
*Mount Sinai Health System*  
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Sabina Berezowska, MD**

Instituto de Patología  
*Lausanne University Hospital y*  
*University of Lausanne*  
Lausana, Suiza

**Lukas Bubendorf, MD**

Instituto de Patología  
*University Hospital Basel*  
Basilea, Suiza

**Federico Cappuzzo, MD, PhD**

*Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna*  
Rávena, Italia

**Jason C. Chang, MD**

Departamento de Patología  
*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*  
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Teh-Ying Chou, MD, PhD, MBA**

División de Patología Molecular  
Departamento de Patología y  
Medicina de Laboratorio  
*Taipei Veterans General Hospital*  
Taipéi, Taiwán

**Jin-Haeng Chung, MD, PhD**

Departamento de Patología y  
Centro Respiratorio  
*Seoul National University Bundang Hospital*  
Ciudad de Seongnam, República de Corea

**Sanja Dacic, MD, PhD**

Departamento de Patología  
Facultad de Medicina de *Yale University*  
New Haven, Connecticut, Estados Unidos

**Ibiayi Dagogo-Jack, MD**

Departamento de Hematología/Oncología  
*Massachusetts General Hospital Cancer Center*  
Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**Jessica S. Donington, MD, MSCR**  
 Departamento de Cirugía Cardiorácica  
 Facultad de Medicina de NYU  
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Alexander Drilon, MD**  
 Servicio de Oncología Torácica y  
 Terapéutica del Desarrollo  
*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*  
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Ivy Elkins**  
 Defensora de pacientes  
 EGFR Resisters  
 Buffalo Grove, Illinois, Estados Unidos

**Kwun M. Fong, MBBS, PhD, FRACP**  
 Departamento de Medicina Torácica  
*Prince Charles Hospital*  
 Chermside, Queensland, Australia

**Justin F. Gainor, MD**  
 Departamento de Hematología/Oncología  
*Massachusetts General Hospital*  
 Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**David R. Gandara, MD**  
 Departamento de Medicina Interna  
 Hematología/Oncología Cancer Center  
 UC Davis Medical Center  
 Sacramento, California, Estados Unidos

**Ritu R. Gill, MD, MPH**  
 Departamento de Radiología  
*Brigham and Women's Hospital*  
 Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**Apoorva Gogna, MD**  
 Departamento de Radiología  
 Vascular e Intervencionista  
*Singapore General Hospital*  
 Singapur

**Yasushi Goto, MD**  
 División de Medicina Interna y  
 Oncología Torácica  
*National Cancer Center Hospital*  
 Chuo-ku, Tokio, Japón

**Jhanelle E. Gray, MD**  
 Programa y División de Oncología Torácica  
*H. Lee Moffitt Cancer Center and  
 Research Institute*  
 Tampa, Florida, Estados Unidos

**Yuchen Han, PhD**  
 Departamento de Patología  
*Shanghai Chest Hospital*  
*Shanghai Jiaotong University*  
 Shanghai, República Popular China

**Lizza E. Hendriks, MD, PhD**  
 Departamento de Enfermedades Pulmonares  
*Maastricht University Medical Center*  
 Maastricht, Países Bajos

**Paul J. Hesketh, MD**  
 Departamento de Hematología y Oncología  
*Lahey Clinic Medical Center*  
 Facultad de Medicina de la *Tufts University*  
 Burlington, Massachusetts, Estados Unidos

**Fred R. Hirsch, MD, PhD**  
 Centro de Oncología Torácica  
*Tisch Cancer Institute*  
 Facultad de Medicina de Icahn  
*Mount Sinai Health System*  
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Paul Hofman, MD, PhD**  
 Departamento de Patología  
*Laboratoire de Pathologie Clinique et  
 Experimentale et Biobanque CRB*  
 CHU de Niza  
 Niza, Francia

**David M. Hwang, MD**  
 Departamento de Patología  
*University of Toronto y University  
 Health Network*  
 Toronto, Ontario, Canadá

**Malinda Itchins, MD**  
 Departamento de Oncología Médica  
*Royal North Shore Hospital*  
 Sídney, Nueva Gales del Sur, Australia

**Deepali Jain, MD**  
 Departamento de Patología  
*All India Institute of Medical Sciences*  
 Nueva Delhi, India

**Philippe Joubert, MD, PhD**  
 Patología  
*Institut Universitaire de Cardiologie et de  
 Pneumologie de Quebec*  
 Ciudad de Quebec, Quebec, Canadá

**Mehdi Karkouri, MD**  
 Departamento de Patología  
*University Hassan de Casablanca*  
 Casablanca, Marruecos

**Dong-Wan Kim, MD**

Departamento de Medicina Interna  
 Centro de Oncología Médica  
*Seoul National University Hospital*  
 Seúl, República de Corea del Sur

**Sylvie Lantuejoul, PhD**

Departamento de Patología  
*Université Grenoble Alpes*  
 Grenoble, Francia  
 Departamento de Patología  
*Centre Léon Bérard Unicancer and CRCL*  
 Lyon, Francia

**Natasha B. Leighl, MD, MMSc, FRCPC, FASCO**

División de Oncología Médica/Hematología  
*Princess Margaret Cancer Centre*  
 Toronto, Ontario, Canadá

**Chien-Feng Li, MD**

Departamento de Patología  
*Chi-Mei Medical Center*  
*National Institute of Cancer Research*  
*National Health Research Institutes*  
*Institute of Precision Medicine*  
*National Sun Yat-sen University*  
 Kaohsiung, Taiwán

**Dongmei Lin, MD**

Patología  
 Laboratorio Clave de Carcinogénesis e  
 Investigación Traslacional  
 Ministerio de Educación  
*Peking University Cancer Hospital and Institute*  
 Pekín, República Popular China

**Jessica J. Lin, MD**

Departamento de Hematología/Oncología  
*Massachusetts General Hospital Cancer Center*  
 Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**Stephen V. Liu, MD**

Oncología médica  
*Lombardi Comprehensive Cancer Center*  
*Georgetown University Medical Center*  
 Washington, DC, Estados Unidos

**Fernando Lopez-Rios, MD, PhD**

Departamento de Patología  
 Hospital Universitario 12 de Octubre  
 Madrid, España

**Laura Mezquita, MD, PhD**

Departamento de Oncología Médica  
 Hospital Clínic de Barcelona  
 Laboratorio de Genómica Traslacional y  
 Terapias Dirigidas en Tumores Sólidos  
*Institut d'Investigacions Biomèdiques August*  
*Pi i Sunyer (IDIBAPS)*  
 Barcelona, España

**Mari Mino-Kenudson, MD**

Departamento de Patología  
*Massachusetts General Hospital y*  
 Facultad de Medicina de Harvard  
 Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**Andrew G. Nicholson, DM**

Departamento de Histopatología  
*Royal Brompton Hospital*  
 Londres, Reino Unido

**Sai-Hong Ignatius Ou, MD, PhD**

División de Hematología/Oncología,  
 Departamento de Medicina  
*Chao Family Comprehensive Cancer Center*  
*University of California Irvine Medical Center*  
 Orange County, California, Estados Unidos

**Mauro Papotti, MD**

Departamento de Patología  
*University of Turin*  
 Turín, Italia

**David Planchard, MD, PhD**

Departamento de Oncología Médica  
*Gustave Roussy*  
 Villejuif, Francia

**Luis E. Raez, MD**

Departamento de Hematología y Oncología  
*Memorial Cancer Institute*  
*Memorial Health Care System*  
 Pembroke Pines, Florida, Estados Unidos

**Natasha Rekhtman, MD**

Departamento de Patología  
*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*  
 Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Jordi Remon, MD**

Departamento de Oncología Médica  
 Centro Integral Oncológico Clara Campal  
 (HM-CIOCC)  
 Hospital HM Delfos, HM Hospitales  
 Barcelona, España

**Anja C. Roden, MD**

Departamento de Medicina de Laboratorio  
y Patología  
Clínica Mayo  
Rochester, Minnesota, Estados Unidos

**Christian Rolfo, MD, PhD**

Departamento de Medicina, Hematología  
y Oncología Médica  
Facultad de Medicina de Icahn  
*Mount Sinai Health System*  
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Julia K. Rotow, MD**

*Lowe Center for Thoracic Oncology*  
*Dana-Farber Cancer Institute*  
Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**Kurt A. Schalper, MD, PhD**

Departamento de Patología  
Facultad de Medicina de *Yale University*  
New Haven, Connecticut, Estados Unidos

**Lecia V. Sequist, MD, MPH**

Departamento de Medicina  
*Massachusetts General Hospital Cancer Center*  
Boston, Massachusetts, Estados Unidos

**Shani Shilo**

Defensora de pacientes  
*Israel Lung Cancer Foundation*  
Rehovot, Israel

**Anders Skanderup, MD**

Departamento de Oncología Médica  
*Genome Institute of Singapore*  
Singapur

**Benjamin J. Solomon, MBBS, PhD, FRACP**

Departamento de Oncología Médica  
*Peter MacCallum Cancer Centre*  
Melbourne, Victoria, Australia

**Emily Stone, MBBS, MMed, FRACP**

Departamento de Medicina Torácica  
*St. Vincent's Hospital*  
Sídney, Nueva Gales del Sur, Australia

**Erik Thunnissen, MD, PhD**

Departamento de Patología  
*Amsterdam University Medical Center*  
Ámsterdam, Países Bajos

**Paul E. Van Schil, MD, PhD**

Departamento de Cirugía Torácica y Vascular  
*Antwerp University Hospital*  
Amberes, Bélgica

**Ignacio Wistuba, MD**

Departamento de Patología Traslacional  
*University of Texas MD Anderson Cancer Center*  
Houston, Texas, Estados Unidos

**Yi-Long Wu, MD**

*Guangdong Lung Cancer Institute*  
*Guangdong General Hospital*  
*Guangdong Academy of Medical Sciences*  
Guangdong, República Popular China

**Soo-Ryum Yang, MD**

Departamento de Patología  
*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*  
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos

**Yasushi Yatabe, PhD**

Departamento de Patología Diagnóstica  
*National Cancer Center Hospital*  
Tokio, Japón

**Helena Yu, MD**

Departamento de Oncología Torácica  
*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*  
Nueva York, Nueva York, Estados Unidos



# Abreviaturas

En el texto se utilizan las siguientes abreviaturas:

ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*

ADC: fármaco inmunoconjugado

ADNtc: ADN tumoral circulante

AHRQ: *US Agency for Healthcare Research and Quality*

ALK: quinasa del linfoma anaplásico

ALKi: ALK inhibidor de la tirosina quinasa

AMI: adenocarcinoma mucinoso invasivo

AMP: *Association for Molecular Pathology*

AMP: reacción en cadena de la polimerasa multiplex anclada

AP: aortopulmonar

APC: poliposis adenomatosa coli

AR: resistencia adquirida

AREG: anfiregulina

ARMS: sistema de mutación alelo-refractario

ARNm: ARN mensajero

ASCO: *American Society of Clinical Oncology*

ATP: trifosfato de adenosina

B-TMB: carga mutacional tumoral en sangre

BRAF: V-raf homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino

CAP: *College of American Pathologists*

CAR T-cell: células T con receptor quimérico de antígeno

CDx: prueba diagnóstica con fines terapéuticos

CEP: sonda de enumeración cromosómica

cfDNA: ADN libre de células

CHIP: hematopoyesis clonal de potencial indeterminado

CI: intervalo de confianza

CNB: biopsia por punción con aguja gruesa

CPI: inhibidor de punto de control

CPK: creatinina fosfoquinasa

CPM: cáncer de pulmón microcítico

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCR: tasa de control de la enfermedad

ddPCR: reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas  
del: delección  
DFG: ácido aspártico, fenilalanina, glicina  
18 FDG-PET: tomografía por emisión de positrones con flúor-18-fluorodesoxiglucosa  
dNTP: desoxinucleótido trifosfato  
DOR: duración de la respuesta  
EBM: medicina basada en la evidencia  
EBUS: ecografía endobronquial  
ECD: dominio extracelular  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EE. UU.: Estados Unidos  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
*EGFR*: receptor del factor de crecimiento epidérmico  
ELCC: Congreso Europeo sobre Cáncer de Pulmón  
ELISA: análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas  
EMA: Agencia Europea de Medicamentos  
*EML4*: proteína 4 similar a la proteína asociada a microtúbulos equinodermos  
EMN: navegación electromagnética  
EQA: evaluación de calidad externa  
*ERBB2*: receptor 2 de la tirosina quinasa erb-b2  
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares  
ESMO: Sociedad Europea de Oncología Médica  
EU: Unión Europea  
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos  
FFPE: fijado en formalina y embebido en parafina  
*FGFR-1*: receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos  
FISH: hibridación fluorescente *in situ*  
FNA: aspiración con aguja fina  
GAP: Proteína activadora de GTPasa  
GCN: número de copias de genes  
GDNF: factor neurotrópico derivado de la glía  
GDP: guanosín difosfato  
GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina  
GEJ: unión gastroesofágica  
GFRAL: GDNF receptor de familia tipo  $\alpha$   
GI: gastrointestinal  
GLIDES: pautas para la toma de decisiones  
GRADE: Valoración, desarrollo y evaluación de la clasificación de las recomendaciones  
GTP: guanosín trifosfato  
GTPasa: guanosín trifosfato hidrolasa o guanosín trifosfatasa  
H&E: hematoxilina y eosina  
*HER2*: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano  
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos  
HR: cociente de riesgo  
HSP: proteína de choque térmico  
IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*  
ICI: inhibidor de puntos de control inmunitario  
*IGFR-1*: receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina

IHQ: inmunohistoquímica  
 ILD: enfermedad pulmonar intersticial  
 indel: inserción y/o deleción  
 ins: inserción  
 IOM: Instituto de Medicina  
 IPASS: Estudio Internacional de Vigilancia Posterior a la Autorización  
 ISH: hibridación *in situ*  
 IVCS: sedación consciente intravenosa  
 IVD: diagnóstico *in vitro*  
 JAK: Janus quinasa  
 JLCS: Sociedad Japonesa de Cáncer de Pulmón  
 JMD: dominio yuxtamembrana  
 KD: dominio quinasa  
 kDa: kilodalton  
 KDD: duplicación del dominio quinasa  
 KRAS: Oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten  
 LMC: leucemia mieloide crónica  
 LSI: identificación específica de locus  
 LuCE: *Lung Cancer Europe*  
 MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno  
 MDT: equipo multidisciplinario  
 MEK: quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)  
 MEKi: inhibidor MEK1/2  
 MEN: neoplasia endocrina múltiple  
 MET: tirosina quinasa del receptor del protooncogén MET  
 mIF: inmunofluorescencia multiplex  
 mOS: mediana de supervivencia global  
 mPFS: mediana de supervivencia libre de progresión  
 MRD: enfermedad residual mínima  
 MRFF: *Medical Research Future Fund*  
 MTB: junta de tumores moleculares  
 MTC: carcinoma medular de tiroides  
 mTOR: diana mecánica de la rapamicina quinasa  
 NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*  
 NGS: secuenciación de nueva generación  
 NHMRC: *National Health and Medical Research Council*  
 NIR: cercano al infrarrojo  
 NK cell: células natural killer  
 NLST: *National Lung Screening Trial*  
 NOS: no especificado  
 NRG1: neurregulina 1  
 NTRK: receptor neurotrópico de la quinasa para la tropomiosina  
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
 PD-L1: ligando 1 de muerte programada  
 PI3K: fosfoinositol 3-quinasa  
 PKC: proteína quinasa C  
 PLCγ: fosfolipasa C-gamma  
 PSI: plexina-semaforina-integrina

*PTEN*: homólogo de fosfatasa y tensina  
RAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata  
RATS: cirugía toracoscópica asistida por robot  
*RET*: reordenado durante la transfección  
RNAseq: secuenciación de ARN  
*ROS1*: oncogén c-ros 1  
ROSE: evaluación rápida *in situ*  
RR: tasa de respuesta  
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa  
RTK: receptor tirosina quinasa  
SG: supervivencia global  
SLP: supervivencia libre de progresión  
SNC: sistema nervioso central  
SNV: variante de nucleótido único  
SOC: estándar de atención  
STAT: transductor de señal y activador de la transcripción  
SV: variante estructural  
TAT: tiempo de respuesta  
TBNA: aspiración transbronquial con aguja  
TC: tomografía computarizada  
TCBD: tomografía computarizada de baja dosis  
TGF $\alpha$ : factor de crecimiento transformante  $\alpha$   
TIL: linfocito que se infiltra en el tumor  
TKD: dominio tirosina quinasa  
TKI: inhibidor de la tirosina quinasa  
TM: transmembrana  
TMB: carga mutacional tumoral  
TMD: dominio transmembrana  
TPS: puntuación de proporción tumoral  
TRG: tasa de respuesta global  
TRK: receptor quinasa para la tropomiosina  
TROP2: antígeno 2 de superficie celular del trofoblasto  
TTF1: factor de transcripción tiroideo 1  
TTNB: biopsia transtorácica con aguja  
VATS: cirugía toracoscópica asistida por video  
VBN: navegación broncoscópica virtual  
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular  
VEGFR2: receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular  
VUS: variante(s) de significación desconocida o variante(s) de significación clínica incierta  
WBC: leucocito  
WES: secuenciación del exoma completo  
WGS: secuenciación del genoma completo

# Introducción

# 1

Por Lynette M. Sholl, Wendy A. Cooper, Keith M. Kerr, Daniel SW Tan, Ming-Sound Tsao y James Chih-Hsin Yang

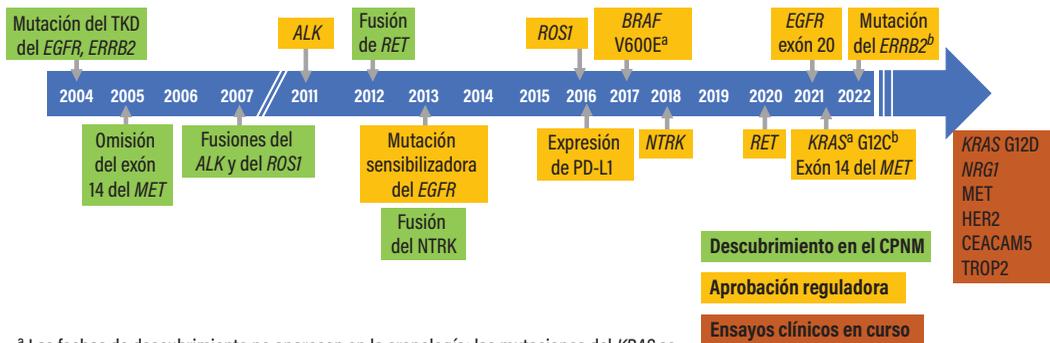
En las últimas 2 décadas, las pruebas de biomarcadores en pacientes con cáncer de pulmón han pasado de ser inexistentes y de relevancia clínica limitada a ser generalizadas y esenciales para el manejo oncológico rutinario. ¿Qué ha impulsado esta evolución de la quimioterapia única para todos a la terapia de precisión altamente personalizada? Una serie de conocimientos y avances técnicos han impulsado este progreso, empezando por el reconocimiento de que algunos tipos de cáncer albergan alteraciones que conducen a una señalización incontrolada a través de proteínas quinasas. Lo que siguió fue el concepto revolucionario e inicialmente controvertido de atacar las tirosina quinasas con inhibidores de tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) de moléculas pequeñas para detener el crecimiento y la proliferación de las células neoplásicas.

La primera terapia con TKI de uso clínico fue el imatinib, un inhibidor de ABL, en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), una neoplasia relativamente homogénea desde el punto de vista genómico debida al evento de fusión *BCR::ABL1*. Esta primera terapia dirigida tuvo un éxito espectacular, ya que muchos pacientes lograron un rápido alivio sintomático y una remisión a largo plazo (y posiblemente incluso la cura) con una toxicidad mínima del fármaco. A partir de ese momento, se inició la carrera para identificar otros ejemplos de tumores con dependencia de las quinasas y las terapias que podrían interferir específicamente en estas vías clave de señalización de la quinasa.

Un factor que determinó el asombroso éxito del imatinib en pacientes con LMC fue el sólido conocimiento de la estructura y función del ABL, así como del papel del evento de fusión oncogénica que impulsaba su actividad en las células neoplásicas. Es importante destacar que el imatinib no funcionó en cualquier paciente con leucemia, sino solo en aquellos cuyos tumores albergaban una fusión *ABL* o algún otro evento oncogénico impulsado por la quinasa con sensibilidad a este inhibidor en particular. Así nació el campo de la atención del cáncer racional o basada en biomarcadores. Esto exigía no solo un diagnóstico histopatológico preciso, sino también una caracterización genómica exacta, con lo que el diagnóstico

molecular pasó de centrarse inicialmente en los biomarcadores diagnósticos a centrarse cada vez más en las pruebas predictivas para orientar las decisiones sobre el tratamiento.

Con estos principios en mente, este atlas refleja 2 décadas de extraordinarios avances en el descubrimiento de biomarcadores y fármacos para el cáncer de pulmón, empezando por el reconocimiento de que las mutaciones del dominio quinasa del *EGFR* predicen la capacidad de respuesta a los TKI del *EGFR*. En la actualidad, se dispone literalmente de docenas de terapias racionales dirigidas principalmente contra tirosina quinasa y miembros de la vía mitogénica para pacientes con cáncer de pulmón cuyos tumores albergan ciertas alteraciones oncogénicas bien definidas (figura 1-1; tabla 1-1). Esta diversificación del tratamiento



<sup>a</sup> Las fechas de descubrimiento no aparecen en la cronología; las mutaciones del *KRAS* se observaron por primera vez en el CPNM en 1984; las mutaciones del *BRAF* se observaron en el 2002.

<sup>b</sup> Indica la aprobación solo en el entorno de segunda línea.

Para conocer los ensayos clínicos que respaldan la aprobación reguladora de primera (o segunda línea), consulte las referencias.<sup>1-8</sup> En las referencias se enumeran los informes de descubrimiento de los biomarcadores.<sup>9-17</sup>

**Figura 1-1.** Cronología de las aprobaciones de fármacos dependientes de biomarcadores por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA) en el entorno de primera línea para pacientes con CPNM avanzado. Abreviaturas: CPNM = cáncer de pulmón no microcítico; TKD = dominio tirosina quinasa.

**Tabla 1-1.** Las terapias basadas en biomarcadores mejoran significativamente la supervivencia de los pacientes con CPNM avanzado

Diana	Fármaco aprobado por la FDA	Línea de terapia	Mediana de SG (m)
Sin biomarcador	Quimioterapia <sup>18</sup>	1L	8-10
EGFR (1G) <sup>19,20</sup>	Erlotinib, gefitinib	1L	21,6-35,5 <sup>a</sup>
EGFR (2G) <sup>21,22</sup>	Afatinib, dacomitinib	1L	31,4-34,1
EGFR (3G) <sup>20</sup>	Osimertinib	1L	38,6
Fusión ALK <sup>23-26</sup>	Crizotinib, ceritinib, alectinib, brigatinib, <sup>b</sup> lorlatinib <sup>b</sup>	1L	>51
Fusión ROS1 <sup>23,27</sup>	Crizotinib, entrectinib <sup>c</sup>	≥1L	51,4; 47,8 <sup>b</sup>
BRAF V600E <sup>28</sup>	Dabrafenib + trametinib	1L	17,3
Fusión TRK <sup>29,30</sup>	Larotrectinib, entrectinib	≥2L	40,7; NE
Fusión RET <sup>31,32</sup>	Selpercatinib, pralsetinib	1L	<sup>b</sup>
PD1/PD-L1 <sup>33</sup>	Nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab	1L	26,3 <sup>d</sup>

Abreviaturas: 1L = primera línea; 2L = segunda línea; FDA = Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico; SG = supervivencia global; TKI = inhibidor de la tirosina quinasa.

<sup>a</sup> Los pacientes pueden haber recibido TKI del *EGFR* de tercera generación tras la progresión.

<sup>b</sup> Datos de SG inmaduros.

<sup>c</sup> Análisis del entrectinib realizado en una cohorte sin tratamiento previo con TKI de ROS1.

<sup>d</sup> Pembrolizumab con PD-L1 ≥50 %.

personalizado y dirigido ha ido acompañada de una mejoría demostrable de los resultados en los pacientes que reciben los fármacos adecuados. El desarrollo de estas terapias dirigidas ha sido posible en gran parte gracias a los enormes avances en la caracterización del genoma tumoral resultantes de las tecnologías de secuenciación masiva en paralelo. Estas tecnologías de escala, que toman prestados los principios de la evolución de los semiconductores, han reducido el costo de la secuenciación genómica en varios órdenes de magnitud desde los noventa y han permitido que esfuerzos institucionales, nacionales y multinacionales como *The Cancer Genome Atlas* definan sistemáticamente las alteraciones genómicas y transcriptómicas subyacentes a los tipos de tumores más comunes. Al mismo tiempo, la comercialización de tecnologías de secuenciación tanto focalizadas como integrales ha hecho que los perfiles genómicos tumorales sean relativamente accesibles para los pacientes con cáncer en la mayoría de los países desarrollados.

Sin embargo, siguen existiendo desafíos a la hora de proporcionar pruebas de biomarcadores oportunas, precisas y clínicamente relevantes para los pacientes con cáncer de pulmón. La enorme diversidad de mecanismos por los que un tumor puede apoderarse de las vías mitogénicas para impulsar el crecimiento y la proliferación exige que los laboratorios desarrollen y validen una serie de estrategias dirigidas al ADN, el ARN y/o las proteínas para garantizar unas pruebas de biomarcadores completas.

Esta diversidad se refleja en los genes que sufren reordenamientos (*ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK1-3*, *NRG1* y otros) o adquieren “fusiones” intragénicas impulsadas por empalmes aberrantes (*MET*). A nivel del ADN, los reordenamientos suelen ser el resultado de roturas en el ADN intrónico. Estos “puntos de rotura” son impredecibles y se producen en una amplia región del genoma, lo que dificulta su detección en el ADN. Por el contrario, los productos oncogénicos de estos reordenamientos dan lugar a transcritos de fusión altamente reproducibles, lo que facilita su detección a partir del ARN tumoral. Aunque la diversidad de la mutagénesis puede ser más limitada en aquellos genes propensos a variantes de un solo nucleótido o a pequeñas deleciones por inserción (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*), siguen descubriéndose mecanismos novedosos o poco frecuentes de activación oncogénica, que requieren una anotación genética molecular experta. El descubrimiento “en tiempo real” que conlleva la secuenciación rutinaria de las muestras de los pacientes requiere una estrategia integrada para informar que hoy en día suele adoptar la forma de reuniones multidisciplinarias, en las que el patólogo, el oncólogo, el especialista en procedimientos y todo el equipo de atención al paciente pueden aprovechar los datos de los biomarcadores para orientar el manejo (véase la figura 2-2).

A pesar de las pruebas que demuestran que el tratamiento con la mayoría de las terapias dirigidas conduce a los mejores resultados clínicos cuando se administra en primera línea, muchos pacientes aún reciben quimioterapia y/o inmunoterapia antes de la terapia dirigida, incluso con las aprobaciones para el uso de esta última en el entorno de primera línea. El fracaso en el empleo de terapias dirigidas puede atribuirse, en parte, a la falta de pruebas de biomarcadores y/o a los retrasos en la recepción de los resultados de los biomarcadores a tiempo. Las pruebas de biomarcadores en tejido se complican con frecuencia por la limitada calidad o cantidad de tejido; aunque este desafío se puede superar en parte mediante la comunicación activa entre el especialista en procedimientos y el patólogo durante la

recolección del tejido, esto requiere una medida de coordinación y experiencia que no está disponible en todos los entornos.

La creciente confiabilidad y sensibilidad de las pruebas de ADN tumoral circulante derivado del plasma de los pacientes ha mejorado el acceso a los resultados de los biomarcadores y ha reducido el tiempo necesario para obtenerlos. Sin embargo, estas pruebas no están disponibles en todas las regiones del mundo y puede resultar difícil acceder a ellas debido a limitaciones económicas, incluso cuando están técnicamente disponibles. Además, este enfoque no cubre, por sí solo, de forma confiable todos los biomarcadores necesarios y tiene una sensibilidad limitada por la extensión del ADN tumoral liberado a la circulación. Esto señala el papel fundamental de la defensa de los pacientes para exigir un mejor acceso a pruebas confiables y terapias dirigidas en todo el mundo.

Por último, pero no por ello menos importante, en este *Atlas de pruebas moleculares para terapias dirigidas en cáncer de pulmón de la IASLC* hemos utilizado los términos “molecular”, “biomarcador”, “biomarcador molecular” y “biomarcador predictivo” de forma un tanto intercambiable en el contexto de la terapia dirigida en el cáncer de pulmón. A pesar de que cada uno de estos términos puede tener significados más específicos y ligeramente diferentes, y a pesar de una reciente propuesta para armonizar las terminologías a “pruebas de biomarcadores”<sup>34</sup>, se utilizan con frecuencia como sinónimos. El término “prueba de mutación” tiene un significado más específico que el de prueba de biomarcadores/pruebas moleculares, ya que tiende a utilizarse para pruebas a nivel de genes, mientras que los biomarcadores o las moléculas pueden incluir genes y/o proteínas. Lo ideal sería que en el futuro se llegara a un consenso sobre términos que sean aceptados y comprendidos por todas las partes interesadas que puedan beneficiarse de este atlas.

Esperamos que este atlas, cuyos autores son expertos internacionales en diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón, ayude a un público amplio a comprender los fundamentos de las anomalías moleculares del cáncer de pulmón que ayudan a orientar la terapia dirigida que se utiliza hoy en día en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

## Referencias

1. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-1500. doi:10.1126/science.1099314.
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-2139. doi:10.1056/NEJMoa040938.
3. Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*. 2004;431(7008):525-526. doi:10.1038/431525b.
4. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2005;65(4):1479-1488. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2650.
5. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-566. doi:10.1038/nature05945.
6. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007;131(6):1190-1203. doi:10.1016/j.cell.2007.11.025.

7. Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4352-4359. doi:10.1200/JCO.2012.44.1477.
8. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1469-1472. doi:10.1038/nm.3352.
9. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246. doi:10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
10. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer [published correction appears in *N Engl J Med*. 2011 Feb 10;364(6):588]. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693-1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448.
11. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(21):1963-1971. doi:10.1056/NEJMoa1406766.
12. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):984-993. doi:10.1016/S1470-2045(16)30146-2.
13. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med*. 2018;378(8):731-739. doi:10.1056/NEJMoa1714448.
14. Wolf J, Seto T, Han JY, et al. Capmatinib in MET exon 14-mutated or MET-amplified non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(10):944-957. doi:10.1056/NEJMoa2002787.
15. Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in non-small-cell lung cancer with MET exon 14 skipping mutations. *N Engl J Med*. 2020;383(10):931-943. doi:10.1056/NEJMoa2004407.
16. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p.G12C mutation. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2371-2381. doi:10.1056/NEJMoa2103695.
17. Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(3):241-251. doi:10.1056/NEJMoa2112431.
18. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(2):92-98. doi:10.1056/NEJMoa011954.
19. Lee CK, Davies L, Wu YL, et al. Gefitinib or erlotinib vs chemotherapy for EGFR mutation-positive lung cancer: individual patient data meta-analysis of overall survival. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(6):10.1093/jnci/djw279. doi:10.1093/jnci/djw279.
20. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. *N Engl J Med*. 2020;382(1):41-50. doi:10.1056/NEJMoa1913662.
21. Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):141-151. doi:10.1016/S1470-2045(14)71173-8.
22. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Updated overall survival in a randomized study comparing dacomitinib with gefitinib as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFR-activating mutations. *Drugs*. 2021;81(2):257-266. doi:10.1007/s40265-020-01441-6.
23. Drilon A, Chiu CH, Fan Y, et al. Long-term efficacy and safety of entrectinib in ROS1 fusion-positive NSCLC. *JTO Clin Res Rep*. 2022;3(6):100332. doi:10.1016/j.jtocrr.2022.100332.
24. Nishio M, Felip E, Orlov S, et al. Final overall survival and other efficacy and safety results from ASCEND-3: phase II study of ceritinib in ALKi-naive patients with ALK-rearranged NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2020;15(4):609-617. doi:10.1016/j.jtho.2019.11.006.
25. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, et al. Brigatinib versus crizotinib in ALK inhibitor-naive advanced ALK-positive NSCLC: final results of phase 3 ALTA-1L trial [published correction appears in *J Thorac Oncol*. 2022 Oct 14]. *J Thorac Oncol*. 2021;16(12):2091-2108. doi:10.1016/j.jtho.2021.07.035.

26. Solomon BJ, Bauer TM, Mok TSK, et al. Efficacy and safety of first-line lorlatinib versus crizotinib in patients with advanced, ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated analysis of data from the phase 3, randomised, open-label CROWN study. *Lancet Respir Med.* 2022;S2213-2600(22)00437-4. doi:10.1016/S2213-2600(22)00437-4.
27. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol.* 2019;30(7):1121-1126. doi:10.1093/annonc/mdz131.
28. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Phase 2 study of dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF V600E-mutant metastatic NSCLC: updated 5-year survival rates and genomic analysis. *J Thorac Oncol.* 2022;17(1):103-115. doi:10.1016/j.jtho.2021.08.011.
29. Drilon A, Tan DSW, Lassen UN, et al. Efficacy and safety of larotrectinib in patients with tropomyosin receptor kinase fusion-positive lung cancers. *JCO Precis Oncol.* 2022;6:e2100418. doi:10.1200/PO.21.00418.
30. Demetri GD, De Braud F, Drilon A, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in patients with NTRK fusion-positive solid tumors [published correction appears in *Clin Cancer Res.* 2022;28(10):2196]. *Clin Cancer Res.* 2022;28(7):1302-1312. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-3597.
31. Drilon A, Subbiah V, Gautschi O, et al. Selpercatinib in patients with RET fusion-positive non-small-cell lung cancer: updated safety and efficacy from the registrational LIBRETTO-001 phase I/II trial. *J Clin Oncol.* 2023;41(2):385-394. doi:10.1200/JCO.22.00393.
32. Griesinger F, Curigliano G, Thomas M, et al. Safety and efficacy of pralsetinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer including as first-line therapy: update from the ARROW trial. *Ann Oncol.* 2022;33(11):1168-1178. doi:10.1016/j.annonc.2022.08.002.
33. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Five-year outcomes with pembrolizumab versus chemotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score  $\geq 50$ . *J Clin Oncol.* 2021;39(21):2339-2349. doi:10.1200/JCO.21.00174.
34. Martin NA, Tepper JE, Giri VN, et al. Adopting consensus terms for testing in precision medicine. *JCO Precis Oncol.* 2021;5:PO.21.00027. doi:10.1200/PO.21.00027.

# Relevancia clínica de las pruebas de biomarcadores en el cáncer de pulmón

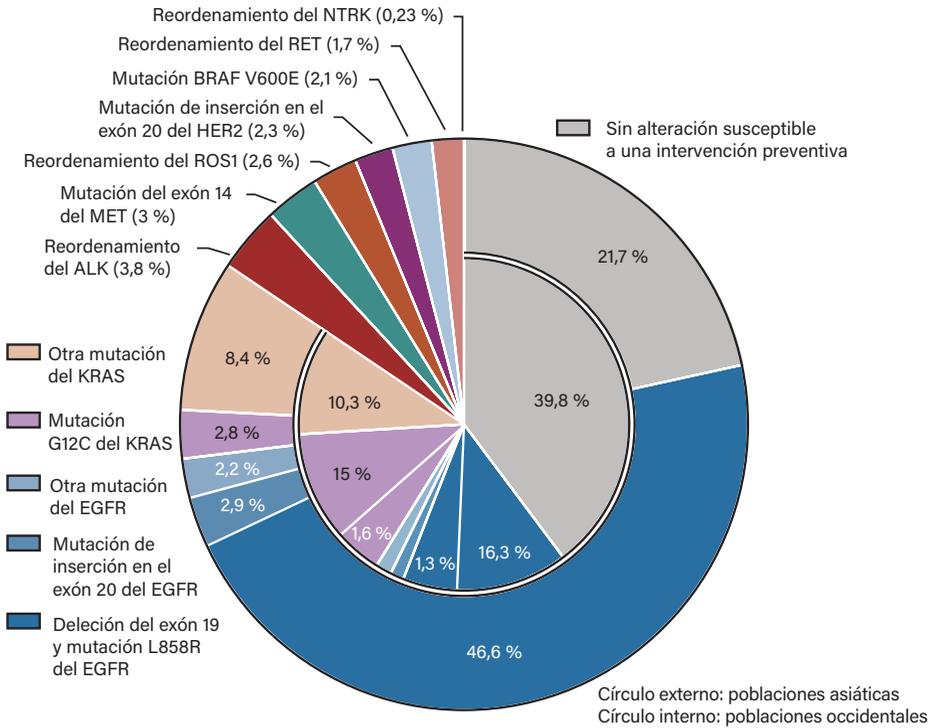
# 2

Por Benjamin J. Solomon, Paul J. Hesketh, Lyudmila Bazhenova, Shani Shilo y Lecia V. Sequist

## Concepto de terapia personalizada para el cáncer de pulmón

¿Por qué es tan importante realizar pruebas de biomarcadores precisas, oportunas y completas para la atención óptima de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) no escamoso? En pocas palabras, porque las recomendaciones basadas en pruebas para el tratamiento en casi todos los estadios y situaciones de esta enfermedad dependen en gran medida del conocimiento de los biomarcadores tumorales para priorizar y personalizar los innumerables tratamientos disponibles para mejorar los resultados de los pacientes con CPNM. En los últimos 15 años, el paradigma de analizar un CPNM en busca de mutaciones conductoras en el momento del diagnóstico inicial ha pasado de ser un requisito experimental a uno estándar para los pacientes con enfermedad metastásica y se está convirtiendo en el estándar de atención para todos los estadios de la enfermedad. Simultáneamente, el número de genes que se deben analizar para optimizar las recomendaciones de tratamiento se ha ampliado de las mutaciones en un único gen a una lista extensa y en constante expansión, y se han desarrollado múltiples plataformas y tecnologías para analizar tanto el tejido tumoral como el plasma en busca de ADN tumoral circulante (ADNtc).

Desde principios de la primera década del siglo XXI, la identificación de alteraciones genómicas oncogénicas en el CPNM y el desarrollo de terapias dirigidas diseñadas para bloquear el factor oncogénico han permitido individualizar el tratamiento y transformar los resultados. Aunque su frecuencia varía entre las poblaciones asiáticas y occidentales, en la mayoría de los adenocarcinomas de pulmón se pueden identificar dianas moleculares potencialmente susceptibles a una intervención preventiva (figura 2-1). Ahora existen terapias eficaces para tratar tumores con mutaciones específicas en los genes *EGFR*, *MET*, *BRAF*, *ERBB2 (HER2)* y *KRAS*, así como fusiones oncogénicas en las que intervienen los genes *ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK1-3* (figura 2-2; tabla 2-1). Las pruebas mutacionales integrales y la terapia dirigida por biomarcadores han permitido ofrecer una medicina personalizada para el CPNM y mejoras en los resultados clínicos.

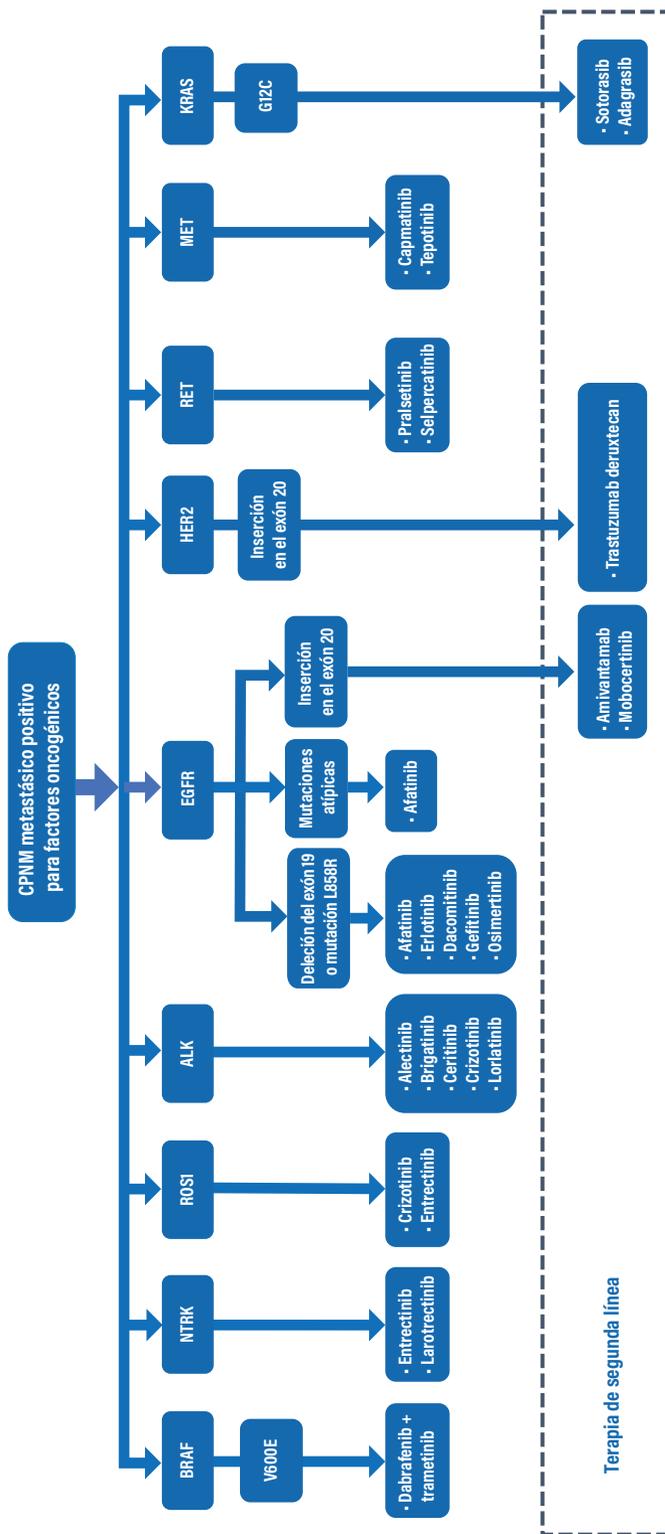


**Figura 2-1.** Frecuencia de los factores oncogénicos en el CPNM (Fuente: Tan y Tan 2022,<sup>1</sup> copyright © 2022, por la Sociedad Americana de Oncología Clínica. Publicado por Wolters Kluwer. Todos los derechos reservados).

## Desarrollo de la terapia dirigida para el CPNM: perspectiva histórica

El primer avance fue el descubrimiento de las mutaciones del gen *EGFR* en el cáncer de pulmón en el 2004. En ese momento, las pruebas de los nuevos inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) bloqueadores del EGFR revelaron que, aunque la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón no se beneficiaron de esta terapia, unos pocos obtuvieron beneficios espectaculares con respuestas rápidas y duraderas.<sup>2-5</sup> En un estudio más detallado de los tumores de los pacientes que respondieron de forma extraordinaria se descubrieron mutaciones en el dominio de la tirosina quinasa del *EGFR* que conferirían una biología “adicta a los oncogenes” en la que la supervivencia del cáncer dependía de forma única de la señalización de la vía del EGFR y, por tanto, podía verse alterada de manera particular por la inhibición terapéutica de esta vía.<sup>6,7</sup> El estudio IPASS demostró que los mejores resultados se obtuvieron al seleccionar a los pacientes en función de la detección de mutaciones del *EGFR* en sus tumores, y no en función de sus características clínicas, y al iniciar la terapia con los TKI del EGFR en el entorno de primera línea (tabla 2-1).<sup>8,9</sup> Estos hallazgos se han confirmado posteriormente en otros múltiples estudios.<sup>10-13</sup>

Estos estudios demostraron mejorías en la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progresión, así como una mejoría de la supervivencia en comparación con los controles históricos.<sup>14</sup> La ventaja en la supervivencia global ha sido más difícil de demostrar en los ensayos de primera línea de gefitinib o erlotinib en comparación con la quimioterapia en el CPNM con mutación del *EGFR*, probablemente debido al cruzado.<sup>15</sup> Se han desarrollado compuestos de segunda generación, incluidos afatinib<sup>16</sup> y dacominitib<sup>17</sup>, que muestran una eficacia mejorada y una ventaja en la supervivencia frente a los TKI de primera generación



**Figura 2-2.** Algoritmo basado en biomarcadores para el uso de la terapia dirigida en el CPNM (véanse también las pautas actualizadas de la *National Comprehensive Cancer Network* [NCCN]<sup>18</sup> y la *Sociedad Europea de Oncología Médica* [ESMO]<sup>19</sup>)

Tabla 2-1. Perfiles de eficacia y toxicidad de los agentes dirigidos aprobados por la FDA

Inhibidor	Estudio	Fármaco	Diseño del estudio	N	Tasa de respuesta objetiva (%)	Mediana de duración de la respuesta (meses)	Mediana de supervivencia libre de progresión (meses)	Mediana de supervivencia global (meses)	Principales eventos adversos relacionados con el tratamiento
EGFR	IPASS <sup>8,9</sup>	Gefitinib	Gefitinib vs. quimioterapia	1217, población general	43,0 vs. 32,2	NS	5,7 vs. 5,8; HR, 0,74	18,8 vs. 17,4; HR, 0,90	Erupción cutánea, diarrea
			261 con mutaciones de EGFR	71,2 con gefitinib vs. 47,3	NS	HR, 0,48	21,6 vs. 21,9; HR, 1,00	Erupción cutánea, diarrea	
	EURTAC <sup>11</sup>	Erlotinib	Erlotinib vs. quimioterapia	176 sin mutaciones	1,1 vs. 23,5	NS	HR, 2,85		11,2 vs. 12,7; HR, 1,18
			174	64 vs. 1	NS	9,7 vs. 5,2; HR, 0,37	19,3 vs. 19,5		
ALK	LUX-Lung III <sup>10</sup>	Afatinib	Afatinib vs. quimioterapia	345	56 vs. 23	11,1 vs. 5,5	11,1 vs. 6,9; HR, 0,58	28 vs. 28 (beneficio de supervivencia en pacientes con deleciones del exón 19, 33 vs. 21,1)	Diarrea, erupción cutánea, estomatitis, paroniquia
			452	76 vs. 70	14,8 vs. 8,3	14,7 vs. 9,2; HR, 0,59	34 vs. 27; HR, 0,78	Dermatitis, diarrea, transaminasas elevadas	
	Archer 1050 <sup>17</sup>	Dacomitinib	Dacomitinib vs. gefitinib	556	80 vs. 76	17,2 vs. 8,5	18,9 vs. 10,2; HR, 0,46		38,6 vs. 31,8; HR, 0,80 (0,64-0,997)
			Osimertinib	343	74 vs. 45	11,3 vs. 5,3	10,9 vs. 7,0; HR, 0,45	NR vs. 47,5 (en la referencia de 4 años; 56,6% crizotinib vs. 49,1% quimioterapia)	Trastornos de la visión, diarrea, náuseas y edema
	PROFILE 1014 <sup>22</sup>	Crizotinib	Fase 3—crizotinib vs. quimioterapia	376	73 vs. 50	23,9 vs. 11,1	16,6 vs. 8,1; HR, 0,55	NR vs. 26,2 (en la referencia de 2 años; 70,6% ceritinib vs. 58,2% quimioterapia)	
ASCEND-4 <sup>23</sup>	Ceritinib	Fase 3—ceritinib vs. quimioterapia	303	83 vs. 76	NR vs. 11,1	34,8 vs. 10,9; HR, 0,43	NR vs. 57,4 (a los 5 años; tasa de SG 62,5% vs 45,5%)	Anemia, mialgia, aumento de bilirrubina, aumento de peso, dolor musculoesquelético y reacción de fotosensibilidad	
ALEX <sup>24,25</sup>	Alectinib	Fase 3—alectinib vs. quimioterapia							

(continúa)

**Tabla 2-1.** Perfiles de eficacia y toxicidad de los agentes dirigidos aprobados por la FDA (continuación)

Inhibidor	Estudio	Fármaco	Diseño del estudio	N	Tasa de respuesta objetiva (%)	Mediana de duración de la respuesta (meses)	Mediana de supervivencia libre de progresión (meses)	Mediana de supervivencia global (meses)	Principales eventos adversos relacionados con el tratamiento
ALK	ALTA-1 <sup>26</sup>	Brigatinib	Fase 3—brigatinib vs. crizotinib	275	74 vs. 62	NR vs. 13,9	24,0 vs. 11,1; HR, 0,48	NR	Eventos GI (diarrea, náuseas, vómitos) aumento de CPK sanguínea, tos y aumento de aminotransferasas
	CROWN <sup>27</sup>	Lorlatinib	Fase 3—lorlatinib vs. crizotinib	296	76 vs. 58	NR vs. 11,1	NR vs. 9,3; HR, 0,28	NR	Hiperlipidemia, edema, aumento de peso, neuropatía periférica y efectos cognitivos
ROS1	Dziedziszko et al <sup>28</sup>	Entrectinib	Principalmente pretratado con platino	107	67,1	15,7	15,7	NE	Disgeusia, mareos, estreñimiento, fatiga, diarrea, aumento de peso, parestesia
	Shaw et al <sup>29</sup>	Crizotinib	13 % sin tratamiento previo	53	72	24,7	19,3	51,4	Trastorno de la visión, náuseas, edema, diarrea, vómitos, transaminasas elevadas y estreñimiento
RET	Drilon et al <sup>30</sup>	Selpercatinib	Pretratado con platino	105	61	28,6	24,6	NE	Boca seca, diarrea, aumento de aspartato aminotransferasa, aumento de alanina aminotransferasa, hipertensión
	Griesinger et al <sup>31</sup>	Pralsetinib	Pretratado con platino	39	84	20,2	22	NE	Neutropenia, leucopenia, aumento de aspartato aminotransferasa, anemia, aumento de alanina aminotransferasa, estreñimiento, fatiga, aumento de creatina fosfoquinasa en sangre
NTRK	Demetri et al <sup>32</sup>	Entrectinib	Principalmente pretratado	75	72	No alcanzado	13	NR	Disgeusia, diarrea, fatiga y aumento de peso.
	Drilon et al <sup>33</sup>	Larotrectinib	Principalmente pretratado	22	63,6	19,9	14,9	NE (20,8-NE)	Mialgias, mareos, náuseas, aumento de alanina aminotransferasa
				15	73	33,3	35,4	40,7	

(continúa)

**Tabla 2-1.** Perfiles de eficacia y toxicidad de los agentes dirigidos aprobados por la FDA (continuación)

Inhibidor	Estudio	Fármaco	Diseño del estudio	N	Tasa de respuesta objetiva (%)	Mediana de duración de la respuesta (meses)	Mediana de supervivencia libre de progresión (meses)	Mediana de supervivencia global (meses)	Principales eventos adversos relacionados con el tratamiento
HER2	Li et al <sup>34</sup>	Trastuzumab deruxtecan 6,4 mg/kg	Pretratado con platino	91	55	9,2	8,2	17,8	Náuseas, fatiga, alopecia, vómitos, neutropenia, anemia, diarrea
	Goto et al <sup>35</sup>	Trastuzumab deruxtecan 6,4 mg/kg	Pretratado con platino	28	42,9	5,9	NR	NR	ILD relacionada con el fármaco 14 %
		Trastuzumab deruxtecan 5,4 mg/kg	Pretratado con platino	52	53,8	NE	NR	NR	ILD relacionada con el fármaco 5,9 %
MET	Wolf et al <sup>36</sup>	Capmatinib	Sin tratamiento previo	28	68	12,6	12,4	20,8	Edema periférico, náuseas, vómitos, aumento de creatinina en sangre, fatiga, diarrea
			Pretratado con platino	69	41	9,7	5,4	13,3	
	Paik et al <sup>37</sup>	Tepotinib	43 % sin tratamiento previo	99	46	11,1	8,5	17,1	Edema periférico, náuseas, diarrea, aumento de creatinina en sangre, hipoalbuminemia
BRAF	Planchard et al <sup>38</sup>	Dabrafenib más trametinib	Sin tratamiento previo	36	64	10,2	10,8	17,3	Pirexia, náuseas, vómitos, piel seca, edema periférico, diarrea, disminución del apetito y tos
			Pretratado con platino	57	68,4	9,8	10,2	18,2	
KRAS	Skoulidis et al <sup>39</sup>	Sotorasib	Pretratado con platino	124	37,1	11,1	6,8	12,5	Diarrea, náuseas, aumento de alanina aminotransferasa, aumento de AST, fatiga
			Pretratado con platino	116	42,9	8,5	6,5	12,6	Diarrea, náuseas, vómitos, fatiga, aumento de alanina aminotransferasa o AST, aumento de creatinina
EGFR exón 20	Park et al <sup>41</sup>	Amivantamab	Pretratado con platino	81	40	11,1	8,3	22,8	Reacciones a la infusión, erupción cutánea, paroniquia
	Zhou et al <sup>42</sup>	Mobocertinib	Pretratado con platino	114	28	17,5	7,3	24	Diarrea, erupción cutánea

Abreviaturas: AST = aspartato aminotransferasa; CPK = creatinina fosfoquinasa; GI = gastrointestinal; HR = cociente de riesgos; ILD = enfermedad pulmonar intersticial; NE = no estimable; NR = no informado; NS = no significativo; SG = supervivencia global.

en algunas poblaciones, aunque con toxicidad adicional. El TKI de tercera generación osimertinib ha demostrado una mayor eficacia, incluida una mejoría de la supervivencia con una toxicidad reducida en comparación con los TKI de primera generación,<sup>20,21</sup> estableciendo un nuevo estándar de atención para el tratamiento de primera línea de pacientes recién diagnosticados con mutaciones del *EGFR*. Recientemente, el osimertinib se convirtió en la primera terapia dirigida aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA) en el entorno adyuvante dada su demostrada mejoría de la supervivencia libre de enfermedad.<sup>43</sup>

Este concepto de terapia dirigida al tumor recibió una nueva validación en el desarrollo de fármacos para el CPNM y en la práctica clínica después de que se describiera el segundo factor oncogénico, la fusión del gen *ALK*, en el cáncer de pulmón en el 2007.<sup>44</sup> Por casualidad, acababa de iniciarse un ensayo de fase 1 en humanos con crizotinib, un nuevo TKI multiquinasa desarrollado para inhibir el MET pero del que se sabía que también inhibía la quinasa del linfoma anaplásico (Anaplastic Lymphoma Kinase, ALK) y el oncogén 1 c-ros (ROS1).<sup>45</sup> El diseño del ensayo cambió rápidamente el enfoque del MET a la identificación y reclutamiento de pacientes cuyos tumores albergaban reordenamientos de *ALK* mediante hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH), y este ensayo y los posteriores de fase 3 mostraron una eficacia significativa y mejorías en los resultados en comparación con la quimioterapia estándar.<sup>22,45,46</sup> En 4 años, el crizotinib recibió la aprobación de la FDA como el primer fármaco estudiado y aprobado de forma específica para cada genotipo. El rápido y exitoso desarrollo del crizotinib marcó la pauta para el desarrollo de fármacos dirigidos que continúa en la actualidad.

Se han desarrollado TKI para ALK de nueva generación, como ceritinib, alectinib, brigatinib, ensartinib y lorlatinib, con una mayor eficacia y una mejor penetración en el sistema nervioso central (SNC).<sup>23,24,26,27,47</sup> Cuatro de estos compuestos de nueva generación (alectinib, brigatinib, ensartinib y lorlatinib) han demostrado una mayor eficacia que el crizotinib en ensayos clínicos de fase 3, elevando el nivel de la terapia de primera línea para el CPNM con *ALK* reordenado. Estas terapias dirigidas han mejorado los resultados en comparación con los controles históricos<sup>48</sup> y han dado lugar a tasas de supervivencia sin precedentes, con una mediana de supervivencia superior a los 5 años.<sup>25</sup>

Posteriormente, se produjo un rápido desarrollo de inhibidores de la quinasa dirigidos contra las mutaciones *BRAF* V600E,<sup>38</sup> las mutaciones de omisión del exón 14 de *MET*,<sup>36,37</sup> así como los reordenamientos genéticos del *ROS1*,<sup>28,29</sup> *RET*,<sup>30,31</sup> y del *NTRK1-3*.<sup>32,33</sup> Las aprobaciones de estas terapias se han basado en gran medida en los resultados de ensayos de fase 1 o 2 de un solo grupo, que demuestran altas tasas de respuesta en tumores con la diana oncogénica específica, sin ensayos de fase 3 que los acompañen, debido en gran parte a las limitaciones de realizar grandes ensayos clínicos de forma aleatoria en poblaciones poco frecuentes con estas dianas poco comunes. La utilización de nuevas estrategias de selección de dianas, como los anticuerpos biespecíficos y los fármacos inmunoconjugados, ha ampliado el espectro de oncogenes susceptibles a una intervención preventiva para incluir las mutaciones del exón 20 del *EGFR*<sup>41,42</sup> y la mutación del *HER2*.<sup>34</sup> Y aunque las mutaciones en la guanosín trifosfato hidrolasa (GTPasa) del *KRAS* han sido históricamente difíciles de atacar,<sup>49</sup> el inhibidor *KRAS* G12C, sotorasib, fue aprobado por la FDA en mayo del 2021,<sup>39</sup>

y posteriormente, el adagrasib fue aprobado para esta indicación en diciembre del 2022 con base en las tasas de respuesta en pacientes con CPNM previamente tratados.<sup>40</sup>

### **Resistencia a las terapias dirigidas**

La resistencia adquirida acabará por desarrollarse y limitará la eficacia de las terapias dirigidas. Los temas comunes en la resistencia a las terapias dirigidas son las aberraciones específicas en la vía inhibida y la resistencia inespecífica mediante la adquisición de vías de derivación o la transformación histológica en carcinoma microcítico o carcinoma de células escamosas. Las biopsias posteriores a la progresión pueden ayudar a comprender los mecanismos de resistencia y guiar la terapia posterior a la progresión en algunos casos. Los mecanismos de resistencia en el contexto de diferentes factores oncogénicos se debaten con más detalle en los capítulos específicos de genes de este atlas.

### **Resultados de la terapia dirigida por biomarcadores en pacientes con cáncer de pulmón**

La disponibilidad y el uso de terapias dirigidas ha mejorado los resultados de los pacientes con CPNM avanzado. La reducción de la mortalidad en la población estadounidense y la mejoría de la supervivencia tras el diagnóstico de CPNM entre el 2013 y el 2016 coincidieron con la aprobación de los TKI para EGFR y ALK.<sup>50</sup> Los programas de pruebas moleculares regionales y nacionales a gran escala en Estados Unidos,<sup>51</sup> y Europa<sup>52,53</sup> demostraron la viabilidad de realizar pruebas para detectar múltiples factores moleculares en grandes poblaciones y el valor de dirigir a los pacientes identificados con alteraciones moleculares a la terapia dirigida adecuada. El *Lung Cancer Mutation Consortium* de EE. UU. analizó los tumores de 733 pacientes para 10 genes y pudo identificar una mutación conductora potencialmente susceptible de responder al tratamiento en el 64 % de los casos. Los resultados mejoraron en los pacientes con un factor oncogénico que recibieron un agente dirigido (n = 260, mediana de supervivencia de 3,5 años) en comparación con los pacientes con un factor oncogénico que no recibieron terapia dirigida (n = 318, mediana de supervivencia de 2,4 años).<sup>51</sup> Un programa nacional francés identificó alteraciones moleculares en aproximadamente la mitad de los 17 664 pacientes con CPNM analizados durante un periodo de 1 año con un panel de 6 genes,<sup>52</sup> y se observaron mejorías en los resultados, incluidas las tasas de respuesta, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en los pacientes que presentaban alteraciones genómicas susceptibles a una intervención preventiva. Del mismo modo, un estudio alemán en el que participaron 5145 pacientes demostró que la genotipificación de los tumores era factible y se asociaba a una mejoría de los resultados de supervivencia en los pacientes con mutaciones del *EGFR* o reordenamientos de *ALK* que recibieron la terapia dirigida apropiada.<sup>53</sup> Un análisis en condiciones reales de 4064 pacientes estadounidenses con CPNM mediante la base de datos electrónica Flatiron vinculada con el perfil genómico estándar de atención reveló que los pacientes cuyos tumores albergaban una alteración del factor oncogénico y fueron tratados con una terapia dirigida adecuada (n = 575) tuvieron una mejor supervivencia global en comparación con los que no tenían una alteración del factor oncogénico (n = 560) (mediana, 18,6 meses en comparación con 11,4 meses;  $P < 0,001$ ).<sup>54</sup>

## Barreras para la realización de pruebas de biomarcadores

Se identificaron varias barreras para la realización de pruebas de biomarcadores clínicamente apropiadas.<sup>55-59</sup> Aunque el impacto relativo de cada barrera varía según la ubicación geográfica (países desarrollados frente a países en vías de desarrollo o zonas rurales frente a zonas metropolitanas) y el entorno asistencial (comunitario frente a académico), se ha observado una notable coherencia entre los distintos entornos en cuanto a los factores clave. Uno de los estudios más integrales para evaluar las barreras para la realización pruebas en un entorno global fue el realizado por la *International Association for the Study of Lung Cancer*.<sup>59</sup> Se identificaron cinco factores comunes en todas las ubicaciones. El más frecuente en todas las regiones geográficas fue el costo. La calidad del tejido (muestra inadecuada, manipulación subóptima) también fue un factor limitante importante. Otros factores fueron el acceso a las pruebas (un solo gen en comparación con un panel único más amplio), tiempos de respuesta prolongados y la concientización (familiaridad con las pautas y dificultades en la interpretación de los resultados). Además, en los países en vías de desarrollo y de ingresos medios, la falta de acceso a diversos agentes dirigidos supone un importante desincentivo para la realización de pruebas de biomarcadores.<sup>60</sup>

Entre las posibles soluciones para abordar estos problemas se incluyen el uso de protocolos de pruebas reflejas; la optimización de la interacción entre los proveedores que obtienen las muestras tumorales, los patólogos y los oncólogos médicos; la revisión de los casos por parte de juntas tumorales multidisciplinarias; y la mejora de los tiempos de respuesta mediante la creciente utilización de pruebas de ADNct basadas en plasma. Dada la rápida evolución de múltiples nuevas dianas moleculares potencialmente tratables, la mejoría de los esfuerzos de formación de los proveedores, en particular los dirigidos a los proveedores comunitarios y no especializados en el ámbito torácico, podría optimizar los esfuerzos en la realización de pruebas moleculares.<sup>56</sup> Una encuesta realizada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica mostró que los médicos de medicina general solicitaban pruebas de biomarcadores con una frecuencia significativamente mayor para sus pacientes con CPNM escamoso en comparación con los especialistas en medicina torácica, a pesar de la relativa escasez de oncogenes susceptibles de responder al tratamiento en este tipo de tumor. Además, fueron menos propensos a aplazar el tratamiento con terapias no dirigidas mientras esperaban los resultados de los biomarcadores en comparación con los oncólogos especialistas, a pesar de los beneficios demostrados del uso de terapias dirigidas en el entorno de primera línea.<sup>56</sup>

## Impacto de no realizar pruebas

El valor de realizar pruebas oportunas y precisas de biomarcadores para guiar las decisiones sobre el tratamiento en el CPNM avanzado está bien reconocido. Las tasas de supervivencia a 5 años de los pacientes que reciben terapias dirigidas o inmunoterapias oscilan entre el 15 % y el 50 % en función del biomarcador, en comparación con una tasa histórica de aproximadamente el 6 % con quimioterapia citotóxica.<sup>62</sup> Recientemente, 2 estudios han reforzado el impacto de la adherencia a las pautas de las pruebas de biomarcadores sobre los resultados en el CPNM.<sup>62,63</sup> John et al estudiaron retrospectivamente una cohorte de 28 784 pacientes con CPNM avanzado procedentes de 280 clínicas oncológicas estadounidenses.<sup>62</sup> Dos tercios de estos pacientes se sometieron a las pruebas de biomarcadores recomendadas por la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (grupo adherente). Se observó una mejoría de los

resultados clínicos, incluido un menor riesgo de mortalidad y una mediana de supervivencia mayor en el grupo adherente en comparación con el de los pacientes que no se sometieron a pruebas de biomarcadores (grupo no adherente). El impacto de una junta de tumores moleculares (molecular tumor board, MTB) a la hora de ayudar a superar las numerosas barreras para obtener y aplicar las pruebas de biomarcadores adecuadas quedó demostrado en un estudio realizado en la Universidad de Kentucky,<sup>63</sup> en el que los casos revisados por la MTB tuvieron mejores resultados de supervivencia que los controles emparejados por propensión sin revisión de la MTB (cociente de riesgo [HR], 8,61;  $P < 0,0001$ ).

Aunque el papel de las pruebas de biomarcadores en estadios más tempranos de la enfermedad ha sido menos definido, la aprobación del osimertinib adyuvante en CPNM resecaados con mutación EGFR positiva<sup>43</sup> y la eficacia de los fármacos inmunooncológicos neoadyuvantes y adyuvantes en pacientes cuyos tumores son negativos para EGFR y ALK también han establecido el papel esencial de las pruebas de biomarcadores en este entorno.

### **Perspectiva del defensor de pacientes**

La nueva era de la medicina personalizada ha proporcionado una esperanza y un optimismo renovados a los pacientes con cáncer de pulmón y a sus familiares cuidadores. Para determinar el tratamiento personalizado óptimo y lograr los mejores resultados posibles, es crucial realizar pruebas de biomarcadores. Hay varias consideraciones importantes desde el punto de vista del paciente o del proveedor de atención médica.

### **Acceso, costo y equidad**

Aunque, en muchos países, las pruebas de biomarcadores son rutinarias y están cubiertas por los sistemas de salud tras el diagnóstico, este no es el caso en todo el mundo. Existen diferencias significativas entre Europa Occidental/Norte y Europa Oriental, por ejemplo, como se describe en el documento de posición de Lung Cancer Europe (LuCE)<sup>64</sup> e importantes disparidades dentro de los países según la raza.<sup>65</sup> Además, las pruebas repetidas de biomarcadores para examinar los mecanismos de resistencia adquirida a la terapia dirigida pueden no ser reembolsadas por los sistemas de salud, lo que obliga a los pacientes a incurrir en gastos por cuenta propia para acceder a opciones de terapia dirigida posteriores.

### **Educación y esperanza**

El impacto de identificar una mutación conductora susceptible a una intervención preventiva puede ser de grandes proporciones; a veces representa literalmente la diferencia entre la vida y la muerte. Sin embargo, muchos cánceres de pulmón no son portadores de un factor oncogénico y, para algunos, las alteraciones genéticas halladas en las pruebas aún no disponen de las terapias dirigidas correspondientes. Es fundamental que los pacientes y sus familias reciban asesoramiento en el momento de realizar las pruebas moleculares que cubra la gama de posibles resultados, la importancia de los posibles hallazgos y las limitaciones de las pruebas. Es crucial gestionar las expectativas de los pacientes y sus familias. Además, la interpretación de los informes de patología molecular puede suponer un reto, razón por la cual debe facilitarse apoyo. El material educativo comprensible disponible en línea o en formato impreso de organizaciones de defensa del paciente, profesionales y educativas desempeña un papel importante, sobre todo para ayudar a quienes no hayan recibido una propuesta

del proveedor relacionada con las pruebas moleculares y para promover la realización de las pruebas necesarias. Además, existen comunidades sociales digitales en las que pacientes y familiares comparten experiencias y aprenden unos de otros, lo que les proporciona apoyo y esperanza. Los proveedores de servicios médicos pueden ayudar dirigiendo a los pacientes recién diagnosticados con cáncer de pulmón hacia estos recursos.

## Conclusión

El diagnóstico y el tratamiento actuales del CPNM dependen en gran medida de la realización de pruebas de biomarcadores tumorales oportunas, bien integradas y exhaustivas, así como de la utilización adecuada de las terapias disponibles. Este atlas es una referencia integral que les permitirá a los lectores proporcionar los enfoques terapéuticos personalizados óptimos para los pacientes con cáncer de pulmón.

## Referencias

1. Tan AC, Tan DSW. Targeted therapies for lung cancer patients with oncogenic driver molecular alterations. *J Clin Oncol*. 2022;40(6):611-625.
2. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol*. 2007;25:1545-1552.
3. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:5892-5899.
4. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT 2. *J Clin Oncol*. 2004;22:785-794.
5. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT 1. *J Clin Oncol*. 2004;22:777-784.
6. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-1500.
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139.
8. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947-957.
9. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol*. 2011;29:2866-2874.
10. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2013;31:3327-3334.
11. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13:239-246.
12. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362:2380-2388.
13. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:121-128.
14. Takano T, Fukui T, Ohe Y, et al. EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan. *J Clin Oncol*. 2008;26:5589-5595.

15. Lee CK, Davies L, Wu YL, et al. Gefitinib or erlotinib vs chemotherapy for EGFR mutation-positive lung cancer: individual patient data meta-analysis of overall survival. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109.
16. Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol.* 2015;16:141-151.
17. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFR-activating mutations. *J Clin Oncol.* 2018;36:2244-2250.
18. NCCN Guidelines Committee. *Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer*, version 5.2022. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nscl.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf).
19. ESMO Guidelines Committee. *Clinical Practice Guidelines—Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up*. Updated September 15, 2020. <https://www.esmo.org/guidelines/guidelines-by-topic/lung-and-chest-tumours/clinical-practice-living-guidelines-metastatic-non-small-cell-lung-cancer>.
20. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;382:41-50.
21. Soria JC, Ramalingam SS. Osimertinib in EGFR mutation-positive advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378:1262-1263.
22. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371:2167-2177.
23. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2017;389:917-929.
24. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;377:829-838.
25. Mok T, Camidge DR, Gadgeel SM, et al. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study. *Ann Oncol.* 2020;31:1056-1064.
26. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, et al. Brigatinib versus crizotinib in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;379:2027-2039.
27. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383:2018-2029.
28. Dziadziuszko R, Krebs MG, De Braud F, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in locally advanced or metastatic ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2021;39:1253-1263.
29. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol.* 2019;30:1121-1126.
30. Drilon A, Subbiah V, Gautschi O, et al. Selpercatinib in patients with RET fusion-positive non-small-cell lung cancer: updated safety and efficacy from the Registrational LIBRETTO-001 phase I/II trial. *J Clin Oncol.* 2022;JCO2200393.
31. Griesinger F, Curigliano G, Thomas M, et al. Safety and efficacy of pralsetinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer including as first-line therapy: update from the ARROW trial. *Ann Oncol.* 2022;33(11):1168-1178.
32. Demetri GD, De Braud F, Drilon A, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in patients with NTRK fusion-positive solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2022;28:1302-1312.
33. Drilon A, Tan DSW, Lassen UN, et al. Efficacy and safety of larotrectinib in patients with tropomyosin receptor kinase fusion-positive lung cancers. *JCO Precis Oncol.* 2022;6:e2100418.
34. Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2022;386:241-251.
35. Goto K, Sang-We K, Kubo T, et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) in patients (Pts) with HER2-mutant metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): interim results from the phase 2 DESTINY-Lung02 trial. *Ann Oncol.* 2022;33:S808-S869.
36. Wolf J, Garon EB, Groen HJM, et al. Capmatinib in MET exon 14-mutated, advanced NSCLC: updated results from the GEOMETRY mono-1 study. *J Clin Oncol.* 2021;39:9020.
37. Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in non-small-cell lung cancer with MET exon 14 skipping mutations. *N Engl J Med.* 2020;383:931-943.

38. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Phase 2 study of dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF V600E-mutant metastatic NSCLC: updated 5-year survival rates and genomic analysis. *J Thorac Oncol.* 2022;17:103-115.
39. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p.G12C mutation. *N Engl J Med.* 2021;384:2371-2381.
40. Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, et al. Adagrasib in non-small-cell lung cancer harboring a KRASG12C mutation. *N Engl J Med.* 2022;387(2):120-131. doi:10.1056/NEJMoa2204619.
41. Park K, Haura EB, Leighl NB, et al. Amivantamab in EGFR exon 20 insertion-mutated non-small-cell lung cancer progressing on platinum chemotherapy: initial results from the CHRYSALIS phase I study. *J Clin Oncol.* 2021;39:3391-3402.
42. Zhou C, Ramalingam SS, Kim TM, et al. Treatment outcomes and safety of mobocertinib in platinum-pretreated patients with EGFR exon 20 insertion-positive metastatic non-small cell lung cancer: a phase 1/2 open-label nonrandomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2021;7:e214761.
43. Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383:1711-1723.
44. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561-566.
45. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693-1703.
46. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:2385-2394.
47. Horn L, Wang Z, Wu G, et al. Ensartinib vs crizotinib for patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2021;7:1617-1625.
48. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2011;12:1004-1012.
49. Uprety D, Adjei AA. KRAS: From undruggable to a druggable cancer target. *Cancer Treat Rev.* 2020;89:102070.
50. Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, et al. The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. *N Engl J Med.* 2020;383:640-649.
51. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA.* 2014;311:1998-2006.
52. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet.* 2016;387:1415-1426.
53. Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP); Network Genomic Medicine (NGM). A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med.* 2013;5:209ra153.
54. Singal G, Miller PG, Agarwala V, et al. Association of patient characteristics and tumor genomics with clinical outcomes among patients with non-small cell lung cancer using a clinicogenomic database. *JAMA.* 2019;321:1391-1399.
55. Smeltzer MP, Wynes MW, Lantuejoul S, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Global Survey on Molecular Testing in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2020;15:1434-1448.
56. Mileham KF, Schenkel C, Bruinooge SS, et al. Defining comprehensive biomarker-related testing and treatment practices for advanced non-small-cell lung cancer: results of a survey of U.S. oncologists. *Cancer Med.* 2022;11:530-538.
57. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, et al. Biomarker testing for patients with advanced non-small cell lung cancer: real-world issues and tough choices. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2019;39:531-542.
58. Rivera MP, Charlot M, Durham DD, et al. Molecular biomarker and programmed death-ligand 1 expression testing in patients with advanced stage non-small cell lung cancer across North Carolina community hospitals. *Chest.* 2021;160:1121-1130.
59. Dalurzo ML, Aviles-Salas A, Soares FA, et al. Testing for EGFR mutations and ALK rearrangements in advanced non-small-cell lung cancer: considerations for countries in emerging markets. *Onco Targets Ther.* 2021;14:4671-4692.
60. Hirsch FR, Zaric B, Rabea A, et al. Biomarker testing for personalized therapy in lung cancer in low- and middle-income countries. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2017;37:403-408.

61. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19:254-266.
62. John A, Yang B, Shah R. Clinical impact of adherence to NCCN guidelines for biomarker testing and first-line treatment in advanced non-small cell lung cancer (aNSCLC) using real-world electronic health record data. *Adv Ther*. 2021;38:1552-1566.
63. Huang B, Chen Q, Allison D, et al. Molecular tumor board review and improved overall survival in non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol*. 2021;5:PO.21.00210.
64. *Position Paper: Disparities and Challenges in Access to Lung Cancer Diagnostics and Treatment across Europe*. Lung Cancer Europe (LuCE); 2020.
65. Harrison S, Judd J, Chin S, et al. Disparities in lung cancer treatment. *Curr Oncol Rep*. 2022;24:241-248.

# Adquisición de muestras y consideraciones preanalíticas

# 3

Los pacientes con cáncer de pulmón pueden manifestar la enfermedad de diversas formas y tenerla en estadio temprano o avanzado en diferentes localizaciones. Independientemente de su manifestación, el tratamiento óptimo requiere la adquisición de tejido para el diagnóstico y, en muchos casos, la caracterización molecular para indicar cuál es la terapia óptima. En este capítulo se revisan los papeles complementarios de los neumólogos, radiólogos y cirujanos en la adquisición de tejido y las variables preanalíticas que influyen en la evaluación patológica óptima y la caracterización molecular del tumor de un paciente.

## Perspectiva del neumólogo

**Por Emily Stone y Kwun M. Fong**

La época en la que los neumólogos solo necesitaban obtener muestras diagnósticas para confirmar la neoplasia maligna y distinguir el cáncer de pulmón microcítico (CPM) del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) ha quedado atrás. La obtención de tejido diagnóstico adecuado para la caracterización molecular de la forma más segura posible es ahora una prioridad, en particular para el CPNM.<sup>1</sup> Cada procedimiento de toma de muestras debe maximizar el rendimiento, ya que el tejido sigue siendo realmente lo esencial tanto para el diagnóstico histopatológico como para la caracterización molecular auxiliar, a pesar de la utilidad de la biopsia líquida en algunos contextos.<sup>2-8</sup>

La adquisición óptima de tejido es un factor preanalítico crucial para el análisis de biomarcadores, ya sea que se utilicen pruebas de un solo gen, un pequeño panel o un perfil genómico integral de secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS).<sup>9-11</sup> Las mejores prácticas tienen como objetivo obtener suficiente tejido para las pruebas histopatológicas y moleculares pertinentes de la forma más segura, eficaz y accesible, teniendo en cuenta las barreras globales para las pruebas de biomarcadores.<sup>12-14</sup>

Esto puede suponer un desafío en el cáncer de pulmón, sobre todo en el caso de lesiones más pequeñas o inaccesibles; con comorbilidades del paciente, como una enfermedad pulmonar grave; o en el contexto de una manifestación en estadio avanzado que contraindique las muestras de resección quirúrgica, que proporcionan más tejido que las biopsias broncoscópicas mínimamente invasivas, la aspiración con aguja y las biopsias por punción con aguja gruesa.<sup>15</sup>

### Broncoscopia flexible

La broncoscopia flexible convencional tiene un alto rendimiento diagnóstico para las lesiones centrales y un bajo rendimiento para las lesiones más pequeñas y periféricas. Las tecnologías más recientes, como la broncoscopia por navegación, la ecografía endobronquial (endobronchial ultrasound, EBUS) y la broncoscopia ultrafina y robótica, mejoran el alcance broncoscópico junto con herramientas de muestreo modernas, por ejemplo, agujas flexibles y gruesas, junto con herramientas de tunelización que están cambiando este paradigma.<sup>16-22</sup> El uso tradicional de la broncoscopia para las lesiones centrales y los abordajes transtorácicos para las lesiones periféricas se está poniendo en tela de juicio a medida que estas técnicas avanzadas de broncoscopia mejoran el rendimiento diagnóstico de las lesiones centrales y periféricas con la capacidad adicional de tomar muestras de los ganglios en el mismo procedimiento con menor riesgo de neumotórax (tabla 3-1).<sup>23</sup>

**Tabla 3-1.** Abordajes broncoscópicos y herramientas de muestreo de uso común para la adquisición de tejido de cáncer de pulmón

Características tumorales	Modalidad	Herramienta de muestreo
Tumor central o endobronquial	Broncoscopia	Biopsia endobronquial Criobiopsia Cepillado Lavados/lavado broncoalveolar
Tumor periférico	Broncoscopia ultrafina EBUS radial	Biopsia transbronquial Criobiopsia transbronquial TBNA Cepillado transbronquial Lavados/lavado broncoalveolar (dirigido)
Tumor mediastinal o tumor extrínseco/ganglio linfático adyacente a las vías respiratorias	EBUS lineal	TBNA

Abreviaturas: EBUS = ecografía endobronquial; TBNA = aspiración transbronquial con aguja.

Para los abordajes endobronquiales y transbronquiales, se han recomendado 5 biopsias endobronquiales/transbronquiales con pinzas, considerándose otras 5 biopsias con pinzas o 2 criobiopsias para maximizar la adquisición de tejido y se ha informado que estas últimas tienen un mayor rendimiento diagnóstico, pero con un mayor riesgo de complicaciones, sobre todo de sangrado.<sup>11,24</sup>

Las lesiones visibles por broncoscopia o por imagen (EBUS, fluoroscopia, tomografía computarizada [TC] de haz cónico) también pueden muestrearse con un cepillo de cerdas cónicas de la lesión; se colocan como frotis en un portaobjetos para citología y se agitan enérgicamente en solución salina para desprender las células que forman pellets por centrifugación en un bloque celular.<sup>25</sup> Un estudio sugirió que los cepillados mostraban una adecuación similar a las biopsias para inmunohistoquímica (PD-L1, *ALK*, *ROS1*) y NGS (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*).<sup>26</sup>

Los lavados bronquiales proporcionan muestras citológicas y bloques celulares, aunque cualquier célula tumoral desprendida queda diluida por otros tipos celulares y restos. Los lavados se pueden utilizar para detectar mutaciones somáticas, metilación aberrante y tinción de PD-L1, pero son relativamente poco selectivos y están limitados por una baja proporción

de células tumorales en muchos casos. Un lavado broncoalveolar más selectivo requiere una vaina guía por la que se navega a través del broncoscopio hasta la lesión.<sup>27-29</sup>

La aspiración transbronquial con aguja (transbronchial needle aspiration, TBNA) se puede realizar sin EBUS. La moderna TBNA guiada por EBUS mejora significativamente el rendimiento diagnóstico para el muestreo de lesiones centrales y ganglios linfáticos mediastinales e hiliares, y el EBUS radial se aplica cada vez más para el muestreo de lesiones periféricas.<sup>14,25,30,31</sup> Las muestras de TBNA se pueden colocar como frotis en un portaobjetos y convertirse en un bloque celular adecuado para análisis histopatológicos y moleculares.<sup>32</sup> Las agujas de TBNA más grandes, de calibre 19, pueden obtener “núcleos”, aunque a menudo consisten en sangre coagulada con fragmentos de tejido atrapados.<sup>33</sup> La gestión multidisciplinaria coordinada y cuidadosa de todas las valiosas muestras es vital para un diagnóstico y un perfil molecular óptimos.<sup>34</sup>

Se recomienda la evaluación rápida *in situ* (Rapid onsite evaluation, ROSE) para garantizar que las TBNA y otras muestras de EBUS sean adecuadas para las pruebas moleculares. Sin embargo, la ROSE requiere recursos adicionales de un citopatólogo/tecnólogo en la sala de procedimientos para confirmar la presencia de células tumorales y la adecuación/rendimiento del muestreo.<sup>33,35-37</sup> Cuando se realiza una aspiración transbronquial con aguja guiada por ultrasonido endobronquial (Endobronchial ultrasound-guided trans-bronchial needle aspiration, EBUS-TBNA) sin ROSE, se ha sugerido un mínimo de 3 y hasta 5 pases.<sup>11</sup>

### **Broncoscopia por navegación**

Los avances tecnológicos han dado lugar a nuevas formas de guiar el broncoscopio hasta la diana. Los sistemas de navegación, que incluyen la navegación broncoscópica virtual (virtual bronchoscopic navigation, VBN) o la navegación electromagnética (electromagnetic navigation, EMN), utilizan imágenes tridimensionales del recorrido de la ruta bronquial anatómica hasta la diana y se utilizan principalmente para lesiones pulmonares periféricas.<sup>18,19,25,38-40</sup>

### **Broncoscopia ultrafina**

Los broncoscopios ultrafinos pueden alcanzar vías respiratorias más distales (vías respiratorias de quinta generación en comparación con las de cuarta generación) que los broncoscopios convencionales. Proporcionan un mayor rendimiento diagnóstico para las lesiones periféricas debido a un canal de trabajo desproporcionadamente grande de 1,7 mm, que permite una sonda EBUS radial pequeña y un muestreo con multiherramienta.<sup>25,41,42</sup>

### **Broncoscopia robótica**

Otra innovación es la broncoscopia robótica tanto para la adquisición de tejido como para una posible terapia. Actualmente se dispone de dos sistemas comerciales. Entre sus ventajas se incluyen la navegación, la capacidad de mantener la posición, la mejora de la articulación y la maniobrabilidad; sin embargo, su elevado costo puede ser un obstáculo para su adopción generalizada.<sup>21,43,44</sup>

### **Preservación y transferencia de muestras**

Las muestras broncoscópicas se suelen recoger en solución salina normal o formalina para su transferencia interdepartamental, práctica habitual en todo el mundo. No obstante, están surgiendo alternativas para superar el impacto negativo de la fijación con formalina sobre la calidad del ácido nucleico, por ejemplo, los fijadores sin formación de enlaces cruzados.<sup>45</sup> Dado que cada vez se utilizan más las pruebas basadas en el ARN, los reactivos que preservan el ARN pueden ayudar a enfrentar el desafío de la degradación del ARN.<sup>46</sup>

### **Conclusión**

La medicina personalizada depende fundamentalmente de la adquisición de tejido tumoral en cantidad y calidad suficientes para las pruebas moleculares, lo que resulta especialmente difícil en el cáncer de pulmón, donde las muestras para el diagnóstico son en su mayoría pequeñas. Para las pruebas complementarias, la obtención de biopsias o bloques celulares siempre que sea posible aumentará las posibilidades de contar con suficientes células tumorales. Los neumólogos deben optimizar las técnicas actuales y aprender nuevas habilidades broncoscópicas para garantizar que las muestras proporcionen la calidad y la cantidad necesarias de células tumorales para los diagnósticos histopatológicos y las pruebas moleculares.<sup>30,47</sup> La orientación informativa multisociedades y basada en pruebas necesitará actualizaciones periódicas para abordar las necesidades cambiantes. No obstante, se están produciendo avances paralelos en la práctica de la broncoscopia avanzada,<sup>48,49</sup> de forma tal que el dilema de probar “más con menos” puede evolucionar a probar “más con más”.<sup>50</sup>

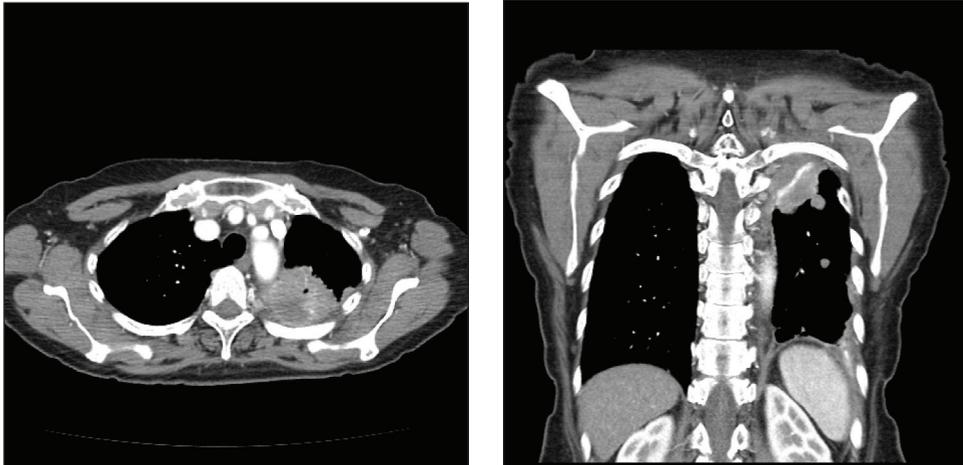
### **Perspectiva del radiólogo intervencionista**

#### **Por Ritu R. Gill y Apoorva Gogna**

La biopsia percutánea transtorácica con aguja (PTNB) guiada por imágenes constituye el estándar de atención en la evaluación diagnóstica de nódulos y masas pulmonares, con una elevada precisión diagnóstica tanto para etiologías benignas como malignas, con una sensibilidad y especificidad acumuladas de 0,95 y 0,99, respectivamente.<sup>51,52</sup> La TC es el método imagenológico preferido para las biopsias guiadas por imágenes y permite un muestreo seguro de lesiones superficiales y profundas al tiempo que minimiza la morbilidad al limitar el paso de la aguja a través del pulmón aireado y ayudar a evitar vasos, cisuras y bulas.<sup>53</sup> La ecografía se puede utilizar para lesiones sin interfase pulmonar, así como para lesiones basadas en la pared torácica y la pleura.<sup>54,55</sup> La fluoroscopia y el arco en C intraoperatorio también se pueden utilizar para biopsias guiadas por imágenes<sup>56,57</sup> pero desempeñan un papel limitado en la obtención de tejido para el diagnóstico y el perfil molecular. Tanto la aspiración con aguja fina (fine-needle aspiration, FNA) como la biopsia por punción con aguja gruesa (core needle biopsy, CNB) se utilizan para obtener muestras para el diagnóstico y la caracterización molecular.<sup>53,58</sup> La precisión para el diagnóstico y el perfil molecular del cáncer de pulmón mediante biopsias guiadas por imágenes oscila entre el 75 % y el 92 %.<sup>52,59-64</sup> Dado que muchos pacientes con cáncer de pulmón no son candidatos quirúrgicos, es importante que se obtenga material suficiente tanto para el diagnóstico como para el perfil molecular.

### Evaluación previa al procedimiento

Los pacientes remitidos para una biopsia guiada por imágenes proceden de muchos servicios, como cirugía torácica, neumología, oncología y medicina general, incluidos pacientes con lesiones indeterminadas y aquellos con cáncer de pulmón conocido. Cualquier solicitud de biopsia pulmonar debe hacer que el radiólogo revise las imágenes disponibles, normalmente una TC con contraste; planifique el abordaje y programe al paciente para el procedimiento. La tomografía por emisión de positrones con flúor-18-fluorodesoxiglucosa (18 FDG-PET) puede ser útil en la selección de la lesión, especialmente en caso de una biopsia previa no diagnóstica, pero no es necesaria antes del procedimiento. Los criterios de elegibilidad para la biopsia incluyen una lesión preferiblemente mayor de 1 cm y una trayectoria accesible mediante guía por imágenes. Las lesiones hipervasculares o la presencia de estructuras vasculares inevitables en la trayectoria son una contraindicación para la biopsia guiada por imágenes (figura 3-1). Las lesiones localizadas en el centro, la coagulopatía no corregible y la presencia de hipertensión pulmonar grave también son criterios de exclusión.



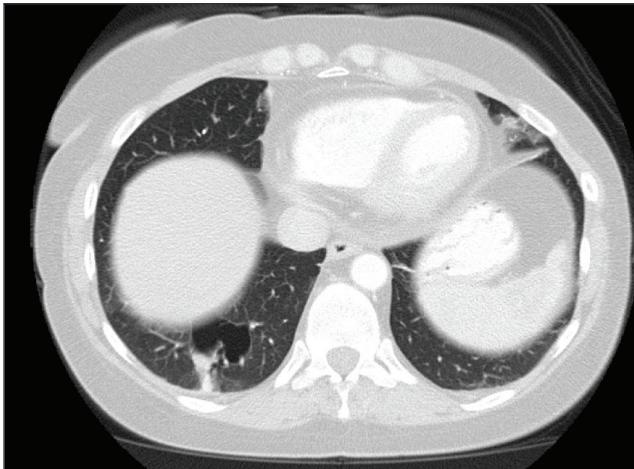
**Figura 3-1.** Los vasos grandes dentro de la lesión son una contraindicación relativa para la biopsia.

### Procedimiento de la biopsia

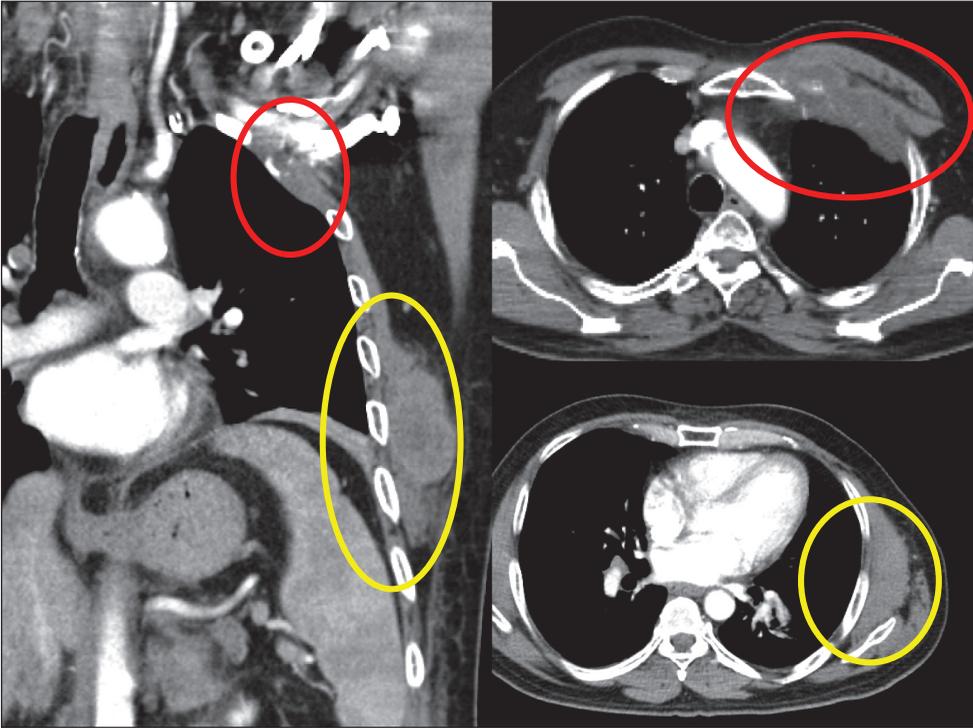
La biopsia transtorácica con aguja (Transthoracic needle biopsy, TTNB) suele ser un procedimiento ambulatorio, y a la mayoría de los pacientes se les da el alta a las pocas horas de la biopsia. El procedimiento se puede realizar solo con anestesia local o bajo sedación consciente intravenosa, y se requieren los preparativos adecuados (ayuno, cuidados posprocedimiento, etc.).

Los procedimientos operativos estándar de las TTNB incluyen la colocación del paciente en decúbito supino, prono o lateral en función de la evaluación previa al procedimiento; la colocación de una rejilla de marcaje superficial; y una TC limitada de la zona de interés para planificar la ruta de biopsia más corta. Se administra sedación consciente intravenosa (intravenous conscious sedation, IVCS), utilizando dosis incrementales tituladas de fentanilo y midazolam, según las preferencias del médico y del paciente. Tras preparar y cubrir de forma estéril el lugar de entrada elegido, se administra anestesia local. A continuación, se inserta la aguja de biopsia en la lesión diana mediante fluoroscopia TC intermitente controlada por el operador para confirmar la posición de la aguja antes de obtener muestras de tejido.

La decisión de realizar una FNA y/o una CNB, el tamaño de la aguja de CNB utilizada y el uso o no de un sistema introductor coaxial los determina el radiólogo que realiza la biopsia con base en factores individuales del paciente y de la lesión (figura 3-2), así como en la indicación de la biopsia (diagnóstico patológico frente a genómica y protocolo de ensayo). Las muestras de FNA se obtienen generalmente con una aguja de calibre 22 a 24 de 15/9 cm, y las muestras de aguja gruesa se pueden obtener con una aguja de biopsia de corte automatizado de calibre 18 o 20 con longitudes que oscilan entre 6 y 20 cm y longitudes de núcleo de 1 o 2 cm. El tamaño y el modelo de la CNB utilizada pueden ser elegidos por el radiólogo que la realiza con base en el caso individual y las preferencias del médico. La presencia de un citólogo *in situ* puede ayudar a determinar la adecuación de la muestra mediante una evaluación rápida *in situ*. Tres o más pases de aguja fina suelen producir suficiente tejido para el diagnóstico y el perfil molecular. Del mismo modo, generalmente se recomiendan al menos 3 muestras de biopsia por punción con aguja gruesa para permitir el diagnóstico y el perfil molecular, aunque no todas las muestras tendrán material suficiente. Las lesiones óseas requieren una consideración especial, como se describe en la sección “Muestras de tejido y citología: perspectiva del patólogo”. Aparte de los pasos necesarios en el laboratorio de patología, se recomienda la toma de muestras de cualquier componente de tejido blando y la recogida de lavados de los instrumentos de toma de muestras óseas (figura 3-3).



**Figura 3-2.** La biopsia por aspiración con aguja fina es más adecuada que la biopsia por punción con aguja gruesa si la lesión es pequeña y está cerca de vasos o quistes importantes, como se observa en estas imágenes de tomografía computarizada (TC).

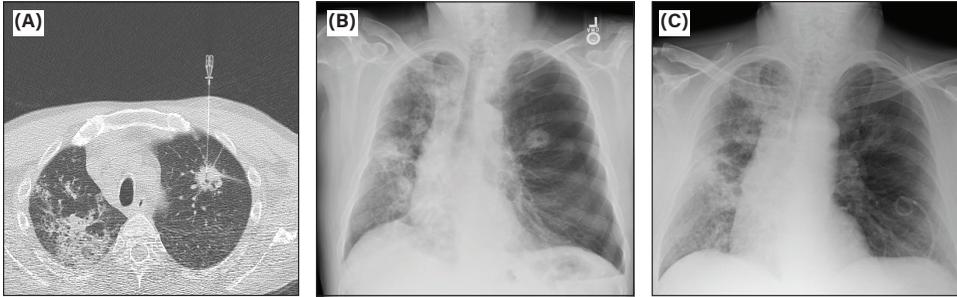


**Figura 3-3.** La lesión de la pared torácica lateral izquierda (*círculo amarillo*) es más adecuada para el perfil genómico que las metástasis de la costilla anterior izquierda (*círculo rojo*). La descalcificación de las metástasis óseas, si es necesaria, hace que el tejido sea subóptimo para la evaluación genética.

Inmediatamente después del procedimiento, se realiza una radiografía de tórax o una TC de tórax para evaluar si hay complicaciones, tales como neumotórax y hemorragia. A continuación, se monitorea a los pacientes ambulatorios durante al menos 2 horas en una unidad de observación y se realiza una radiografía de tórax antes del alta para evaluar si hay neumotórax retardado y/o hemorragia. Los pacientes hospitalizados son devueltos a la sala para su monitorización, con una radiografía posterior al procedimiento que se realizará a las 2 horas. Los pacientes con complicaciones significativas, por ejemplo, un neumotórax que requiera la colocación de un tubo de tórax, son hospitalizados para su posterior manejo y observación, según lo considere clínicamente apropiado el equipo intervencionista.

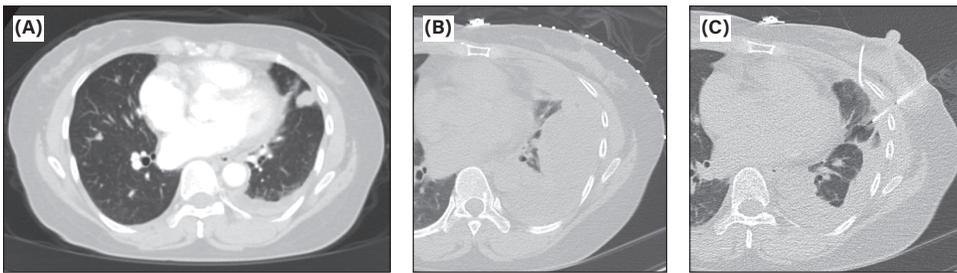
### Complicaciones de la biopsia

Las complicaciones que se informan con mayor frecuencia en la TTNB son el neumotórax y la hemorragia, con unas tasas informadas de neumotórax y colocación de tubo de tórax del 12 % al 45 % y del 2 % al 15 %, respectivamente<sup>52,64,65</sup> (figura 3-4). El grado de enfisema, el recorrido más largo de la aguja, el calibre de la aguja, los tiempos de permanencia y el cruce de una cisura aumentan las probabilidades de neumotórax en un factor de 3,7.<sup>66</sup> Las tasas informadas de hemorragia pulmonar tras la TTNB varían del 8 % al 65 %, <sup>67</sup> y los casos graves de sangrado pueden requerir embolización o intervención quirúrgica. Se han informado complicaciones poco frecuentes, como embolia aérea y muerte.<sup>68</sup>



**Figura 3-4.** (A) Biopsia transtorácica con aguja guiada por tomografía computarizada (TC) (B) complicación por neumotórax izquierdo posterior a la biopsia. (C) Colocación de catéter *pigtail* para tratar el neumotórax.

Las biopsias pueden no ser diagnósticas, por lo que deben revisarse todos los casos de muestras insuficientes y plantearse una nueva biopsia solo después de revisar de nuevo las imágenes (figura 3-5). La necesidad de una estrategia alternativa, imágenes adicionales o un abordaje alternativo (como el transbronquial) debe considerarse caso por caso.



**Figura 3-5.** (A) Lesión del lóbulo superior izquierdo previa al procedimiento para una nueva biopsia. (B) El día del procedimiento, un gran derrame pleural oscurece la lesión. (C) Tras el drenaje del derrame y el envío para citología, también se toma una biopsia por punción con aguja gruesa de la lesión para garantizar un material adecuado para el diagnóstico y el perfil molecular.

## Conclusión

Las biopsias guiadas por imágenes son un método seguro y eficaz para la adquisición de tejido para el diagnóstico del cáncer de pulmón y la elaboración de perfiles moleculares con una baja tasa de complicaciones. La guía por TC es el pilar para las biopsias guiadas por imágenes y para los pacientes sometidos a una nueva biopsia. Un enfoque multidisciplinario es clave para el manejo óptimo de los pacientes, ya que las lesiones más apropiadas para biopsias endobronquiales o transbronquiales se deben remitir a neumología intervencionista. También son necesarias una comunicación y un etiquetado eficaces de las muestras para garantizar que se transmite la información clínicamente relevante al patólogo informador, a fin de permitir un manejo adecuado del tejido para el diagnóstico y las pruebas moleculares (tabla 3-2).

**Tabla 3-2.** Consideraciones clave en la adquisición de muestras guiadas radiológicamente

- La biopsia transtorácica con aguja (TTNB) es un método seguro y eficaz de obtener tejido suficiente para el perfil genómico.
- Los protocolos estandarizados basados en la institución que detallan el flujo de trabajo desde la revisión de las imágenes hasta la adquisición de la muestra, el etiquetado claro y el transporte a patología, así como la comunicación en bucle cerrado son vitales para mejorar el rendimiento del procedimiento para el perfil molecular.
- Generalmente se prefieren las biopsias por punción con aguja gruesa para el perfil molecular; sin embargo, si solo es posible la aspiración con aguja fina (FNA), deben intentarse 3 o más pases.
- El líquido pleural maligno, si se aspira en el momento de la biopsia, también se debe someter a análisis.

## Perspectiva del cirujano torácico

Por Jessica S. Donington y Paul E. Van Schil

### Introducción

Idealmente, las biopsias son mínimamente invasivas y, en un único procedimiento, establecen el diagnóstico y el estadio, al tiempo que proporcionan tejido adecuado para el análisis molecular. Por este motivo, el pulmón rara vez es el lugar ideal para la biopsia de un CPNM localmente avanzado o metastásico. Las biopsias percutáneas y endoscópicas con aguja son la fuente más común de tejido diagnóstico en el CPNM, pero no todas las lesiones son susceptibles a estos abordajes. Cuando se requiere una biopsia quirúrgica torácica, se prefieren los procedimientos mínimamente invasivos y la toracotomía para la adquisición de tejido ya no es apropiada en la mayoría de las circunstancias. Las biopsias de cirugía torácica para el CPNM se dividen en 3 grandes categorías: biopsias de ganglios linfáticos, pleurales y parenquimatosas. El tejido obtenido de las resecciones anatómicas de la enfermedad en estadio temprano también se puede utilizar para pruebas moleculares con el fin de indicar cuál es el tratamiento adyuvante o el tratamiento tras la progresión de la enfermedad.

### Biopsias de ganglios linfáticos

La adquisición de tejido de los ganglios mediastinales o hiliares se suele realizar mediante EBUS. Esta ha sustituido en gran medida a la mediastinoscopia por sus características mínimamente invasivas y su capacidad para alcanzar los ganglios linfáticos dentro del hilio pulmonar.<sup>69</sup> La mediastinoscopia sigue teniendo algunas indicaciones, principalmente para diagnosticar linfomas y tras una EBUS no diagnóstica. Las biopsias obtenidas en la mediastinoscopia son más grandes que las obtenidas en la EBUS y, por lo tanto, la adecuación del tejido para el análisis molecular rara vez es un problema, pero la comunicación con el patólogo es esencial para asegurar que el tejido se reserva para el análisis molecular en los casos en los que se solicita un corte congelado. Clásicamente, la mediastinoscopia puede acceder a los ganglios linfáticos de las estaciones 4R, 4L y 7, pero los ganglios hiliares y los de la ventana aortopulmonar (AP) por lo general no se alcanzan.

La afectación aislada de los ganglios linfáticos de las estaciones 5 o 6 por tumores del lóbulo superior izquierdo es competencia del cirujano torácico. La biopsia guiada por EBUS en esta localización requiere una aguja que atraviese la arteria pulmonar y, aunque se ha informado de ella, no se ha adoptado de forma generalizada. Del mismo modo, la mediastinoscopia solo puede llegar a estas estaciones mediante un procedimiento ampliado descrito por Ginsberg *et al* en 1987, pero nunca ampliamente adoptado.<sup>70</sup> El acceso quirúrgico a la ventana AP se puede realizar mediante un procedimiento de mediastinotomía anterior (Chamberlain) o mediante cirugía mínimamente invasiva izquierda, utilizando cirugía toracoscópica asistida por video (video-assisted thoracoscopic surgery, VATS) o cirugía toracoscópica asistida por robot (robotic-assisted thoracoscopic surgery, RATS). Las ventajas del procedimiento de Chamberlain son que no requiere ventilación pulmonar única y se suele realizar sin tubo de tórax y como procedimiento ambulatorio. Pero la incisión es dolorosa y antiestética y la visualización dentro del tórax es limitada. Por ello, los procedimientos de Chamberlain han sido sustituidos en gran medida por un abordaje VATS o RATS del lado izquierdo para las biopsias de ventana AP. Estos suelen requerir ventilación pulmonar única, pero se pueden realizar como procedimientos ambulatorios y permiten una excelente visualización intrapleural y una evaluación completa del espacio pleural para detectar la propagación de la enfermedad.

### **Biopsia pleural**

La diseminación pleural es un patrón de propagación en el CPNM, que suele dar lugar a un derrame pleural. El análisis citológico proporciona un diagnóstico en hasta el 60 % de los derrames malignos, pero el diagnóstico de los cánceres de células escamosas puede ser difícil solo con la citología.<sup>71</sup> La visualización directa del espacio pleural para el diagnóstico y la biopsia es necesaria en aproximadamente el 20 % de los derrames malignos, y la VATS ha sustituido en gran medida a la biopsia pleural cerrada.<sup>72</sup> Se recomiendan los procedimientos de puerto único y se pueden realizar con anestesia local o general; no es obligatorio el aislamiento pulmonar. Se realiza una inspección superficial tras el drenaje del líquido y se practican biopsias dirigidas de la pleura parietal. El corte congelado puede ser apropiado para asegurar el material diagnóstico y no se aconseja realizar las biopsias pleurales viscerales. La precisión diagnóstica de la biopsia pleural por VATS es superior al 90 % y las complicaciones son poco frecuentes.<sup>73</sup> Las intervenciones paliativas, ya sea pleurodesis o catéter pleural tunelizado, se deben realizar simultáneamente, pero la adecuación de la biopsia para el análisis molecular y la gestión adecuada del tejido deben seguir siendo prioritarias.

### **Biopsias parenquimatosas**

En el CPNM suele ser necesaria la confirmación de tejido tumoral antes del tratamiento; una excepción representa la enfermedad en estadio clínico IA. Algunos cirujanos y pacientes prefieren la confirmación patológica antes de una resección anatómica; la biopsia previa al tratamiento puede no ser necesaria, especialmente en el contexto de un alto riesgo de neoplasia maligna, bajo riesgo de enfermedad mediastinal y sin indicación de terapia de inducción. Una biopsia quirúrgica en cuña puede ser el paso inicial de una resección anatómica planificada, y el corte congelado se utiliza para determinar la necesidad de proceder o no. La comunicación con los patólogos es fundamental para asegurarse de que son conscientes de que la muestra reseca representa probablemente toda la extensión de la enfermedad del paciente y para evitar, si es posible, tomar muestras de toda la lesión en el corte congelado. Las biopsias quirúrgicas en cuña también se realizan con frecuencia en el contexto de la enfermedad oligometastásica u oligoprogresiva para obtener beneficios terapéuticos y diagnósticos.

Las biopsias pulmonares quirúrgicas para el CPNM, si se realizan como parte de una resección planificada más amplia o como procedimiento independiente, se deben realizar mediante VATS o RATS siempre que sea posible y deben preservar el parénquima a la vez que aseguran la escisión completa de la lesión sin bisecarla. La localización de nódulos pequeños, no sólidos o profundos puede ser un reto durante la cirugía mínimamente invasiva. Las tecnologías para la localización de nódulos se dividen en 4 categorías: (1) complementos imagenológicos intraoperatorios, como la ecografía toracoscópica; (2) marcadores físicos, como hilos de gancho, microbobinas y fiduciales; (3) colorantes y “tatuajes” parenquimatosos utilizados con o sin imágenes cercanas al infrarrojo (near-infrared, NIR);<sup>74</sup> y (4) dianas moleculares.<sup>75</sup> Lo ideal es que la localización y la resección se realicen con un único anestésico. Esto se ve facilitado por los quirófanos híbridos torácicos que incluyen escáneres de TC de haz cónico, navegación electromagnética, fluoroscopia y equipos de RATS y/o VATS incluidos en un único quirófano.<sup>76</sup>

## Conclusión

La obtención de tejido para el análisis molecular seguirá aumentando en importancia en el tratamiento multimodal del CPNM. Los cirujanos rara vez tienen problemas significativos con la adquisición de biopsias de tamaño adecuado para el análisis molecular, pero deben ser conscientes de su papel central en la manipulación y comunicación adecuadas de las muestras de biopsia en la era de la oncología molecular. Esto será cada vez más importante a medida que más terapias dirigidas neoadyuvantes y adyuvantes se conviertan en estándares de atención.

## Muestras de tejido y citología: perspectiva del patólogo

Por Mary Beth Beasley, Lukas Bubendorf y Deepali Jain

Independientemente de si las muestras se obtuvieron por vía quirúrgica, percutánea o endoscópica, las variables preanalíticas tienen el potencial de influir en el diagnóstico patológico y en la eficacia de las pruebas moleculares. Tales factores incluyen el volumen de la muestra, así como factores de manipulación y procesamiento (tabla 3-3). Un tiempo prolongado de isquemia fría puede provocar la degradación del ADN y el ARN, lo que puede afectar los resultados de las pruebas. Lo óptimo es que el tiempo de isquemia fría sea inferior a 1 hora, pero la colocación del tejido en formalina se debe realizar lo antes posible. Las muestras se deben fijar rápidamente en formalina neutra amortiguada al 10 %, y se deben evitar los fijadores ácidos o que contengan mercurio. Lo ideal es que el tiempo de fijación recomendado sea de 6 a 48 horas, con un intervalo óptimo de 8 a 18 horas para las muestras quirúrgicas de mayor tamaño.<sup>49,77</sup> Es importante recordar que las muestras de tejido solo se pueden fijar y procesar una vez. Estos pasos deben ser permisivos con *todas* las técnicas de diagnóstico que pueda requerir la muestra, incluida la morfología estándar, la inmunohistoquímica (IHQ) y la secuenciación. Aunque la fijación con formalina y la incrustación en parafina se utilizan en laboratorios de todo el mundo como método estándar para preservar el tejido para el diagnóstico, la formalina tiene el potencial de modificar los nucleótidos (cambios de C a T y de G a A). Además, tanto la infra fijación como la sobrefijación pueden comprometer la calidad del ADN y el ARN, y la sobrefijación provoca además una posible fragmentación del ADN y una alteración de la secuencia. La sobrefijación, en particular, puede dar lugar además a enlaces cruzados entre proteínas y ácidos nucleicos que impidan el análisis.<sup>77</sup> Aunque las muestras de resección no son inmunes a las variables preanalíticas (véase el texto posterior), la influencia de la mayoría de las variables preanalíticas tiende a afectar en mayor medida a las muestras de citología y de biopsias pequeñas.

Dado que a muchos pacientes con CPNM se les diagnostica mediante una muestra citológica, como una FNA, o una biopsia tisular pequeña, como una biopsia bronquial o por punción con aguja gruesa, y que dicha muestra puede ser el único material disponible para las pruebas moleculares, el manejo adecuado de las muestras es fundamental para intentar maximizar la cantidad de información diagnóstica, pronóstica y predictiva obtenida.<sup>78</sup> La mayoría de los sistemas actuales de pruebas NGS que abarcan la secuenciación de ADN y ARN suelen requerir de 100 a 200 ng de ADN o ARN para obtener resultados óptimos, aunque cantidades más pequeñas (hasta 10-20 ng) pueden ser suficientes para paneles NGS dirigidos que utilicen métodos basados en amplicones, plataformas de pruebas rápidas menos integrales basadas en la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) multiplex o análisis de un solo gen. Por ello, la tasa de éxito tanto de las biopsias pequeñas como de las muestras citológicas suele ser alta; sin embargo, un manejo cuidadoso puede ayudar a garantizar una mayor probabilidad de éxito.<sup>9</sup>

**Tabla 3-3.** Variables preanalíticas que pueden influir en las pruebas moleculares de las muestras de cáncer de pulmón

<b>Todas las muestras</b>	
<p>Tiempo de isquemia fría</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Lo óptimo es menos de 1 hora.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo de fijador           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Se prefiere formalina neutra amortiguada al 10 %.</li> <li>– Se deben evitar los fijadores ácidos o a base de mercurio y los agentes descalcificadores fuertes.</li> <li>– En caso necesario, se pueden utilizar protocolos de descalcificación basados en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).</li> </ul> </li> <li>• Para una fijación adecuada, se recomiendan de 6 a 48 horas.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selección del bloque de tejido y de los cortes           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Seleccione la cantidad máxima de tumor en relación con las células estromales y/o inflamatorias de fondo.</li> <li>– La selección óptima suele ser de un 20 % o más de las células tumorales.</li> <li>– Se deben tomar precauciones al realizar los cortes para evitar una posible contaminación cruzada.</li> <li>– El porcentaje tumoral puede enriquecerse mediante macro o microdissección o la extracción de muestras.</li> </ul> </li> </ul>	
<b>Citología/pequeñas muestras de biopsia</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calibre de la aguja           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Calibre de 14 a 20 para biopsias por punción con aguja gruesa</li> <li>– Calibre de 20 a 25 para aspiración transtorácica con aguja fina (FNA)</li> <li>– Calibre 19, 21 o 22 para FNA transbronquiales por ecografía endobronquial (EBUS)</li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Número de biopsias/pases           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Intentar maximizar la cantidad de tejido obtenido siempre que sea posible.</li> <li>– Recomendaciones sugeridas               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mínimo 3 biopsias por punción con aguja gruesa</li> <li>- Con aspiración transbronquial con aguja (TBNA) guiada por EBUS, de 3 a 5 pases</li> <li>- Múltiples pases para la FNA transtorácica, centrándose en el material para la preparación del bloque celular</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de la evaluación rápida <i>in situ</i> (ROSE) cuando sea posible</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manejo de muestras pequeñas por el laboratorio           <ul style="list-style-type: none"> <li>– Separación de las muestras de biopsia por punción con aguja gruesa y bronquial en bloques separados cuando sea posible</li> <li>– Optimización de los protocolos de corte del laboratorio para minimizar el desperdicio de tejido</li> <li>– Limitación de la investigación en la fase de diagnóstico inicial solo a los pasos esenciales (uso juicioso de la inmunohistoquímica)</li> </ul> </li> </ul>	

Aunque el número de células tumorales es importante, al menos 200 como regla general para los paneles basados en el ADN, lo más importante es que la muestra tenga una proporción suficiente de células tumorales para proporcionar un monto adecuado de ADN y/o ARN que no se diluya por el presente en las células nucleadas del resto de la muestra. Idealmente, el bloque de tejido o frotis seleccionado para el análisis genómico debe tener el mayor porcentaje disponible de células nucleadas tumorales, óptimamente superior al 20 % del total de células nucleadas de una muestra. La macro o microdissección de las muestras y la extracción de muestras de la zona de alta densidad celular tumoral antes de la extracción del ácido nucleico pueden ayudar a aumentar aún más la proporción de células tumorales respecto a las células nucleadas de fondo de la muestra (enriquecimiento tumoral).<sup>78,79</sup> Aunque se ha demostrado que una superficie tumoral superior a 25 mm<sup>2</sup> mejora las tasas de éxito de las pruebas moleculares,<sup>9</sup> esta cantidad de tumor no siempre se puede obtener en muestras de biopsia pequeñas, incluso aumentando el número de cortes utilizados.

Para superar el riesgo de fracaso causado por una muestra inadecuada, el tamaño de la muestra de tejido se debe maximizar cuando sea factible, lo que implica la colaboración del clínico que realiza el procedimiento diagnóstico. Un documento de pautas sobre la recogida y manipulación de pequeñas muestras de biopsia y citología torácicas del College of American Pathologists (véase también la sección anterior) recomienda al menos 3 biopsias por punción con aguja gruesa, si es posible, utilizando una aguja de calibre 14 a 20, y se deben tomar múltiples biopsias si es posible durante las biopsias broncoscópicas.<sup>49</sup> De forma similar, para la FNA transtorácica, se recomiendan múltiples pases obtenidos utilizando una aguja de calibre 20 a 25. Para las TBNA guiadas por EBUS, se recomienda utilizar una aguja de calibre 19, 21 o 22 para realizar de 3 a 5 pases cuando sea factible, sobre todo cuando no se disponga de evaluación *in situ*.

El uso de ROSE, aunque no esté disponible en todas las situaciones de la práctica, puede ayudar a garantizar la adecuación del material y el triaje para pruebas auxiliares. Para todas las muestras citológicas, se debe intentar recoger material adecuado para la preparación de un bloque celular.<sup>49</sup> El material de bloque celular fijado con formalina es la preparación citológica más común y más utilizada para la realización de estudios moleculares; sin embargo, se pueden utilizar portaobjetos para frotis u otros métodos, como la citología de base líquida, si se validan adecuadamente.<sup>80,81</sup> Aunque las recomendaciones anteriores se aplican a las muestras de aspiración con aguja, las muestras de citología de líquido pleural o, con menos frecuencia, otras muestras, como los lavados bronquioloalveolares/lavados o cepillados bronquiales, también se pueden utilizar con éxito para las pruebas genómicas siempre que haya una proporción suficientemente alta de células tumorales.<sup>82,83</sup> Dado que las muestras citológicas, incluidas las preparaciones de bloques celulares fijadas en última instancia en formalina, se suelen exponer inicialmente a distintas cantidades de etanol u otros fijadores, se debe realizar una validación rigurosa antes de utilizarlas para estudios auxiliares; no obstante, la mayoría de las preparaciones citológicas proporcionan resultados excelentes siempre que haya suficiente material tumoral.

En el caso de las muestras de biopsias con aguja gruesa o bronquiales, se puede utilizar la citología de impresión táctil para evaluar la adecuación de la muestra; sin embargo, debe tenerse cuidado, ya que este proceso puede comprometer la muestra de tejido.<sup>84</sup> Lo ideal sería distribuir las biopsias con aguja gruesa o bronquiales en bloques separados, en lugar de presentarlas íntegramente en un único bloque, de modo que pueda utilizarse un bloque para las tinciones diagnósticas y conservar los bloques restantes para las pruebas moleculares. Este enfoque, sin embargo, requeriría que todos los fragmentos contuvieran tumor.

Los procedimientos de corte del tejido también deben diseñarse para minimizar el posible desperdicio de tejido. Los laboratorios deben idear su propio protocolo óptimo basándose en las capacidades disponibles; sin embargo, se han sugerido diversos enfoques, desde el corte superficial de un solo portaobjetos hasta una serie de estrategias que implican el precorte de múltiples portaobjetos sin teñir, a menudo con evaluación de hematoxilina y eosina (H&E) de niveles anteriores y posteriores a los utilizados para la extracción de ADN y ARN. Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación cruzada en todos los puntos de procesamiento y corte; esto puede implicar el uso de un micrótopo dedicado y una cuchilla nueva y sin usar cada vez que se corten secciones para la extracción de ADN/ARN.

Además, aunque la biopsia de una lesión ósea ofrece la oportunidad de diagnosticar y estadificar potencialmente un tumor de forma simultánea y puede ser el lugar más accesible de la enfermedad, debe tenerse muy en cuenta evitar los agentes descalcificantes si es posible.<sup>84</sup> Si no se puede evitar la descalcificación, se debe seguir un protocolo basado en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).<sup>9</sup> Debe aconsejarse a los radiólogos intervencionistas que tomen biopsias de metástasis óseas que enjuaguen la aguja de biopsia o recojan muestras adicionales de FNA para evitar retrasar el proceso de diagnóstico por el tiempo de descalcificación y proporcionar material adicional para pruebas moleculares.

Las muestras resecaadas quirúrgicamente suelen plantear menos problemas en cuanto a consideraciones de volumen tumoral; sin embargo, otros aspectos pueden influir en los resultados de las pruebas moleculares. El tiempo de isquemia fría puede verse influido por el tiempo de transporte al laboratorio y el tiempo necesario para cualquier análisis de corte congelado y/o recogida de tejido para biobancos y/o fines de investigación. Además, las muestras de mayor tamaño pueden experimentar una fijación inadecuada, ya que la formalina penetra mal en la pleura visceral. Las muestras de resección requieren inflarse o inyectarse con formalina o, en algunos casos, cortarse antes de sumergirlas en formalina para garantizar una fijación adecuada. Las muestras de resección tras la terapia neoadyuvante pueden requerir una manipulación especial para facilitar la evaluación del tumor residual.<sup>85</sup> La heterogeneidad tumoral no suele ser un problema con el perfil genómico de las mutaciones conductoras, pero, como se describió con las muestras de biopsia pequeñas, el bloque seleccionado para las pruebas genéticas debe contener la mayor proporción de células tumorales en relación con las células estromales o inflamatorias de fondo.<sup>79</sup>

## Conclusión

La forma en que se manipulan las muestras en el laboratorio de patología es crucial para determinar el éxito, o el fracaso, en cualquier prueba de biomarcadores moleculares que se requiera. Las variables preanalíticas relacionadas con la fijación y el procesamiento de los tejidos, aunque son esenciales para permitir la microscopía, pueden dañar el ADN, el ARN y la integridad del antígeno/epítipo. Se deben desarrollar procedimientos estandarizados para facilitar *todos* los pasos del proceso de diagnóstico. Es esencial hacerlo bien a la primera, ya que las muestras solo se pueden fijar y procesar una vez, y estas muestras suelen ser muy pequeñas y contener poco tumor. Los bloques de parafina se deben cortar el menor número de veces posible; se recomienda el corte reflejo de las secciones en blanco y un uso mínimo de la IHQ para el diagnóstico. El rendimiento de ADN y ARN se puede mejorar mediante microdissección. Las muestras de tipo citológico son perfectamente adecuadas para las pruebas de biomarcadores moleculares siempre que se procesen correctamente y contengan suficiente tumor. Aunque las muestras de resección quirúrgica suelen tener abundante tumor, se deben prever y evitar los problemas de isquemia fría y mala fijación.

## Referencias

1. Kerr KM. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology*. 2012;60(4):531-546.
2. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361(10):947-957.

3. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):121-128.
4. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010;362(25):2380-2388.
5. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(9):495-509.
6. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022;17(3):362-387.
7. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2018;13(3):323-358.
8. Hirsch FR, Wynes MW, Gandara DR, Bunn PA Jr. The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(20):4909-4911.
9. Mata DA, Harries L, Williams EA, et al. Method of tissue acquisition affects success of comprehensive genomic profiling in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2022. doi:10.5858/arpa.2021-0313-OA.
10. Penault-Llorca F, Kerr KM, Garrido P, et al. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing—part 2: analysis, reporting, and quality assessment. *Virchows Arch.* 2022;481(3):351-366.
11. Penault-Llorca F, Kerr KM, Garrido P, et al. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing—part 1: tissue collection and management. *Virchows Arch.* 2022;481(3):335-350.
12. Mino-Kenudson M, Le Stang N, Daigneault JB, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer global survey on programmed death-ligand 1 testing for NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(4):686-696.
13. Smeltzer MP, Wynes MW, Lantuejoul S, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer global survey on molecular testing in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2020;15(9):1434-1448.
14. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax.* 2016;71(2):177-184.
15. Gan Q, Roy-Chowdhuri S. Small but powerful: the promising role of small specimens for biomarker testing. *J Am Soc Cytopathol.* 2020;9(5):450-460.
16. Harzheim D, Sterman D, Shah PL, Eberhardt R, Herth FJ. Bronchoscopic transparenchymal nodule access: feasibility and safety in an endoscopic unit. *Respiration.* 2016;91(4):302-306.
17. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013;143(5 suppl):e142S-e65S.
18. Leong S, Ju H, Marshall H, et al. Electromagnetic navigation bronchoscopy: a descriptive analysis. *J Thorac Dis.* 2012;4(2):173-185.
19. Wang Memoli JS, Nietert PJ, Silvestri GA. Meta-analysis of guided bronchoscopy for the evaluation of the pulmonary nodule. *Chest.* 2012;142(2):385-393.
20. Steinfurt DP, Vincent J, Heinze S, Antippa P, Irving LB. Comparative effectiveness of radial probe endobronchial ultrasound versus CT-guided needle biopsy for evaluation of peripheral pulmonary lesions: a randomized pragmatic trial. *Respir Med.* 2011;105(11):1704-1711.
21. Fielding DIK, Bashirzadeh F, Son JH, et al. First human use of a new robotic-assisted fiber optic sensing navigation system for small peripheral pulmonary nodules. *Respiration.* 2019;98(2):142-150.
22. Oki M, Saka H. Diagnostic value of ultrathin bronchoscopy in peripheral pulmonary lesions: a narrative review. *J Thorac Dis.* 2020;12(12):7675-7682.
23. Fielding DI, Chia C, Nguyen P, et al. Prospective randomised trial of endobronchial ultrasound-guide sheath versus computed tomography-guided percutaneous core biopsies for peripheral lung lesions. *Intern Med J.* 2012;42(8):894-900.
24. Haentschel M, Boeckeler M, Ehab A, et al. Cryobiopsy increases the EGFR detection rate in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2020;141:56-63.
25. Shinagawa N. A review of existing and new methods of bronchoscopic diagnosis of lung cancer. *Respir Investig.* 2019;57(1):3-8.

26. Botticella MA, De Summa S, Cisternino L, et al. The role of rapid on site evaluation on touch imprint cytology and brushing during conventional bronchoscopy. *Diagn Cytopathol.* 2021;49(7):832-837.
27. Um SW, Kim Y, Lee BB, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in bronchial washings. *Clin Epigenetics.* 2018;10:65.
28. Roncarati R, Lupini L, Miotto E, et al. Molecular testing on bronchial washings for the diagnosis and predictive assessment of lung cancer. *Mol Oncol.* 2020;14(9):2163-2175.
29. Bubendorf L, Conde E, Cappuzzo F, et al. A noninterventional, multinational study to assess PD-L1 expression in cytological and histological lung cancer specimens. *Cancer Cytopathol.* 2020;128(12):928-938.
30. Fielding D, Kurimoto N. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2018;39(1):111-123.
31. Fox AH, Jett JR, Roy UB, et al. Knowledge and practice patterns among pulmonologists for molecular biomarker testing in advanced non-small cell lung cancer. *Chest.* 2021;160(6):2293-303.
32. Stone E, Leong TL. Contemporary concise review 2021: pulmonary nodules from detection to intervention. *Respirology.* 2022;27(9):776-785.
33. Sung S, Heymann JJ, Crapanzano JP, et al. Lung cancer cytology and small biopsy specimens: diagnosis, predictive biomarker testing, acquisition, triage, and management. *J Am Soc Cytopathol.* 2020;9(5):332-345.
34. Parente P, Carbonelli C, Biancofiore G, et al. Handling and standardization of EBUS needle aspiration in NSCLC patients: the value of the cell block, a monoinstitutional experience. *Thorac Cancer.* 2022;13(17):2480-2488.
35. Jain D, Allen TC, Aisner DL, et al. Rapid on-site evaluation of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspirations for the diagnosis of lung cancer: a perspective from members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(2):253-262.
36. van der Heijden EH, Casal RF, Trisolini R, et al. Guideline for the acquisition and preparation of conventional and endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for the diagnosis and molecular testing of patients with known or suspected lung cancer. *Respiration.* 2014;88(6):500-517.
37. Fassina A, Corradin M, Zardo D, et al. Role and accuracy of rapid on-site evaluation of CT-guided fine needle aspiration cytology of lung nodules. *Cytopathology.* 2011;22(5):306-312.
38. Asano F, Matsuno Y, Shinagawa N, et al. A virtual bronchoscopic navigation system for pulmonary peripheral lesions. *Chest.* 2006;130(2):559-566.
39. Asano F, Shinagawa N, Ishida T, et al. Virtual bronchoscopic navigation combined with ultrathin bronchoscopy. A randomized clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(3):327-333.
40. Ishida T, Asano F, Yamazaki K, et al. Virtual bronchoscopic navigation combined with endobronchial ultrasound to diagnose small peripheral pulmonary lesions: a randomised trial. *Thorax.* 2011;66(12):1072-7.
41. Oki M, Saka H, Ando M, et al. Ultrathin bronchoscopy with multimodal devices for peripheral pulmonary lesions. A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(4):468-476.
42. Oki M, Saka H, Asano F, et al. Use of an ultrathin vs thin bronchoscope for peripheral pulmonary lesions: a randomized trial. *Chest.* 2019;156(5):954-964.
43. Rojas-Solano JR, Ugalde-Gamboa L, Machuzak M. Robotic bronchoscopy for diagnosis of suspected lung cancer: a feasibility study. *J Bronchology Interv Pulmonol.* 2018;25(3):168-175.
44. Murgu SD. Robotic assisted-bronchoscopy: technical tips and lessons learned from the initial experience with sampling peripheral lung lesions. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):89.
45. Southwood M, Krenz T, Cant N, et al. Systematic evaluation of PAXgene(R) tissue fixation for the histopathological and molecular study of lung cancer. *J Pathol Clin Res.* 2020;6(1):40-54.
46. Dotson T, Bellinger C, Su J, et al. Feasibility of lung cancer RNA acquisition from a single transbronchial or transthoracic needle pass (FASTT trial). *Lung Cancer.* 2019;127:6-11.
47. Fielding D, Oki M. Technologies for targeting the peripheral pulmonary nodule including robotics. *Respirology.* 2020;25(9):914-923.
48. Gilbert CR, Wahidi MM, Yarmus LB, Roy-Chowdhuri S, Pastis NJ 2nd. Key highlights for the College of American Pathology statement on collection and handling of thoracic small biopsy and cytology specimens for ancillary studies. *Chest.* 2020;158(6):2282-2284.

49. Roy-Chowdhuri S, Dacic S, Ghofrani M, et al. Collection and handling of thoracic small biopsy and cytology specimens for ancillary studies: guideline from the College of American Pathologists in Collaboration with the American College of Chest Physicians, Association for Molecular Pathology, American Society of Cytopathology, American Thoracic Society, Pulmonary Pathology Society, Papanicolaou Society of Cytopathology, Society of Interventional Radiology, and Society of Thoracic Radiology. *Arch Pathol Lab Med*. 2020. doi:10.5858/arpa.2020-0119-CP.
50. Hirsch FR, Kerr KM, Bunn PA Jr, et al. Molecular and immune biomarker testing in squamous-cell lung cancer: effect of current and future therapies and technologies. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(4):331-339.
51. Zhang HF, Zeng XT, Xing F, Fan N, Liao MY. The diagnostic accuracy of CT-guided percutaneous core needle biopsy and fine needle aspiration in pulmonary lesions: a meta-analysis. *Clin Radiol*. 2016;71(1):e1-10.
52. Takeshita J, Masago K, Kato R, et al. CT-guided fine-needle aspiration and core needle biopsies of pulmonary lesions: a single-center experience with 750 biopsies in Japan. *AJR Am J Roentgenol*. 2015;204(1):29-34.
53. Lee C, Guichet PL, Abtin F. Percutaneous lung biopsy in the molecular profiling era: a survey of current practices. *J Thorac Imaging*. 2017;32(1):63-67.
54. Diacon AH, Schuurmans MM, Theron J, et al. Safety and yield of ultrasound-assisted transthoracic biopsy performed by pulmonologists. *Respiration*. 2004;71(5):519-522.
55. Koh DM, Burke S, Davies N, Padley SP. Transthoracic US of the chest: clinical uses and applications. *Radiographics*. 2002;22(1):e1.
56. Gill RR, Barlow J, Jaklitsch MT, et al. Image-guided video-assisted thoracoscopic resection (iVATS): translation to clinical practice-real-world experience. *J Surg Oncol*. 2020;121(8):1225-1232.
57. Kang DY, Kim HK, Kim YK, et al. Needle-scopy-assisted resection of pulmonary nodule after dual localisation. *Eur Respir J*. 2011;37(1):13-17.
58. Gill RR, Murphy DJ, Kravets S, et al. Success of genomic profiling of non-small cell lung cancer biopsies obtained by trans-thoracic percutaneous needle biopsy. *J Surg Oncol*. 2018;118(7):1170-1177.
59. Cardarella S, Johnson BE. The impact of genomic changes on treatment of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(7):770-775.
60. Kim L, Tsao MS. Tumour tissue sampling for lung cancer management in the era of personalised therapy: what is good enough for molecular testing? *Eur Respir J*. 2014;44(4):1011-1122.
61. Lizotte PH, Jones RE, Keogh L, et al. Fine needle aspirate flow cytometric phenotyping characterizes immunosuppressive nature of the mesothelioma microenvironment. *Sci Rep*. 2016;6:31745.
62. Loh SE, Wu DD, Venkatesh SK, et al. CT-guided thoracic biopsy: evaluating diagnostic yield and complications. *Ann Acad Med Singap*. 2013;42(6):285-290.
63. Schneider F, Smith MA, Lane MC, et al. Adequacy of core needle biopsy specimens and fine-needle aspirates for molecular testing of lung adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(2):193-200; quiz 306.
64. Tian P, Wang Y, Li L, et al. CT-guided transthoracic core needle biopsy for small pulmonary lesions: diagnostic performance and adequacy for molecular testing. *J Thorac Dis*. 2017;9(2):333-343.
65. Heerink WJ, de Bock GH, de Jonge GJ, et al. Complication rates of CT-guided transthoracic lung biopsy: meta-analysis. *Eur Radiol*. 2017;27(1):138-148.
66. Nour-Eldin NE, Alsubhi M, Emam A, et al. Pneumothorax complicating coaxial and non-coaxial CT-guided lung biopsy: comparative analysis of determining risk factors and management of pneumothorax in a retrospective review of 650 patients. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2016;39(2):261-270.
67. Tai R, Dunne RM, Trotman-Dickenson B, et al. Frequency and severity of pulmonary hemorrhage in patients undergoing percutaneous CT-guided transthoracic lung biopsy: single-institution experience of 1175 cases. *Radiology*. 2016;279(1):287-296.
68. Freund MC, Petersen J, Goder KC, et al. Systemic air embolism during percutaneous core needle biopsy of the lung: frequency and risk factors. *BMC Pulm Med*. 2012;12:2.
69. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 suppl):e211S-e250S.

70. Ginsberg RJ, Rice TW, Goldberg M, Waters PF, Schmocker BJ. Extended cervical mediastinoscopy. A single staging procedure for bronchogenic carcinoma of the left upper lobe. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987;94(5):673-678.
71. Hooper C, Lee YC, Maskell N, Group BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax*. 2010;65(suppl 2):ii4-ii17.
72. Ferrer J, Roldan J, Teixidor J, et al. Predictors of pleural malignancy in patients with pleural effusion undergoing thoracoscopy. *Chest*. 2005;127(3):1017-1022.
73. Menzies R, Charbonneau M. Thoracoscopy for the diagnosis of pleural disease. *Ann Intern Med*. 1991;114(4):271-276.
74. Hachey KJ, Digesu CS, Armstrong KW, et al. A novel technique for tumor localization and targeted lymphatic mapping in early-stage lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;154(3):1110-1118.
75. Predina JD, Okusanya O, Newton AD, Low P, Singhal S. Standardization and optimization of intraoperative molecular imaging for identifying primary pulmonary adenocarcinomas. *Mol Imaging Biol*. 2018;20(1):131-138.
76. Zhao ZR, Lau RWH, Ng CSH. Hybrid theater and uniportal video-assisted thoracic surgery: the perfect match for lung nodule localization. *Thorac Surg Clin*. 2017;27(4):347-355.
77. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, et al. Preanalytics and precision pathology: pathology practices to ensure molecular integrity of cancer patient biospecimens for precision medicine. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(11):1346-1363.
78. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, Thunnissen E. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: number 2 in the series "Pathology for the clinician," ed. Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *Eur Respir Rev*. 2017;26(144):170007.
79. Aggarwal C, Bubendorf L, Cooper WA, et al. Molecular testing in stage I-III non-small cell lung cancer: approaches and challenges. *Lung Cancer*. 2021;162:42-53.
80. Baum JE, Zhang P, Hoda RS, et al. Accuracy of next-generation sequencing for the identification of clinically relevant variants in cytology smears in lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2017;125(6):398-406.
81. Mohan AA, Vallonthaiel AG, Nambiar A, et al. EGFR analysis on scrapings from cytology smears in lung carcinoma, an effective alternative to testing on trucut biopsies. *Diagn Cytopathol*. 2021;49(10):1155-1163.
82. Dalvi SD, Chau K, Sajjan S, et al. Adequacy of pleural fluid cytology for comprehensive molecular analysis of lung adenocarcinoma: experience of a large health-care system. *Cytojournal*. 2022;19:7.
83. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346.
84. Vanderlaan PA, Yamaguchi N, Folch E, et al. Success and failure rates of tumor genotyping techniques in routine pathological samples with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;84(1):39-44.
85. Travis WD, Dacic S, Wistuba I, et al. IASLC multidisciplinary recommendations for pathologic assessment of lung cancer resection specimens after neoadjuvant therapy. *J Thorac Oncol*. 2020;15(5):709-740.

# Biopsia líquida: adquisición de la muestra, estrategias de prueba y funciones clínicas

# 4

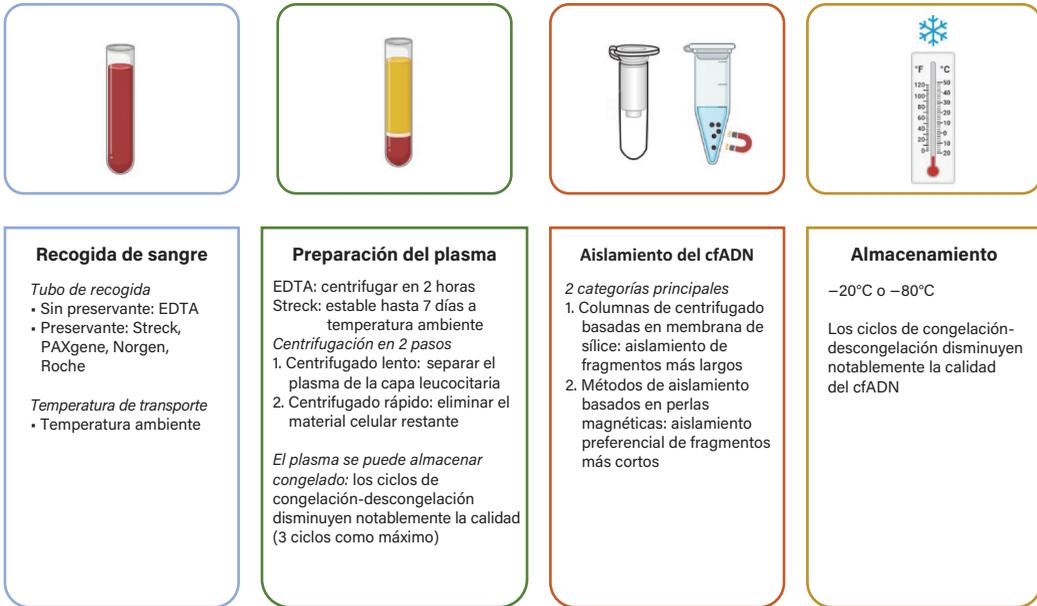
## Manipulación, procesamiento y estrategias de prueba de la muestra

Por Fernando Lopez-Rios, Maria E. Arcila y Christian Rolfo

Definidas en sentido amplio, las biopsias líquidas abarcan una gran variedad de componentes (células tumorales circulantes, vesículas extracelulares, ácidos nucleicos libres de células y diversos metabolitos, entre otros). Sin embargo, el ADN tumoral circulante (ADNtc) es el que ha atraído más atención en el ámbito clínico y constituye el tema principal de este capítulo. A diferencia de otras fuentes de ADN tumoral, la biología y los aspectos técnicos del ADNtc son únicos y más complejos, con varios factores de confusión que siguen siendo responsables de las limitaciones para su implantación generalizada en el diagnóstico clínico rutinario.

El ADN libre de células (cfADN) representa la suma de fragmentos cortos de ADN liberados de células tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo tanto los derivados de células tumorales como de células normales. Las pruebas demuestran que las variables preanalíticas en la recogida, el procesamiento y el almacenamiento de las muestras pueden tener efectos profundos y adversos en el rendimiento total del cfADN, el grado de contaminación del ADN genómico, la integridad general de la muestra y la longitud de los fragmentos de ácidos nucleicos. El tipo de tubo de recogida, los anticoagulantes utilizados, los medios de estabilización, las condiciones de transporte, el momento de la separación del plasma de la sangre, la agitación del tubo, las velocidades y protocolos de centrifugación, las condiciones de almacenamiento/duración del plasma, el número de ciclos de congelación-descongelación, la extracción de cfADN y los métodos de cuantificación de los ácidos nucleicos pueden influir directamente en el análisis posterior.<sup>1-7</sup> En la figura 4-1 se incluyen los principales pasos preanalíticos que influyen en el rendimiento.

En las muestras de sangre, las consideraciones preanalíticas inmediatas se centran en la estabilización del ADNtc y la prevención de la contaminación con ADN genómico de células hematopoyéticas, que puede hacer que el ADNtc sea indetectable. *In vivo*, la vida media del



**Figura 4-1.** Factores preanalíticos que influyen en el cfADN. Abreviaturas: cfADN = ADN libre de células; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético.

ADN<sub>tc</sub> se estima generalmente en unas 2 horas. En ausencia de sistemas fisiológicos activos de eliminación, la vida media *in vitro* es mayor, pero su aislamiento puede verse comprometido por la contaminación con ADN genómico liberado de los leucocitos (white blood cells, WBC) durante el proceso de coagulación o por la lisis celular durante el almacenamiento. Existen varias opciones de tubos de recogida estabilizadores disponibles en el mercado (por ejemplo, Streck, PAXgene [BD Biosciences], Norgen Biotek, Roche Diagnostics) y presentan capacidades variables de preservación y estabilización de los WBC. En contraste con los tubos de recogida de ácido etilendiaminotetraacético (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), estos permiten una ventana de procesamiento más amplia entre la extracción de sangre y la separación del plasma y permiten la agrupación de muestras recogidas en diferentes momentos.<sup>1-7</sup> Generalmente sigue un protocolo de centrifugación en 2 pasos, que consiste en un paso inicial de centrifugación a baja velocidad para separar el plasma y un ciclo posterior a alta velocidad para eliminar cualquier material celular restante.<sup>8</sup>

Existe una gran variabilidad en los métodos de extracción y en la cantidad de plasma utilizada para el aislamiento del ADN<sub>tc</sub>.<sup>9</sup> Los métodos de aislamiento comunes y los kits disponibles comercialmente se dividen en 2 categorías principales: columnas de centrifugado basadas en membranas de sílice y métodos de aislamiento basados en perlas magnéticas.<sup>10</sup> El método utilizado afecta al rendimiento, la integridad y el tamaño de los fragmentos. Se ha informado que los sistemas de perlas magnéticas aíslan preferentemente fragmentos de cfADN más cortos<sup>11</sup> en comparación con los métodos basados en membranas. Los métodos basados en precipitación se asocian a una mayor integridad del ADN en varios estudios.<sup>12-14</sup> El cfADN se puede almacenar durante varios meses a temperaturas bajo cero de -20°C o -80°C para su uso posterior. Se ha informado de una disminución significativa de la integridad del cfADN después de 3 ciclos de congelación-descongelación.<sup>1,15</sup>

Se han implementado varias metodologías para el análisis del cfADN en la práctica clínica y con fines de investigación, incluidos los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las tecnologías basadas en la secuenciación de nueva generación (NGS).<sup>16</sup> Los enfoques basados en la PCR permiten intrínsecamente análisis de genes más restringidos (una única diana o unas pocas) pero pueden ofrecer una mayor sensibilidad para el gen o genes diana. Los enfoques de NGS pueden proporcionar una genotipificación tumoral más completa, identificando no solo mutaciones somáticas, sino también alteraciones en el número de copias, así como reordenamientos genéticos.<sup>17</sup> La creciente demanda de biomarcadores para guiar el manejo adecuado de los pacientes y el desafío que supone la disponibilidad limitada de tejido han dado lugar a un cambio drástico en los usos potenciales de la biopsia líquida en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado, como se describe en la siguiente sección de “Aplicación clínica”. Este cambio drástico ha sido posible gracias a los importantes avances tecnológicos de los últimos años, con varias plataformas de NGS plasmática ya disponibles en la práctica clínica cuya utilidad está apoyada por datos clínicos sólidos.<sup>18-20</sup> En la actualidad, 2 pruebas de cfADN disponibles comercialmente han obtenido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) para la genotipificación tumoral en el CPNM avanzado, y varias terapias dirigidas recientemente aprobadas cuentan con pruebas diagnósticas con fines terapéuticos basadas en la biopsia líquida.

La hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) se debe tener en cuenta al interpretar los resultados de cfADN en la práctica clínica, sobre todo en pacientes de más de 70 años. La CHIP se puede definir como las variaciones somáticas que adquieren las células madre hematopoyéticas con la edad. Por ejemplo, entre los genes frecuentemente implicados se encuentran *ASXL1*, *ATM*, *CBL*, *CHEK2*, *DNMT3A*, *JAK2*, *KMT2D (MLL2)*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *MPL*, *MYD88*, *SF3B1*, *TET2*, *TP53*, y *U2AF1*. Esta fuente de ruido se puede filtrar secuenciando células mononucleares de sangre periférica emparejadas con las del paciente o mitigarse utilizando algoritmos bioinformáticos especializados.<sup>21</sup>

Las estrategias de pruebas de biopsia líquida en pacientes con CPNM avanzado sin tratamiento previo se revisan en detalle en la siguiente sección de “Aplicación clínica”. Aunque las pruebas basadas en tejidos siguen siendo el modelo estándar para la genotipificación tumoral en muchos pacientes con cáncer, debido a las limitaciones técnicas y biológicas del análisis de ADNtc, el análisis de cfADN se puede utilizar de forma secuencial, cuando el tejido tumoral es insuficiente o inadecuado para las pruebas, o de forma concurrente, cuando el tejido es escaso o de adecuación incierta para la genotipificación.<sup>16,22,23</sup>

Además, recientemente se propuso un enfoque basado en el plasma para el CPNM avanzado, a partir de los prometedores resultados de estudios prospectivos<sup>24-27</sup> y retrospectivos<sup>28-30</sup> que demuestran que la NGS en plasma podría proporcionar una genotipificación tumoral más completa con un menor tiempo de respuesta en comparación con la genotipificación tisular estándar de atención, con una sensibilidad y especificidad comparables para los oncogenes conductores clínicamente relevantes. La principal limitación prevista de este enfoque es el hipotético aumento de los costos en comparación con la genotipificación tisular por sí sola, aunque un reciente análisis de rentabilidad en una población

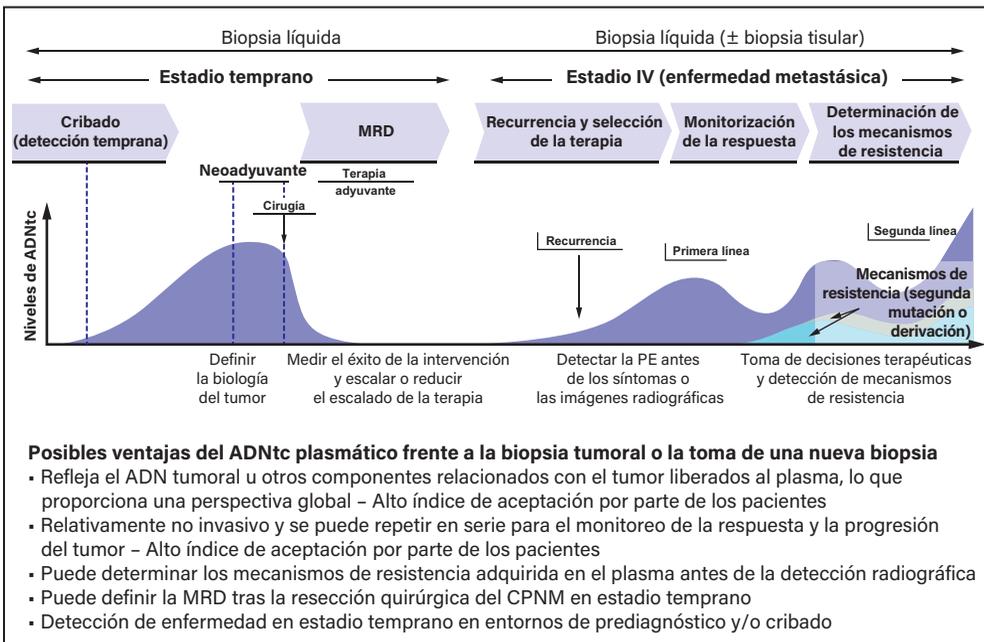
canadiense<sup>31</sup> demostró que un enfoque concurrente de análisis NGS tisular más plasmático en pacientes clínicamente seleccionados con CPNM avanzado no aumenta los costos del sistema y eleva la proporción de pacientes que reciben una terapia dirigida adecuada.

Dado que la NGS plasmática aumenta las tasas de detección de biomarcadores clínicamente relevantes en pacientes con resultados tisulares limitados pero no aumenta la detección en pacientes con resultados de NGS tisular disponibles,<sup>27</sup> una estrategia de pruebas concurrentes de plasma y tejido puede ser sensible en el contexto de biopsias tisulares pequeñas con adecuación incierta para los análisis de NGS, aumentando las posibilidades de obtener un genotipo tumoral integral para todos los factores oncogénicos recomendados. Además, estudios recientes demostraron que la incorporación del análisis del cfADN en la metodología diagnóstica inicial de pacientes con sospecha de CPNM avanzado puede dar lugar a resultados moleculares más rápidos y a un menor tiempo hasta el tratamiento.<sup>32,33</sup> Se necesitan más estudios prospectivos con poblaciones de pacientes más grandes para aclarar mejor la utilidad clínica y la relación costo-eficacia de este enfoque.

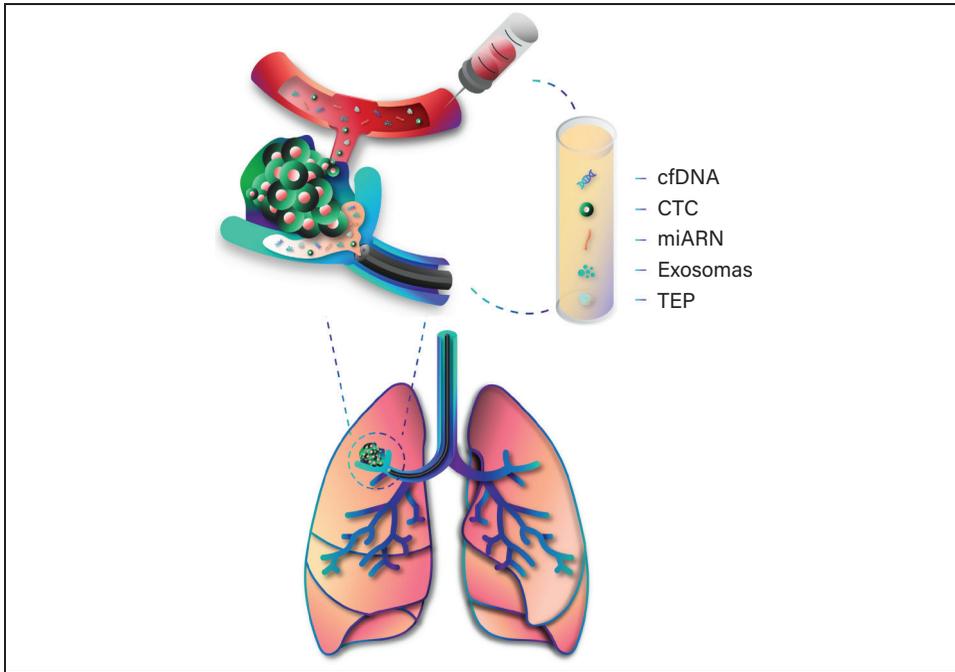
## Aplicación clínica

Por **Natasha B. Leigh, Myung-Ju Ahn y David R. Gandara**

La aplicación clínica de la biopsia líquida en el diagnóstico y la toma de decisiones terapéuticas para el CPNM sigue evolucionando rápidamente. En la figura 4-2 se muestra el proceso continuo de atención del CPNM, desde el cribado y el diagnóstico precoz hasta la determinación de la enfermedad residual mínima (minimal residual disease, MRD) en el entorno posquirúrgico de la enfermedad en estadio temprano, pasando por el diagnóstico



**Figura 4-2.** Biopsia líquida en el proceso continuo de atención del cáncer en pacientes individuales. Abreviaturas: ADNtc = ADN tumoral circulante; MRD = enfermedad residual mínima; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico; PE = progresión de la enfermedad. (Adaptado de Wan *et al.*<sup>34</sup>)



**Figura 4-3.** Componentes de la biopsia líquida. Abreviaturas: cfADN = ADN libre de células; CTC = células tumorales circulantes; miARN = micro-ARN; TEP = plaquetas educadas por el tumor. (Fuente: Freitas *et al.*<sup>38</sup>)

genómico e inmunodiagnóstico de la enfermedad en estadio avanzado.<sup>16,34</sup> Cabe destacar que, si bien el perfilado del tejido tumoral es aplicable en pacientes con CPNM en estadio IV, la biopsia líquida está especialmente indicada por su potencial para abordar el cribado de personas en situación de riesgo, la determinación de la MRD y la monitorización de la respuesta al tratamiento.<sup>22</sup>

### Cribado y detección temprana del cáncer de pulmón

La detección temprana del cáncer de pulmón es esencial para reducir la morbilidad y la mortalidad, especialmente en personas con alto riesgo. El National Lung Screening Trial (NLST) demostró una disminución del 20 % en la tasa de mortalidad específica por cáncer de pulmón con la tomografía computarizada de baja dosis (low-dose computed tomography, LDCT) entre las personas con alto riesgo.<sup>35</sup> El ensayo europeo NELSON demostró una disminución de la mortalidad por cáncer de pulmón del 25 % a los 10 años.<sup>36</sup> Sin embargo, la tasa de falsos positivos, el sobrediagnóstico y los procedimientos invasivos innecesarios siguen siendo un desafío.<sup>37</sup>

La biopsia líquida tiene un papel emergente en el cribado y la detección temprana del cáncer de pulmón mediante células tumorales circulantes, cfADN circulante (genómica o epigenómica), micro-ARN circulantes, exosomas derivados del tumor y plaquetas educadas por el tumor (figura 4-3).<sup>38</sup> La tabla 4-1 resume las ventajas y limitaciones de estos análisis.<sup>38</sup> Aunque estos biomarcadores son prometedores en la detección temprana del cáncer de pulmón, su importancia clínica sigue siendo limitada debido a la importante proporción de resultados falsos negativos y a la falta de estandarización. Recientemente, varias pruebas de genotipificación de cfADN en plasma recibieron la designación de dispositivo innovador por parte de la FDA (tabla 4-2).<sup>39</sup> Antes de su implementación en la práctica clínica para el

**Tabla 4-1.** Resumen de las ventajas y desventajas en el diagnóstico del cáncer de pulmón según los biomarcadores basados en biopsia líquida

Biomarcadores	Ventajas	Desventajas
cfADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumentan en pacientes con cáncer</li> <li>• Las alteraciones genéticas y epigenéticas reflejan las del tumor original</li> <li>• Representación de la heterogeneidad y la dinámica del tumor</li> <li>• Disponibilidad de pruebas de alta sensibilidad (PCR, NGS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcadamente diluido en comparación con el ADN de circulación de línea germinal</li> <li>• Se correlaciona positivamente con el tamaño y la estadificación del tumor</li> <li>• Aumentan en algunas afecciones benignas o premalignas</li> <li>• Costos elevados</li> </ul>
CTC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite el análisis morfológico y la caracterización molecular del tumor</li> <li>• Se correlaciona con el pronóstico</li> <li>• Técnicas emergentes de enriquecimiento y caracterización</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin prueba validada</li> <li>• Poco frecuente en el torrente sanguíneo en el cáncer de pulmón no microcítico</li> <li>• Transición epitelial a mesenquimal con pérdida de marcadores específicos epiteliales</li> <li>• Falta aclarar el papel en la propagación del cáncer</li> </ul>
miARN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferentes perfiles entre los pacientes con cáncer en estadio temprano</li> <li>• Estable en la mayoría de los tipos de fluidos corporales</li> <li>• Liberado por varias estructuras (por ejemplo, exosoma, TEP)</li> <li>• Kits comerciales disponibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta variabilidad, según los pacientes y las tecnologías, lo que requiere métodos de normalización</li> <li>• Se deben validar los métodos de cuantificación y detección</li> <li>• Inespecífico para un tipo de cáncer</li> </ul>
Exosomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contienen varios tipos de biomarcadores, como proteínas y ácidos nucleicos</li> <li>• Aumentan en pacientes con cáncer de pulmón</li> <li>• Estables y accesibles en la mayoría de los tipos de fluidos corporales</li> <li>• Kits comerciales disponibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El método de extracción, la detección y los métodos de caracterización son difíciles y requieren estandarización</li> <li>• Costos elevados</li> </ul>
TEP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los perfiles de ARNm plaquetario son distintos en los pacientes con cáncer</li> <li>• Abundante</li> <li>• Fácilmente aislable</li> <li>• Adquiere ARN específico de células tumorales que refleja sus alteraciones genéticas</li> <li>• Repertorio de ARNm dinámico debido a su corta vida útil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin prueba validada ni abordaje estandarizado</li> <li>• Capacidad de reproducirse</li> <li>• Las técnicas de detección no están ampliamente disponibles</li> <li>• Requiere mucho tiempo y amplios recursos informáticos</li> </ul>

Abreviaturas: cfADN = ADN libre de células; CTC = célula tumoral circulante; ARNm = ARN mensajero; miARN = micro-ARN; NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; TEP = plaquetas educadas por el tumor. Fuente: Freitas *et al.*<sup>38</sup>

cribado o el diagnóstico temprano del cáncer de pulmón, será necesario desarrollar pruebas más sensibles y específicas, así como nuevos estudios más grandes y sólidos que combinen biopsias líquidas con imagenología.

### Enfermedad residual mínima en el CPNM

Una de las cuestiones más importantes en oncología en general, y en el CPNM en particular, es la mejora de la identificación de los pacientes con alto riesgo de recurrencia tras una terapia local definitiva como la resección quirúrgica.<sup>40</sup> En la actualidad, la terapia adyuvante se administra basándose principalmente en el estadio, una variable clínica que no identifica de

**Tabla 4-2.** Pruebas de genotipificación del cfADN en el plasma del CPNM que han recibido la designación de dispositivo innovador como pruebas de detección temprana de múltiples tipos de cáncer

Kit o prueba	Empresa	Tecnología y aplicación	Estado según la FDA
Prueba de detección temprana de múltiples tipos de cáncer	GRAIL	Prueba de sangre NGS que analiza los patrones de metilación del ADNtc para detectar múltiples tipos de cáncer	Designación de dispositivo innovador por la FDA (mayo del 2019)
CancerSEEK	Thrive Earlier Detection	Prueba multianalítica que combina la detección multiplexada por PCR de mutaciones en el ADNtc en 1933 loci con mediciones de biomarcadores proteicos validados para diagnosticar 8 tipos comunes de cáncer, incluidos el de mama, ovario e hígado	Designación de dispositivo innovador por la FDA (agosto del 2018)
Prueba Ivy-Gene CORE; prueba Ivy-Gene Dx para el hígado	Laboratory for Advanced Medicine	Analiza la presencia de ADNtc hipermetilado de múltiples dianas genéticas para confirmar la presencia de cáncer de mama, colon, hígado y pulmón ya en estadio I	Designación de dispositivo innovador por la FDA (septiembre del 2019)
Prueba de detección del cáncer CASCADE-LUNG	Delfi Diagnostics	Método basado en el aprendizaje automático que analiza los patrones de fragmentación del cfADN para detectar la presencia de cáncer	Designación de dispositivo innovador por la FDA (marzo del 2021)

Abreviaturas: cfADN = ADN libre de células; ADNtc = ADN tumoral circulante; FDA = Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa. Fuente: Gray et al.<sup>39</sup>

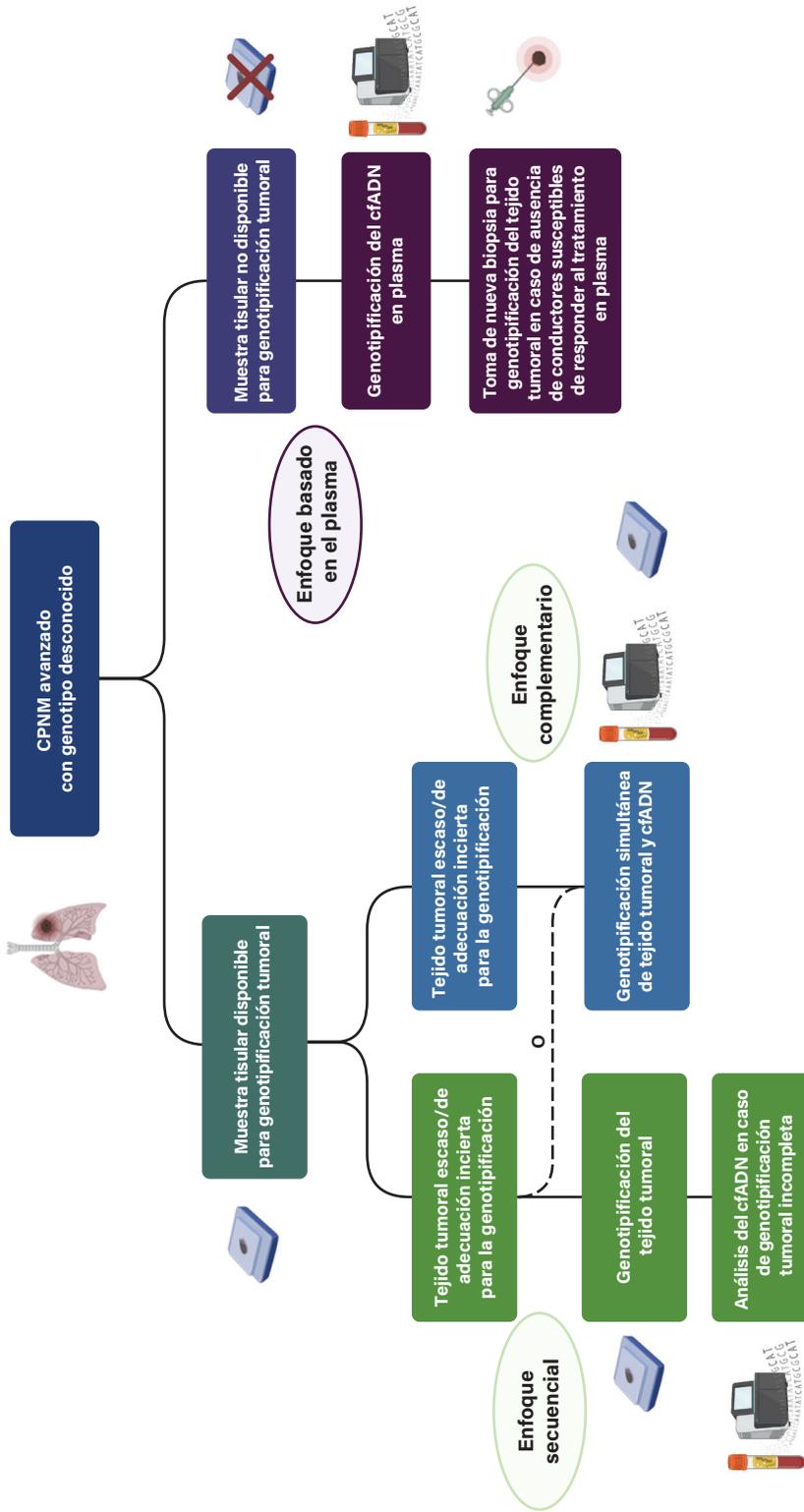
**Tabla 4-3.** Enfoques de biopsia líquida para la enfermedad residual mínima

Parámetro	Sin tejido previo	Informado por el tejido
Adecuación de la muestra de tejido tumoral	No se requiere	Limitación práctica
Sensibilidad	Mejora las pruebas específicas para MRD	Disminuye el LOD
Especificidad	La CHIP requiere algoritmo de filtración; mejora según el ADNtc de referencia	Específico del tumor
Variantes emergentes	Detecta	No puede evaluar
Variantes de resistencia	Detecta	No puede evaluar
Tiempo de respuesta	Mucho menor	Mayor

Abreviaturas: CHIP = hematopoyesis clonal de potencial indeterminado; ADNtc = ADN tumoral circulante; LOD = límite de detección; MRD = enfermedad residual mínima.

forma consistente a los pacientes que han alcanzado la cura quirúrgica en comparación con los que requieren tratamiento adicional. La determinación de la MRD mediante biopsia líquida en plasma, si es suficientemente sensible y específica, ofrece la posibilidad de seleccionar mejor a los pacientes que necesitan una intensificación de la terapia o, por el contrario, en los que podría omitirse la terapia adyuvante.

En la actualidad, se están evaluando múltiples pruebas de MRD en el CPNM, algunas basadas únicamente en el ADNtc, otras en combinación con componentes epigenéticos y otras “informadas por el tejido” o “agnósticas al tejido”.<sup>41,42</sup> Cada uno de estos enfoques ofrece ventajas y desventajas potenciales (tabla 4-3). Los estudios completados recientemente sugieren que, sin importar la metodología, será necesario perfeccionar las pruebas de MRD



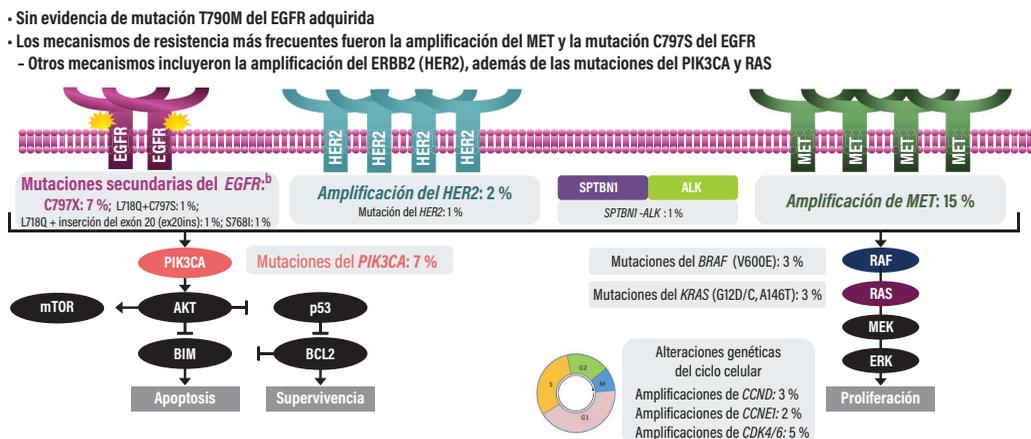
**Figura 4-4.** Algoritmo diagnóstico para el uso de la biopsia líquida en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado sin tratamiento previo (Adaptado de Rolfo et al<sup>16</sup> con aportaciones de Alessandro Russo, Hospital Papardo, Messina, Italia).

antes de generalizar su aplicación clínica. Por ejemplo, en un análisis retrospectivo preliminar de la MRD en el ensayo IMpower-010 de atezolizumab adyuvante, una prueba informada por el tejido basada en una única muestra de plasma a las 8 semanas, aproximadamente, de la intervención quirúrgica resultó insuficiente para alterar un enfoque de terapia adyuvante para todos los pacientes. Aunque los resultados fueron claramente diferentes en las poblaciones MRD positivas y MRD negativas, ambos grupos mostraron patrones de recidiva continuos.<sup>43,44</sup> Se esperan con gran expectación los resultados de los ensayos prospectivos en curso.

### Selección del tratamiento de primera línea en el CPNM avanzado

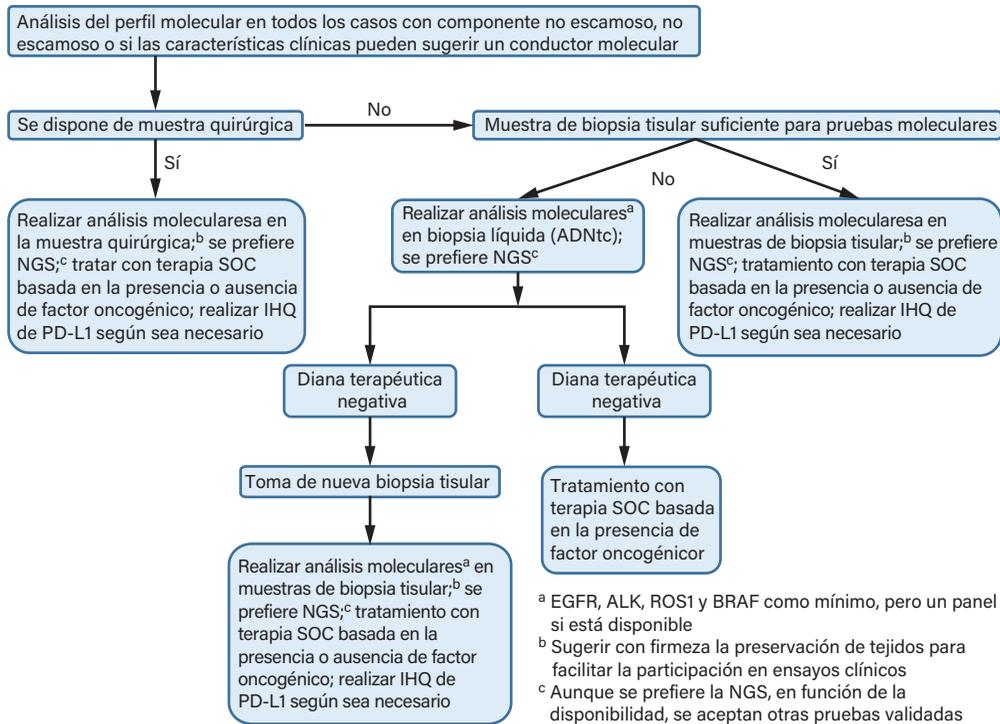
La selección de la terapia óptima para los pacientes con CPNM avanzado y, cada vez más, en estadio temprano, requiere una evaluación tanto histopatológica como genómica. Las pautas recomiendan las pruebas rutinarias de muestras de CPNM no escamoso para detectar alteraciones genómicas y PD-L1 susceptibles a una intervención preventiva.<sup>45</sup> Las pruebas también pueden beneficiar a pacientes con otros subtipos patológicos en escenarios seleccionados (por ejemplo, pacientes más jóvenes, no fumadores o fumadores moderados). Los pacientes con alteraciones tumorales susceptibles de responder al tratamiento (por ejemplo, en *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *NTRK1-3*) obtienen mejores resultados con la terapia dirigida de primera línea para la enfermedad avanzada. Otros pueden ser candidatos para agentes dirigidos de segunda línea o terapias emergentes (por ejemplo, alteraciones en *KRAS* G12C, *EGFR* exón 20, *ERBB2*, *NRG1*). Sin embargo, la obtención de tejido suficiente para la evaluación genómica puede ser un desafío en pacientes con cáncer de pulmón avanzado.

A menudo, los pacientes son diagnosticados mediante pequeñas muestras de biopsia o citología que pueden resultar inadecuadas para el análisis de biomarcadores. En algunas situaciones, el paciente no puede esperar a que se repitan las biopsias o a que se retrasen los resultados genómicos.<sup>46</sup> Se recomienda el uso de pruebas de cfADN en plasma para garantizar la genotipificación completa de los pacientes con tejido insuficiente o no disponible para la genotipificación. Estas pruebas desempeñan un papel cada vez más importante como estrategia de pruebas complementarias incluso cuando se dispone de pruebas de tejido



<sup>a</sup> Dos pacientes presentaron mutaciones T790M *de novo* de referencia, de los cuales uno adquirió la mutación C797S en la progresión.

**Figura 4-5.** Mecanismos de resistencia adquiridos por candidatos con osimertinib en el estudio FLAURA (n = 91). El mecanismo de resistencia informado se puede solapar con otro. (Fuente: Ramalingam *et al.*<sup>52</sup> Copyright © 2018, Elsevier).

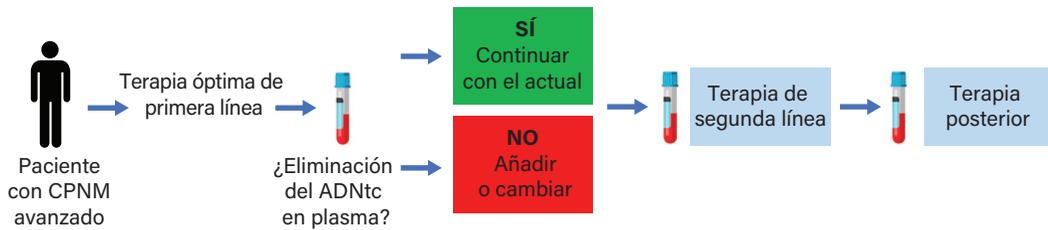


**Figura 4-6.** Paciente con enfermedad progresiva o recurrente por CPNM durante el tratamiento con TKI. Abreviaturas: ADNtc = ADN tumoral circulante; IHQ = inmunohistoquímica; NGS = secuenciación de nueva generación; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico; SOC = estándar de atención; TKI = inhibidor de la tirosina quinasa. (Fuente: Rolfo *et al.*<sup>53</sup>)

(figura 4-4),<sup>16</sup> lo que permite que más pacientes accedan a la terapia dirigida. Los resultados de la biopsia líquida son altamente concordantes con los del tejido, arrojan resultados de tratamiento similares, ofrecen un tiempo de respuesta más rápido e incluso pueden suponer un ahorro de costos.<sup>24,25,28,30,31</sup> Se demostró que una implementación más temprana de la biopsia líquida en la vía diagnóstica acelera el inicio del tratamiento de primera línea en la enfermedad avanzada, lo que puede mejorar aún más los resultados en los pacientes.<sup>29,47,48</sup>

### Genómica de la resistencia adquirida en el CPNM en estadio avanzado

Los agentes moleculares dirigidos se asocian a mejoras significativas en los resultados clínicos de los pacientes con CPNM con factores oncogénicos; sin embargo, la resistencia adquirida a estos agentes sigue siendo un desafío fundamental sin resolver. Para determinar el mecanismo de resistencia, es esencial realizar pruebas moleculares integrales, que pueden ayudar a guiar la terapia posterior. Aunque la genotipificación tisular se considera el modelo estándar para la elaboración de perfiles moleculares,<sup>45</sup> la repetición de biopsias en el contexto de la enfermedad recidivante no siempre es factible.<sup>28</sup> La biopsia líquida presenta notables ventajas sobre la genotipificación tisular en cuanto a su carácter no invasivo, su breve tiempo de respuesta y su capacidad para captar variantes heterogéneas que surgen en diferentes localizaciones de la enfermedad. Sin embargo, la biopsia líquida tiene limitaciones, como el riesgo de resultados falsos negativos cuando el ADNtc no es detectable en la sangre y su incapacidad para captar información histológica como la transformación a cáncer de pulmón microcítico. Existen varias pruebas aprobadas por la FDA para la genotipificación del cfADN



**Figura 4-7.** Futura integración de la monitorización de biopsia líquida en la toma de decisiones sobre el tratamiento. Abreviaturas: ADNtc = ADN tumoral circulante; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico.

plasmático en el CPNM, que incluyen la prueba de mutación del EGFR Cobas basada en PCR (Roche Diagnostics) y en NGS, y las pruebas diagnósticas con fines terapéuticos (CDx) Guardant 360 y FoundationOne liquid CDx (Foundation Medicine).

La mutación T790M del EGFR es el mecanismo de resistencia más común a los inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) del EGFR de primera o segunda generación, y la evaluación de la T790M es crucial para iniciar el osimertinib como terapia posterior. En las consultas en las que se utilizan TKI del EGFR de primera o segunda generación en el entorno del tratamiento de primera línea, se puede utilizar la biopsia líquida en la progresión en lugar de la biopsia tisular para detectar la resistencia impulsada por la mutación T790M; sin embargo, si las pruebas realizadas en plasma son negativas, se recomienda la biopsia tisular.<sup>49</sup> El osimertinib se recomienda como tratamiento preferente de primera línea con base en los resultados del ensayo FLAURA,<sup>50</sup> los mecanismos heterogéneos de resistencia al osimertinib detectados en la progresión tras el tratamiento de primera línea se han caracterizado mediante biopsia líquida (figura 4-5).<sup>51,52</sup> Aunque la detección de mecanismos de resistencia tras el tratamiento con agentes dirigidos contra otros factores oncogénicos no es obligatoria, las pruebas integrales mediante cfADN pueden utilizarse para guiar el tratamiento posterior y probablemente desempeñarán un papel de manejo más importante en el futuro. La figura 4-6 muestra un diagrama de flujo recomendado por la International Association for the Study of Lung Cancer para el uso de la biopsia líquida en pacientes que progresan durante el tratamiento con TKI.<sup>53</sup>

### Monitorización del tratamiento en el cáncer de pulmón

Los niveles de ADNtc en plasma se han revelado como un posible sustituto del pronóstico y de la respuesta al tratamiento. Varios estudios han confirmado que la ausencia de ADNtc plasmático en pacientes con cáncer de pulmón avanzado antes de iniciar la terapia es un factor de buen pronóstico asociado a mejores resultados independientemente del tratamiento.<sup>54</sup> La eliminación o disminución del ADNtc plasmático se ha asociado con la respuesta a los TKI, la inmunoterapia y la quimioterapia.<sup>54-59</sup> En la enfermedad localmente avanzada, la persistencia de ADNtc tras la quimiorradiación puede identificar a una población con mayor riesgo de recaída, identificando a posibles candidatos para una terapia de consolidación más intensificada.<sup>60</sup> En los pacientes que reciben una terapia a largo plazo con inhibidores de puntos de control (checkpoint inhibitor, CPI), el ADNtc detectable en plasma puede identificar a los pacientes con riesgo de recidiva, mientras que la ausencia puede identificar a aquellos que podrían suspender los CPI de mantenimiento y permanecer libres de progresión.<sup>61</sup> Sin embargo, aún está por demostrar la utilidad clínica de la monitorización mediante biopsia líquida para fundamentar las decisiones sobre el tratamiento, como la intensificación o la

reducción escalonada segura de la terapia. El riesgo de resultados falsos positivos o negativos en las pruebas seriadas sigue siendo una limitación técnica importante. Múltiples estudios están examinando la monitorización de los niveles de ADNtc y el tratamiento con inhibidores de la quinasa del EGFR (NCT02856893, NCT04410796), así como la inmunoterapia y la quimioterapia (NCT04093167, NCT04966676; figura 4-7). Aunque el uso actual de la monitorización con biopsia líquida para fundamentar las decisiones sobre el tratamiento no está listo para la práctica rutinaria, es un importante criterio de valoración indirecto potencial que se está investigando activamente.

### **Biomarcadores predictivos para la inmunoterapia de puntos de control**

Se está desarrollando un gran número de biomarcadores para la CPI, lo que refleja la complejidad de las interacciones entre el microentorno tumoral y el estroma, así como la naturaleza continua de los resultados de la mayoría de estas pruebas (por ejemplo, PD-L1 y cargas mutacionales tumorales [tumor mutational burdens, TMB]), en contraste con los biomarcadores discretos (por ejemplo, estado del gen mutante frente al de tipo salvaje).<sup>16</sup> De ellos, actualmente, el más pertinente para la biopsia líquida es la TMB. Aunque la TMB evaluada en tejido es un biomarcador pan-tumoral aprobado por la FDA en Estados Unidos, los diferentes resultados y las variaciones en la metodología de la prueba, la definición del punto de corte y otros parámetros han complicado su aplicación clínica. Las pruebas basadas en la carga mutacional tumoral en sangre (blood TMB, B-TMB) se han validado y evaluado analítica y clínicamente en estudios retrospectivos y prospectivos.<sup>62,63</sup> Más recientemente, se ha informado de la cohorte de fase 3 del BFAST, en la que los pacientes con CPNM avanzado sin tratamiento previo y B-TMB elevada ( $\geq 16$  mt/Mb) se asignaron aleatoriamente a atezolizumab o a quimioterapia basada en platino.<sup>64</sup> Aunque el criterio de valoración principal de la supervivencia libre de progresión mostró una tendencia hacia el grupo de atezolizumab (cociente de riesgo [HR] 0,77; 0,59-1,00;  $p = 0,054$ ), las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Cabe destacar que los resultados favorecieron a los pacientes con histología escamosa, mientras que no hubo beneficios en los de la cohorte no escamosa. Por lo tanto, en la práctica habitual, el uso de B-TMB no está indicado actualmente para la selección del tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Aunque se está desarrollando una amplia variedad de pruebas basadas en plasma, incluida la medición del PD-L1 mediante ARN mensajero o vesículas extracelulares, por el momento siguen en fase de investigación.<sup>65,66</sup>

### **Referencias**

1. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YM. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*. 2005;51(4):781-784.
2. Henao Diaz E, Yachnin J, Grönberg H, Lindberg J. The in vitro stability of circulating tumour DNA. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168153.
3. Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, et al. Performance of Streck cfDNA blood collection tubes for liquid biopsy testing. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166354.
4. Norton SE, Luna KK, Lechner JM, Qin J, Fernando MR. A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(4):305-311.
5. Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, et al. The effect of preservative and temperature on the analysis of circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2017;23(10):2471-2477.

6. Toro PV, Erlanger B, Beaver JA, et al. Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clin Biochem*. 2015;48(15):993-998.
7. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*. 2013;46(12):1099-1104.
8. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-230.
9. Haselmann V, Ahmad-Nejad P, Geilenkeuser WJ, et al. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(2):220-228.
10. Lu JL, Liang ZY. Circulating free DNA in the era of precision oncology: pre- and post-analytical concerns. *Chronic Dis Transl Med*. 2016;2(4):223-230.
11. Kloten V, Rüchel N, Brüchle NO, et al. Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of *KRAS* mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget*. 2017;8(49):86253-86263.
12. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*. 2011;412(23-24):2085-2088.
13. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplac External Quality Assessment experience. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(12):1935-1942.
14. Yuan H, Zhu ZZ, Lu Y, et al. A modified extraction method of circulating free DNA for epidermal growth factor receptor mutation analysis. *Yonsei Med J*. 2012;53(1):132-137.
15. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41(2):276-282.
16. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, et al. Liquid biopsy for advanced NSCLC: a consensus statement from the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2021;16(10):1647-1662.
17. Russo A, De Miguel Perez D, Gunasekaran M, et al. Liquid biopsy tracking of lung tumor evolutions over time. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(12):1099-1108.
18. Odegaard JJ, Vincent JJ, Mortimer S, et al. Validation of a plasma-based comprehensive cancer genotyping assay utilizing orthogonal tissue- and plasma-based methodologies. *Clin Cancer Res*. 2018;24(15):3539-3549.
19. Pritchett MA, Camidge DR, Patel M, et al. Prospective clinical validation of the InVisionFirst-Lung Circulating Tumor DNA assay for molecular profiling of patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol*. 2019;3:PO.18.00299. doi:10.1200/PO.18.00299.
20. Schrock AB, Welsh A, Chung JH, et al. Hybrid capture-based genomic profiling of circulating tumor DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(2):255-264.
21. Krebs MG, Malapelle U, André F, et al. Practical considerations for the use of circulating tumor DNA in the treatment of patients with cancer: a narrative review. *JAMA Oncol*. 2022;8(12):1830-1839. doi:10.1001/jamaoncol.2022.4457.
22. Aggarwal C, Rolfo CD, Oxnard GR, et al. Strategies for the successful implementation of plasma-based NSCLC genotyping in clinical practice. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(1):56-62.
23. Pascual J, Attard G, Bidard FC, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2022;33(8):750-768.
24. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical utility of comprehensive cell-free DNA analysis to identify genomic biomarkers in patients with newly diagnosed metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4691-4700.
25. Page RD, Drusbosky LM, Dada H, et al. Clinical outcomes for plasma-based comprehensive genomic profiling versus standard-of-care tissue testing in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2022;23(1):72-81.
26. Palmero R, Taus A, Viteri S, et al. Biomarker discovery and outcomes for comprehensive cell-free circulating tumor DNA versus standard-of-care tissue testing in advanced non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol*. 2021;5:93-102.
27. Schwartzberg LS, Li G, Tolba K, et al. Complementary roles for tissue- and blood-based comprehensive genomic profiling for detection of actionable driver alterations in advanced NSCLC. *JTO Clin Res Rep*. 2022;3(9):100386.

28. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al. Clinical implications of plasma-based genotyping with the delivery of personalized therapy in metastatic non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):173-180.
29. Cui W, Milner-Watts C, O'Sullivan H, et al. Up-front cell-free DNA next generation sequencing improves target identification in UK first line advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Eur J Cancer.* 2022;171:44-54.
30. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: analysis of over 8000 cases. *Cancer.* 2020;126(14):3219-3228.
31. Ezeife DA, Spackman E, Juergens RA, et al. The economic value of liquid biopsy for genomic profiling in advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2022;14:17588359221112696.
32. Cui W, Milner-Watts C, McVeigh TP, et al. A pilot of blood-first diagnostic cell free DNA (cfDNA) next generation sequencing (NGS) in patients with suspected advanced lung cancer. *Lung Cancer.* 2022;165:34-42.
33. Garcia-Pardo M, Czarnecka K, Law JH, et al. Plasma-first: accelerating lung cancer diagnosis and molecular profiling through liquid biopsy. *Ther Adv Med Oncol.* 2022;14:17588359221126151.
34. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):223-238. doi:10.1038/nrc.2017.7.
35. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al; National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011;365:395-409.
36. De Koning HJ, Van Der Aalst CM, De Jong PA, et al. Reduced lung-cancer mortality with volume CT screening in a randomized trial. *N Engl J Med.* 2020;382:503-513.
37. PatzEFJr, Pinsky P, Gatsonis C, et al. Overdiagnosis in low-dose computed tomography screening for lung cancer [published correction appears in *JAMA Intern Med.* 2014;174(5):828]. *JAMA Intern Med.* 2014;174(2):269-274. doi:10.1001/jamainternmed.2013.12738.
38. Freitas C, Sousa C, Machado F et al. The role of liquid biopsy in early diagnosis of lung cancer. *Front Oncol.* 2021;11:634316.
39. Gray J, Thompson JC, Carpenter EL, et al. Plasma cell-free DNA genotyping: from an emerging concept to a standard-of-care in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 2021;26:e1812-1821.
40. Malapelle U, Pisapia P, Addeo A, et al. Liquid biopsy from research to clinical practice: focus on non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2021;21(11):1165-1178. doi:10.1080/14737159.2021.1985468.
41. Moding EJ, Nabet BY, Alizadeh AA, Diehn M. Detecting liquid remnants of solid tumors: circulating tumor DNA minimal residual disease. *Cancer Discov.* 2021;11(12):2968-2986. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0634.
42. Pellini B, Chaudhuri AA. Circulating tumor DNA minimal residual disease detection of non-small-cell lung cancer treated with curative intent. *J Clin Oncol.* 2022;40(6):567-575. doi:10.1200/JCO.21.01929.
43. Zhou C, Das Thakur M, Srivastava MK, et al. IMPower010: biomarkers of disease-free survival (DFS) in a phase 3 study of atezolizumab (atezo) vs best supportive care (BSC) after adjuvant chemotherapy in stage IB-IIIA NSCLC. ESMO Immuno-Oncology Congress 2021, Abstract 2O. *Ann Oncol.* 2021;32(suppl 7):S1373-S1391.
44. Carbone D, Lee J, Kris M, et al. Clinical/biomarker data for neoadjuvant atezolizumab in resectable stage IB-IIIB NSCLC: primary analysis in the LCMC3 study. *J Thorac Oncol.* 2021;16(3 suppl):S115-S116. doi:10.1016/j.jtho.2021.01.294.
45. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142:321-346.
46. Lim C, Tsao MS, Le LW, et al. Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(7):1415-1421. doi:10.1093/annonc/mdv208.
47. Garcia-Pardo M, Czarnecka K, Law JH, et al. Plasma first: Accelerating lung cancer diagnosis through liquid biopsy. Abstract 3039. *J Clin Oncol.* 2022;40(16 suppl):3039. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.3039.

48. Thompson JC, Aggarwal C, Wong J, et al. Plasma genotyping at the time of diagnostic tissue biopsy decreases time-to-treatment in patients with advanced NSCLC: results from a prospective pilot study. *JTO Clin Res Rep*. 2022;3(4):100301. doi:10.1016/j.jtocrr.2022.100301.
49. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34:3375-3382.
50. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018;378:113-125.
51. Romero A, Serna-Blasco R, Alfaro C, et al. ctDNA analysis reveals different molecular patterns upon disease progression in patients treated with osimertinib. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(3):532-540. doi:10.21037/tlcr.2020.04.01.
52. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, et al. Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann Oncol*. 2018;29:viii740.
53. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1248-1268.
54. Gray JE, Okamoto I, Sriuranpong V, et al. Tissue and plasma EGFR mutation analysis in the FLAURA trial: osimertinib versus comparator EGFR tyrosine kinase inhibitor as first-line treatment in patients with EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(22):6644-6652. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1126.
55. Anagnostou V, Forde PM, White JR, et al. Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2019;79(6):1214-1225. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1127.
56. Horn L, Whisenant JG, Wakelee H, et al. Monitoring therapeutic response and resistance: analysis of circulating tumor DNA in patients with ALK+ lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(11):1901-1911. doi:10.1016/j.jtho.2019.08.003.
57. Iijima Y, Hirotsu Y, Amemiya K, et al. Very early response of circulating tumour-derived DNA in plasma predicts efficacy of nivolumab treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2017;86:349-357. doi:10.1016/j.ejca.2017.09.004.
58. Song Y, Hu C, Xie Z, et al; on behalf of AME Lung Cancer Collaborative Group. Circulating tumor DNA clearance predicts prognosis across treatment regimen in a large real-world longitudinally monitored advanced non-small cell lung cancer cohort. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(2):269-279. doi: 10.21037/tlcr.2020.03.17.
59. Zulato E, Attili I, Pavan A, et al. Early assessment of KRAS mutation in cfDNA correlates with risk of progression and death in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2020;123(1):81-91. doi:10.1038/s41416-020-0833-7.
60. Moding EJ, Liu Y, Nabet BY, et al. Circulating tumor DNA dynamics predict benefit from consolidation immunotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Nat Cancer*. 2020;1(2):176-183. doi:10.1038/s43018-019-0011-0.
61. Hellmann MD, Nabet BY, Rizvi H, et al. Circulating tumor DNA analysis to assess risk of progression after long-term response to PD-(L)1 blockade in NSCLC. *Clin Cancer Res*. 2020;26(12):2849-2858. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3418.
62. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med*. 2018;24(9):1441-1448. doi:10.1038/s41591-018-0134-3.
63. Drusbosky L, Bilen MA, Azzi G, et al. Blood-based tumor mutational burden from circulating tumor DNA (ctDNA) across advanced solid malignancies using a commercially available liquid biopsy assay. Abstract. *J Clin Oncol*. 2021;39(15 suppl):3040.
64. Peters S, Dziadziuszko R, Morabito A, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in advanced or metastatic NSCLC with high blood-based tumor mutational burden: primary analysis of BFAST cohort C randomized phase 3 trial. *Nat Med*. 2022;28(9):1831-1839. doi:10.1038/s41591-022-01933-w.
65. Raez LE, Danenberg K, Sumarriva D, et al. Using cfRNA as a tool to evaluate clinical treatment outcomes in patients with metastatic lung cancers and other tumors. *Cancer Drug Resist*. 2021;4(4):1061-1071. doi:10.20517/cdr.2021.78.
66. Rodriguez-Martinez A, Simon-Saez I, Perales S, et al. Exchange of cellular components between platelets and tumor cells: impact on tumor cells behavior. *Theranostics*. 2022;12(5):2150-2161. doi:10.7150/thno.64252.



# Tecnologías para la detección de biomarcadores

# 5

Por Yasushi Yatabe, Lynette M. Sholl, Sanja Dacic, Keith M. Kerr, Erik Thunnissen y Anders Skanderup

Existen múltiples tecnologías para la detección de biomarcadores y tienen distintas capacidades para detectar variantes genéticas y cambios en las proteínas. En la actualidad existen 5 anomalías genéticas y proteicas principales relevantes para la práctica clínica del cáncer (tabla 5-1):

1. **Variante de nucleótido único (SNV):** un nucleótido se sustituye por otro cuando se compara con la secuencia de referencia. Las variantes de nucleótido único (single nucleotide variants, SNV) patogénicas son no sinónimas y dan lugar a un cambio de aminoácido que puede originar una ganancia de función oncogénica (por ejemplo, *EGFR* L858R, *KRAS* G12C, y *BRAF* V600E) o una pérdida de función en el caso de genes supresores tumorales (por ejemplo, *TP53* y *RB1*). En el caso de las mutaciones que provocan codones de terminación (TAA, TAG y TGA), la proteína no se genera a partir de la mutación (mutación terminadora). Las SNV no siempre dan lugar a cambios de aminoácidos (cambios de nucleótidos sinónimos) y estos son típicamente no patogénicos, aunque algunas SNV sinónimas pueden inducir cambios funcionales debido a la alteración del empalme de los transcritos.<sup>1</sup>
2. **Inserción y/o deleción (indel):** la indel se define como una inserción o deleción de 1 o más nucleótidos que puede alterar la secuencia de aminoácidos y conducir potencialmente a un cambio en el marco de lectura. Las indel pueden conferir una actividad oncogénica o una alteración funcional. Las deleciones del exón 19 del *EGFR* dentro del marco de lectura y las inserciones del exón 20 del *HER2* son ejemplos de mutaciones oncogénicas, mientras que la mayoría de las indel en genes supresores tumorales, como el *TP53*, el *APC* y el *RB1*, suelen estar más fuera del marco de lectura y provocan un deterioro funcional del alelo mutado.

**Tabla 5-1.** Alteraciones genéticas clínicamente relevantes en el cáncer de pulmón

Alteraciones genéticas	Principales genes implicados en el cáncer de pulmón	Métodos de detección
SNV, indel	<i>EGFR, KRAS, BRAF, HER2</i>	Secuenciación directa por PCR, PCR específica de mutación, NGS-amplicón, NGS-captura híbrida, ddPCR
Amplificación genética	<i>FGFR, MET</i>	FISH, NGS-captura híbrida, ddPCR
Reordenamiento genético	<i>ALK, ROS1, RET, NTRK, NRG</i>	Secuenciación directa por RT-PCR, NGS (basado en ADN o ARN), FISH, IHQ (ALK)
Expresión/sobreexpresión proteica	ALK, PD-L1, HER2	IHQ, ELISA, <sup>a</sup> espectrometría de masas <sup>a</sup>

Abreviaturas: ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas; ELISA = ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; FISH = hibridación fluorescente *in situ*; IHQ = inmunohistoquímica; indel = inserción y/o delección; NGS = secuenciación de nueva generación; RT = transcripción inversa; SNV = variante de nucleótido único.

<sup>a</sup> No se utiliza en la práctica clínica habitual.

- Amplificación genética, variación del número de copias:** la amplificación genética describe los aumentos en el número de copias de un segmento específico de ADN que pueden llevar a la sobreexpresión proteica. La variación del número de copias es un término más general que se utiliza para incluir el aumento o la disminución de copias de genes, por ejemplo, 4 copias de *MET*, que pueden no ser oncogénicas.
- Reordenamiento genético:** los reordenamientos cromosómicos (también conocidos como *translocaciones*) se producen cuando un segmento cromosómico se desprende y se une a otro cromosoma o a un lugar diferente del mismo cromosoma. Las inversiones se producen cuando el segmento se vuelve a unir al mismo cromosoma en sentido inverso. Los reordenamientos pueden dar lugar a fusiones de genes oncogénicos (por ejemplo, *EML4::ALK*, *CD74::ROS1* y *KIF5B::RET*).
- Expresión/sobreexpresión proteica:** la amplificación y el reordenamiento de genes se pueden traducir en una sobreexpresión proteica aberrante. La sobreexpresión de HER2 se puede deber a una amplificación genética. Los reordenamientos genéticos pueden dar lugar a alteraciones de la expresión proteica (por ejemplo, la fusión del gen quinasa del linfoma anaplásico (Anaplastic Lymphoma Kinase, *ALK*) da lugar a una expresión anormal del dominio quinasa de la *ALK*). La expresión anormal de una proteína puede ser patogénica pero no estar directamente relacionada con una alteración genética (por ejemplo, los cánceres de pulmón que sobreexpresan PD-L1 no demuestran alteraciones en el gen *CD274/PD-L1* salvo en escasas ocasiones).

Para detectar anomalías, se han desarrollado varios métodos para diferentes pruebas, que van desde la detección *in situ* de alteraciones proteicas o genéticas en cortes fijados en formalina e incrustados en parafina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) hasta la detección simultánea de múltiples alteraciones genéticas en ADN o ARN extraídos. Cada prueba tiene ventajas y desventajas en relación con los tipos de muestras que pueden analizarse, las alteraciones detectadas, el costo y el tiempo necesario para informar (tiempo de respuesta [turnaround time, TAT]). Comprender las propiedades de la prueba es importante para una selección óptima de la misma y es fundamental para evitar dificultades.

## Tiempo de respuesta

El TAT se define como el tiempo que transcurre desde que se solicita una prueba hasta que se recibe el informe. En la práctica clínica, el TAT es un factor crucial y se relaciona con la prueba específica, así como con otros factores, como la transferencia de muestras entre laboratorios, la dotación de personal del laboratorio y la agrupación de casos. Los días laborables óptimos de laboratorio para diversas pruebas (que se comentan a continuación) son los siguientes: menos de 2 días laborables para la inmunohistoquímica (IHQ), de 2 a 3 días para la hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH), de 3 a 4 días para la secuenciación directa por reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR)/PCR con transcripción inversa (RT-PCR), de 4 a 5 días para la secuenciación basada en amplicones y de 5 a 14 días para la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) basada en captura híbrida.

En el caso del análisis híbrido de ADN/ARN, es posible que no se obtenga un resultado de ADN o de ARN, ya sea por insuficiencia cuantitativa o cualitativa de la muestra. (Véase el capítulo 3, “Adquisición de muestras y consideraciones preanalíticas”). Se debe tener en cuenta el tiempo global hasta la decisión de tratamiento del paciente, no solo el tiempo de trabajo nominal de la prueba de laboratorio. Es importante tener en cuenta que, si todos los resultados se devuelven como fallos del análisis, el estado clínico volverá al principio.

## Inmunohistoquímica

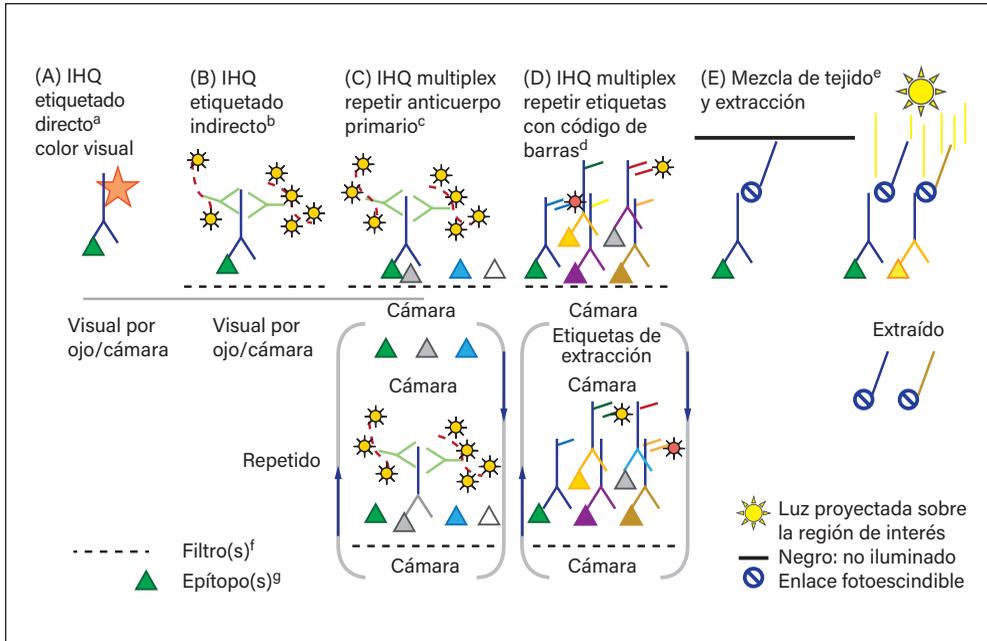
La IHQ es una herramienta diagnóstica poderosa, y los protocolos se han vuelto sólidos para la detección de proteínas relevantes para la clasificación patológica de tumores y la identificación de algunas alteraciones moleculares susceptibles de responder al tratamiento. En la figura 5-1 se muestra una representación gráfica simplificada de la IHQ directa e indirecta. La técnica básica se describió en el *Atlas de inmunohistoquímica diagnóstica de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC)*. El método en sí es más cualitativo que cuantitativo.<sup>2</sup> Sin embargo, se puede lograr una evaluación semicuantitativa mediante una cuidadosa construcción y validación del protocolo a lo largo de un rango corto (factor de 2) de concentración proteica.<sup>3</sup>

## Principios básicos

El procedimiento básico que da como resultado un color visible microscópico *in situ* contiene los siguientes pasos: recuperación del epítipo, incubación con anticuerpo primario, lavado para eliminar los anticuerpos no unidos, incubación con anticuerpo secundario marcado que se une a la cadena pesada del anticuerpo primario, lavado para eliminar los anticuerpos no unidos y posterior visualización con un paso de realce de señal.

## Validación de IHQ para pruebas predictivas

Los métodos de validación difieren ligeramente en los marcadores diagnósticos en comparación con los predictivos. Para fines diagnósticos, en Estados Unidos se suele exigir un conjunto de validación mínimo de 20 muestras, que contenga controles positivos y negativos claros.<sup>5</sup> Para las pruebas predictivas de marcadores, el umbral de una prueba desempeña un papel crucial. Como no todas las pruebas de PD-L1 son iguales,<sup>6,7</sup> la validación clínica analítica e indirecta parece ser la mejor aproximación posible.<sup>7</sup>



**Figura 5-1.** Representación gráfica simplificada de diferentes tecnologías de análisis espacial de proteínas tisulares.

<sup>a</sup> Se requiere una alta concentración de epítopos para la absorción visual de la señal de color o de la etiqueta fluorescente. Para esta última, se requiere una concentración de epítopos ligeramente inferior a la de un cromógeno.

<sup>b</sup> Realce de señal mediante (1) unión con varios anticuerpos secundarios (por ejemplo, anti-conejo de ratón; anti-humano de cabra, etc.) marcados con (2) enzima para la generación de cromógeno insoluble (por ejemplo, diaminobencidina marrón); (3) amplificación inicial con complejo estreptavidina-biotina (streptavidin-biotin, SAB) y posteriormente con polímeros (factor 5-20x superior al complejo SAB).

<sup>c</sup> Tras la primera ronda de captura de imagen, etiquetado fluorescente indirecto y captura de imagen digital, se requiere la inactivación/eliminación del colorante con una captura posterior de imagen digital de fondo/autofluorescencia. El procedimiento se puede repetir en el mismo corte con diferentes anticuerpos primarios. La imagen anterior a la incubación del anticuerpo primario (con autofluorescencia) se sustrae de la imagen posterior al etiquetado. Se pueden proyectar (superponer) marcadores únicos o múltiples en el mismo corte.

<sup>d</sup> Cada anticuerpo primario se conjuga con un código de barras único (ADN). Se incuban varios anticuerpos primarios a la vez. Las etiquetas con fluoróforo y cadena complementaria a un código de barras se unen al anticuerpo primario con un máximo de 3 fluoróforos a la vez (en la representación esquemática se muestran 2 fluoróforos diferentes). Tras la imagenología y la eliminación de las etiquetas de fluoróforo y la captura de imágenes, se puede incubar un siguiente conjunto (normalmente hasta 3) de etiquetas complementarias únicas (cada una con un fluoróforo diferente). Este procedimiento se puede repetir. Todos los marcadores se pueden examinar individualmente o cualquier combinación superpuesta en el corte.

<sup>e</sup> Con etiquetas de oligonucleótidos únicas y anticuerpos marcados con enlaces fotoescindibles con unión de alta afinidad sobre un epítipo en el corte histológico, una región de interés puede recibir selectivamente la luz, provocando la liberación de oligonucleótidos fotoescindibles, que luego se extraen y se utilizan para la lectura con, por ejemplo, secuenciación de nueva generación, citometría de flujo o espectrometría de masas. La lectura se puede superponer digitalmente a la imagen digital del corte histológico.<sup>4</sup>

<sup>f</sup> Los filtros implican 1 filtro antes de que la luz pase por el tejido/células y 1 entre el tejido y el ojo/cámara. El primero bloquea la luz de mayor longitud de onda, y el segundo la de menor longitud de onda. Solo la luz con una longitud de onda emitida pasará el segundo filtro.

<sup>g</sup> Para la representación gráfica, los epítopos se muestran en forma de triángulo. *In vivo*, la característica esencial es una estructura tridimensional (3-D), donde el dominio variable del anticuerpo se une estereológicamente con alta afinidad. Los distintos epítopos tienen estructuras 3-D diferentes.

En todos los enfoques digitales, es necesario determinar la región de interés (que también puede ser una célula). Para ello será necesario segmentar la región/objeto. Para ello, es necesario que el número de píxeles de la cámara con dispositivo de carga acoplado (charge-coupled device, CCD) coincida con la resolución de la lente del objetivo del microscopio. Para mantener baja la tasa de error de la segmentación es necesario utilizar cámaras CCD de alta calidad.

### *Microscopía de fluorescencia*

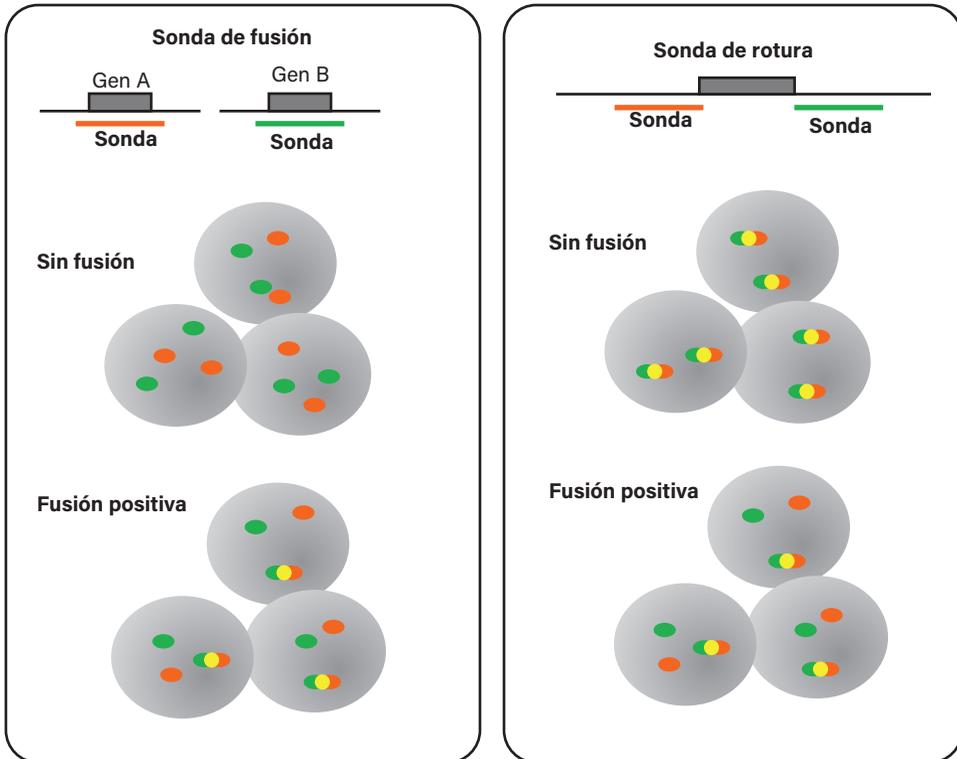
Con el etiquetado por fluorescencia (inmunofluorescencia) se consigue una mayor sensibilidad que con un sustrato de absorción. Esto implica que la microscopía de fluorescencia puede ser necesaria para detectar señales con una menor concentración de epítomos.<sup>3</sup> Para visualizar imágenes fluorescentes se utilizan 2 filtros. El primero se coloca antes de que la luz llegue al corte tisular y permite el paso de la luz a una longitud de onda relativamente baja pero, bloquea la luz a una longitud de onda mayor. En el corte, la luz alcanzará el colorante fluorescente y provocará la excitación del mismo a una longitud de onda mayor. El segundo filtro bloquea la luz de longitud de onda menor y deja pasar la luz de longitud de onda mayor. Para capturar una imagen digital se puede utilizar un sistema de cámara en lugar de los ojos. Cuando se utilizan múltiples fluoróforos, la longitud de onda que pasará a través de estos filtros se puede reducir (con filtros de paso de banda), donde 1 de los fluoróforos se excita a una longitud de onda menor y el otro emite una longitud de onda esencialmente mayor después de la excitación. Aunque la inmunofluorescencia es una técnica muy sensible para la detección de proteínas, actualmente no se utiliza en la práctica clínica habitual para el cáncer de pulmón.

### **IHQ específica de mutación**

Dado que una mutación patogénica adquirida del *EGFR* dará lugar a un cambio en la estructura tridimensional de la proteína, puede estar presente un epítomo que sea único para esta mutación y que difiera de la proteína de tipo salvaje. Además, algunas mutaciones del *EGFR* se producen con gran frecuencia, especialmente la L858R en el exón 21 y las deleciones en el exón 19. Esto ha conducido al desarrollo de anticuerpos específicos contra las mutaciones del *EGFR*.<sup>9-13</sup> Estos pueden aplicarse en casos de muestras de tamaño limitado inadecuadas para las pruebas basadas en el ADN. Una reacción IHQ positiva está probablemente asociada a la mutación. Sin embargo, los anticuerpos pueden tener reacciones cruzadas con las mutaciones de inserción en el exón 20 del *EGFR* que son insensibles para los inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) del *EGFR* de primera generación, y la tasa de detección de las deleciones del exón 19 puede variar. Las inserciones del exón 20, A769 inserción ASV y D770 inserción SVD, fueron positivas para los anticuerpos en 1 estudio,<sup>10</sup> y es posible que no se detecte la deleción del exón 19, distinta de la deleción de 5 aminoácidos (ELREA).<sup>11</sup> Es importante destacar que una tinción negativa no excluye la presencia de una mutación del *EGFR* clínicamente susceptible a una intervención preventiva.

También se han desarrollado anticuerpos específicos contra la mutación BRAF V600E<sup>14,15</sup> y son muy sensibles. A diferencia de los anticuerpos específicos de la mutación *EGFR*, la IHQ específica de la mutación BRAF V600E no presenta reacciones cruzadas con las mutaciones que no sean V600E.<sup>16</sup>

La alta sensibilidad con anticuerpos específicos de mutaciones sugiere que este enfoque de IHQ se puede utilizar como herramienta de cribado para sus respectivas mutaciones específicas. No obstante, en los casos IHQ negativos, sigue siendo posible la presencia de otras mutaciones en el mismo gen con posibles mutaciones susceptibles a una intervención preventiva. Además, puede estar justificada la confirmación mediante una prueba molecular.



**Figura 5-2.** Hibridación fluorescente *in situ* utilizando sondas de fusión y sondas de rotura para la detección de translocación.

### IHQ para detección o cribado de reordenamientos genéticos

Las pruebas predictivas de IHQ con anticuerpos de tipo salvaje, como para la proteína ALK, son muy sensibles y específicas para las alteraciones del *ALK*, ya que la proteína ALK no se expresa en el tejido pulmonar normal.<sup>17-19</sup> En cambio, la IHQ para *ROS1* y *NTRK* tiene una especificidad menor, por lo que se requiere una técnica ortogonal (por ejemplo, FISH o NGS) para demostrar la presencia de un reordenamiento.<sup>20,21</sup> Mientras que la sensibilidad de la IHQ para *ROS1* es alta, lo que la hace adecuada para el cribado, la sensibilidad de la IHQ para *NTRK* es de aproximadamente el 80 %, <sup>22,23</sup> lo que implica que se pueden detectar la mayoría de las fusiones del *NTRK*, pero no todas.

### Hibridación fluorescente *in situ*

Se han desarrollado pruebas FISH para detectar una serie de alteraciones genómicas que incluyen amplificaciones, reordenamientos/traslocaciones, ganancias y pérdidas de cromosomas enteros o de regiones cromosómicas específicas. Para la FISH se utilizan varias sondas básicas, entre ellas las sondas de enumeración cromosómica (chromosome enumeration probes, CEP) y las sondas de identificación específica de gen/locus (gene/locus-specific identification probes, LSI). Las CEP se utilizan a menudo para distinguir la polisomía de la verdadera amplificación genética, ya que las CEP reflejan el número de cromosomas.

### **Detección de reordenamientos**

Se han diseñado dos tipos de sondas FISH para detectar reordenamientos cromosómicos: de fusión y de rotura (figura 5-2). Los conjuntos de sondas de fusión consisten en sondas marcadas diferencialmente para 2 loci distintos, en los que los 2 genes fusionados no están normalmente situados cerca el uno del otro. Se pueden producir señales falsas positivas en células en las que las 2 sondas se encuentren cerca la una de la otra. Por lo tanto, cada laboratorio debe probar los casos de control negativo y desarrollar criterios de corte para el porcentaje de núcleos que contienen un patrón de fusión. Las sondas de rotura consisten en 2 sondas marcadas diferencialmente que hibridan con el mismo gen, pero son específicas para regiones que se encuentran en lados opuestos del punto de rotura de la translocación. Esta estrategia de rotura es especialmente valiosa para detectar las translocaciones que afectan a los denominados genes promiscuos (es decir, el *ALK*), en los que se pueden producir fusiones con múltiples genes compañeros. Se suele definir una distancia entre las 2 señales y un porcentaje mínimo (15 % para el *ALK*) de núcleos que muestran las señales separadas para diagnosticar la presencia de una translocación genética.<sup>24</sup>

### **Detección de la amplificación genética**

Las pruebas para la amplificación genética emplean una sonda específica para el gen diana de interés y a menudo se combinan con una sonda marcada diferencialmente para el centrómero correspondiente. Se observan múltiples señales del gen diana en el entorno de la amplificación y, al calcular la relación entre las señales del gen diana y las del centrómero, se pueden distinguir incluso niveles bajos de amplificación de la polisomía para todo el cromosoma.

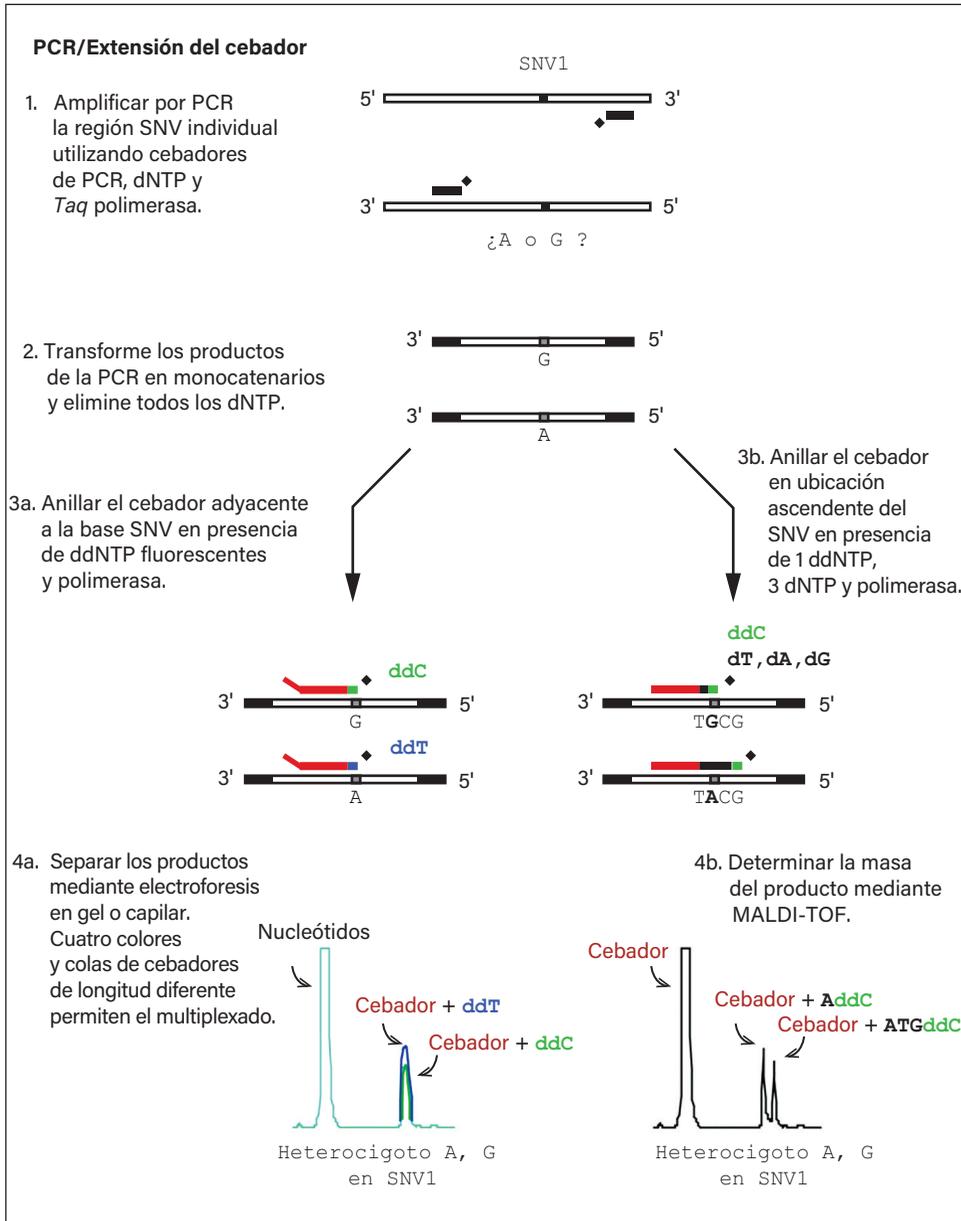
### **Muestras para el análisis FISH**

Un análisis satisfactorio de muestras de tejido o citología utilizando cualquier protocolo FISH requiere una fijación adecuada y, en el caso de los bloques de parafina de archivo, condiciones de almacenamiento.<sup>25,26</sup> Los tejidos procesados en soluciones ácidas fuertes no son adecuados para la prueba FISH, mientras que una descalcificación leve con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido fórmico no suele afectar al rendimiento de la prueba. Se deben seguir las recomendaciones sobre los pasos preanalíticos descritas en las pautas de práctica de patología del *College of American Pathologists* (CAP), la *Association for Molecular Pathology* (AMP), la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) y otras.<sup>27,28</sup> El TAT se determina mediante diferentes protocolos de FISH. En general, los protocolos sencillos y automatizados son mejores que los manuales. Casi siempre, los pasos básicos son similares a los de la IHQ, es decir, una prueba de 2 días que requiere aproximadamente de 3 a 4 horas el primer día y 30 minutos el segundo. Dependiendo del flujo de trabajo del laboratorio, puede ser necesario un día adicional para la interpretación.

### **Selección de pruebas FISH**

Aunque actualmente se comercializan pruebas FISH aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA), algunos laboratorios pueden optar por desarrollar sus propias sondas “caseras”, que suelen ser más rentables. Los vectores de clonación, como los cromosomas artificiales bacterianos, son excelentes fuentes de sondas FISH caseras. Es esencial verificar que se obtuvo el clon correcto,

ya sea cribando la secuencia de ADN de interés mediante PCR o realizando FISH en metafase. Tanto si se utiliza la prueba comercial aprobada por la FDA como si no, se debe caracterizar en detalle el conjunto de sondas utilizado para las pruebas clínicas, y los valores de corte deben mostrar un rendimiento reproducible con controles normales y muestras de pacientes y/o líneas celulares anormales conocidas para obtener resultados exactos y precisos.<sup>27</sup> La especificidad y la sensibilidad deben ser equivalentes a las de su contraparte comercial. En el caso de los laboratorios que opten por utilizar sondas desarrolladas en el laboratorio, también



**Figura 5-3.** Esquema generalizado de la prueba de extensión de nucleótido único.<sup>31</sup> Abreviaturas: dNTP = desoxinucleótido trifosfato; ddNTP = didesoxinucleótido trifosfato MALDI-TOF = desorción/ionización por láser asistida por matriz con tiempo de vuelo [espectrometría de masas]; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; SNV = variante de nucleótido único.

se debe prestar atención a la variabilidad de los lotes de los clones, las enzimas de etiquetado del ADN y otros reactivos.<sup>27</sup>

## **PCR, RT-PCR y ddPCR**

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

La PCR es un método de amplificación del ADN utilizado habitualmente para detectar mutaciones de tipo SNV/indel. Debido a la cantidad extremadamente pequeña de ADN que queda en los tejidos biopsiados para los análisis directos, el ADN tisular se debe amplificar mediante PCR. Además, las mutaciones oncogénicas, como las del *EGFR*, se producen en 1 de los 2 alelos, y las muestras clínicas contienen sistemáticamente una mezcla de tejidos no neoplásicos; por lo tanto, se han desarrollado diversos enfoques para detectar alelos mutantes y se han establecido como pruebas clínicamente viables. Las siguientes pruebas se utilizan habitualmente y están aprobadas para la detección de mutaciones del *EGFR*.

### *Pruebas de PCR en tiempo real específicas de alelo*

La prueba clave de PCR en tiempo real específica de alelo es una sonda que complementa la secuencia mutada e identifica el alelo mutante con una técnica particular. Therascreen (Qiagen) utiliza una sonda Scorpion,<sup>29</sup> mientras que las mutaciones se detectan por desplazamiento y escisión del colorante reportador y las sondas marcadas con extintor en función de la actividad exonucleasa 5'-3' cuando se hibridan con la secuencia complementaria en el sistema Cobas (Roche Diagnostics). Amoy Diagnostics (AmoyDx) utiliza una sonda TaqMan, cuyo sistema de detección es similar al Cobas utilizando la Taq polimerasa. En estos sistemas, las señales mutantes se pueden detectar como niveles fluorescentes aumentados.

### *Pruebas de extensión de cebador monobásico*

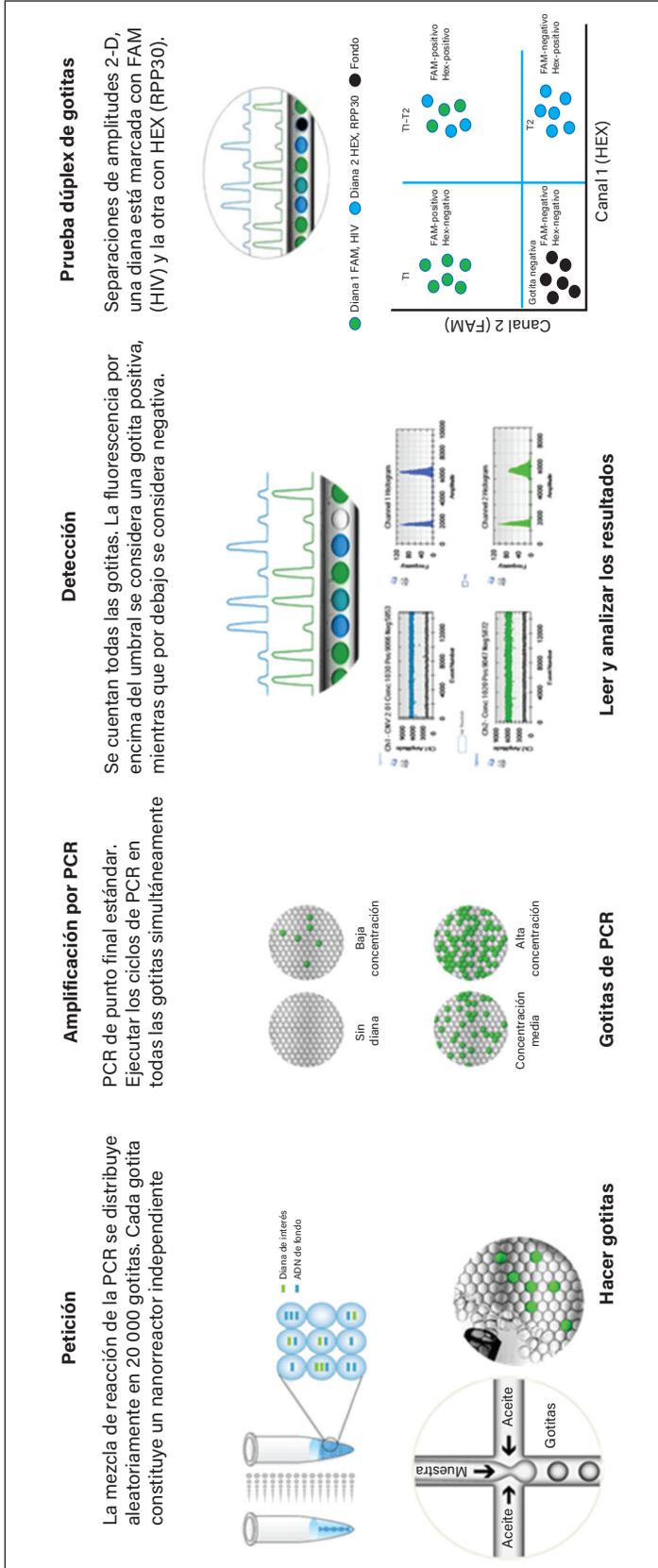
En las pruebas de extensión de cebador monobásico, las regiones diana, incluidos los sitios de mutación, se amplifican mediante PCR. Se anilla la sonda adyacente al sitio de mutación y se realiza una extensión monobásica utilizando un didesoxinucleósido distinguible. La diferencia de alelos mutados y de tipo salvaje en bases incorporadas se detecta mediante colorante fluorescente (SNaPshot [ThermoFisher Scientific]) o espectrometría de masas (MassArray [Agena Bioscience]) (figura 5-3).

### **Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa**

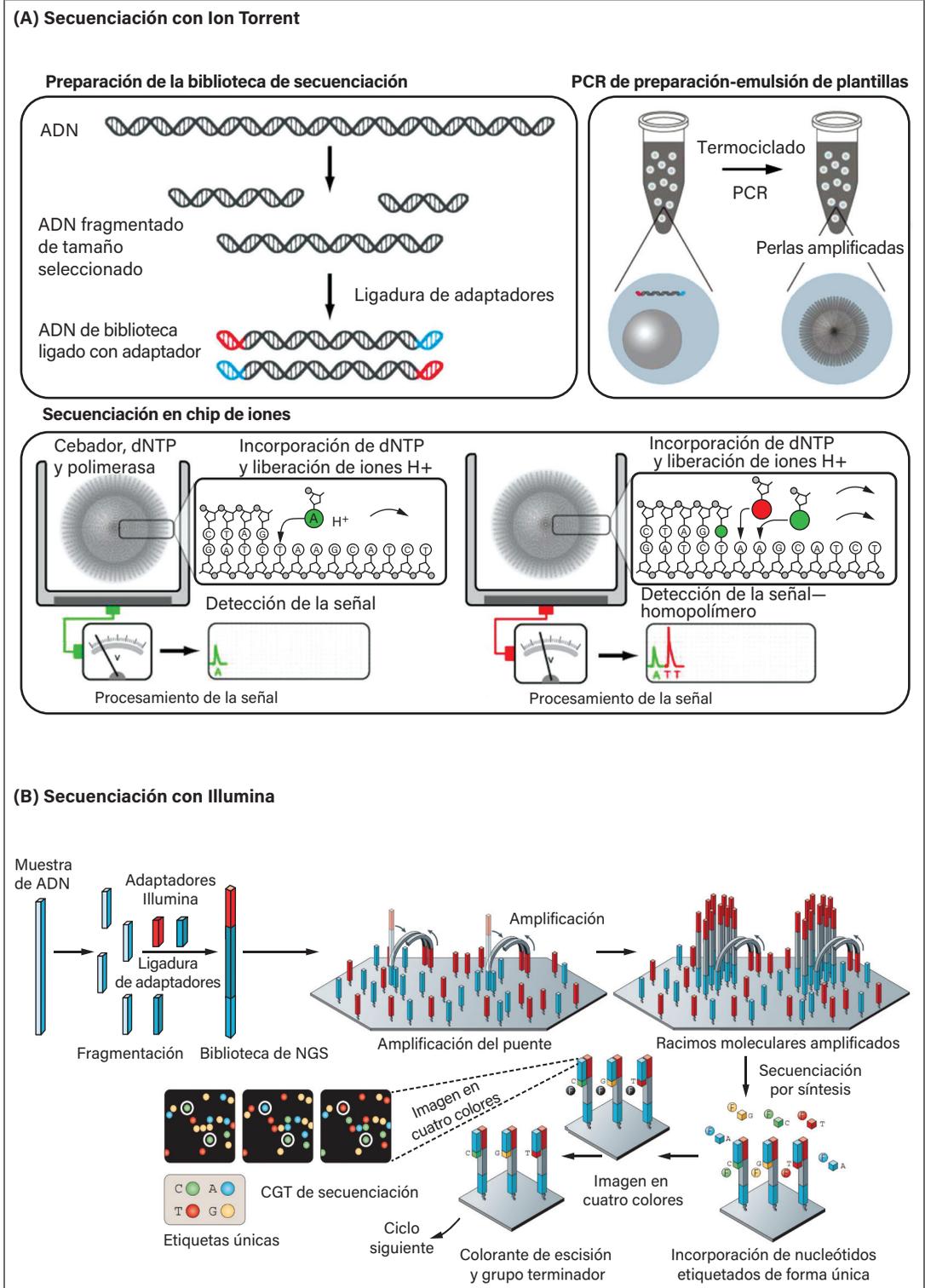
La RT-PCR se utiliza habitualmente para detectar genes de fusión, que son difíciles de detectar mediante PCR de ADN debido a las largas secuencias de intrones. Para cubrir varios patrones de fusión, se suele realizar una PCR multiplex con múltiples conjuntos de cebadores. Por ejemplo, se han desarrollado 6 conjuntos de cebadores para la PCR multiplex para cubrir diferentes fusiones *EML4-ALK*.<sup>30</sup>

### **Reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas**

Con la PCR digital en gotas (droplet digital PCR, ddPCR), el ADN de la muestra experimenta una dilución limitante en compartimentos de pequeño volumen. Lo óptimo es que cada compartimento contenga una única molécula diana. La amplificación positiva con PCR en el compartimento indica la presencia de moléculas diana. Basándose en la distribución de



**Figura 5-4.** Flujo de trabajo de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas (ddPCR) utilizando el sistema Bio-Rad ddPCR.<sup>33</sup>



**Figura 5-5.** Plataformas de secuenciación de **(A)** ThermoFisher Scientific Ion Torrent y **(B)** el sistema Illumina.<sup>38</sup> Abreviaturas: dNTP = desoxinucleótido trifosfato; NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

la presencia o ausencia en unidades de microrreacción, el número de copias/densidad de la molécula diana se estima con la distribución de Poisson (PCR digital).<sup>31</sup> Para crear unidades de microrreacción, la tecnología de gotas de emulsión de agua-aceite proporciona una prueba de alto rendimiento y rentable para la ddPCR. Dado que la ddPCR es ventajosa por su alta sensibilidad y su cuantificación precisa, es una técnica preferida para el análisis del ADN tumoral circulante a partir de biopsia líquida (figura 5-4).

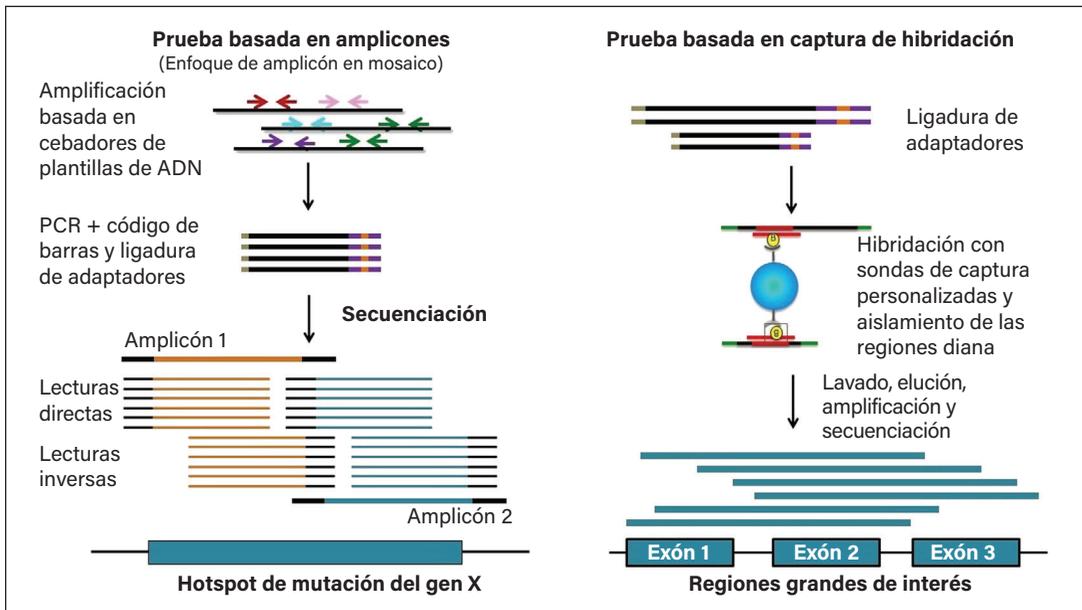
## Secuenciación de nueva generación

### Principios básicos

La NGS ofrece un enfoque de secuenciación paralela de alto rendimiento para caracterizar el panorama molecular de un tumor.

### Secuenciación dirigida del genoma completo/secuenciación del exoma completo

Mientras que la secuenciación del genoma completo (whole genome sequencing, WGS)/ secuenciación del exoma completo (whole exome sequencing, WES) se aplica con frecuencia en grandes cohortes tumorales para descubrir y caracterizar nuevos conductores y biomarcadores de la enfermedad,<sup>34</sup> la secuenciación NGS dirigida se utiliza más comúnmente en la práctica clínica. El principio de secuenciación por síntesis es el núcleo de la tecnología.<sup>35</sup> En pocas palabras, los fragmentos de ADN aislados de una muestra tumoral se fijan a una matriz y se secuencian en paralelo sintetizando secuencialmente los fragmentos complementarios inversos (lecturas). Los instrumentos de NGS pueden realizar este proceso de forma masivamente paralela permitiendo la secuenciación de hasta 10 000 millones de lecturas en 1 día.



**Figura 5-6.** Comparación entre las pruebas basadas en amplicones y las basadas en captura híbrida. Abreviatura: PCR = reacción en cadena de la polimerasa. (Fuente: Jennings *et al* 2017.<sup>39</sup>)

### *Tecnología de secuenciación*

Existen 2 grandes plataformas que se basan en principios diferentes para la secuenciación en paralelo (figura 5-5). En el sistema Ion Torrent PGM (ThermoFisher Scientific), los fragmentos de ADN con secuencias adaptadoras específicas se diluyen hasta una sola molécula del fragmento y se realiza una PCR en emulsión, lo que da lugar a productos amplificados que se unen en la superficie de las perlas (figura 5-5A). A continuación, las perlas se cargan en pozos sensores de protones y, a medida que se procede a la secuenciación, se incorpora secuencialmente un desoxinucleótido trifosfato (deoxynucleotide triphosphate, dNTP) de los sitios adaptadores, con protones liberadores. Las diferencias en el número de protones liberadores según los nucleótidos incorporados se convierten en secuencias de nucleótidos. Con este secuenciador semiconductor se generan algo menos de datos por corrida, pero los tiempos de operación son más cortos con lecturas más largas (~400 pares de bases).

En cambio, el sistema Illumina HiSeq utiliza un método diferente, con 2 pasos: PCR puente y posterior secuenciación por síntesis (figura 5-5B). Tras la ligación final de 2 secuencias adaptadoras diferentes, el ADN diana desnaturalizado se hibrida con las secuencias adaptadoras de los extremos 5' y 3' prefijadas en la celda de flujo (formación del puente). En este estado, la ADN polimerasa realiza una reacción de elongación del ADN y desnaturaliza el ADN dando lugar a 2 fragmentos de ADN monocatenario. Posteriormente, repitiendo las reacciones de unión en puente, elongación y desnaturalización, se puede amplificar localmente un gran número de fragmentos de ADN monocatenario y fijarlos como racimos en la celda de flujo (PCR en puente). Para la secuenciación, la ADN polimerasa realiza una elongación monobásica del extremo 3' bloqueando los dNTP fluorescentes. A continuación, el colorante fluorescente unido a la base se excita mediante un rayo láser y la emisión se registra en forma de fotografía. Se toman cuatro fotografías (A, C, G, T) para determinar las 4 bases diferentes en racimos individuales. Este proceso se repite hasta secuenciar toda la longitud.

Una decisión clave a la hora de aplicar la NGS a una muestra tumoral es la selección de las regiones diana para la secuenciación. Las pruebas NGS dirigidas típicas se centran en 100 a 500 genes con relevancia para el cáncer. Por el contrario, las pruebas que secuencian todos los genes humanos o el genoma completo suelen denominarse WES y WGS, respectivamente.<sup>36</sup> Existe un claro equilibrio entre las pruebas dirigidas y las amplias (WES/WGS). Una prueba dirigida suele proporcionar una mayor profundidad de secuenciación y sensibilidad para detectar mutaciones en genes seleccionados. Por el contrario, las WES/WGS tienen una menor profundidad de secuenciación, pero un mayor potencial para descubrir nuevas mutaciones de biomarcadores y variantes estructurales. Estas pruebas amplias también suelen requerir más datos de secuenciación, tienen mayores requisitos computacionales y TAT más largos, lo que a menudo conlleva costos más elevados en comparación con las pruebas dirigidas.<sup>37</sup>

### *Captura basada en amplicones y captura híbrida*

Al realizar la secuenciación dirigida, otro punto de decisión clave es la tecnología utilizada para seleccionar y enriquecer los fragmentos de ADN en los genes de interés. Dos técnicas comúnmente utilizadas son la secuenciación por amplicones y la captura híbrida (figura 5-6),<sup>36</sup> ambas soportadas por la mayoría de las plataformas (por ejemplo, AmpliSeq Focus Panel y TruSight Oncology 500 como tecnologías de enriquecimiento de amplicones y captura en la plataforma Illumina, respectivamente).



La captura híbrida utiliza sondas de ADN complementario para unir y capturar fragmentos de ADN de los genes seleccionados. La secuenciación por amplicones selecciona y enriquece los fragmentos de ADN de los genes de interés utilizando cebadores y amplificación por PCR multiplexada. La secuenciación por amplicones es potencialmente ventajosa porque puede trabajar a partir de menores cantidades de ADN de entrada; sin embargo, sigue asociada al riesgo de introducir sesgos específicos de alelos en los datos procedentes de la amplificación por PCR. Además, la secuenciación por amplicones impone un límite al número de genes/regiones que se pueden secuenciar, lo que suele restringirla a pequeños paneles de genes o regiones *hotspot*. Por el contrario, la captura híbrida no tiene ese límite y puede ampliarse a todo el exoma.<sup>37</sup> Además, la selección de fragmentos de ADN basada en sondas con la captura híbrida también es más adecuada para la detección de proteínas de fusión.<sup>36</sup>

### *Contenido de células tumorales*

El contenido de células tumorales (también conocido como *celularidad tumoral* o *pureza tumoral*) de la muestra es una consideración clave para realizar la NGS. Algunas muestras tumorales pueden tener un bajo número y una baja proporción de células tumorales debido a la mezcla de tejido no neoplásico, como células estromales e inmunocitos. El ADN de las células no tumorales diluirá las señales de mutación e influirá negativamente en el proceso de detección de mutaciones somáticas con la NGS, lo que se traducirá en una sensibilidad reducida de la detección de mutaciones y variaciones del número de copias en muestras con bajo contenido de células tumorales.<sup>36</sup> Este problema se puede paliar parcialmente realizando una secuenciación más profunda; sin embargo, cuando sea factible, dar prioridad a las muestras con alto contenido de células tumorales para el análisis con NGS puede ser una estrategia más rentable.<sup>37</sup> Como valor estándar, la mayoría de los paneles de NGS están diseñados para un contenido de células tumorales del 20 % o más.

### *Estimación de la carga mutacional tumoral*

La carga mutacional tumoral (tumor mutational burden, TMB) ha surgido como un biomarcador de respuesta a la inhibición de puntos de control inmunitarios<sup>40</sup> y se puede evaluar utilizando la misma prueba empleada para identificar alteraciones genéticas susceptibles de responder al tratamiento. La TMB se define como el número de mutaciones somáticas por megabase de secuencia genómica interrogada, y la NGS permite la detección paralela y sin sesgos de mutaciones somáticas en un gran número de genes, lo que posibilita la estimación cuantitativa de la TMB en una muestra. Sin embargo, si el panel genético de la NGS es demasiado pequeño, puede que la TMB no se estime de forma fiable.<sup>40</sup> Además, dado que el contenido de células tumorales puede afectar a la sensibilidad de detección de mutaciones de la prueba NGS, la celularidad tumoral también se debe considerar como una posible variable de confusión para la estimación de la TMB.<sup>41</sup>

### **Pruebas de panel disponibles comercialmente**

En la tabla 5-2 se muestran las pruebas de panel disponibles comercialmente actuales y de uso común. Los paneles individuales se caracterizan por los siguientes factores.

### *Nucleótido diana (basado en ADN, en ARN o en ambos)*

Debido a que el ADN es más estable que el ARN, los paneles basados en ADN se han establecido por delante de los paneles basados en ARN. Sin embargo, existen algunas limitaciones con los paneles de ADN.<sup>42</sup> El reordenamiento de genes particulares con intrones grandes y/o repetitivos o deleciones, como *NTRK*, puede no detectarse con el análisis basado en ADN. Por lo tanto, se pueden utilizar otros enfoques como los paneles híbridos de ADN/ARN o las pruebas de panel secuenciales (secuenciación de panel de ARN si se obtienen resultados negativos en el panel de ADN).

### *Método de enriquecimiento (captura híbrida en comparación con amplicones)*

Los tejidos de biopsia pequeños o la necesidad de un TAT rápido se pueden beneficiar de la secuenciación por amplicones, mientras que el análisis genómico integral mediante secuenciación por captura híbrida permite evaluar otras alteraciones para posibles ensayos clínicos.

### *Cobertura genética*

Según la naturaleza de un panel dirigido, la cobertura genética de los paneles no es idéntica, incluso después de incorporar alteraciones importantes. Además, el rendimiento de la detección de indel más grandes, incluso con 12 pares de bases o más, es diferente entre paneles debido a la elección de las herramientas bioinformáticas.

### *Entrada de ADN/ARN necesaria*

Las pruebas individuales requieren diferentes entradas de ADN/ARN. Incluso utilizando tejido del tamaño recomendado, los rendimientos del ADN/ARN extraído pueden diferir, posiblemente relacionados con factores como la fijación del tejido y el almacenamiento de bloques y cortes sin teñir. En particular, las muestras descalcificadas, los tejidos fijados de forma inadecuada y los bloques envejecidos ( $\geq 5$  años) pueden tener rendimientos inferiores en comparación con las muestras FFPE estándar.

## **Conclusión**

Este capítulo ha proporcionado una amplia descripción general de las diversas tecnologías disponibles actualmente para la detección clínica de biomarcadores moleculares en el cáncer de pulmón, incluidas sus ventajas y desventajas y su capacidad para identificar diversas variantes genéticas y cambios proteicos. Puesto que no existe una única tecnología adecuada para todos los biomarcadores y dados los rápidos avances en este campo, la comprensión de las tecnologías actuales y emergentes es esencial para ofrecer una atención clínica óptima y eficaz a los pacientes con cáncer de pulmón.

## **Referencias**

1. Supek F, Miñana B, Valcárcel J, Gabaldón T, Lehner B. Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell*. 2014;156(6):1324-1335. doi:10.1016/j.cell.2014.01.051.
2. Yatabe Y, Borczuk AC, Cooper WA, et al, eds. *IASLC Atlas of Diagnostic Immunohistochemistry*. International Association for the Study of Lung Cancer;2020.

3. Prinsen CF, Klaassen CH, Thunnissen FB. Microarray as a model for quantitative visualization chemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003;11(2):168-173. doi:10.1097/00129039-200306000-00014.
4. Merritt CR, Ong GT, Church SE, et al. Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue. *Nat Biotechnol*. 2020;38:586-599.
5. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(11):1432-1443. doi:10.5858/arpa.2013-0610-CP.
6. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 immunohistochemistry comparability study in real-life clinical samples: results of blueprint phase 2 project. *J Thorac Oncol*. 2018;13(9):1302-1311. doi:10.1016/j.jtho.2018.05.013.
7. Dodson A, Parry S, Lissenberg-Witte B, et al. External quality assessment demonstrates that PD-L1 22C3 and SP263 assays are systematically different. *J Pathol Clin Res*. 2020;6(2):138-145. doi:10.1002/cjp2.153.
8. Thunnissen E. How to validate predictive immunohistochemistry testing in pathology? A practical approach exploiting the heterogeneity of programmed death ligand-1 present in non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(1):11-12. doi:10.5858/arpa.2018-0410-ED.
9. Kawahara A, Yamamoto C, Nakashima K, et al. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis. *Clin Cancer Res*. 2010;16(12):3163-3170. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3239.
10. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3349-3355. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0129.
11. Simonetti S, Molina MA, Queralt C, et al. Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med*. 2010;8:135. doi:10.1186/1479-5876-8-135.
12. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn*. 2010;12(2):169-176. doi:10.2353/jmol dx.2010.090140.
13. Jiang G, Fan C, Zhang X, et al. Ascertain an appropriate diagnostic algorithm using EGFR mutation-specific antibodies to detect EGFR status in non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e59183. doi:10.1371/journal.pone.0059183.
14. Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, et al. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2013;82(1):51-54. doi:10.1016/j.lungcan.2013.06.014.
15. Ilie M, Long E, Hofman V, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAFV600E mutation in primary lung adenocarcinoma Caucasian patients. *Ann Oncol*. 2013;24(3):742-748.
16. Seto K, Haneda M, Masago K, et al. Negative reactions of BRAF mutation-specific immunohistochemistry to non-V600E mutations of BRAF. *Pathol Int*. 2020;70(5):253-261. doi:10.1111/pin.12903.
17. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology [published correction appears in *J Thorac Oncol*. 2013;8(10):1343]. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-859. doi:10.1097/JTO.0b013e318290868f.
18. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346. doi:10.5858/arpa.2017-0388-CP.
19. Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E, et al. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1255-1263. doi:10.1097/JTO.0000000000000239.

20. Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al. Immunohistochemistry of pulmonary biomarkers: a perspective from members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(3):408-419. doi:10.5858/arpa.2017-0106-SA.
21. Penault-Llorca F, Rudzinski ER, Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol.* 2019;72(7):460-467. doi:10.1136/jclinpath-2018-205679.
22. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* 2019;32(1):147-153. doi:10.1038/s41379-018-0118-3.
23. Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, Aisner DL. Detection of tumor NTRK gene fusions to identify patients who may benefit from tyrosine kinase (TRK) inhibitor therapy. *J Mol Diagn.* 2019;21(4):553-571. doi:10.1016/j.jmoldx.2019.03.008.
24. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the Western population [published correction appears in *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):7110]. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5216-5223. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0802.
25. Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol.* 2004;13(4):197-206. doi:10.1097/01.pdm.0000135286.05198.89.
26. Hunt JL. Molecular pathology in anatomic pathology practice: a review of basic principles. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(2):248-260. doi:10.5858/2008-132-248-MPIAPP.
27. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2018;13(3):323-358. doi:10.1016/j.jtho.2017.12.001.
28. Roy-Chowdhuri S, Dacic S, Ghofrani M, et al. Collection and handling of thoracic small biopsy and cytology specimens for ancillary studies: guideline from the College of American Pathologists in collaboration with the American College of Chest Physicians, Association for Molecular Pathology, American Society of Cytopathology, American Thoracic Society, Pulmonary Pathology Society, Papanicolaou Society of Cytopathology, Society of Interventional Radiology, and Society of Thoracic Radiology. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;10.5858/arpa.2020-0119-CP. doi:10.5858/arpa.2020-0119-CP.
29. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol.* 1999;17(8):804-807. doi:10.1038/11751.
30. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-6624. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1018.
31. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9236-9241. doi:10.1073/pnas.96.16.9236.
32. Kirk BW, Feinsod M, Favis R, Kliman RM, Barany F. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(15):3295-3311. doi:10.1093/nar/gkf466.
33. Chung HK, Hattler JB, Narola J, et al. Development of droplet digital PCR-based assays to quantify HIV proviral and integrated DNA in brain tissues from viremic individuals with encephalitis and virally suppressed aviremic individuals. *Microbiol Spectr.* 2022;10(1):e0085321. doi:10.1128/spectrum.00853-21.
34. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell.* 2013;153(1):17-37. doi:10.1016/j.cell.2013.03.002.
35. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future [published correction appears in *Nature.* 2019;568(7752):E11]. *Nature.* 2017;550(7676):345-353. doi:10.1038/nature24286.
36. Gagan J, Van Allen EM. Next-generation sequencing to guide cancer therapy. *Genome Med.* 2015;7(1):80. doi:10.1186/s13073-015-0203-x.
37. Berger ME, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(6):353-365. doi:10.1038/s41571-018-0002-6.
38. Anandhakumar C, Kizaki S, Bando T, Pandian GN, Sugiyama H. Advancing small-molecule-based chemical biology with next-generation sequencing technologies. *Chembiochem.* 2015;16(1):20-38. doi:10.1002/cbic.201402556.

39. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(3):341-365.
40. Budczies J, Allgäuer M, Litchfield K, et al. Optimizing panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement. *Ann Oncol.* 2019;30(9):1496-1506. doi:10.1093/annonc/mdz205.
41. Anagnostou V, Niknafs N, Marrone K, et al. Multimodal genomic features predict outcome of immune checkpoint blockade in non-small-cell lung cancer. *Nat Cancer.* 2020;1(1):99-111. doi:10.1038/s43018-019-0008-8.
42. Benayed R, Offin M, Mullaney K, et al. High yield of RNA sequencing for targetable kinase fusions in lung adenocarcinomas with no mitogenic driver alteration detected by DNA sequencing and low tumor mutation burden. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4712-4722. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0225.



# Una perspectiva global de las guías sobre pruebas moleculares y sus prácticas

# 6

Por Deepali Jain, Wendy A. Cooper, Lizza E. Hendriks, Fred R. Hirsch, Mehdi Karkouri, Keith M. Kerr, Dongmei Lin, Ming-Sound Tsao y Yasushi Yatabe

En la última década y media, el manejo del cáncer de pulmón, especialmente del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), se ha orientado cada vez más hacia la incorporación de terapias dirigidas.<sup>1,2</sup> Las pruebas moleculares durante o después de los estudios diagnósticos del cáncer de pulmón se han convertido en una herramienta esencial para identificar biomarcadores predictivos para la selección de pacientes para terapias personalizadas.<sup>3,4</sup> La mayoría de estos biomarcadores se detectan mediante técnicas moleculares modernas como la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) o métodos basados en secuenciación, que proporcionan resultados rápidos y precisos. Además, se recomienda encarecidamente que las pruebas genéticas necesarias para apoyar el manejo de los pacientes se realicen en laboratorios que cumplan los estándares nacionales y locales específicos (por ejemplo, las normativas de las Enmiendas para la Mejora de los Laboratorios Clínicos en Estados Unidos). Además, múltiples pautas publicadas por diferentes grupos internacionales (*College of American Pathologists* [CAP], Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón [International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC], *Association for Molecular Pathology* [AMP], *American Society of Clinical Oncology* [ASCO], Sociedad Europea de Oncología Médica [European Society for Medical Oncology, ESMO], *National Comprehensive Cancer Network* [NCCN]) proporcionan recomendaciones detalladas para la selección de pacientes con cáncer de pulmón para pruebas y tratamiento, requisitos de muestras y métodos y plataformas de pruebas moleculares.<sup>3,5-7</sup> El objetivo de este capítulo es proporcionar una descripción general de la implementación de estas y otras guías sobre pruebas moleculares para pacientes con cáncer de pulmón a nivel mundial.

## Desarrollo de guías y guías

En el pasado, la toma de decisiones clínicas dependía en gran medida de la experiencia y la habilidad del médico responsable. Sin embargo, una vez que la medicina basada en la evidencia (evidence-based medicine, EBM) fue propuesta por Guyatt en Canadá en 1991,<sup>8</sup> el concepto se extendió a diversos campos clínicos junto con una creciente concientización social sobre la necesidad de una atención médica de calidad. Las guías de práctica actuales se basan en un informe del Instituto de Medicina (Institute of Medicine, IOM) del 2011, *Clinical Practice Guidelines We Can Trust*,<sup>9</sup> que se deriva del concepto de EBM. Este informe proporciona la definición de una guía de práctica, así como de algunos métodos para el desarrollo de guías. La valoración, desarrollo y evaluación de la clasificación de las recomendaciones (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*, GRADE) es el sistema más utilizado en el mundo.<sup>10</sup> Las pautas para la toma de decisiones (GuideLines Into Decision Support, GLIDES) es un sistema resultante de un proyecto contratado por la *US Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ) entre 2008 y 2013.<sup>11</sup> Ambos sistemas determinan el nivel de pruebas mediante revisiones sistemáticas. Las recientes guías sobre pruebas moleculares del CAP/IASLC/AMP se han elaborado utilizando este sistema.<sup>12</sup>

## CAP/IASLC/AMP, ASCO y NCCN

Ciertas guías, como las del panel de pruebas moleculares del CAP/IASLC/AMP, se han centrado en la comunidad de laboratorios y facultan al patólogo y/o al especialista en diagnóstico molecular para dirigir el uso de pruebas moleculares que consumen muchos recursos y garantizar una selección de pruebas adecuada a las terapias dirigidas disponibles. La guía original del CAP/IASLC/AMP se publicó en el 2013 y ha servido de modelo para los esfuerzos nacionales e internacionales posteriores.<sup>13</sup> La guía original y su actualización en el 2018 suscitaron el respaldo de la ASCO y sirven como referencias clave para las guías de la NCCN.<sup>5,6,14</sup> Estos documentos divergen en sus recomendaciones de pruebas y tratamiento como resultado de su cronología en relación con el rápido ritmo de aprobaciones de terapias dirigidas en la última década. Las guías del CAP/IASLC/AMP se encuentran actualmente en fase de revisión y se espera una publicación actualizada en el 2024.

## Sociedad Europea de Oncología Médica

La ESMO publica periódicamente guías para el manejo de pacientes con cáncer de pulmón,<sup>7</sup> que incluyen recomendaciones sobre el análisis de una amplia gama de dianas para las que la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) ha aprobado terapias.<sup>7</sup>

La aprobación de la EMA es permisiva pero no garantiza el acceso a los fármacos en cada país. Al menos en el contexto de los sistemas nacionales de salud pública, cada país puede aprobar los fármacos y, en un grado variable, facilitar las pruebas. Así pues, el principal factor determinante que impulsa las pruebas es la disponibilidad de terapias dirigidas pertinentes; esto da lugar a innumerables guías nacionales o incluso regionales que reflejan la variación en la práctica local. Las dianas recomendadas para las pruebas no son coherentes en todos los países; sin embargo, *EGFR*, *ALK*, *ROS1* y PD-L1 se recomiendan en todas las guías y *BRAF* y *NTRK* en la mayoría, pero las pruebas de *KRAS*, *MET*, *RET* y *ERBB2* (*HER2*) no se abordan en muchas.<sup>15</sup> La realización de las pruebas depende entonces del acceso a las instalaciones de laboratorio y de los acuerdos para el reintegro de las pruebas.<sup>15</sup> Aunque la

**Tabla 6-1.** Resumen de las guías de Estados Unidos y Europa

Guía	Población	Diana	Método de prueba <sup>a</sup>
CAP/IASLC/AMP del 2018	Pacientes recién diagnosticados	<i>EGFR</i>	PCR/NGS
		<i>ALK</i>	IHQ ± FISH
		<i>ROS1</i>	IHQ (cribado) y FISH/PCR/NGS
		<i>RET, MET, ERBB2 (HER2), KRAS, BRAF</i>	Parte del panel multiplex de NGS; ya sea inicialmente o cuando las pruebas para <i>EGFR, ALK</i> o <i>ROS1</i> sean negativas
	Pacientes con recidiva que reciben terapias dirigidas	T790M del <i>EGFR</i> (cfADN/ADN tisular)	Sensibilidad analítica del 5 % (basada en PCR/NGS)
ESMO del 2023 <sup>b</sup>	Pacientes recién diagnosticados	<i>EGFR</i>	Cualquier método validado para cubrir mutaciones en el exón 18-21 (preferiblemente NGS de ADN)
		<i>ALK</i>	NGS de ARN; IHQ ± confirmación molecular (NGS, FISH)
		<i>ROS1</i>	NGS de ARN; cribado con IHQ, esencial la confirmación molecular (NGS, FISH)
		<i>RET, MET, NTRK, ERBB2 (HER2), KRAS, BRAF</i>	Prueba con panel de NGS de ADN/ARN
		PD-L1	IHQ
		T790M del <i>EGFR, MET</i> (según sea adecuado) (cfADN/ADN tisular)	PCR/NGS/ISH
	Pacientes con recidiva que reciben terapias dirigidas	<i>EGFR</i> (categoría 1)	Perfil molecular amplio (NGS) <sup>c</sup>
NCCN del 2022	Pacientes recién diagnosticados	<i>ALK</i> (categoría 1)	Perfil molecular amplio (NGS)
		<i>KRAS, ROS1, BRAF, NTRK1/2/3</i> , omisión del exón 14 de <i>MET, RET</i>	
		PD-L1	IHQ
		Pacientes con recidiva que reciben terapias dirigidas	T790M del <i>EGFR</i> y otras mutaciones de resistencia genómica (cfADN/ADN tisular)

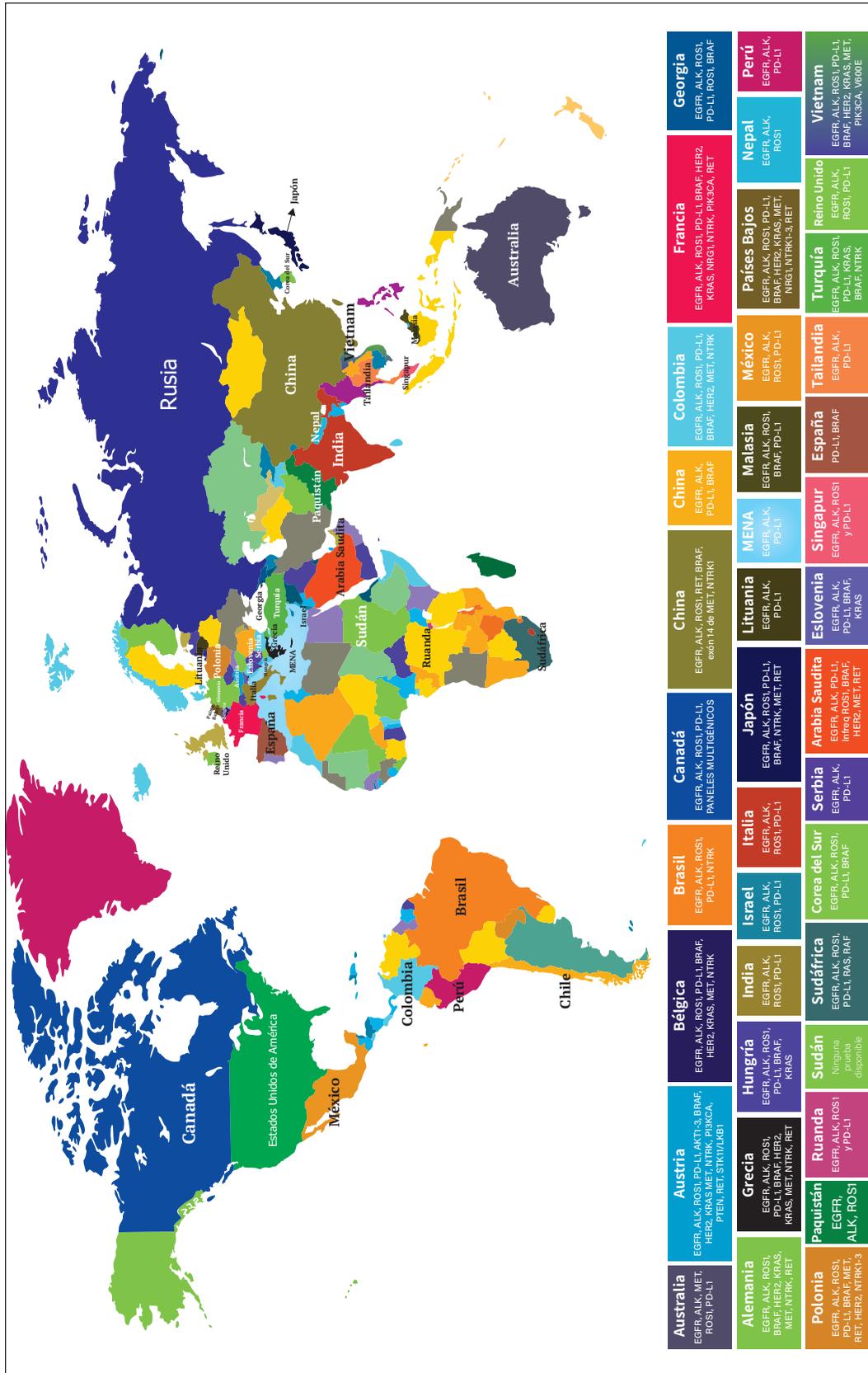
Abreviaturas: AMP = *Association for Molecular Pathology*; ASCO = *American Society of Clinical Oncology*; CAP = *College of American Pathologists*; cfADN = ADN libre de células; ESMO = *Sociedad Europea de Oncología Médica*; FISH = hibridación fluorescente *in situ*; IASLC = *International Association for the Study of Lung Cancer*; IHQ = inmunohistoquímica; ISH = hibridación *in situ*; NCCN = *National Comprehensive Cancer Network*; NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>a</sup>Se prefieren los paneles de secuenciación multiplexados a las pruebas de un solo gen. La ASCO respaldó estas guías además de incluir la de la mutación de *BRAF*.<sup>5</sup>

<sup>b</sup>Guías de la ESMO del 2023.<sup>7</sup>

<sup>c</sup>También se busca detectar biomarcadores emergentes como la amplificación de alto nivel de *MET* y la mutación *ERBB2 (HER2)*.

secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) está incluida como recomendación en las guías de la ESMO y en muchas guías nacionales, el acceso a la NGS está lejos de ser universal.<sup>16</sup> Las iniciativas dentro de la Unión Europea están dirigidas a abordar esta disparidad. Según las guías del 2023 de la ESMO sobre el CPNM metastásico adicto a



**Figura 6-1.** Biomarcadores predictivos probados en diferentes países señalados en un mapa del mundo. Abreviatura: MENA = Oriente Medio y Norte de África. (Datos tomados de la serie *Journal of Thoracic Oncology*.<sup>21</sup>)

oncogenes, los biomarcadores recomendados para las pruebas son *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET*, *MET* (omisión del exón 14 así como amplificación), *NTRK*, mutación *ERBB2 (HER2)*, mutación de inserción en el exón 20 del *EGFR*, y mutación G12C del *KRAS*.<sup>7</sup> En la tabla 6-1 se ofrece un resumen de las guías estadounidenses y europeas.

### **Prácticas de pruebas de biomarcadores específicas para cada región**

La selección de biomarcadores varía según el país en función de sus necesidades específicas y la disponibilidad de recursos. Para muchos países, la implementación de estas prácticas de pruebas de biomarcadores para el cribado molecular con el fin de identificar biomarcadores predictivos supone un desafío debido a las limitaciones operativas y logísticas.<sup>15,17,18</sup> Por lo tanto, la mayoría de los países siguen sus propias prácticas de pruebas de biomarcadores para el cribado molecular del cáncer de pulmón en su región, que no solo incluye países de ingresos bajos o medios, sino también algunas naciones desarrolladas. Cada país tiene sus propias limitaciones, que incluyen el costo de las pruebas moleculares, la disponibilidad de infraestructura para las pruebas, el acceso a los conocimientos técnicos e interpretativos, las políticas gubernamentales relativas al seguro médico y el reembolso, y los requisitos para la aprobación de las pruebas por parte de las autoridades locales. En algunos países, los tratamientos dirigidos no están disponibles o son inaccesibles desde el punto de vista financiero para los pacientes a pesar de la disponibilidad de la prueba molecular.<sup>15,19,20</sup> La figura 6-1 muestra las prácticas de pruebas de biomarcadores en diferentes países. Aunque en la mayoría de los países se realizan las pruebas de *EGFR*, *ALK*, *ROS1* y PD-L1, hay algunos en los que se ofrece *EGFR* o solo *EGFR* y *ALK*. A continuación, se ofrecen algunos ejemplos específicos de cada país.

## **Norteamérica**

### ***Estados Unidos***

En Estados Unidos, las guías de la NCCN son de amplio uso para orientar las decisiones sobre el tratamiento y como punto de referencia para los pagadores (principalmente aseguradoras privadas).<sup>6</sup> Estas guías representan opiniones de expertos basadas en datos clínicos actuales y están muy influidas por las aprobaciones de fármacos por parte de autoridades reguladoras (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos [US Food and Drug Administration, FDA]). Dado que las guías de la NCCN se pueden actualizar varias veces al año para reflejar las nuevas aprobaciones, tienden a reflejar el entorno de pruebas y tratamiento más actualizado. En cambio, las guías sistemáticas, como las del CAP/IASLC/AMP, dependen de una revisión rigurosa y prolongada de las pruebas publicadas y revisadas por expertos<sup>12</sup> y, por razones prácticas, solo se actualizan cada ciertos años.

A pesar del papel y el valor reconocidos de las guías disponibles, el cumplimiento de sus recomendaciones sigue siendo subóptimo. Una encuesta basada en datos del mundo real recopilados en consultas oncológicas comunitarias entre el 2018 y el 2020 mostró que, aunque al 91 % de los pacientes con CPNM metastásico no escamoso se les realizó al menos 1 análisis de un solo gen, solo al 49 % se le evaluaron 5 o más genes terapéuticamente relevantes, y en el 39 % solo se realizó NGS.<sup>22</sup> El examen de bases de datos de atención de salud amplias y de gran alcance también reveló disparidades raciales significativas en relación con las pruebas

de NGS entre los pacientes con CPNM en Estados Unidos, con aproximadamente un 55 % de pacientes blancos que recibieron NGS en algún momento de su atención en comparación con alrededor del 44 % de pacientes negros.<sup>23</sup> En vista de los desafíos reconocidos de la insuficiencia de muestras y los prolongados tiempos de respuesta de las pruebas basadas en tejidos, el análisis de ADN libre de células (cfADN) (biopsia líquida) ha ganado un importante arraigo en la práctica estadounidense. Aunque en Estados Unidos no existen guías sobre pruebas específicas del cfADN, las guías actualizadas del CAP/IASLC/AMP reconocen su utilidad en pacientes que carecen de tejido tumoral suficiente para realizar pruebas de biomarcadores, o en aquellos que necesitan una caracterización molecular tras una recidiva en la terapia dirigida.<sup>12</sup> La IASLC publicó recomendaciones en el 2021,<sup>24</sup> aunque basadas en la opinión de expertos, no en una revisión sistemática de la literatura. (Véase el capítulo 4).

### *Canadá*

En Canadá, el sistema de atención de salud está financiado casi en su totalidad por el gobierno, por lo que el alcance de las pruebas moleculares disponibles de forma rutinaria para los pacientes con cáncer viene determinado por las autoridades de atención de salud. Dado que los gobiernos provinciales tienen jurisdicción sobre la atención de salud, el tipo y el sistema de pruebas disponibles para los pacientes pueden variar de una provincia a otra. Las pruebas se realizan principalmente en laboratorios de diagnóstico molecular, la mayoría de los cuales están establecidos dentro de los departamentos de medicina de laboratorio o patología de los principales hospitales. En general, la mayoría de las autoridades provinciales encargadas de la atención del cáncer inician una deliberación sobre la financiación de las pruebas de biomarcadores cuando se considera la financiación pública de un nuevo fármaco que ha sido aprobado por *Health Canada*. Entre las principales cuestiones que se tienen en cuenta en dichas deliberaciones se incluyen la rentabilidad de la prueba y los métodos/ ensayos de prueba que se proponen, así como su impacto en la prestación de atención al paciente para los tipos de cáncer pertinentes.<sup>25-28</sup> Aunque la financiación suele seguir las guías aceptadas internacionalmente (por ejemplo, CAP/IASLC/AMP, ASCO, ESMO), las publicaciones periódicas de consenso o revisión de grupos de líderes canadienses de opinión clave en oncología médica, patología y patología molecular pueden proporcionar recomendaciones en el contexto canadiense.<sup>29-35</sup> En la actualidad, para el cáncer de pulmón, se recomiendan pruebas moleculares para todas las alteraciones susceptibles de responder al tratamiento, incluidas las mutaciones T790M del *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* V600E, *NTRK*, *KRAS* G12C y *EGFR* en pacientes con CPNM mutante para *EGFR* que hayan presentado progresión con inhibidores de la quinasa de *EGFR* de primera y/o segunda generación.<sup>35</sup> Se incluirán nuevos marcadores a medida que se aprueben en Canadá los fármacos dirigidos correspondientes. También se recomienda realizar pruebas para detectar la mutación T790M del *EGFR* circulante en muestras de plasma (biopsia líquida) como método alternativo (preferido) o complementario. Aunque la elección del método de prueba la determina el laboratorio, con base en aportaciones multidisciplinarias, se exige a los laboratorios que sigan las guías aceptables para validar las pruebas individuales antes de su implementación clínica. Esto es crucial, ya que, a diferencia de lo que ocurre en Estados Unidos, *Health Canada* suele asociar las aprobaciones de fármacos específicos a una “prueba validada”, en lugar de a una prueba diagnóstica específica con fines terapéuticos. Este enfoque ha impulsado la realización

de varios estudios multicéntricos canadienses para optimizar y estandarizar las pruebas de biomarcadores pulmonares, como las de *EGFR*, *ALK*, *ROS1* y *PD-L1*.<sup>36-39</sup>

## Europa

Según una encuesta realizada en el 2019,<sup>40</sup> los médicos europeos conocen las guías (inter) nacionales sobre las pruebas de biomarcadores del CPNM. Los criterios de selección para las pruebas son similares en todos los países: *PD-L1* para todos los pacientes con CPNM metastásico y pruebas moleculares para factores oncogénicos en aquellos con CPNM no escamoso o histología de células escamosas, pero sin antecedentes de tabaquismo. La situación de las pruebas moleculares en Europa es muy heterogénea. En aproximadamente dos tercios de los países europeos, las “pruebas reflejas” (dirigidas por los patólogos) son habituales; en los demás, las pruebas se realizan por encargo. Las pruebas se suelen realizar de forma interna o en un laboratorio regional. En alrededor de tres cuartas partes de los países, la NGS es una práctica habitual; en los demás, se utiliza la PCR en tiempo real.<sup>15,40</sup>

Los países europeos tienen una gran diversidad de sistemas de atención y economías en materia de salud, que repercuten en la realización de perfiles moleculares tumorales.<sup>41,42</sup> En todos los países se dispone de pruebas de *EGFR*, *ALK* y *PD-L1*, pero la práctica del reembolso varía entre la cobertura total por parte del seguro médico nacional o privado o la financiación por parte de las compañías farmacéuticas, hasta la ausencia de financiación o incluso la ausencia de pruebas para determinados biomarcadores.<sup>40</sup> En países como Francia, existen programas estructurados apoyados por el gobierno para lograr pruebas moleculares sistemáticas centralizadas en un número limitado de centros.<sup>43</sup>

Aunque existe concientización sobre los criterios de las pruebas, no todos los pacientes tienen acceso a ellas, e incluso en los países con acceso, no todos los tumores que cumplen los criterios de las pruebas se someten a ellas, aunque las tasas de realización de pruebas están aumentando con el tiempo.<sup>15,44-47</sup> Es importante destacar que el conocimiento por parte de los pacientes de los resultados de sus pruebas de biomarcadores parece escaso, ya que en una encuesta europea, el 23 % de los pacientes que sabían que sus tumores se habían sometido a pruebas desconocían los resultados.<sup>48</sup>

## Región Asia-Pacífico

La región de Asia-Pacífico es muy diversa e incluye países como Japón, donde se reembolsan las pruebas de NGS, así como otros países como Indonesia, donde el acceso a la atención oncológica es subóptimo. En Asia se hace menos hincapié en las pruebas diagnósticas con fines terapéuticos, y el costo y el reembolso de la NGS dependen en gran medida de cada país. Muchos adoptan un enfoque pragmático en el que las pruebas de biomarcadores se basan en el acceso a terapias novedosas, teniendo en cuenta que las aprobaciones locales de fármacos a menudo pueden retrasarse hasta 2 años con respecto a las aprobaciones de la FDA/EMA. Este es el caso incluso en Hong Kong, Taiwán y Singapur.

## Australia

En Australia, las pruebas para las alteraciones del *EGFR*, *ALK*, *ROS1* y *MET*, así como la inmunohistoquímica (IHQ) del *PD-L1*, se realizan de forma rutinaria y están financiadas por el gobierno. Aunque en los centros más grandes se realizan pruebas de panel NGS, no

están disponibles en todo el mundo. En el caso del *ALK* y *ROS1*, se realiza un cribado IHQ y actualmente se requiere la confirmación de un reordenamiento mediante una prueba de hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH) para acceder a los agentes dirigidos. Las pruebas para fusiones menos comunes, como *RET* y *NTRK1-3*, están menos disponibles. En la actualidad, las pruebas moleculares mediante biopsias líquidas se realizan con poca frecuencia en Australia y no están financiadas por el gobierno.<sup>49</sup>

### China

Las dianas terapéuticas aprobadas en China continental incluyen mutaciones de *EGFR* y *BRAF*, fusiones de *ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK*, y mutaciones de omisión del exón 14 de *MET*. Por lo tanto, las guías chinas recomiendan que se analicen los genes anteriores. Los fármacos dirigidos contra la mutación de los genes *KRAS* y *ERBB2* (*HER2*), la amplificación genética de *MET* y otros genes se encuentran aún en fase de ensayo clínico, por lo que se recomiendan estas dianas como componentes de las pruebas ampliadas.<sup>50,51</sup>

Los métodos basados en PCR y la NGS son los métodos de prueba recomendados para las mutaciones, mientras que las fusiones genéticas se detectan mediante FISH, reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) del sistema de mutación alelo-refractario (allele-refractory mutation system, ARMS), NGS (basada en ARN) e IHQ. La IHQ de *ALK* (D5F3) se recomienda como prueba diagnóstica con fines terapéuticos, mientras que la IHQ de *ROS1* y del receptor de tirosina quinasa neurotrópico (*NTRK/pan-TRK*) se recomiendan como pruebas de cribado.<sup>50,52,53</sup> Las pruebas moleculares se realizan de forma rutinaria en muestras quirúrgicas de CPNM con histología no escamosa en estadio IB o superior. Para el CPNM avanzado, se prefieren las biopsias tisulares. También se puede considerar la biopsia líquida si no se dispone de muestras tisulares. Además, la detección del PD-L1 es igualmente importante y se debería realizar al mismo tiempo.<sup>54,55</sup>

### India

Las guías indias recomiendan pruebas secuenciales o simultáneas según el criterio del oncólogo.<sup>56</sup> En la actualidad, la mayoría de las terapias para nuevas dianas genéticas (*BRAF*, *MET*, *RET*, *HER2*, *KRAS*) no están disponibles en la India. Por lo tanto, estos genes no se incluyen en las pruebas moleculares de rutina en todos los pacientes con CPNM avanzado, pero se pueden analizar en pacientes que presentan progresión o desarrollan resistencia a la terapia de primera línea. Los paneles de expertos recomiendan los genes *EGFR*, *ALK*, y *ROS1*, así como la proteína PD-L1, como biomarcadores de primera línea para las pruebas moleculares.<sup>56</sup>

Dependiendo del criterio del oncólogo y de los medios económicos del paciente, se aconsejan tanto las pruebas de un solo gen como la NGS. La ARMS-PCR, la PCR digital y la NGS son los métodos preferidos para las pruebas de la mutación del *EGFR* en el CPNM. Se recomienda la IHQ para el reordenamiento de *ALK* y la expresión del PD-L1, mientras que el cribado del reordenamiento de *ROS1* se realiza mediante IHQ seguida de FISH para su confirmación.

Debido a la disponibilidad limitada del osimertinib en los entornos de primera línea, los pacientes suelen someterse a la prueba de la mutación T790M del *EGFR* en la biopsia líquida

en el momento de la recidiva. Sin embargo, se les aconseja someterse a una biopsia tumoral si los resultados de la biopsia líquida son negativos.

### **Japón**

Las pruebas de biomarcadores en Japón están reguladas por la política de atención de salud del gobierno, y la mayoría de las pruebas predictivas de biomarcadores están cubiertas por el seguro médico. Los pacientes con cáncer de pulmón avanzado suelen ser examinados con pruebas multiplex focalizadas tras el diagnóstico, y la prueba de perfil genómico integral se aplica en algunos pacientes que presentan progresión tras la terapia estándar.<sup>57,58</sup> En cuanto a las guías de tratamiento, la *Japanese Lung Cancer Society* (JLCS) publica guías para el tratamiento del cáncer de pulmón que se elaboran mediante el sistema GRADE y se actualizan cada año; en la literatura internacional se ha informado de un resumen parcial.<sup>59</sup> En cuanto a los biomarcadores predictivos individuales, el comité de biomarcadores de la JLCS facilita la implementación adecuada de las pruebas moleculares con orientación para *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *KRAS* y las pruebas multiplex. Las orientaciones para *ALK*,<sup>60</sup> *MET*,<sup>61</sup> y las pruebas multiplex<sup>58</sup> están disponibles en inglés.

### **África y oriente medio**

Las pruebas de biomarcadores para pacientes con CPNM en África y Oriente Medio son heterogéneas, ya que la región incluye países de ingresos altos y de ingresos bajos a medios. A diferencia de lo que ocurre en los países de ingresos altos de Oriente Medio, la disponibilidad de pruebas de biomarcadores de cáncer de pulmón es muy limitada en los países subsaharianos.<sup>62,63</sup> La experiencia local en pruebas también es escasa. Puede que ni siquiera existan centros de pruebas en el país o que estén situados en un lugar céntrico, lo que da lugar a tiempos de respuesta prolongados. Varios países recurren a la subcontratación de laboratorios europeos para las pruebas moleculares. En la mayoría de los casos, el paciente corre con el costo de la prueba. En países como Sudáfrica, el acceso a las pruebas de biomarcadores y a las terapias dirigidas viene dictado en parte por el acceso del paciente a los servicios de atención de salud del sector privado en comparación con los del sector público.<sup>64</sup> Esto se aplica también a las herramientas de diagnóstico, ya que las pruebas de laboratorio de histopatología pueden no estar disponibles en todo el país, y las técnicas rutinarias en otros entornos, como la inmunohistoquímica, pueden ser difíciles de encontrar.<sup>65</sup> Esto significa que, en determinados países, ni siquiera se dispone de una tipificación histológica básica del CPNM mediante inmunohistoquímica, por no hablar de las pruebas moleculares.<sup>19</sup> Además, el acceso a las terapias dirigidas es muy limitado y el costo de la terapia no suele estar cubierto por la mayoría de los sistemas de salud pública. Esta importante brecha se traduce en un retraso en la atención del CPNM y obstaculiza los esfuerzos por proporcionar la mejor atención posible a estos pacientes.

### **Conclusión**

La implementación global de las guías estándar para las pruebas de biomarcadores en el cáncer de pulmón depende de factores locales y regionales específicos de cada país que incluyen la disponibilidad de recursos e infraestructuras, la asequibilidad, las políticas de reembolso por parte del gobierno o de entidades privadas, el acceso a las pruebas y los mecanismos de

aprobación de fármacos. Aunque las recomendaciones sobre las pruebas específicas no son coherentes en todos los países, las pruebas para *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, y PD-L1 están ampliamente implementadas. Con el aumento de la disponibilidad de nuevas terapias dirigidas, prevemos que esta lista se amplíe, lo que requerirá un cambio hacia las pruebas multiplexadas.

## Referencias

- Alexander M, Kim SY, Cheng H. Update 2020: management of non-small cell lung cancer. *Lung*. 2020;198(6):897-907.
- Morgensztern D, Campo MJ, Dahlberg SE, et al. Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014. *J Thorac Oncol*. 2015;10(1 suppl 1):S1-63.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346.
- Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8661.
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018;36(9):911-919.
- Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-small cell lung cancer, version 3.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2022;20(5):497-530.
- Hendriks LE, Kerr K, Menis J, et al. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(22\)04781-0/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(22)04781-0/fulltext).
- Guyatt GH. Evidence-based medicine. *ACP J Club*. 1991;114(2):A16.
- Institute of Medicine. *Clinical Practice Guidelines We Can Trust*. National Academies Press; 2011.
- Welcome to the GRADE Working Group. GRADE. 2004-2002. Updated January 21, 2021. <https://www.gradeworkinggroup.org/>.
- GuideLines Into DEcision Support (GLIDES). Yale School of Medicine. Updated January 21, 2021. <https://medicine.yale.edu/cmi/glides/>.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):323-358.
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-859.
- Leighl NB, Rekhtman N, Biermann WA, et al. Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology guideline. *J Clin Oncol*. 2014;32(32):3673-3679.
- Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, et al. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer Amst Neth*. 2021;154:161-175.
- Horgan D, Curigliano G, Rieß O, et al. Identifying the steps required to effectively implement next-generation sequencing in oncology at a national level in Europe. *J Pers Med*. 2022;12(1):72.
- Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Ann Glob Health*. 2019;85(1):8.
- Smeltzer MP, Wynes MW, Lantuejoul S, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer global survey on molecular testing in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2020;15(9):1434-1448.

19. Elhassan MMA, Mohamedani AA, Mohamed SAH, et al. Lung cancer in Sudan. *J Thorac Oncol.* 2022;17(4):489-498.
20. Sheikh HS, Munawar K, Sheikh F, Qamar MFU. Lung cancer in Pakistan. *J Thorac Oncol.* 2022;17(5):602-607.
21. Lung cancer worldwide. Editorial series. *J Thorac Oncol.* 2019-2022.
22. Robert NJ, Espirito JL, Chen L, et al. Biomarker testing and tissue journey among patients with metastatic non-small cell lung cancer receiving first-line therapy in the US Oncology Network. *Lung Cancer Amst Neth.* 2022;166:197-204.
23. Bruno DS, Hess LM, Li X, Su EW, Patel M. Disparities in biomarker testing and clinical trial enrollment among patients with lung, breast, or colorectal cancers in the United States. *JCO Precis Oncol.* 2022;6:e2100427.
24. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, et al. Liquid biopsy for advanced NSCLC: a consensus statement from the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2021;16(10):1647-1662.
25. Djalalov S, Beca J, Hoch JS, et al. Cost effectiveness of EML4-ALK fusion testing and first-line crizotinib treatment for patients with advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014;32(10):1012-1019.
26. Ontario Health (Quality). Cell-free circulating tumour DNA blood testing to detect EGFR T790M mutation in people with advanced non-small cell lung cancer: a health technology assessment. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2020;20(5):1-176.
27. Makarem M, Ezeife DA, Smith AC, et al. Reflex ROS1 IHC screening with FISH confirmation for advanced non-small cell lung cancer—a cost-efficient strategy in a public healthcare system. *Curr Oncol Tor Ont.* 2021;28(5):3268-3279.
28. Ezeife DA, Spackman E, Juergens RA, et al. The economic value of liquid biopsy for genomic profiling in advanced non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2022;14:17588359221112696.
29. Ellis PM, Blais N, Soulieres D, et al. A systematic review and Canadian consensus recommendations on the use of biomarkers in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6(8):1379-1391.
30. Melosky B, Blais N, Cheema P, et al. Standardizing biomarker testing for Canadian patients with advanced lung cancer. *Curr Oncol Tor Ont.* 2018;25(1):73-82.
31. Stockley T, Souza CA, Cheema PK, et al. Evidence-based best practices for EGFR T790M testing in lung cancer in Canada. *Curr Oncol Tor Ont.* 2018;25(2):163-169.
32. Melosky B, Cheema P, Agulnik J, et al. Canadian perspectives: update on inhibition of ALK-positive tumours in advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol Tor Ont.* 2018 Oct;25(5):317-328.
33. Cheema PK, Gomes M, Banerji S, et al. Consensus recommendations for optimizing biomarker testing to identify and treat advanced EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol Tor Ont.* 2020;27(6):321-329.
34. Bebb DG, Banerji S, Blais N, et al. Canadian consensus for biomarker testing and treatment of TRK fusion cancer in adults. *Curr Oncol Tor Ont.* 2021;28(1):523-548.
35. Ionescu DN, Stockley TL, Banerji S, et al. Consensus recommendations to optimize testing for new targetable alterations in non-small cell lung cancer. *Curr Oncol Tor Ont.* 2022;29(7):4981-4997.
36. Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E, et al. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2014;9(9):1255-1263.
37. Torlakovic E, Albadine R, Bigras G, et al. Canadian multicenter project on standardization of programmed death-ligand 1 immunohistochemistry 22C3 laboratory-developed tests for pembrolizumab therapy in NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2020;15(8):1328-1337.
38. Cheung CC, Smith AC, Albadine R, et al. Canadian ROS proto-oncogene 1 study (CROS) for multi-institutional implementation of ROS1 testing in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2021;160:127-135.
39. Leighl NB, Kamel-Reid S, Cheema PK, et al. Multicenter validation study to implement plasma epidermal growth factor receptor T790M testing in clinical laboratories. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:520-533.
40. Thunnissen E, Weynand B, Udovicic-Gagula D, et al. Lung cancer biomarker testing: perspective from Europe. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(3):887-897.
41. Horgan D, Ciliberto G, Conte P, et al. Bringing greater accuracy to Europe's healthcare systems: the unexploited potential of biomarker testing in oncology. *Biomed Hub.* 2020;5(3):182-223.

42. Horgan D, Ciliberto G, Conte P, et al. Bringing onco-innovation to Europe's healthcare systems: the potential of biomarker testing, real world evidence, tumour agnostic therapies to empower personalised medicine. *Cancers*. 2021;13(3):583.
43. Hofman P, Rouleau E, Sabourin JC, et al. Predictive molecular pathology in non-small cell lung cancer in France: the past, the present and the perspectives. *Cancer Cytopathol*. 2020;128(9):601-610.
44. Griesinger F, Eberhardt W, Nusch A, et al. Biomarker testing in non-small cell lung cancer in routine care: analysis of the first 3,717 patients in the German prospective, observational, nation-wide CRISP registry (AIO-TRK-0315). *Lung Cancer Amst Neth*. 2021;152:174-184.
45. Salas C, Martín-López J, Martínez-Pozo A, et al. Real-world biomarker testing rate and positivity rate in NSCLC in Spain: Prospective Central Lung Cancer Biomarker Testing Registry (LungPath) from the Spanish Society of Pathology (SEAP). *J Clin Pathol*. 2022;75(3):193-200.
46. Provencio M, Cobo M, Rodriguez-Abreu D, et al. Determination of essential biomarkers in lung cancer: a real-world data study in Spain with demographic, clinical, epidemiological and pathological characteristics. *BMC Cancer*. 2022;22(1):732.
47. Steeghs EMP, Groen HJM, Schuurin E, et al. Mutation-tailored treatment selection in non-small cell lung cancer patients in daily clinical practice. *Lung Cancer Amst Neth*. 2022;167:87-97.
48. Tufman A, Redmond K, Giannopoulou A, et al. Patient perception of burden of disease and treatment preferences in non-small cell lung cancer: results from a European survey. *Lung Cancer Amst Neth*. 2022;168:59-66.
49. John T, Cooper WA, Wright G, et al. Lung cancer in Australia. *J Thorac Oncol*. 2020;15(12):1809-1814.
50. Chinese Society of Pathology, Pathology Quality Control Center; Chinese Medical Association Chinese Society of Oncology; China Anti-Cancer Association Chinese Society of Lung Cancer; Chinese Thoracic Oncology Group. Guidelines on clinical practice of molecular tests in non-small cell lung cancer in China. Article in Chinese. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2021;50(4):323-332.
51. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):531-540.
52. Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, et al. DNA-based versus RNA-based detection of MET exon 14 skipping events in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(4):737-741.
53. Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1711-1723.
54. Chinese Anti-Cancer Association, Lung Cancer Study Group of Committee of Oncopathology; Chinese Society of Lung Cancer; Expert Group on PD-L1 Testing Consensus. Chinese expert consensus on standards of PD-L1 immunohistochemistry testing for non-small cell lung cancer. Article in Chinese. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2020;23(9):733-740.
55. Felip E, Altorki N, Zhou C, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multi-centre, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;398(10308):1344-1357.
56. Prabhaskar K, Advani SH, Batra U, et al. Biomarkers in non-small cell lung cancers: Indian consensus guidelines for molecular testing. *Adv Ther*. 2019;36(4):766-785.
57. Motoi N, Yatabe Y. Lung cancer biomarker tests: the history and perspective in Japan. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(3):879-886.
58. Yatabe Y, Sunami K, Goto K, et al. Multiplex gene-panel testing for lung cancer patients. *Pathol Int*. 2020;70(12):921-931.
59. Ninomiya K, Teraoka S, Zenke Y, et al. Japanese Lung Cancer Society guidelines for stage IV NSCLC with EGFR mutations. *JTO Clin Res Rep*. 2021;2(1):100107.
60. Mitsudomi T, Yatabe Y, Akita H, et al.; Biomarker Committee, the Japan Lung Cancer Society. *Guidance for ALK Gene Testing in Lung Cancer Patients*. Version 1.2. Japan Lung Cancer Society;2011. <https://www.haigan.gr.jp/uploads/files/photos/641.pdf>.
61. Yatabe Y, Goto K, Matsumoto S, et al. METex14 skipping testing guidance for lung cancer patients: the guidance from the Biomarker Committee, the Japan Lung Cancer Society. *Haigan*. 2021;61(5):361-370. <https://doi.org/10.2482/haigan.61.361>.
62. Slavik T, Asselah F, Fakhruddin N, et al. Diagnosis and predictive molecular analysis of non-small-cell lung cancer in the Africa-Middle East region: challenges and strategies for improvement. *Clin Lung Cancer*. 2014;15(6):398-404.

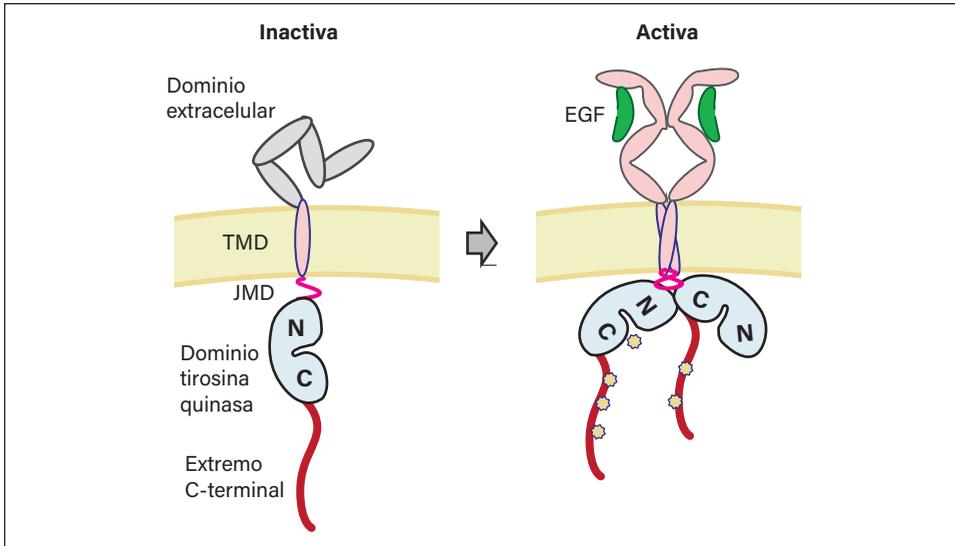
63. Niyibizi BA, Muhizi E, Ndoli DA, et al. Lung cancer in Rwanda. *J Thorac Oncol.* 2022;17(9):1074-1077.
64. van Eeden R, Tunmer M, Geldenhuys A, Nayler S, Rapoport BL. Lung cancer in South Africa. *J Thorac Oncol.* 2020;15(1):22-28.
65. Patel K, Strother RM, Ndiangui F, et al. Development of immunohistochemistry services for cancer care in western Kenya: implications for low- and middle-income countries. *Afr J Lab Med.* 2016;5(1):187.



## Estructura y función de los genes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR/ErbB1), con ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4), es un miembro de la familia de receptores *ERBB*. Estos miembros de la familia de receptores señalizan como homo y heterodímeros tras la unión del ligando, con la excepción de HER2, que participa en la dimerización en ausencia de un ligando conocido.<sup>1</sup> La proteína EGFR es un receptor transmembrana tirosina quinasa que comprende un dominio extracelular (extracellular domain, ECD), un dominio transmembrana (transmembrane domain, TMD), un dominio yuxtamembrana (juxtamembrane domain, JMD), un dominio tirosina quinasa (tyrosine kinase domain, TKD) y un extremo C-terminal.<sup>2</sup>

Tras la unión a los distintos ligandos, incluidos el factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ , TGF $\alpha$ ), la anfiregulina (amphiregulin, AREG), etc.,<sup>2</sup> los cambios conformacionales en el ECD permiten la dimerización del receptor.<sup>3</sup> Esta dimerización induce la interacción asimétrica entre los lóbulos C y N de los TKD, lo que da lugar a la autofosforilación del sitio receptor tirosina quinasa y de los sitios de fosforilación en el extremo C-terminal. Se ha demostrado que el JMD estabiliza esta interacción a través de un mecanismo de enganche yuxtamembrana (figura 7-1).<sup>4,5</sup> Dentro del TKD, esta fosforilación induce cambios conformacionales en el posicionamiento de la hélice  $\alpha$ C y, en consecuencia, en el posicionamiento del bucle de activación, que adopta una conformación abierta permisiva para la unión de sustratos.<sup>6</sup> Dentro del extremo C-terminal, los sitios de acoplamiento fosforilados unen mediadores adicionales de la señalización descendente. La activación del EGFR conduce en última instancia a la activación de múltiples vías de señalización descendentes, incluidas las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la fosfoinositol 3-quinasa (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT y la quinasa Janus (Janus kinase, JAK)/transductores de señales y activadores de la transcripción (signal transducers and activators of transcription, STAT), que promueven el crecimiento y la supervivencia celular.<sup>7</sup>



**Figura 7-1.** Estructura de la proteína EGFR en las conformaciones inactiva y activa. La unión del ligando EGF induce cambios conformacionales que permiten la dimerización proteica. La interacción entre los dominios tirosina quinasa permite la activación catalítica de la quinasa así como el acoplamiento de mediadores de la señalización descendente en el extremo C-terminal. Abreviaturas: EGF = factor de crecimiento epidérmico; C = lóbulo C; JMD = dominio yuxtamembrana; N = lóbulo N; TMD = dominio transmembrana. (Adaptado de Jura *et al.*<sup>4</sup>)

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

La incidencia global de las mutaciones del *EGFR* varía, oscilando aproximadamente entre el 12 % de los adenocarcinomas de pulmón en poblaciones europeas, el 15 % en Norteamérica y el 49 % en poblaciones asiáticas.<sup>8</sup> La prevalencia es mayor en las mujeres, en las personas sin antecedentes de consumo de tabaco y en los pacientes más jóvenes.<sup>9</sup> Las pruebas siguen siendo importantes en todos los pacientes con adenocarcinoma, ya que las mutaciones activadoras del *EGFR* son detectables en todas las poblaciones de pacientes con cáncer de pulmón. Por ejemplo, en una serie de casos, mientras que en el 52 % de los pacientes sin antecedentes de consumo de tabaco se detectaron mutaciones activadoras del *EGFR*, las mutaciones del *EGFR* estuvieron presentes además en el 21 % de los que habían consumido tabaco anteriormente y en el 6 % de los que seguían consumiendo tabaco.<sup>10</sup> Del mismo modo, aunque las mutaciones del *EGFR* son poco frecuentes en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) con histología escamosa, siguen detectándose con baja prevalencia, sobre todo en aquellos con otras características demográficas clásicas (por ejemplo, personas que nunca han fumado) o con histología adenoescamosa mixta.<sup>11</sup>

Por el momento, la epidemiología molecular de las mutaciones del *EGFR* se debe interpretar con mucha cautela, ya que las frecuencias dependen de las diferentes estrategias de prueba, que deben tener en cuenta la heterogeneidad geográfica de las mutaciones del *EGFR*. Por ejemplo, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) en tiempo real podría ser un enfoque sensato en zonas de alta incidencia, aunque se pasen por alto algunas mutaciones poco comunes y compuestas.<sup>12</sup> Por el contrario, el uso de la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) podría cambiar nuestra comprensión de la frecuencia de las mutaciones poco comunes.<sup>13</sup>

**Tabla 7-1.** Métodos para la detección de mutaciones del *EGFR*

Técnica	Sensibilidad analítica	Sensibilidad diagnóstica	Anotación precisa de las variantes	Frecuencia de alelos informada	ADN de entrada	Costo	Tiempo de respuesta
PCR y secuenciación directa	Más baja	Excelente	Sí	No	Alto	Más bajo	3-4 días
PCR y pirosecuenciación	Variable	Intermedia	A veces	No	Alto	Bajo	3-4 días
PCR en tiempo real	Alta	Intermedia	A veces	No	Bajo	Bajo	De horas a 1-2 días
PCR digital	Más alta	Baja	Sí	No	Más bajo	Bajo	De horas a 1-2 días
Dirigida por NGS y basada en amplificación	Variable (alta)	Variable (alta)	Sí	Sí	Bajo	Intermedio	Entre 1-2 y 10 días
Captura de hibridación dirigida por NGS	Variable (alta)	Variable (alta)	Sí	Sí	Alto	Intermedio	15-20 días
NGS-exoma completo	Variable	Excelente	Sí	Sí	Alto	Alto	Semanas
NGS-genoma completo	Variable	Excelente	Sí	Sí	Alto	Más alto	Semanas

Abreviaturas: NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

Adaptado de Pao *et al.*<sup>14</sup>; Pennell *et al.*<sup>15</sup>

## Estrategias de prueba

Todas las personas implicadas en las pruebas de biomarcadores del cáncer de pulmón deben conocer las métricas de rendimiento de las diferentes técnicas que se utilizan habitualmente para identificar las mutaciones del *EGFR* (tabla 7-1).<sup>14,15</sup> En la siguiente sección se analiza cada uno de los tipos de pruebas disponibles para detectar las mutaciones del *EGFR*. La secuenciación directa (o de Sanger) y los métodos de PCR rápida se utilizaron principalmente cuando se descubrieron las mutaciones del *EGFR*.<sup>16,17</sup> En las últimas 2 décadas, al principio se desarrollaron pruebas comerciales de PCR en tiempo real, seguidas de la aplicación clínica de paneles de NGS.<sup>18-20</sup> En consecuencia, esas son las 2 técnicas más utilizadas para detectar mutaciones del *EGFR*, y existen varias pruebas de PCR en tiempo real y paneles de NGS aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA). La mayoría de las guías nacionales e internacionales recomiendan la realización de pruebas de biomarcadores integrales, por lo que cada vez se adoptan más las pruebas del *EGFR* basadas en NGS.<sup>21,22</sup>

La sensibilidad analítica (a menudo denominada simplemente *sensibilidad*) es el límite de detección, el porcentaje más pequeño de células tumorales que se puede detectar en una muestra determinada. La sensibilidad diagnóstica está relacionada con la exhaustividad de la prueba o con el porcentaje de todas las mutaciones descritas para el gen detectables por la prueba dada.<sup>15</sup> En esta línea, algunas de estas pruebas no pueden discriminar entre variantes (es decir, los resultados se presentan como “mutación detectada” vs. “mutación no detectada” o “deleción del exón 19, no especificada”), y solo los paneles de NGS ofrecen una estimación fiable de la fracción de alelos. Las tasas de éxito suelen estar relacionadas con la cantidad de

ADN presente en la muestra, ya que los paneles de NGS de captura de hibridación requieren mucho más ADN de entrada que las pruebas NGS basadas en amplicones o la PCR en tiempo real. Por último, cabe destacar que los kits de PCR en tiempo real ultrarrápidos o incluso los flujos de trabajo de NGS totalmente automatizados, con un tiempo manual mínimo, pueden proporcionar resultados en 1 o 2 días.<sup>23-25</sup>

### **Tipo de alteraciones del *EGFR* e implicaciones clínicas**

Para comprender mejor las estrategias de análisis y las implicaciones clínicas de las mutaciones del *EGFR* en pacientes con CPNM, resulta útil dividir las 5 categorías siguientes.

#### **1. Mutaciones comunes**

Las mutaciones activadoras del *EGFR* más comunes son las deleciones dentro del marco de lectura del exón 19 (residuos de aminoácidos 747-750) y las mutaciones puntuales L858R del exón 21, que representan entre el 80 % y el 85 % de todas las mutaciones del *EGFR*.<sup>21</sup> Los pacientes con CPNM que presentan estas mutaciones responden bien a los inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) del *EGFR*, y los TKI del *EGFR* son el estándar de atención actual en el tratamiento de primera línea de la enfermedad avanzada/metastásica. Los TKI del *EGFR* de primera generación, incluidos el gefitinib y el erlotinib, así como los TKI del *EGFR* de segunda generación, como el afatinib o el dacomitinib, mostraron una supervivencia libre de progresión (SLP) estadísticamente más larga y significativa en comparación con la quimioterapia basada en platino en el entorno de primera línea.<sup>26-30</sup> En un ensayo de fase 2, se informó una SLP más larga con el afatinib en comparación con el gefitinib, pero sin diferencias en la tasa de supervivencia global (SG).<sup>31,32</sup> Del mismo modo, en un ensayo de fase 3, con el dacomitinib, otro TKI del *EGFR* de segunda generación, se informó una mejora significativa de la SLP pero no de la SG (valor de *p* requerido 0,025, valor de *p* alcanzado 0,04) en comparación con el gefitinib. Sin embargo, a diferencia del ensayo con afatinib, en el ensayo con dacomitinib no se permitieron pacientes con metástasis cerebrales.<sup>33-35</sup> Aunque con los TKI del *EGFR* de segunda generación se informaron mejores resultados, estos TKI del *EGFR* se asocian a una mayor incidencia de toxicidades, como erupciones cutáneas y diarrea, en comparación con el gefitinib.<sup>31,33</sup>

El osimertinib, un TKI del *EGFR* de tercera generación, se desarrolló inicialmente para pacientes con mutación T790M resistente adquirida tras un fracaso con un TKI del *EGFR* previo de primera o segunda generación en el estudio de fase 1 AURA y en el estudio de fase 3 AURA3.<sup>36-38</sup> Con la alentadora eficacia en la cohorte de pacientes sin tratamiento previo en el estudio AURA,<sup>39</sup> se evaluó el uso del osimertinib en el entorno de primera línea en el estudio FLAURA. En este estudio, los pacientes sin tratamiento previo con deleción del exón 19 del *EGFR* avanzada/metastásica y mutación L858R del exón 21 fueron asignados aleatoriamente a recibir tratamiento con osimertinib en comparación con erlotinib o gefitinib. El estudio mostró que el osimertinib mejoró significativamente la SLP, el criterio de valoración principal, y el análisis de seguimiento de la SG también mostró los beneficios del osimertinib.<sup>40,41</sup> Además, el osimertinib mostró una mejor actividad en el sistema nervioso central (SNC) en comparación con los TKI del *EGFR* de primera generación.<sup>42</sup> En la actualidad, el osimertinib es la opción de tratamiento de primera línea preferida de la enfermedad avanzada/metastásica. Sin embargo, los TKI del *EGFR* de tercera generación aumolertinib,<sup>43</sup> furmonertinib,<sup>44</sup> y lazertinib,<sup>45</sup> ya

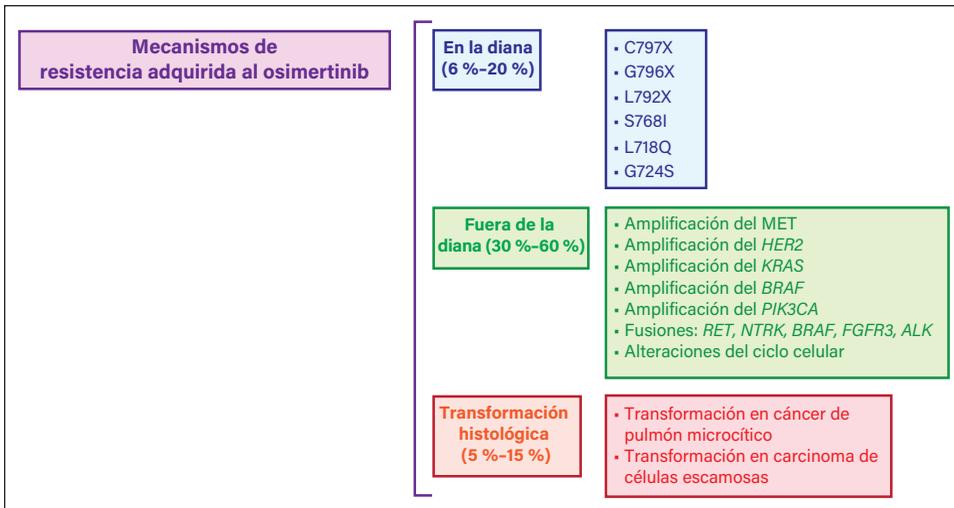
han informado de tasas de SLP más prolongadas que las obtenidas con el gefitinib en entornos de primera línea en pacientes con CPNM avanzado con mutación del *EGFR*. Además, en el entorno de primera línea, el ensayo MARIPOSA (NCT04487080) evalúa la combinación de lazertinib más amivantamab (un anticuerpo monoclonal biespecífico EGFR-MET); el ensayo FLAURA2 (NCT04035486) evalúa el beneficio de añadir quimioterapia basada en platino al osimertinib; y el estudio ECOG-ACRIN 5182 de fase 3 (NCT04181060) evalúa el osimertinib con o sin bevacizumab. Recientemente, un ensayo clínico adyuvante con osimertinib mostró una marcada mejora de la supervivencia libre de enfermedad en comparación con el placebo en pacientes con CPNM reseca quirúrgicamente en estadios IB a IIIA con enfermedad positiva a la mutación del *EGFR*.<sup>46</sup>

## 2. Mutaciones poco frecuentes (o atípicas)

Las mutaciones poco frecuentes o atípicas incluyen todas las mutaciones, excepto las deleciones del exón 19, las mutaciones L858R y T790M. Las identificadas con más frecuencia son la G719X en el exón 18 (0,9 %-4,8 % de todas las mutaciones del *EGFR*), la L861X en el exón 21 (0,5 %-3,5 % de todas las mutaciones del *EGFR*) y la S768I en el exón 20 (0,5 %-2,5 % de todas las mutaciones del *EGFR*).<sup>47</sup> Son poco frecuentes y no se incluyen en algunos paneles más limitados, por lo que puede ser necesaria la NGS para identificarlas; es importante buscar estas mutaciones poco frecuentes porque pueden ser sensibles a los TKI del *EGFR*. Estas mutaciones atípicas del *EGFR* muestran una respuesta clínica al gefitinib o al erlotinib; sin embargo, la tasa de respuesta global (TRG) y la tasa de SLP son inferiores a las de las mutaciones comunes del *EGFR*.<sup>48,49</sup> El afatinib mostró actividad para las mutaciones G719X, L861Q y S768I y recibió la aprobación de la FDA.<sup>50,51</sup> El osimertinib también mostró actividad clínicamente significativa para mutaciones poco frecuentes en un estudio de fase 2 de un solo grupo,<sup>52</sup> así como en un estudio retrospectivo de la vida real.<sup>53</sup>

Entre las alteraciones menos comunes del *EGFR* que pueden tener implicaciones clínicas se encuentran las duplicaciones del dominio quinasa (kinase domain duplications, KDD) y las fusiones oncogénicas del *EGFR*. Los pacientes con KDD del *EGFR* mostraron respuesta clínica a los TKI del *EGFR* con distintas duraciones de respuesta.<sup>54-56</sup> Las KDD son una alteración genómica activadora poco frecuente que se encuentra en todos los miembros de la familia *ERBB*. Las KDD del *EGFR* son el resultado de la duplicación en tándem dentro del marco de lectura del TKD del *EGFR* (exones 18-25). Ocurren hasta en el 1,4 % de los casos de CPNM y se encuentran además en otros tumores sólidos, más comúnmente en el glioma y las neoplasias malignas gastrointestinales (GI). Las KDD del *EGFR* producen una proteína que forma dímeros intramoleculares de TKD constitutivamente activos sin necesidad de la unión del ligando del EGF.<sup>57</sup> Las fusiones oncogénicas del *EGFR* son otra alteración del factor oncogénico poco frecuente de la que se informa en entre el 0,5 % y el 0,13 % de los casos de CPNM con diversas fusiones asociadas del *EGFR*, siendo la más común la fusión *EGFR-RAD51*.<sup>58</sup> Estas fusiones son capaces de impulsar la dimerización y la señalización oncogénica y pueden influir en la degradación de la proteína *EGFR*.<sup>59</sup> Varias series de casos han demostrado la actividad de la terapia con TKI del *EGFR* contra las fusiones *EGFR* activadoras.<sup>59,60</sup>

Históricamente, la amplificación y la sobreexpresión del *EGFR* se han evaluado como biomarcadores de respuesta a las terapias dirigidas al *EGFR*. Aunque la sobreexpresión del



**Figura 7-2.** Mecanismo de resistencia adquirida al osimertinib

EGFR no ha ofrecido un biomarcador fiable para la actividad de las terapias con TKI del EGFR,<sup>61</sup> la adquisición de amplificación o sobreexpresión del *EGFR* en la resistencia adquirida (RA) a la terapia con TKI del EGFR para el manejo de las mutaciones conductoras del *EGFR* clásicamente susceptibles a una intervención preventiva sigue siendo un área de investigación clínica activa.<sup>62,63</sup>

### 3. Inserción en el exón 20 del *EGFR*

Las inserciones en el exón 20 del *EGFR* son el mayor subconjunto de mutaciones atípicas (0,8 %-4,2 % de todas las mutaciones del *EGFR*)<sup>12,13,47</sup> que actualmente son susceptibles a una intervención preventiva pero muy heterogéneas, desde un punto de vista biológico y clínico, por lo que se requiere NGS para detectar toda la gama de inserciones en el exón 20 y proporcionar una anotación precisa de la variante.<sup>21</sup> Los pacientes con inserción en el exón 20 del *EGFR* no responden bien a los TKI convencionales del *EGFR*, excepto quizá el subtipo FQEA.<sup>50,64</sup> El poziotinib es un TKI del *EGFR* irreversible y mostró actividad clínica en pacientes con inserción en el exón 20 del *EGFR*, pero la elevada tasa de toxicidades, como erupciones cutáneas y diarrea, dio lugar a frecuentes interrupciones y disminuciones de la dosis que provocaron una SLP de duración relativamente corta.<sup>65,66</sup> Recientemente, en el CPNM refractario al platino, un nuevo TKI del *EGFR*, el mobocertinib<sup>67</sup> y el amivantamab<sup>68</sup>, mostraron una mejor TRO y SLP en comparación con el control histórico. Por lo tanto, la FDA ha concedido la aprobación condicional al mobocertinib y amivantamab para pacientes con CPNM metastásico y mutaciones de inserción en el exón 20 del *EGFR*, cuya enfermedad presentó progresión con o después de la quimioterapia basada en platino. Otros fármacos, como el sunvozertinib, el CLN081 y el furmonertinib, se están probando en esta población con resultados iniciales prometedores.<sup>69-71</sup>

### 4. Mutaciones compuestas

Las mutaciones compuestas también se han denominado *dobles*, *complejas* o *múltiples*, ya que por definición se trata de múltiples mutaciones independientes del *EGFR* en la misma muestra, y representan entre el 4 % y el 26 % de todas las mutaciones del *EGFR*. Se puede

encontrar cualquier tipo de combinación: 2 frecuentes (10 %-20 %), frecuente y poco frecuente (30 %-50 %), 2 poco frecuentes (25 %-40 %), y también la presencia de una mutación frecuente o poco frecuente con una mutación T790M *de novo* (10 %-50 %).<sup>72</sup>

### 5. Mutaciones de resistencia

En los pacientes con cáncer de pulmón con mutación del *EGFR* tratados inicialmente con TKI del *EGFR* de primera y segunda generación, entre el 50 % y el 60 % de los casos pueden desarrollar la mutación T790M de RA del *EGFR* en el exón 20 que confiere sensibilidad a la eficacia del osimertinib en este entorno.<sup>37</sup>

Para los pacientes tratados inicialmente con osimertinib en el entorno de primera línea, los mecanismos de RA al osimertinib son heterogéneos y complejos<sup>73</sup> y se pueden dividir en 3 categorías principales (figura 7-2): resistencia en la diana (10 %-20 %), resistencia fuera de la diana a través de la activación de vías oncogénicas de derivación (30 %-60 %), y transformación histológica (5 %-15 %). La caracterización de estos mecanismos puede revelar conocimientos susceptibles a una intervención preventiva para seleccionar tratamientos posteriores o reclutar a pacientes en ensayos clínicos. Por lo tanto, se recomienda volver a realizar una biopsia (líquida, tisular o ambas) cuando haya progresión de la enfermedad.<sup>21</sup> Cabe destacar que la biopsia líquida no captará la transformación histológica como mecanismo de RA. Sin embargo, en hasta la mitad de los pacientes, los mecanismos de RA al osimertinib siguen siendo desconocidos, y podrían estar relacionados con concentraciones plasmáticas subóptimas de TKI.<sup>74</sup> En una reciente cohorte prospectiva de fase 2 (estudio ELIOS), solo el 39 % de los pacientes tuvieron biopsias tisulares pareadas en el momento de la progresión con el osimertinib. En este estudio, se informó de resistencias en la diana en el 15 % de los casos, y se produjo un mecanismo de derivación en el 17 % de los casos. Estos datos ponen de relieve los desafíos que plantea la obtención de biopsias tisulares tras la progresión y la necesidad de métodos de prueba no invasivos más integrales.<sup>75</sup>

### Resistencia en la diana luego del osimertinib

El osimertinib bloquea selectivamente el *EGFR* mutado uniéndose de forma irreversible a su residuo C797 en el exón 20. Las mutaciones en este punto son los mecanismos de RA dependientes del *EGFR* más comunes, normalmente una sustitución a serina, que da lugar a la mutación C797S. La incidencia de C797X en el entorno clínico difiere en función de la línea de tratamiento de osimertinib (7 % en primera línea y 15 %-22 % en segunda línea).<sup>76-78</sup> En los entornos de segunda línea, para superar el CPNM resistente al osimertinib con mutación T790M positiva y C797X adquirida en los casos *cis* (el mismo alelo, en el 66 % de los casos), se han desarrollado TKI del *EGFR* de cuarta generación, como EAI045, JBJ-04-1252, BBT-176 y BLU-945, con los que se ha informado actividad preclínica.<sup>79-81</sup> En el estudio de fase 1 SYMPHONY (NCT04862780), con el BLU-945 más osimertinib se ha informado de una actividad clínica dependiente de la dosis en 11 pacientes con CPNM positivo para *EGFR*/T790M/C797S y resistente al osimertinib. Del mismo modo, en el entorno de segunda línea para aquellos pacientes con mutación C797X adquirida y mutación T790M en casos *trans* (alelo diferente, 34 % de los casos), los datos preclínicos y algunos informes de casos apoyan la combinación de TKI del *EGFR* de primera o segunda generación más osimertinib.<sup>73,82</sup> Por último, el uso de TKI del *EGFR* de primera o segunda generación tras el fracaso del osimertinib en el entorno de primera línea en tumores con mutación C797X en ausencia de

mutación T790M coexistente podría ser una opción.<sup>73</sup> En este entorno, los modelos preclínicos sugieren que el OBX02-011 y el BLU-701 pueden ser un nuevo TKI del EGFR prometedor para superar la resistencia mediada por C797S en el CPNM.<sup>83</sup> De hecho, se ha informado de que el BLU-701 es un fármaco que penetra al cerebro ( $Kp_{uu} > 0,9$ ).<sup>83</sup> Sin embargo, las pruebas clínicas de todas las estrategias anteriores siguen siendo limitadas, y la quimioterapia basada en platino con o sin inhibidores de puntos de control inmunitarios y bevacizumab son una opción de tratamiento estándar de segunda línea.<sup>83,84</sup> No obstante, el papel de la quimioterapia más inmunoterapia en este entorno sigue siendo controvertido tras los resultados del ensayo CheckMate 722, que no informaron de la SLP y la SG con esta estrategia en comparación con la quimioterapia por sí sola.<sup>86</sup> Recientemente, los agentes fármaco inmunoconjugados (antibody-drug conjugated, ADC), como el patritumab deruxtecán anti-HER3<sup>87</sup> y el antiantígeno 2 de la superficie celular del trofoblasto (TROP2), datopotamab deruxtecán,<sup>88</sup> demostraron actividad clínica abarcando mecanismos de resistencia a los TKI del EGFR conocidos y desconocidos, lo que sugiere que estos fármacos son posibles estrategias de tratamiento agnóstico cuando los enfoques basados en biomarcadores no son factibles o en ausencia de un mecanismo específico de RA.

### Resistencia fuera de la diana

La amplificación del *MET* es el mecanismo fuera de la diana más común de RA al osimertinib (15 % y 20 % en osimertinib de primera y segunda línea, respectivamente, ambos detectados en biopsias líquidas, lo que podría subestimar la incidencia real).<sup>76,77</sup> Cabe destacar que las diferentes herramientas de diagnóstico y las definiciones inconsistentes de amplificación del *MET* utilizadas en diversos ensayos clínicos han confundido el uso de inhibidores de *MET* en la práctica clínica. En la actualidad, la definición más ampliamente adoptada de la amplificación del *MET* es la presencia de un número de copias del gen *MET* igual o superior a 5 o una proporción *MET/CEP7* igual o superior a 2.<sup>89</sup> La resistencia a la amplificación del *MET* desencadena la fosforilación independiente del EGFR de ERBB3 y la activación descendente de la vía PI3K/AKT, lo que proporciona una vía de derivación incluso en presencia de un inhibidor del EGFR.<sup>90</sup>

Tradicionalmente, este mecanismo de RA se ha abordado clínicamente mediante la adición de un TKI del *MET* al TKI del EGFR, y la eficacia de esta combinación se estableció con solidez en varios ensayos clínicos de fase 1 y 2<sup>91-94</sup> y se confirmó recientemente en los ensayos INSIGHT2 y SAVANNAH.<sup>95,96</sup> De hecho, los datos iniciales sugieren que esta estrategia personalizada mejora el resultado en comparación con la quimioterapia estándar;<sup>89</sup> sin embargo, se debe confirmar en los ensayos clínicos aleatorizados de fase 3 en curso: GEOMETRY-E (NCT04816214), SAFFRON (NCT05261399) y MARIPOSA-2 (NCT04988295). Del mismo modo, se informó de actividad clínica con la combinación de amivantamab más lazertinib en el CPNM recidivante tratado con osimertinib. El beneficio fue similar independientemente del tratamiento previo con quimioterapia, y se produjeron respuestas en pacientes con y sin resistencia identificada al EGFR/*MET*, pero el resultado fue de especial interés en pacientes con un puntaje positivo en inmunohistoquímica (IHQ) (puntaje EGFR + *MET*  $\geq 400$ ).<sup>63,97</sup> Por último, en el caso del CPNM recidivante tratado con osimertinib, se informó de actividad con la combinación de osimertinib y telisotuzuamb (un ADC anti-*MET*) en tumores con sobreexpresión de *MET* ( $\geq 25$  % de células tumorales con

intensidad 3+).<sup>98</sup> Aunque la expresión de MET es un biomarcador sencillo, la clasificación de los pacientes por IHQ podría variar hasta en un 40 % entre las distintas áreas tumorales.<sup>99</sup>

También se examinó la eficacia del osimertinib con TKI específicos según el patrón de resistencia identificado con otros mecanismos de resistencia por derivación, como la fusión *RET*<sup>100,101</sup> y la mutación *BRAF V600E*,<sup>102,103</sup> aunque las pruebas son aún limitadas. El ensayo ORCHARD (NCT03944772) evalúa prospectivamente el papel de la estrategia basada en biomarcadores en la progresión con diferentes enfoques combinatorios junto con osimertinib. Cabe destacar que se informó de la eficacia del patritumab deruxtecán<sup>87</sup> en varios mecanismos de RA al TKI del EGFR, incluidos los mecanismos de derivación. Por último, otras posibles opciones de tratamiento agnóstico en tumores T790M negativos son la combinación de osimertinib con necitumumab (un anticuerpo monoclonal anti-EGFR)<sup>104</sup> o selumetinib (un inhibidor de la quinasa MAPK/quinasa regulada por señal extracelular [MEK/ERK]).<sup>105</sup>

### Transformación histológica

El mecanismo de transformación histológica de la RA se asocia a malos resultados clínicos. Los tumores con mutación *TP53* o *Rb* de referencia y firmas APOBEC hipermutadas tienen un mayor riesgo de transformación en cáncer de pulmón microcítico (CPM),<sup>106,107</sup> así como aquellos con amplificación *TERT* adquirida.<sup>108</sup> Los tumores con transformación en CPM conservan la mutación del *EGFR*,<sup>109</sup> lo que indica que no se trata de cánceres *de novo* independientes. Aunque la quimioterapia con platino-etopósido es el tratamiento estándar, su eficacia es limitada.<sup>110</sup> También se informó de la transformación en carcinoma de células escamosas en el 15 % de los tumores recidivantes tratados con osimertinib, independientemente de la línea de tratamiento.<sup>62</sup> Los tumores con transformación escamosa presentaron una complejidad genómica considerable, y sigue sin saberse si el mejor método de tratamiento debe ser la quimioterapia con o sin inhibidores de puntos de control inmunitario.

### Papel de la biopsia líquida

En la práctica diaria, debido a la localización o el tamaño de la progresión de la enfermedad, no todos los pacientes que inician tratamiento con los TKI del EGFR de primera, segunda o tercera generación son candidatos adecuados para nuevas biopsias tisulares en el momento de la progresión, lo que puede retrasar el inicio del tratamiento. Además, la heterogeneidad tumoral es un problema bien reconocido que hace que una sola biopsia tisular en un foco de metástasis no sea representativa de todo el panorama genómico del tumor en el momento de la progresión.<sup>111-113</sup> Por lo tanto, las biopsias líquidas se han establecido como buenas herramientas para la elaboración de perfiles genómicos tanto de referencia como en el momento de aparición de la RA. En la actualidad, la mayoría de los mecanismos de RA al osimertinib de primera línea se han informado basándose en la evaluación de la biopsia líquida.<sup>76</sup> (Véase también el capítulo 4.)

### Referencias

1. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):58. doi:10.1186/s12943-018-0782-4.
2. Purba ER, Saita EI, Maruyama IN. Activation of the EGF receptor by ligand binding and oncogenic mutations: the "rotation model." *Cells*. 2017;6(2):13. doi:10.3390/cells6020013.

3. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003;12(3):541-552. doi:10.1016/S1097-2765(03)00350-2.
4. Jura N, Endres NF, Engel K, et al. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment [published correction appears in *Cell*. 2009;138(3):604]. *Cell*. 2009;137(7):1293-1307. doi:10.1016/j.cell.2009.04.025.
5. Red Brewer M, Choi SH, Alvarado D, et al. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell*. 2009;34(6):641-651. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.034.
6. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 2006;125(6):1137-1149. doi:10.1016/j.cell.2006.05.013.
7. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-137. doi:10.1038/35052073.
8. Melosky B, Kambartel K, Häntschel M, et al. Worldwide prevalence of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Mol Diagn Ther*. 2022;26(1):7-18. doi:10.1007/s40291-021-00563-1.
9. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(48):78985-78993. doi:10.18632/oncotarget.12587.
10. D'Angelo SP, Pietanza MC, Johnson ML, et al. Incidence of EGFR exon 19 deletions and L858R in tumor specimens from men and cigarette smokers with lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2066-2070. doi:10.1200/JCO.2010.32.6181.
11. Ho HL, Kao HL, Yeh YC, Chou TY. The importance of EGFR mutation testing in squamous cell carcinoma or non-small cell carcinoma favor squamous cell carcinoma diagnosed from small lung biopsies. *Diagn Pathol*. 2019;14(1):59. doi:10.1186/s13000-019-0840-2.
12. Lin HM, Yin Y, Crossland V, Wu Y, Ou SI. EGFR testing patterns and detection of EGFR exon 20 insertions in the United States. *JTO Clin Res Rep*. 2022;3(3):100285. doi:10.1016/j.jtocrr.2022.100285.
13. Passaro A, Mok T, Peters S, Popat S, Ahn MJ, de Marinis F. Recent advances on the role of EGFR tyrosine kinase inhibitors in the management of NSCLC with uncommon, non exon 20 insertions, EGFR mutations. *J Thorac Oncol*. 2021;16(5):764-773. doi:10.1016/j.jtho.2020.12.002.
14. Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):4954-4955. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1387.
15. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H. Biomarker testing for patients with advanced non-small cell lung cancer: real-world issues and tough choices. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:531-542. doi:10.1200/EDBK\_237863.
16. Pan Q, Pao W, Ladanyi M. Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J Mol Diagn*. 2005;7(3):396-403. doi:10.1016/S1525-1578(10)60569-7.
17. Conde E, Angulo B, Tang M, et al. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 pt 1):710-717. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1362.
18. Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, et al. A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry. *PLoS One*. 2012;7(8):e43842. doi:10.1371/journal.pone.0043842.
19. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, et al. Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2013;66(5):381-385. doi:10.1136/jclinpath-2012-201240.
20. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): a hybridization capture-based next-generation sequencing clinical assay for solid tumor molecular oncology. *J Mol Diagn*. 2015;17(3):251-264. doi:10.1016/j.jmoldx.2014.12.006.
21. Passaro A, Leighl N, Blackhall F, et al. ESMO expert consensus statements on the management of EGFR mutant non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2022;33(5):466-487. doi:10.1016/j.annonc.2022.02.003.

22. Hess LM, Krein PM, Haldane D, Han Y, Sireci AN. Biomarker testing for patients with advanced/metastatic nonsquamous NSCLC in the United States of America, 2015 to 2021. *JTO Clin Res Rep*. 2022;3(6):100336. doi:10.1016/j.jtocrr.2022.100336.
23. Momeni-Boroujeni A, Salazar P, Zheng T, et al. Rapid EGFR mutation detection using the Idylla platform: single-institution experience of 1200 cases analyzed by an in-house developed pipeline and comparison with concurrent next-generation sequencing results. *J Mol Diagn*. 2021;23(3):310-322. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.11.009.
24. Bormann Chung C, Lee J, Barritault M, et al. Evaluating targeted next-generation sequencing assays and reference materials for NTRK fusion detection. *J Mol Diagn*. 2022;24(1):18-32. doi:10.1016/j.jmoldx.2021.09.008.
25. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients [published correction appears in *Nat Med*. 2017 Aug 4;23 (8):1004]. *Nat Med*. 2017;23(6):703-713. doi:10.1038/nm.4333.
26. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361(10):947-957. doi:10.1056/NEJMoa0810699.
27. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362(25):2380-2388. doi:10.1056/NEJMoa0909530.
28. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):735-742. doi:10.1016/S1470-2045(11)70184-X.
29. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246. doi:10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
30. Yang JCH, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):141-151. doi:10.1016/S1470-2045(14)71173-8.
31. Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):577-589. doi:10.1016/S1470-2045(16)30033-X.
32. Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol*. 2017;28(2):270-277. doi:10.1093/annonc/mdw611.
33. Wu YL, Cheng Y, Zhou X, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1454-1466. doi:10.1016/S1470-2045(17)30608-3.
34. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFR-activating mutations. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2244-2250. doi:10.1200/JCO.2018.78.7994.
35. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al. Updated overall survival in a randomized study comparing dacomitinib with gefitinib as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFR-activating mutations. *Drugs*. 2021;81(2):257-266. doi:10.1007/s40265-020-01441-6.
36. Jänne PA, Yang JCH, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1689-1699. doi:10.1056/NEJMoa1411817.
37. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(7):629-640. doi:10.1056/NEJMoa1612674.
38. Papadimitrakopoulou VA, Mok TS, Han JY, et al. Osimertinib versus platinum-pemetrexed for patients with EGFR T790M advanced NSCLC and progression on a prior EGFR-tyrosine kinase inhibitor: AURA3 overall survival analysis. *Ann Oncol*. 2020;31(11):1536-1544. doi:10.1016/j.annonc.2020.08.2100.

39. Ramalingam SS, Yang JCH, Lee CK, et al. Osimertinib as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):841-849. doi:10.1200/JCO.2017.74.7576.
40. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(2):113-125. doi:10.1056/NEJMoa1713137.
41. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. *N Engl J Med*. 2020;382(1):41-50. doi:10.1056/NEJMoa1913662.
42. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, et al. CNS response to osimertinib versus standard epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018;JCO2018783118. doi:10.1200/JCO.2018.78.3118.
43. Lu S, Dong X, Jian H, et al. AENEAS: a randomized phase III trial of aumolertinib versus gefitinib as first-line therapy for locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer with EGFR exon 19 deletion or L858R mutations. *J Clin Oncol*. 2022;40(27):3162-3171. doi:10.1200/JCO.21.02641.
44. Shi Y, Chen G, Wang X, et al. Furmonertinib (AST2818) versus gefitinib as first-line therapy for Chinese patients with locally advanced or metastatic EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (FURLONG): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 study. *Lancet Respir Med*. 2022;10(11):1019-1028. doi:10.1016/S2213-2600(22)00168-0.
45. Cho BC, Ahn M-J, Kang JH, et al. LBA7: a randomized, double-blind, multinational phase III study to assess the efficacy and safety of lazertinib versus gefitinib in the first-line treatment of patients with EGFR mutation (EGFRm), advanced NSCLC (LASER301; NCT04248829). *Ann Oncol*. 2022;33:S1560. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.349>.
46. Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1711-1723. doi:10.1056/NEJMoa2027071.
47. John T, Taylor A, Wang H, et al. Uncommon EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: a systematic literature review of prevalence and clinical outcomes. *Cancer Epidemiol*. 2022;76:102080. doi:10.1016/j.canep.2021.102080.
48. Keam B, Kim DW, Park JH, et al. Rare and complex mutations of epidermal growth factor receptor, and efficacy of tyrosine kinase inhibitor in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(4):594-600. doi:10.1007/s10147-013-0602-1.
49. Janning M, Süptitz J, Albers-Leischner C, et al. Treatment outcome of atypical EGFR mutations in the German National Network Genomic Medicine Lung Cancer (nNGM). *Ann Oncol*. 2022;33(6):602-615. doi:10.1016/j.annonc.2022.02.225.
50. Yang JCH, Sequist LV, Geater SL, et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):830-838. doi:10.1016/S1470-2045(15)00026-1.
51. Yang JC, Schuler M, Popat S, et al. Afatinib for the treatment of NSCLC harboring uncommon EGFR mutations: a database of 693 cases. *J Thorac Oncol*. 2020;15(5):803-815. doi:10.1016/j.jtho.2019.12.126.
52. Cho JH, Lim SH, An HJ, et al. Osimertinib for patients with non-small-cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations: a multicenter, open-label, phase II trial (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol*. 2020;38(5):488-495. doi:10.1200/JCO.19.00931.
53. Bar J, Peled N, Schokrpur S, et al. Uncommon EGFR mutations: international case series on efficacy of osimertinib in real-life practice in first line setting (UNICORN). *J Thorac Oncol*. 2022;S1556-0864(22)01854-8. doi:10.1016/j.jtho.2022.10.004.
54. Gallant JN, Sheehan JH, Shaver TM, et al. EGFR kinase domain duplication (EGFR-KDD) is a novel oncogenic driver in lung cancer that is clinically responsive to afatinib. *Cancer Discov*. 2015;5(11):1155-1163. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0654.
55. Wang J, Li X, Xue X, et al. Clinical outcomes of EGFR kinase domain duplication to targeted therapies in NSCLC. *Int J Cancer*. 2019;144(11):2677-2682. doi:10.1002/ijc.31895.
56. Lee C, Kim M, Kim DW, et al. Acquired resistance mechanism of EGFR kinase domain duplication to EGFR TKIs in non-small cell lung cancer. *Cancer Res Treat*. 2022;54(1):140-149. doi:10.4143/crt.2021.385.

57. Naidoo J, Sima CS, Rodriguez K, et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer*. 2015;121(18):3212-3220. doi:10.1002/cncr.29493.
58. Robichaux JP, Elamin YY, Tan Z, et al. Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nat Med*. 2018;24(5):638-646. doi:10.1038/s41591-018-0007-9.
59. Prelaj A, Bottiglieri A, Proto C, et al. Poziotinib for EGFR and HER2 exon 20 insertion mutation in advanced NSCLC: results from the expanded access program. *Eur J Cancer*. 2021;149:235-248. doi:10.1016/j.ejca.2021.02.038.
60. Zhou C, Ramalingam SS, Kim TM, et al. Treatment outcomes and safety of mobocertinib in platinum-pretreated patients with EGFR exon 20 insertion-positive metastatic non-small cell lung cancer: a phase 1/2 open-label nonrandomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2021;7(12):e214761. doi:10.1001/jamaoncol.2021.4761.
61. Park K, Haura EB, Leighl NB, et al. Amivantamab in EGFR exon 20 insertion-mutated non-small-cell lung cancer progressing on platinum chemotherapy: initial results from the CHRYSALIS phase I study. *J Clin Oncol*. 2021;39(30):3391-3402. doi:10.1200/JCO.21.00662.
62. Wang M, Yang JCH, Mitchell PL, et al. Sunvozertinib, a selective EGFR inhibitor for previously treated non-small cell lung cancer with EGFR exon 20 insertion mutations. *Cancer Discov*. 2022;12(7):1676-1689. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1615.
63. Yu HA, Tan DSW, Smit EF, et al. Phase (Ph) 1/2a study of CLN-081 in patients (pts) with NSCLC with EGFR exon 20 insertion mutations (Ins20). *J Clin Oncol*. 2022;40(16 suppl):9007. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.9007.
64. Lin Y, Hu Z, Zhang Y, et al. Preliminary clinical investigations of high-dose furmonertinib in NSCLC with EGFR exon 20 insertions (20ins). *J Clin Oncol*. 2022;40(16 suppl):e21029. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.e21029.
65. Attili I, Passaro A, Pisapia P, Malapelle U, de Marinis F. Uncommon EGFR compound mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review of available evidence. *Curr Oncol*. 2022;29(1):255-266. doi:10.3390/currenol29010024.
66. Passaro A, Jänne PA, Mok T, Peters S. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nat Cancer*. 2021;2(4):377-391. doi:10.1038/s43018-021-00195-8.
67. Du Z, Brown BP, Kim S, et al. Structure-function analysis of oncogenic EGFR kinase domain duplication reveals insights into activation and a potential approach for therapeutic targeting. *Nat Commun*. 2021;12(1):1382. doi:10.1038/s41467-021-21613-6.
68. Raez LE, Pinto JA, Schrock AB, Ali SM. EGFR-RAD51 fusion: a targetable partnership originated from the tumor evolution? *J Thorac Oncol*. 2018;13(3):e33-e34. doi:10.1016/j.jtho.2017.10.005.
69. Konduri K, Gallant JN, Chae YK, et al. EGFR fusions as novel therapeutic targets in lung cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(6):601-611. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0075.
70. Copia Sperandio R, Luiza Teixeira Tostes F, Vidal Campregher P, et al. EGFR-RAD51 fusion in lung adenocarcinoma with systemic and intracranial response to osimertinib: a case report and review of the literature. *Lung Cancer*. 2022;166:94-97. doi:10.1016/j.lungcan.2022.02.006.
71. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2866-2874. doi:10.1200/JCO.2010.33.4235.
72. Schoenfeld AJ, Chan JM, Kubota D, et al. Tumor analyses reveal squamous transformation and off-target alterations as early resistance mechanisms to first-line osimertinib in EGFR-mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(11):2654-2663. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3563.
73. Bauml J, Cho BC, Park K, et al. Amivantamab in combination with lazertinib for the treatment of osimertinib-relapsed, chemotherapy-naïve EGFR mutant (EGFRm) non-small cell lung cancer (NSCLC) and potential biomarkers for response. *J Clin Oncol*. 2021;39(15 suppl):9006. doi:10.1200/JCO.2021.39.15\_suppl.9006.
74. Geraud A, Mezquita L, Auclin E, et al. Chronic plasma exposure to kinase inhibitors in patients with oncogene-addicted non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):E3758. doi:10.3390/cancers12123758.

75. Piotrowska Z, Ahn MJ, Pang YK, et al. LBA53 ELIOS: a multicentre, molecular profiling study of patients (pts) with epidermal growth factor receptor-mutated (EGFRm) advanced NSCLC treated with first-line (1L) osimertinib. *Ann Oncol.* 2022;33:S1420-S1421. doi:10.1016/j.annonc.2022.08.055.
76. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, et al. Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann Oncol.* 2018;29:viii740. doi:10.1093/annonc/mdy424.063.
77. Papadimitrakopoulou VA, Wu YL, Han JY, et al. Analysis of resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR T790M advanced NSCLC from the AURA3 study. *Ann Oncol.* 2018;29:viii741. doi:10.1093/annonc/mdy424.064.
78. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, et al. Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib. *JAMA Oncol.* 2018;4(11):1527-1534. doi:10.1001/jamaoncol.2018.2969.
79. Wang S, Song Y, Liu D. EAI045: the fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Lett.* 2017;385:51-54. doi:10.1016/j.canlet.2016.11.008.
80. To C, Jang J, Chen T, et al. Single and dual targeting of mutant EGFR with an allosteric inhibitor. *Cancer Discov.* 2019;9(7):926-943. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0903.
81. Schalm SS, Dineen T, Lim SM, et al. BLU-945, a highly potent and selective 4th generation EGFR TKI for the treatment of EGFR T790M/C797S resistant NSCLC. *Ann Oncol.* 2020;31:S1391. doi:10.1016/j.annonc.2020.10.378.
82. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, et al. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies. *Clin Cancer Res.* 2015;21(17):3924-3933. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0560.
83. Conti C, Campbell J, Woessner R, et al. Abstract 1262: BLU-701 is a highly potent, brain-penetrant and WT-sparing next-generation EGFR TKI for the treatment of sensitizing (ex19del, L858R) and C797S resistance mutations in metastatic NSCLC. *Cancer Res.* 2021;81(13 suppl):1262-1262. doi:10.1158/1538-7445.AM2021-1262.
84. Nogami N, Barlesi F, Socinski MA, et al. IMpower150 final exploratory analyses for atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in key NSCLC patient subgroups with EGFR mutations or metastases in the liver or brain. *J Thorac Oncol.* 2022;17(2):309-323. doi:10.1016/j.jtho.2021.09.014.
85. Lu S, Wu L, Jian H, et al. ORIENT-31: phase III study of sintilimab with or without IBI305 plus chemotherapy in patients with EGFR mutated nonsquamous NSCLC who progressed after EGFR-TKI therapy. *Ann Oncol.* 2022;33(1):112-113. doi:10.1016/j.annonc.2021.10.007.
86. Mok TSK, Nakagawa K, Park K, et al. LBA8: nivolumab (NIVO) + chemotherapy (chemo) vs chemo in patients (pts) with EGFR-mutated metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC) with disease progression after EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in CheckMate 722. *Ann Oncol.* 2022;33:S1561-2. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.350>.
87. Jänne PA, Baik C, Su WC, et al. Efficacy and safety of patritumab deruxtecan (HER3-DXd) in EGFR inhibitor-resistant, EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2022;12(1):74-89. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0715.
88. Garon EB, Johnson ML, Lisberg AE, et al. Efficacy of datopotamab deruxtecan (Dato-DXd) in patients (pts) with advanced/metastatic (adv/met) non-small cell lung cancer (NSCLC) and actionable genomic alterations (AGAs): preliminary results from the phase I TROPION-PanTumor01 study. *Ann Oncol.* 2021;32:S1326-S1327. doi:10.1016/j.annonc.2021.08.2128.
89. Wu YL, Cheng Y, Zhou J, et al. Tepotinib plus gefitinib in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer with MET overexpression or MET amplification and acquired resistance to previous EGFR inhibitor (INSIGHT study): an open-label, phase 1b/2, multicentre, randomised trial. *Lancet Respir Med.* 2020;8(11):1132-1143. doi:10.1016/S2213-2600(20)30154-5.
90. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316(5827):1039-1043. doi:10.1126/science.1141478.

91. Wu YL, Zhang L, Kim DW, et al. Phase Ib/II study of capmatinib (INC280) plus gefitinib after failure of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor therapy in patients with EGFR-mutated, MET factor-dysregulated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(31):3101-3109. doi:10.1200/JCO.2018.77.7326.
92. Yang JJ, Fang J, Shu YQ, et al. A phase Ib study of the highly selective MET-TKI savolitinib plus gefitinib in patients with EGFR-mutated, MET-amplified advanced non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2021;39(2):477-487. doi:10.1007/s10637-020-01010-4.
93. Sequist LV, Han JY, Ahn MJ, et al. Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2020;21(3):373-386. doi:10.1016/S1470-2045(19)30785-5.
94. Yu HA, Ambrose H, Baik C, et al. ORCHARD osimertinib + savolitinib interim analysis: a biomarker-directed phase II platform study in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) whose disease has progressed on first-line (1L) osimertinib. *Ann Oncol*. 2021;32:S978-S979. doi:10.1016/j.annonc.2021.08.1844.
95. Ahn M, De Marinis F, Bonanno L, et al. EP08.02-140: MET biomarker-based preliminary efficacy analysis in SAVANNAH: savolitinib+osimertinib in EGFRm NSCLC post-osimertinib. *J Thorac Oncol*. 2022;17:S469-70. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.07.823>.
96. Mazieres J, Kim TM, Lim BK, et al. LBA52 Tepotinib + osimertinib for EGFRm NSCLC with MET amplification (METamp) after progression on first-line (1L) osimertinib: initial results from the INSIGHT 2 study. *Ann Oncol*. 2022;33:S1419-S1420. doi:10.1016/j.annonc.2022.08.054.
97. Shu CA, Goto K, Ohe Y, et al. Amivantamab and lazertinib in patients with EGFR-mutant non-small cell lung (NSCLC) after progression on osimertinib and platinum-based chemotherapy: updated results from CHRYSALIS-2. *J Clin Oncol*. 2022;40(16 suppl):9006. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.9006.
98. Goldman JW, Horinouchi H, Cho BC, et al. Phase 1/1b study of telisotuzumab vedotin (Teliso-V) + osimertinib (Osi), after failure on prior Osi, in patients with advanced, c-Met overexpressing, EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2022;40(16 suppl):9013. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.9013.
99. Casadevall D, Gimeno J, Clavé S, et al. MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget*. 2015;6(18):16215-16226. doi:10.18632/oncotarget.3976.
100. Piotrowska Z, Isozaki H, Lennerz JK, et al. Landscape of acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant NSCLC and clinical validation of combined EGFR and RET inhibition with osimertinib and BLU-667 for acquired RET fusion. *Cancer Discov*. 2018;8(12):1529-1539. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1022.
101. Rotow J, Patel J, Hanley M, et al. Combination osimertinib plus selpercatinib for EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC) with acquired RET fusions. *J Thorac Oncol*. 2021;16(3):S230. doi:10.1016/j.jtho.2021.01.150.
102. Meng P, Koopman B, Kok K, et al. Combined osimertinib, dabrafenib and trametinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer patients with an osimertinib-induced BRAF V600E mutation. *Lung Cancer*. 2020;146:358-361. doi:10.1016/j.lungcan.2020.05.036.
103. Valet O, Swalduz A, Boussageon M, et al. Response to the combination of osimertinib, dabrafenib, and trametinib in leptomeningitis from EGFR-mutant NSCLC with acquired BRAF V600E mutation: a case report. *JTO Clin Res Rep*. 2021;2(6):100192. doi:10.1016/j.jtocrr.2021.100192.
104. Riess JW, Krailo MD, Padda SK, et al. Osimertinib plus necitumumab in EGFR-mutant NSCLC: final results from an ETCTN California Cancer Consortium phase I study. *J Clin Oncol*. 2022;40(16 suppl):9014. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.9014.
105. Yang JCH, Ohe Y, Chiu CH, et al. Osimertinib plus selumetinib in EGFR-mutated, non-small cell lung cancer after progression on EGFR-TKIs: a phase 1b, open-label, multicenter trial (TATTON Part B). *Clin Cancer Res*. 2022;clincanres.4329.2022-1-26 08:36:37.517. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-4329.
106. Lee JK, Lee J, Kim S, et al. Clonal history and genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol*. 2017;35(26):3065-3074. doi:10.1200/JCO.2016.71.9096.

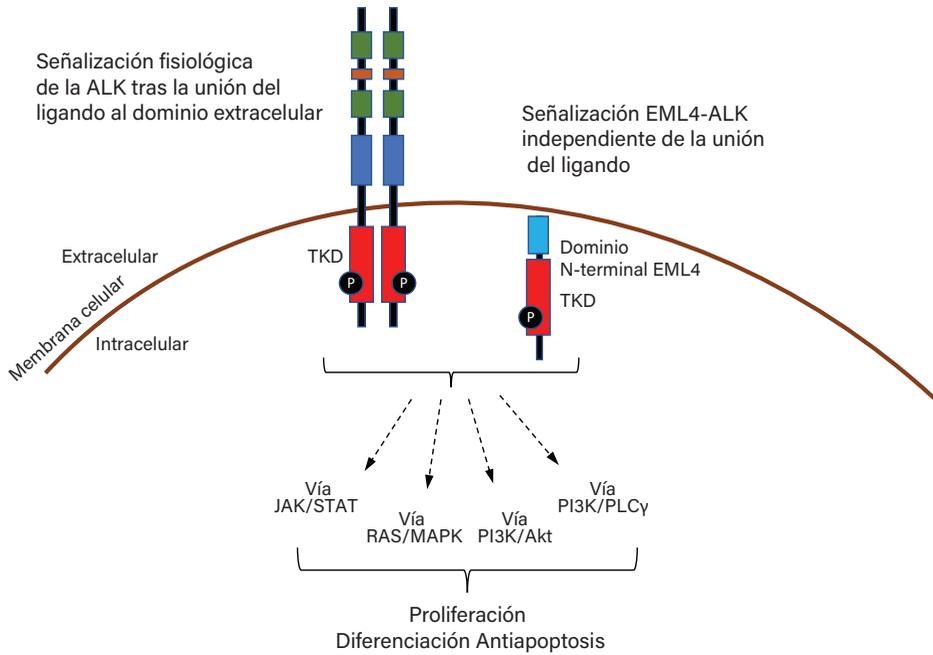
107. Offin M, Chan JM, Tenet M, et al. Concurrent RB1 and TP53 alterations define a subset of EGFR-mutant lung cancers at risk for histologic transformation and inferior clinical outcomes. *J Thorac Oncol.* 2019;14(10):1784-1793. doi:10.1016/j.jtho.2019.06.002.
108. McLeer A, Foll M, Brevet M, et al. Detection of acquired TERT amplification in addition to predisposing p53 and Rb pathways alterations in EGFR-mutant lung adenocarcinomas transformed into small-cell lung cancers. *Lung Cancer.* 2022;167:98-106. doi:10.1016/j.lungcan.2022.01.008.
109. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3(75):75ra26. doi:10.1126/scitranslmed.3002003.
110. Marcoux N, Gettinger SN, O’Kane G, et al. EGFR-mutant adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer and other neuroendocrine carcinomas: clinical outcomes. *J Clin Oncol.* 2019;37(4):278-285. doi:10.1200/JCO.18.01585.
111. Lim C, Sung M, Shepherd FA, et al. Patients with advanced non-small cell lung cancer: are research biopsies a barrier to participation in clinical trials? *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):79-84. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.006.
112. Piotrowska Z, Niederst MJ, Mino-Kenudson M, et al. Variation in mechanisms of acquired resistance among EGFR-mutant NSCLC patients with more than 1 postresistant biopsy: metastatic non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;90(5):S6-S7. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.08.032.
113. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, et al. Spatiotemporal T790M heterogeneity in individual patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer after acquired resistance to EGFR-TKI. *J Thorac Oncol.* 2015;10(11):1553-1559. doi:10.1097/JTO.0000000000000647.

## Estructura y función del gen *ALK*

El gen de la *quinasa del linfoma anaplásico* (anaplastic lymphoma kinase, *ALK*) está situado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23) y codifica un receptor tirosina quinasa que pertenece a la superfamilia del receptor de la insulina.<sup>1,2</sup> Codifica una proteína de 1620 aminoácidos que forma un receptor transmembrana de cadena única que comprende un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana y un dominio catalítico intracelular de quinasa (figura 8-1).<sup>1,2</sup> La proteína tiene una gran homología con los dominios intracelulares de la tirosina quinasa leucocitaria, así como con el c-ROS y la quinasa del receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina.<sup>1,2</sup> Al unirse al ligando, el receptor de la *ALK* experimenta una homodimerización, una fosforilación de la tirosina en el dominio quinasa y la posterior activación de múltiples vías de señalización descendentes, como la fosfoinositol 3-quinasa (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt, la PI3K/fosfolipasa C-gamma, la quinasa Janus/transductor de señal y activador de la transcripción (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) y la RAS/proteína quinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK), con papeles en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular.<sup>3-5</sup> Tanto la pleiotropina como la midquina se han propuesto como ligandos fisiológicos de la *ALK*, aunque existe cierta incertidumbre y otros no han podido corroborar los hallazgos.<sup>4-8</sup> La señalización en mamíferos a través de la *ALK* está implicada en el desarrollo del sistema nervioso y la supervivencia celular.<sup>1,2,9</sup> La expresión proteica se produce en el sistema nervioso durante el desarrollo y se reduce postnatalmente, observándose expresión en algunos nervios en adultos.<sup>1,2,9</sup>

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

Al igual que otros receptores tirosina quinasa, el potencial oncogénico de la *ALK* es el resultado de variantes genéticas activadoras, como reordenamientos, mutaciones o amplificaciones. Se describió originalmente en linfomas anaplásicos de células grandes, donde se descubrió que



**Figura 8-1.** Señalización ALK fisiológica tras la unión del ligando al dominio extracelular (*izquierda*) y señalización EML4-ALK constitutiva sin unión del ligando (*derecha*). Abreviaturas: JAK = Janus quinasa; MAPK = proteína quinasa activada por mitógeno; PI3K = fosfoinositol 3-quinasa; PLCγ = fosfolipasa C-gamma; STAT = transductor de señal y activador de la transcripción; TKD = dominio tirosina quinasa.

formaba un gen de fusión oncogénico con la nucleofosmina (*NPM1::ALK*) causado por una translocación entre los cromosomas 2 y 5 (2;5)(p23;q35).<sup>1,2</sup> Posteriormente se han descrito translocaciones activadoras oncogénicas en diversas neoplasias malignas, como el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), los tumores miofibroblásticos inflamatorios y, con menor frecuencia, en melanomas, mesoteliomas y diversos carcinomas, como el carcinoma colorrectal y el carcinoma de mama.<sup>4,10,11</sup>

En un subgrupo de adenocarcinomas de pulmón, se pueden producir translocaciones oncogénicas que afectan al *ALK*, la mayoría de las veces debido a una pequeña inversión en el cromosoma 2 que fusiona el extremo 3' del gen de la *ALK*, que contiene el dominio citoplasmático de la quinasa (exones 20-29) con el extremo N-terminal del gen de la proteína 4 similar a

**Tabla 8-1.** Variantes de fusión más comunes de *EML4::ALK*

Variantes	Tipos de fusión <i>EML4::ALK</i>	Frecuencia (%)
1	E13;A20	55
2	E20;A20	10
3a/b	E6a/b;A20	30
4	E14;ins11del49A20	3
5a/b	E2:A20 (5a), E2ins117A20 (5b)	1
6	E3;ins69A20	1
7	E14;del12A20	<1
8a/b	E17;ins30A20 (8a), E17ins30;ins65A20 (8b)	<1

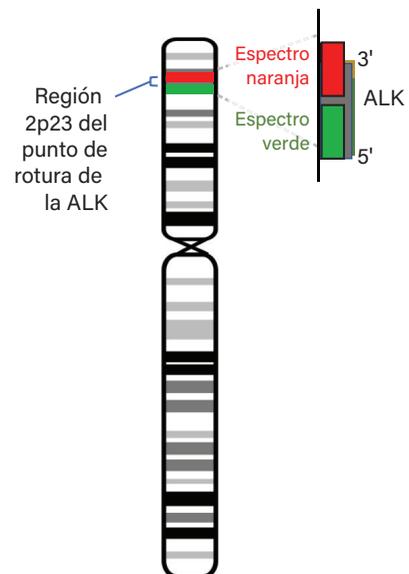
Adaptado de Choi *et al* y Li *et al*.<sup>18,19</sup>

la proteína asociada a microtúbulos equinodermos (echinoderm microtubule-associated protein-like 4, *EML4*), que codifica una proteína de 120 kDa crucial para la formación de microtúbulos (Inv[2] [p21;p23]).<sup>12-14</sup> Hasta la fecha se han descrito al menos 13 variantes de fusión *EML4::ALK*, y todas ellas incorporan la misma porción del *ALK* que codifica el dominio tirosina quinasa (tyrosine kinase domain, TKD) intracelular y longitudes variables del *EML4* que incluyen el dominio de hélice superenrollada (tabla 8-1).<sup>13,15-19</sup>

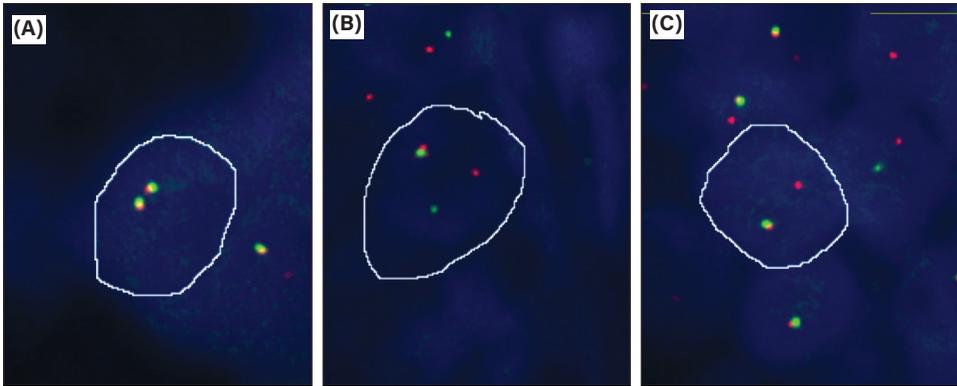
Además del *EML4*, que representa aproximadamente el 95 % de las fusiones asociadas al *ALK* en el CPNM, hasta la fecha se han identificado al menos 90 asociaciones nuevas diferentes, y el uso creciente de la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) acelera la identificación de asociaciones nuevas.<sup>12</sup> Las fusiones asociadas se localizan con mayor frecuencia en el brazo corto del cromosoma 2, pero también pueden estar en otros cromosomas e incluyen *KIF5B*, *TFG*, *KLC1*, *PTPN3*, *HIP1*, *STRN*, *TPR*, *DCTN1*, *SQSTM1*, *NPM1*, *BCL11A*, y *BIRC6*.<sup>10-12,15,20</sup> Los genes de fusión oncogénicos codifican oncoproteínas aberrantes, en su mayoría con actividad quinasa constitutiva, lo que conduce a propiedades oncogénicas que incluyen la proliferación y la supervivencia incontroladas.<sup>3,15</sup> Los genes de fusión aberrantes llevan característicamente a la sobreexpresión de la proteína *ALK*. También se ha descrito un aumento del número de copias del gen *ALK* en varios tumores, incluido el CPNM.<sup>10</sup> Las translocaciones del *ALK* son mutuamente excluyentes con otras alteraciones oncogénicas, aparte de los informes poco frecuentes de casos en la literatura. Se pueden producir mutaciones puntuales secundarias adquiridas en el CPNM tras la terapia con el inhibidor de la tirosina quinasa de la *ALK* (ALK tyrosine kinase inhibitor, ALKi) como mecanismo de resistencia adquirida.<sup>10</sup>

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

El adenocarcinoma de pulmón con reordenamiento del *ALK* constituye entre el 4 % y el 5 % de los adenocarcinomas de pulmón, con una incidencia similar informada en poblaciones asiáticas y no asiáticas.<sup>13,21</sup> Las fusiones del *ALK* se producen con mayor frecuencia en personas que nunca han fumado o en fumadores moderados, donde la incidencia es del 12 %, pero se asocian con menos solidez al sexo femenino que las mutaciones del *EGFR*.<sup>22</sup> La mediana de la edad de los pacientes con cáncer de pulmón con reordenamiento del *ALK* es unos 10 años menor que la de otros pacientes con CPNM, y una mayor proporción de personas presenta la enfermedad en estadio avanzado.<sup>21</sup> El reordenamiento del *ALK* en el cáncer de pulmón se asocia con solidez con la histología del adenocarcinoma, en particular con el patrón de crecimiento acinar y/o sólido, o con características celulares de carcinoma de células en anillo de sello.<sup>21</sup>



**Figura 8-2.** Esquema del diseño de la sonda de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de rotura del *ALK* con sonda marcada en naranja que se une al extremo 3' del *ALK* y sonda marcada en verde que se une al extremo 5' del *ALK*, con cada sonda a cada lado del punto de rotura.



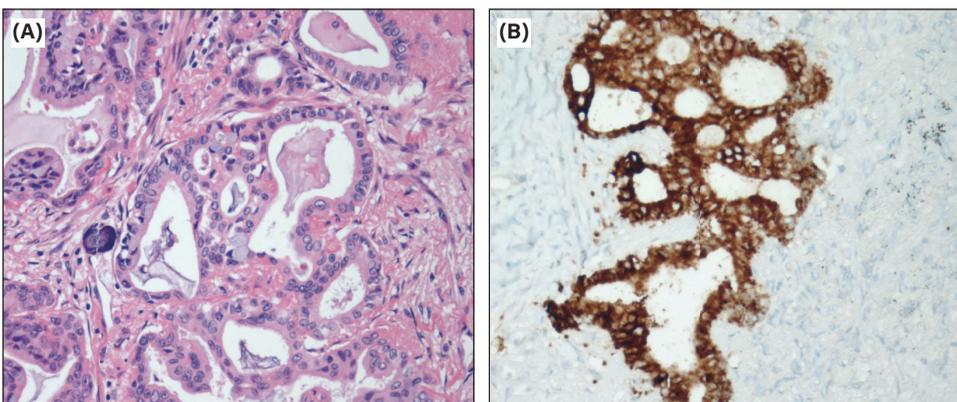
**Figura 8-3.** Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) del *ALK* utilizando una sonda de rotura. **(A)** Dos señales fusionadas que indican una célula sin reordenamiento del *ALK*. **(B)** Un par normal de señales fusionadas y una división de las señales roja 3' y verde 5' que indican una célula con un reordenamiento del *ALK*, independientemente de la fusión asociada. **(C)** Un par normal de señales fusionadas y una única señal roja 3' con el dominio quinasa del *ALK* también indica una célula positiva para el reordenamiento del *ALK*.

### Estrategias de prueba

La inmunohistoquímica (IHQ), la hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) o las pruebas de NGS se pueden utilizar para identificar los CPNM con reordenamiento del *ALK*.

### Hibridación fluorescente *in situ*

La FISH fue la primera prueba diagnóstica con fines terapéuticos utilizada para detectar fusiones del *ALK* en el CPNM. Se adoptaron sondas de rotura, en lugar de sondas de señal de fusión dual, para detectar un reordenamiento independientemente de la fusión asociada (figura 8-2). En la fusión *EML4::ALK* más frecuente, a menudo se observan señales de FISH divididas muy próximas debido a la pequeña inversión en el cromosoma 2. Una célula positiva por FISH se define por señales divididas con una separación de al menos el doble del diámetro de la señal más grande o la pérdida de la señal 5' en al menos el 15 % de las células con un mínimo de 50 células contadas (figura 8-3).



**Figura 8-4.** **(A)** Adenocarcinoma *ALK*-positivo con arquitectura cribiforme y unas pocas células en anillo de sello. **(B)** La inmunohistoquímica para *ALK* (clon D5F3) muestra una tinción citoplasmática positiva, que muy probablemente indica un reordenamiento del *ALK*.

### Inmunohistoquímica

La IHQ de la ALK que utiliza clones de alta sensibilidad, como D5F3 o 5A4, se puede utilizar de forma fiable como sustituto del reordenamiento funcional del *ALK* en el CPNM (figura 8-4).<sup>23</sup> Los primeros estudios descubrieron que la expresión de la proteína ALK fusionada era menor en el CPNM que en el linfoma, y se requieren clones de alta afinidad que utilicen métodos de detección más sensibles para la IHQ de la ALK en el CPNM. Las pruebas IHQ de la ALK son ahora una herramienta clínicamente estándar, y las pruebas IHQ comerciales, como Ventana ALK D5F3, han sido aprobadas como diagnósticas con fines terapéuticos para la selección del inhibidor anti-ALK alectinib en algunos países. Entre las posibles dificultades a la hora de interpretar la IHQ de la ALK se incluyen la interpretación de falsos negativos debido a la mucina intracelular citoplasmática y la tinción positiva en algunos carcinomas neuroendocrinos a pesar de la ausencia de fusiones del *ALK*.<sup>24</sup> Aunque la IHQ de la ALK que utiliza clones apropiados es muy sensible a los reordenamientos del *ALK*, se han informado numerosos casos de resultados discrepantes entre FISH e IHQ, y hay algunos datos que sugieren que los casos IHQ-positivos/FISH-negativos para ALK responden menos al tratamiento, incluso en el contexto de un evento de fusión probado por NGS.<sup>25,26</sup> No está clara la base de esta discrepancia ni el impacto aparentemente adverso en los resultados clínicos.

### Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

Inicialmente no se recomendaba la RT-PCR para la identificación clínica rutinaria de fusiones del *ALK* debido a la dificultad de obtener ARN de alta calidad a partir de tejido fijado en formalina e incrustado en parafina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) y a la presencia de múltiples patrones de fusión/genes asociados y el consiguiente riesgo de resultados falsos negativos.<sup>27</sup> Sin embargo, el ARN se puede conservar relativamente bien en muestras FFPE rutinarias manipuladas con métodos preanalíticos estandarizados y técnicas de extracción mejoradas, y en la actualidad se comercializan varias pruebas de RT-PCR que utilizan una curva de fusión. La principal limitación de la RT-PCR es la incapacidad de identificar nuevas fusiones no incluidas en el diseño de la prueba. Además, las pruebas NGS basadas en ARN, con una sensibilidad clínica mejorada, también confirmaron la detección fiable de fusiones del *ALK* utilizando ARN derivado de FFPE.

### Pruebas de secuenciación de nueva generación

Las fusiones del *ALK* se pueden detectar mediante NGS utilizando pruebas basadas en ADN o ARN a partir de FFPE y permiten la detección de variantes conocidas (pruebas basadas en amplicones) o de variantes de fusión tanto conocidas como desconocidas. Las pruebas de NGS tienen la ventaja de identificar la variante de fusión o la fusión asociada, así como la capacidad de probar simultáneamente alteraciones en otros genes además del *ALK*. Las limitaciones de las pruebas NGS en la identificación del CPNM con reordenamiento del *ALK* incluyen:

- Necesidad de cantidades relativamente grandes de tejido: las muestras de biopsia pequeñas o de citología escasas pueden no ser adecuadas para las pruebas NGS basadas en captura híbrida, dados los requisitos relativamente altos de ácidos nucleicos. Los paneles de *hot spot* basados en amplicones y la PCR multiplex anclada (anchored multiplex PCR, AMP)/NGS tienen la ventaja de que los requisitos de ADN/ARN son menores. La AMP/NGS es una forma de NGS dirigida que permite la detección de fusiones oncogénicas sin conocimiento previo de las fusiones asociadas.

- Falsos negativos en las pruebas NGS basadas en ADN: los puntos de rotura genómica en el ADN son más diversos en comparación con los patrones de fusión en el ARN. Por lo tanto, algunas fusiones ALK pueden pasar desapercibidas por la NGS de ADN y requerir la secuenciación del ARN para su identificación.<sup>28</sup>
- Sensibilidad subóptima para muestras con bajo contenido de células tumorales: dado que la NGS se basa en las frecuencias de alelos de interés, la detección de fusiones en muestras con bajas proporciones de células tumorales puede resultar difícil, aunque esto no es exclusivo de la evaluación del ALK. El código de barras molecular y la secuenciación profunda son útiles para intentar superar este desafío.

### Implicaciones clínicas

Los CPNM con reordenamiento del *ALK* son sumamente sensibles a las terapias con ALKi. Las pruebas históricas de los ensayos clínicos de fase 3 apoyaron por primera vez al ALKi crizotinib como tratamiento estándar de atención superior a la quimioterapia con dobles de platino en el 2014, con una marcada ventaja en la supervivencia libre de progresión (SLP) y la tolerabilidad, antes de que se confirmara la superioridad de la supervivencia global (SG) con un 57 % de pacientes vivos a los 4 años con crizotinib de primera línea.<sup>29,30</sup>

A medida que evolucionaba la experiencia, se informó de que el 70 % de los pacientes tratados con crizotinib sufrieron una progresión en el sistema nervioso central (SNC)<sup>31</sup>; intrínsecamente, el CPNM con reordenamiento del *ALK* conlleva una propensión a hacer metástasis en el cerebro, y alrededor del 25 % presentaba enfermedad del SNC en el momento del diagnóstico.<sup>29</sup>

En consecuencia, las terapias con ALKi de nueva generación se desarrollaron en primer lugar para ser activas en caso de fracaso del crizotinib y superar los mecanismos de resistencia al fármaco, para penetrar en gran proporción el cerebro y para proporcionar una mayor afinidad “en la diana” a la ALK.<sup>32-37</sup>

Una vez demostrada la seguridad y eficacia tras el tratamiento con crizotinib, los ALKi de segunda generación (ceritinib, alectinib, brigatinib y ensartinib) pasaron rápidamente a la fase 3 de investigación de primera línea. Todos demostraron superioridad respecto a su grupo de comparación, que fue la quimioterapia con ceritinib y crizotinib para el resto como estándar de atención en el diseño del ensayo.<sup>38-41</sup> En vista de la mediana de supervivencia numérica menor con ceritinib en comparación con las terapias con ALKi de segunda generación alternativas, y la menor tolerabilidad, ha disminuido el lugar del ceritinib en el paradigma de tratamiento empírico para la ALK. Sin embargo, la comparación cruzada entre ensayos de alectinib, brigatinib y ensartinib, concluye una SLP comparable, con una señal de mayor eficacia en el SNC con alectinib y brigatinib en comparación con el ensartinib. La mediana de la SLP más larga hasta la fecha se observó con alectinib a los 35 meses (evaluada por el investigador), así como datos maduros de fase 3 sobre la tasa de SG, con un 63 % vivo a los 5 años, y se espera que la mediana de la tasa de SG de todos los participantes supere los 8 años.<sup>42</sup>

Los perfiles de toxicidad entre las terapias con ALKi conllevan algunos efectos de clase consistentes y efectos adversos potenciales únicos entre las terapias con ALKi, que pueden llegar a ser clínicamente relevantes a la hora de seleccionar un ALKi alternativo en caso de una toxicidad inaceptable.

Los datos de fase 1 y 2 de un solo grupo de tercera generación con el ALKi de alta actividad y penetración cerebral lorlatinib establecieron ahora la eficacia en personas pretratadas después de 1 a múltiples líneas previas de ALKi.<sup>36,43</sup> El lorlatinib es eficaz en el contexto de mutaciones comunes que confieren resistencia a las terapias con ALKi de generación anterior.<sup>44</sup> La investigación de fase 3 de primera línea con lorlatinib (en comparación con crizotinib) arrojó ya datos provisionales positivos, sin que se haya alcanzado aún la mediana de SLP; sin embargo, los datos de referencia demuestran que el 64 % están libres de progresión a los 3 años, y el 50 % lo están en aquellos con metástasis en el SNC de referencia. Son los datos de supervivencia en primera línea inmaduros más convincentes hasta la fecha.<sup>45,46</sup>

En el 2022, las terapias con ALKi de cuarta generación han entrado en fase temprana de investigación, demostrando actividad preclínica en mutaciones compuestas de resistencia del *ALK*, incluidas las panresistentes a terapias previas con ALKi.<sup>47,48</sup> Se están llevando a cabo ensayos clínicos prospectivos de terapias combinadas novedosas, que incluyen terapias con ALKi con una terapia adicional, a menudo dirigida, para investigar si esta estrategia puede prevenir o superar la aparición de resistencia al fármaco, mejorar la supervivencia y preservar la tolerabilidad.

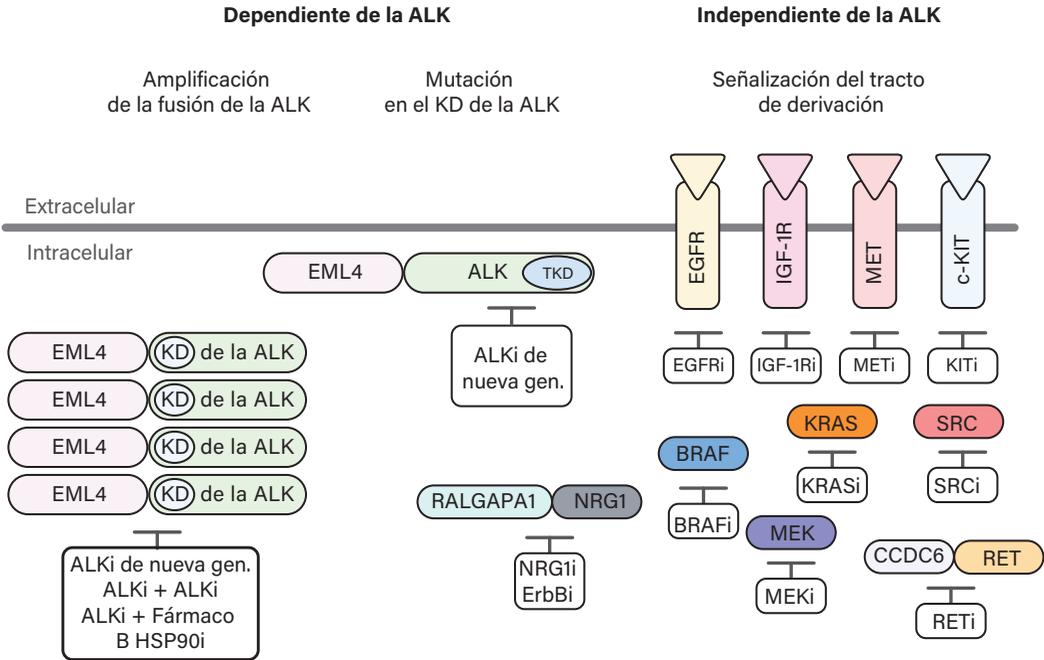
En la actualidad, no existen biomarcadores moleculares adicionales que guíen de forma rutinaria la selección de un ALKi específico en la práctica clínica habitual. La presencia de metástasis cerebrales de referencia o la intención de proteger el cerebro pueden ayudar a seleccionar la terapia óptima con ALKi. La mayoría de las personas recibirán cada línea de terapia de forma empírica con base en la disponibilidad del fármaco y los limitados datos de secuenciación.

## Mecanismos de resistencia

A pesar de la eficacia y tolerabilidad superiores de los ALKi en la enfermedad avanzada, la resistencia a los fármacos sigue siendo inevitable. El mecanismo subyacente se explica en parte porque estas terapias albergan mayores propiedades citostáticas que citotóxicas, dando lugar al fenómeno de la selección clonal.

Los mecanismos de resistencia a los fármacos se describieron por primera vez con el crizotinib y se clasificaron a grandes rasgos en resistencia primaria y adquirida (secundaria) y en mecanismos “adquiridos” a “dependientes de la *ALK*” o “independientes de la *ALK*”.<sup>49,50</sup> La resistencia primaria es poco frecuente y se puede deber a una genotipificación falsa positiva o a un fenotipo molecular o histológicamente diverso. En la resistencia secundaria, pocas veces se puede producir una transformación histológica, que incluye células pequeñas, escamosas o neuroendocrinas, y es probablemente más frecuente con las terapias con ALKi de última generación, que son más potentes contra la *ALK*.<sup>51,52</sup>

Los mecanismos dependientes de la *ALK* suelen implicar la aparición de una mutación de resistencia al *ALK*, que con frecuencia se produce en el bolsillo intracelular de unión al fármaco del TKD. Se han descrito en un 25 % a más del 50 % de los casos tratados con terapias con ALKi de primera y segunda generación y pueden implicar 1 o múltiples mutaciones que evolucionan en las mismas células tumorales o en clones de células tumorales diferentes.<sup>53</sup> Para determinar el mecanismo de resistencia, se requiere una biopsia tisular y/o líquida que utilice un amplio panel de secuenciación genética molecular, que capture tanto los genes no *ALK* clínicamente relevantes como el dominio quinasa de la *ALK* de la forma más integral posible.



**Figura 8-5.** Mecanismos de resistencia a los inhibidores de la ALK. Los mecanismos de resistencia pueden ser dependientes o independientes de la ALK y son heterogéneos dentro de los pacientes y entre ellos. Abreviaturas: HSP = proteína de choque térmico; i = inhibidor; KD = dominio quinasa; TKD = dominio tirosina quinasa. (Adaptado de Lovly.<sup>64</sup>)

Para el crizotinib, el TKD más común es la mutación “*gatekeeper*” L1196M, que bloquea directamente la unión al fármaco, mientras que con las terapias con ALKi de segunda generación, la más común es la mutación de frente solvente G1202R, que repele la unión al fármaco mediante impedimento estérico.<sup>44</sup> Se han descrito más de 50 mutaciones de resistencia al *ALK*, y los datos preclínicos y clínicos establecen la sensibilidad de las terapias con ALKi en presencia de una serie de mutaciones de resistencia emergentes que a menudo difieren entre las exposiciones al ALKi, dadas sus estructuras y propiedades moleculares únicas. Cuando se producen múltiples mutaciones del TKD, es más probable que estas sean resistentes a las terapias con ALKi de primera generación y, si ocurren de forma concurrente con la mutación G1202R, es más probable que también sean resistentes a lorlatinib.<sup>54</sup>

La variante individual de fusión del *ALK* puede predisponer aún más la eficacia duradera de los ALKi y dar lugar a un perfil de resistencia único debido a las diferentes estabilidades de la oncoproteína y vulnerabilidades genéticas. Ha habido informes preclínicos y clínicos que sugieren que la variante de fusión concreta puede predecir el rendimiento de los ALKi, y la variante 1 de la fusión *EML4::ALK*, la más común, sugiere una SLP superior con inhibidores de primera y segunda generación; sin embargo, la variante 3 de la fusión *EML4::ALK*, en comparación con la variante 1, muestra resultados superiores con lorlatinib.<sup>55-59</sup> Curiosamente, la variante albergada también puede predisponer a diferentes manifestaciones de resistencia, con mayor dependencia de la *ALK* en la variante 3 e independencia de la *ALK* en la variante 1.<sup>57</sup> Al margen de las mutaciones de resistencia al *ALK*, otro mecanismo de resistencia dependiente del *ALK* puede ser la ganancia de número de copias del gen *ALK* y el aumento de la expresión de la oncoproteína *ALK*; estas características no se prueban de forma

rutinaria, ni se han establecido las técnicas y los umbrales óptimos para definir la ganancia del número de copias del gen o del nivel de proteína clínicamente relevantes.

Los mecanismos de resistencia independientes de la ALK (activación de mecanismos mediados por vías de derivación) se pueden producir de forma aislada o, lo que es más habitual, en concierto con variantes de resistencia dependientes de la ALK y se pueden demostrar en más del 50 % de los pacientes tratados con ALKi de nueva generación (figura 8-5). La resistencia independiente de la ALK aumenta en frecuencia con las líneas de terapia recibidas y la exposición a ALKi de última generación. Los mecanismos de resistencia independientes de la ALK incluyen la activación de vías aberrantes secundaria a alteraciones en los genes *KRAS*, *ERBB2*, *BRAF*, *EGFR*, *MET*, *MEK*, *KIT*, y más.<sup>49,50,60-63</sup> Ciertas mutaciones concomitantes no *ALK* en el contexto del reordenamiento del *ALK* predicen una respuesta atenuada a la monoterapia con ALKi, siendo la más establecida la mutación *TP53*.<sup>58</sup> En el caso de la resistencia independiente de la ALK, faltan determinar las mejores estrategias terapéuticas. Los datos preclínicos y unos pocos informes de casos describen combinaciones terapéuticas dirigidas eficaces; sin embargo, el acceso a estas estrategias de combinación en la práctica puede ser limitado.<sup>63,65-67</sup> Los ensayos clínicos están examinando estrategias terapéuticas de combinación para todos los pacientes, no de forma personalizada informada por biomarcadores. Entre los ensayos que aparecen en ClinicalTrials.gov se incluyen la administración de terapias con ALKi con un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor, VEGF), SHP2 o MAPK; un segundo ALKi; o con quimioterapia o radioterapia.

## Referencias

- Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439-449.
- Morris SW, Naeve C, Mathew P, et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK) [published correction appears in *Oncogene* 1997 Dec 4;15(23):2883]. *Oncogene*. 1997;14(18):2175-2188.
- Lee CC, Jia Y, Li N, et al. Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem J*. 2010;430(3):425-437.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J*. 2009;420(3):345-361.
- Stoica GE, Kuo A, Aigner A, et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16772-16779.
- Guan J, Umapathy G, Yamazaki Y, et al. FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *Elife*. 2015;4:e09811.
- Perez-Pinera P, Zhang W, Chang Y, Vega JA, Deuel TF. Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *J Biol Chem*. 2007;282(39):28683-28690.
- Stoica GE, Kuo A, Powers C, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem*. 2002;277(39):35990-35998.
- Vernersson E, Khoo NK, Henriksson ML, et al. Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns*. 2006;6(5):448-461.
- Du X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*. 2018;9(4):423-430.
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. [published correction appears in *N Engl J Med*. 2011 Feb 10;364(6):588]. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693-1703.
- Ou SI, Zhu VW, Nagasaka M. Catalog of 5' fusion partners in ALK-positive NSCLC circa 2020. *JTO Clin Res Rep*. 2020;1(1):100015.

13. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-566.
14. Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(12):1450-1454.
15. Della Corte CM, Viscardi G, Di Liello R, et al. Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):30.
16. Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, et al. Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clin Cancer Res*. 2012;18(17):4682-4690.
17. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*. 2008;14(20):6618-6624.
18. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2008;68(13):4971-4976.
19. Li T, Maus MK, Desai SJ, et al. Large-scale screening and molecular characterization of EML4-ALK fusion variants in archival non-small-cell lung cancer tumor specimens using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Thorac Oncol*. 2014;9(1):18-25.
20. Kang J, Deng QM, Peng KC, et al. Clinicopathological features and resistance mechanisms in HIP1-ALK-rearranged lung cancer: a multicenter study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022;61(4):177-186.
21. Fan L, Feng Y, Wan H, Shi G, Niu W. Clinicopathological and demographical characteristics of non-small cell lung cancer patients with ALK rearrangements: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e100866.
22. Paik PK, Johnson ML, D'Angelo SP, et al. Driver mutations determine survival in smokers and never-smokers with stage IIIB/IV lung adenocarcinomas. *Cancer*. 2012;118(23):5840-5847.
23. Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2013;26(12):1545-1553.
24. Akhoundova D, Haberecker M, Fritsch R, et al. Targeting ALK in neuroendocrine tumors of the lung. *Front Oncol*. 2022;12:911294.
25. Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, et al. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape project. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2780-2787.
26. Mok T, Peters S, Camidge DR, et al. Outcomes according to ALK status determined by central immunohistochemistry or fluorescence in situ hybridization in patients with ALK-positive NSCLC enrolled in the phase 3 ALEX study. *J Thorac Oncol*. 2021;16(2):259-268.
27. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology [published correction appears in *J Thorac Oncol*. 2013 Oct;8(10):1343]. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-859.
28. Benayed R, Offin M, Mullaney K, et al. High yield of RNA sequencing for targetable kinase fusions in lung adenocarcinomas with no mitogenic driver alteration detected by DNA sequencing and low tumor mutation burden. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4712-4722.
29. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer [published correction appears in *N Engl J Med*. 2015 Oct 15;373(16):1582]. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2167-2177.
30. Solomon BJ, Kim DW, Wu YL, et al. Final overall survival analysis from a study comparing first-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-mutation-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2251-2258.
31. Costa DB, Shaw AT, Ou SH, et al. Clinical experience with crizotinib in patients with advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastases. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1881-1888.
32. Shaw AT, Kim TM, Crinò L, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):874-886.
33. Novello S, Mazières J, Oh IJ, et al. Alectinib versus chemotherapy in crizotinib-pretreated anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-small-cell lung cancer: results from the phase III ALUR study. *Ann Oncol*. 2018;29(6):1409-1416.

34. Gettinger SN, Bazhenova LA, Langer CJ, et al. Activity and safety of brigatinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and other malignancies: a single-arm, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):1683-1696.
35. Popat S, Liu G, Lu S, et al. Brigatinib vs alectinib in crizotinib-resistant advanced anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer (ALTA-3). *Future Oncol.* 2021;17(32):4237-4247.
36. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2019 Jan;20(1):e10]. *Lancet Oncol.* 2018;19(12):1654-1667.
37. Horn L, Infante JR, Reckamp KL, et al. Ensartinib (X-396) in ALK-positive non-small cell lung cancer: results from a first-in-human phase I/II, multicenter study. *Clin Cancer Res.* 2018;24(12):2771-2779.
38. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2017;389(10072):917-929.
39. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(9):829-838.
40. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, et al. Brigatinib versus crizotinib in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(21):2027-2039.
41. Horn L, Wang Z, Wu G, et al. Ensartinib vs crizotinib for patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2021;7(11):1617-1625.
42. Mok T, Camidge DR, Gadgeel SM, et al. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study. *Ann Oncol.* 2020;31(8):1056-1064.
43. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(12):1590-1599.
44. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov.* 2016;6(10):1118-1133.
45. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(21):2018-2029.
46. Solomon B, Bauer T, Mok T, et al. Updated efficacy and safety from the phase 3 CROWN study of first-line lorlatinib vs crizotinib in advanced anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) [AACR conference abstract CT223]. *Cancer Res.* 2022;82(12 suppl):CT223.
47. Murray BW, Zhai D, Deng W, et al. TPX-0131, a potent CNS-penetrant, next-generation inhibitor of wild-type ALK and ALK-resistant mutations. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(9):1499-1507.
48. Pelish HE, Tangpeerachaikul A, Kohl NE, et al. NUV-655 (NVL-655) is a selective, brain-penetrant ALK inhibitor with antitumor activity against the lorlatinib-resistant G1202R/L1196M compound mutation. Abstract 1468. *Cancer Res.* 2021;81(13 suppl):1468.
49. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med.* 2012;4(120):120ra17.
50. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1472-1482.
51. Balla A, Khan F, Hampel KJ, Aisner DL, Sidiropoulos N. Small-cell transformation of ALK-rearranged non-small-cell adenocarcinoma of the lung. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2018;4(2):a002394.
52. Fares AF, Lok BH, Zhang T, et al. ALK-rearranged lung adenocarcinoma transformation into high-grade large cell neuroendocrine carcinoma: clinical and molecular description of two cases. *Lung Cancer.* 2020;146:350-354.
53. Gainor J. Next generation ALK inhibitors and mechanisms of resistance to therapy. *Ann Oncol.* 2015;26(suppl 2):iii14.
54. Yoda S, Lin JJ, Lawrence MS, et al. Sequential ALK inhibitors can select for lorlatinib-resistant compound ALK mutations in ALK-positive lung cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(6):714-729.

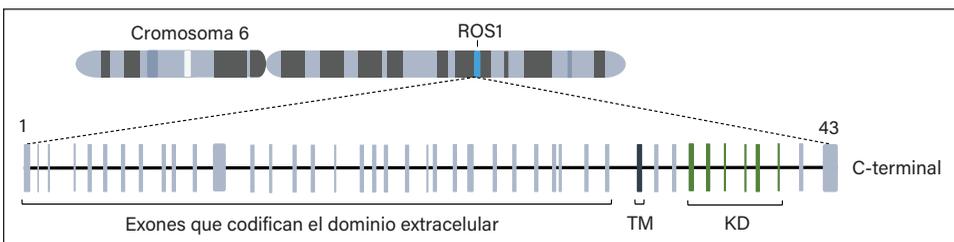
55. Ruano-Ravina A, Provencio-Pulla M. Differential crizotinib response duration among ALK fusion variants in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Transl Cancer Res.* 2017;S54-S56.
56. Camidge DR, Dziadziuszko R, Peters S, et al. Updated efficacy and safety data and impact of the EML4-ALK fusion variant on the efficacy of alectinib in untreated ALK-positive advanced non-small cell lung cancer in the global phase III ALEX study [published correction appears in *J Thorac Oncol.* 2019 Nov;14(11):2023]. *J Thorac Oncol.* 2019;14(7):1233-1243.
57. Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, et al. Impact of EML4-ALK variant on resistance mechanisms and clinical outcomes in ALK-positive lung cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(12):1199-1206.
58. Camidge R, Niu H, Kim HY, et al. Correlation of baseline molecular and clinical variables with ALK inhibitor efficacy in ALTA-1L. *J Clin Oncol.* 2020;38(15 suppl):9517-9517.
59. Childress MA, Himmelberg SM, Chen H, et al. ALK fusion partners impact response to ALK inhibition: differential effects on sensitivity, cellular phenotypes, and biochemical properties. *Mol Cancer Res.* 2018;16(11):1724-1736.
60. Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science.* 2014;346(6216):1480-1486.
61. Lovly CM, Shaw AT. Molecular pathways: resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2249-2256.
62. Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2014;4(6):662-673.
63. Dagogo-Jack I, Yoda S, Lennerz JK, et al. MET alterations are a recurring and actionable resistance mechanism in ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(11):2535-2545.
64. Lovly CM. Combating acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2015;e165-e173. doi:10.14694/EdBook\_AM.2015.35.e165.
65. Miyawaki M, Yasuda H, Tani T, et al. Overcoming EGFR bypass signal-induced acquired resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors in ALK-translocated lung cancer. *Mol Cancer Res.* 2017;15(1):106-114.
66. Tanizaki J, Okamoto I, Okabe T, et al. Activation of HER family signaling as a mechanism of acquired resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6219-6226.
67. Tanizaki J, Okamoto I, Takezawa K, et al. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer.* 2012;106(4):763-767.

## Estructura y función de los genes

El protooncogén ROS 1 (ROS1) es un receptor tirosina quinasa (receptor tyrosine kinase, RTK) que pertenece a la familia de los receptores de insulina y es evolutivamente próximo a la familia ALK. El gen *ROS1* se ubica en el cromosoma 6 (región 6q22.1) y codifica una proteína receptora transmembrana con características únicas. El dominio extracelular N-terminal abarca los exones 1 a 32, lo que lo convierte en uno de los dominios extracelulares más grandes de toda la familia RTK humana. La parte C-terminal de *ROS1* codifica un dominio quinasa (kinase domain, KD) y un único dominio transmembrana (transmembrane, TM) (figura 9-1). Se conoce muy poco acerca del papel fisiológico de la proteína ROS1 de tipo salvaje, y no se han identificado sus ligandos en humanos.<sup>1,2</sup>

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

Los reordenamientos oncogénicos del gen *ROS1* se producen en el extremo 5' de los exones 32, 34, 35 o 36, o en los intrones 31 o 33.<sup>3,4</sup> El dominio extracelular coil-coil no se incluye en las fusiones de *ROS1*, en contraste con el KD intracitoplasmático, que se fusiona con el extremo N-terminal de los genes compañeros. Los principales genes compañeros identificados son *CD74* (38 %-54 %), *EZR* (13 %-24 %), *SDC4* (9 %-13 %), *SLC34A2* (5 %-10 %), *TPM3* (3 %-15 %) y



**Figura 9-1.** Esquema del gen *ROS1* en el cromosoma 6. Abreviaturas: KD = dominio quinasa; TM = transmembrana.

*FIG* o *GOPC* (2 %-3 %), con hasta 28 compañeros más reportados hasta la fecha, pero que representan menos del 1 % cada uno.<sup>5</sup> La proteína de fusión *ROS1* es una quinasa activada con propiedades oncogénicas, que puede activar diferentes vías de señalización a través de la fosforilación, como la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)-AKT-diana mecánica de la rapamicina quinasa (mTOR), implicada en la diferenciación, proliferación, crecimiento y supervivencia celular. Las fusiones oncogénicas del *ROS1* pueden ocurrir en una gran variedad de cánceres diferentes al cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), incluyendo el glioblastoma, el colangiocarcinoma, y el tumor miofibroblástico inflamatorio. No se han reportado mutaciones o amplificaciones activadoras del gen *ROS1* en el CPNM, y los reordenamientos de *ROS1* que ocurren con mutaciones concomitantes son muy poco frecuentes, representados principalmente por mutaciones del *EGFR* o *KRAS*.<sup>6</sup>

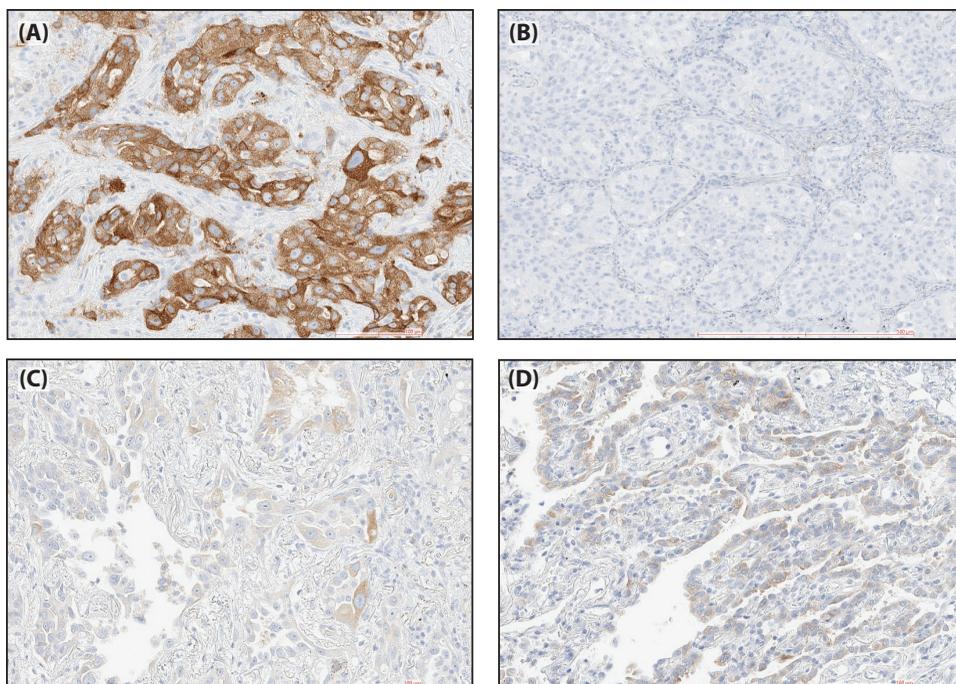
### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Las fusiones del *ROS1* son poco frecuentes en el cáncer de pulmón con un rango de frecuencia del 0,9 % al 2,9 %. Estas fusiones son más prevalentes en pacientes jóvenes, mujeres, y personas que nunca han fumado.<sup>7,8</sup> Suelen diagnosticarse en pacientes con adenocarcinomas positivos para el factor de transcripción tiroideo 1 (thyroid transcription factor-1, TTF1) en estadio avanzado<sup>1,9</sup> y solo muy rara vez se encuentran en carcinomas de células escamosas o de células grandes.<sup>10</sup> Los tumores con reordenamiento del *ROS1* suelen tener una arquitectura sólida, a menudo con características cribiformes, un estroma rico en cuerpos de psamoma y células tumorales en anillo de sello.<sup>10</sup> Los pacientes pueden tener un mayor riesgo de tromboembolias y coagulación intravascular diseminada.<sup>11,12</sup>

### Estrategias de prueba

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es el modelo estándar para la detección de la fusión del *ROS1*, y la mayoría de los laboratorios utilizan sondas de rotura de doble color (por ejemplo, sonda de rotura de doble color para *ROS1* [CytoCell], sonda de rotura de doble color para *ROS1* ZytoLight SPEC [ZytoVision/Zytomed], o sonda de rotura por FISH para *ROS1* Vysis [Abbott]). El principio consiste en etiquetar la parte 3' (centromérica) del punto de rotura de la fusión con 1 fluorocromo y la parte 5' (telomérica) con otro fluorocromo. Se consideran diagnósticos dos patrones de reordenamiento de *ROS1*. Uno es el patrón clásico de rotura, con 1 señal de fusión (*ROS1* nativa) y 2 señales 3' y 5' separadas. El otro, denominado *atípico*, tiene en cuenta una señal 3' (verde) aislada, con 1 señal de fusión (*ROS1* nativa) y ninguna señal 5'.<sup>2,13,14</sup> Se deben analizar al menos 50 células tumorales, idealmente 100, y el umbral de positividad es del 15 % o más de células positivas. Un recuento de 5 a 25 células positivas se considera no concluyente y necesita un segundo análisis por otro observador.

Dado que los reordenamientos del *ROS1* son poco frecuentes, y que la prueba FISH requiere mucho tiempo y no está implementada en todos los laboratorios de patología, puede utilizarse la inmunohistoquímica (IHQ) como técnica de cribado.<sup>15</sup> Existen tres anticuerpos anti-*ROS1* comercializados: el clon D4D6 (Cell Signaling Technology), utilizado en estudios clínicos; el clon SP384 (Roche Tissue Diagnostics, anteriormente conocido como Ventana); y el clon 1A1 (Origene). Todos ellos tienen una alta sensibilidad (90 %-100 %) en comparación con la prueba FISH y la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS), pero con una especificidad menor, que oscila entre el 70 % y el 90 %, y se requiere



**Figura 9-2.** (A) Inmunohistoquímica (IHQ) para ROS1 (clon D4D6) adenocarcinoma de pulmón con fusión *CD74::ROS1*; tinción citoplasmática fuerte y difusa. (B) IHQ para ROS1 (clon D4D6) en un adenocarcinoma de pulmón con mutación del exón 21 p.L858R del gen *EGFR*; sin tinción. (C) IHQ para ROS1 (clon D4D6) en un adenocarcinoma de pulmón con mutación del exón 21 p.L858R del gen *EGFR*; tinción citoplasmática débil y focal. (D) IHQ para ROS1 (clon D4D6) en un adenocarcinoma de pulmón con fusión *KIF5B::RET*; tinción citoplasmática débil y focal.

la prueba FISH u otras técnicas moleculares para confirmar el reordenamiento del *ROS1* en tumores IHQ-positivos.<sup>2</sup> Se recomienda encarecidamente el uso de un control externo positivo, como una muestra tumoral o línea celular con reordenamiento del *ROS1*, así como la participación en programas externos de control de calidad. Aunque no existe un sistema de puntuación universalmente aceptado, es más probable que una tinción citoplasmática fuerte y difusa indique un tumor con reordenamiento del *ROS1*-que una tinción en parches.<sup>16</sup> Aunque la tinción suele ser citoplasmática y granular, en algunas variantes (*CD74* y *EZR*) se han descrito tinciones en el aparato de Golgi o en la membrana.<sup>14</sup> Cabe destacar que a menudo se tiñen los neumocitos normales de tipo II y macrófagos, así como un tercio de los CPNM determinados por *EGFR*, *ALK* o *MET*<sup>13,17</sup> (figura 9-2). Para confirmar la fusión del *ROS1* en tumores IHQ-positivos se requiere y se puede realizar por medio de la prueba FISH o técnicas moleculares. Estas últimas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) multiplex y la NGS.<sup>15</sup> Se prefiere la NGS híbrida basada en ADN-ARN o en ARN diseñada para detectar reordenamientos en regiones intrónicas.<sup>18</sup> Curiosamente, las tecnologías de perfil genómico integral son ahora capaces de detectar cualquier fusión en hasta el 92 % de las muestras de ADN tumoral circulante (ADNtc) y 10 de 13 fusiones del *ROS1*.<sup>19</sup>

### **Implicaciones clínicas: tratamiento de tumores *ROS1* en pacientes con CPNM**

El crizotinib y el entrectinib son los dos agentes aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) y la Agencia

**Tabla 9-1.** Inhibidores de ROS1 (aprobados y en desarrollo)

TKI	Fase (estudio clínico)	N	TRG (%)	mSLP (meses)	mSG (meses)
Crizotinib	1 y 2 (Profile 1001)	53	72	19	51
	1 y 2 (AcSé)	36	47	6	17
	2 (EUCROSS)	34	70	20	NR
	2 (METROS)	26	65	23	NR
Ceritinib	2	32	62	19	24
Entrectinib	2 (STARTRK 1/2, ALKA 372)	172	69	18	NR
Lorlatinib	1 y 2	69	62 <sup>a</sup>	21	NA
			35 <sup>b</sup>	9	NA
Cabozantinib	2	6	33	NA	NA
Taletrectinib	2	40	90 <sup>c</sup>	NA	NA
			47 <sup>d</sup>	NA	NA
Repotrectinib	2	55	86	30,9	NA
Ensartinib	2	59	27	NA	NA
TQ-B3101	2	111	78	15	NA

Abreviaturas: mOS = mediana de supervivencia global; mSLP = mediana de supervivencia libre de progresión; NA = no aplicable; NR = no informado; TRG = tasa de respuesta global; TKI = inhibidor de la tirosina quinasa

<sup>a</sup> Entorno de primera línea.

<sup>b</sup> Entorno de segunda línea y más allá.

<sup>c</sup> Sin tratamiento previo con crizotinib.

<sup>d</sup> Resistencia al crizotinib.

Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento del CPNM con reordenamiento del *ROS1*-<sup>20-23</sup>, aunque también se han desarrollado otros agentes (tabla 9-1).

El crizotinib tiene actividad contra los tumores con reordenamientos de *ALK* y *ROS1*, y fue aprobado con base en el ensayo PROFILE 1001 para el CPNM metastásico con reordenamiento del *ROS1*, con una tasa de respuesta global (TRG) del 72 %, una tasa de control de la enfermedad (DCR) del 90 %, una mediana de duración de la respuesta (DOR) de 24,7 meses, y una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) de 19,3 y 51,4 meses, respectivamente.<sup>24</sup> En el ensayo de fase 3 AcSé se observó una TRG del 47,2 %, con una mediana de la SLP y la SG de 5,5 y 17,2 meses, respectivamente.<sup>25</sup> Los estudios EUCROSS y METROS mostraron una TRG del 70 % y el 65 %, respectivamente, con una mediana de la SLP de 20 y 22,8 meses.<sup>26,27</sup> Los efectos secundarios más frecuentes, todos de grado 1 y 2, fueron alteraciones de la visión (82 %), diarrea (44 %) y náuseas (40 %). Dado que el crizotinib tiene una baja penetración en el sistema nervioso central (SNC), se desarrollaron metástasis cerebrales en hasta el 47% de los pacientes, además del 36% de los pacientes con CPNM con reordenamiento del *ROS1*- que tenían metástasis cerebrales en el momento del diagnóstico.<sup>9,28</sup>

El ceritinib tiene actividad contra los tumores con reordenamientos de *ALK* y *ROS1*<sup>29</sup>, y en un estudio de fase 2, 32 CPNM con reordenamiento del *ROS1*, la mayoría en entornos de primera línea (1L), alcanzaron una TRG del 62 % y una mediana de SLP de 9,3 meses<sup>30</sup>; 8 pacientes con metástasis cerebrales tuvieron una TRG del 63 %. El perfil de toxicidad fue aceptable con un 37 % de eventos adversos grado 3

El entrectinib actúa contra las fusiones de *ROS1*, *ALK* y *NTRK* en el CPNM.<sup>23</sup> El estudio de fase 2 STARTRK-2 confirmó la eficacia del entrectinib en 172 pacientes con CPNM con reordenamiento del *ROS1*,<sup>31,32</sup> con una TRG del 69 %, una mediana de SLP de 17,7 meses y una mediana de SG a 1 año del 81 %. Debido a su penetración del SNC, la TRG fue del 79,2 % en pacientes con metástasis cerebrales. Los eventos adversos más frecuentes fueron disgeusia (41,4 %), fatiga (27,9 %), vértigo (25,4 %), y estreñimiento (23,7 %).

El lorlatinib tiene actividad contra *ALK* y *ROS1*, con una TRG en pacientes de 1L del 62 %, una mediana de SLP de 21 meses y una TRG cerebral del 64 %.<sup>33-35</sup> En pacientes ya tratados con crizotinib, la TRG, la mediana de SLP y la TRG intracerebral fueron del 35 %, 8,5 meses y 50 %, respectivamente. Los eventos adversos más frecuentes de grados 3 o 4 se produjeron en el 43 % y el 6 % de los pacientes, respectivamente, siendo los más frecuentes la hipercolesterolemia (65 %), la hipertrigliceridemia (42 %), el edema periférico (39 %) y las neuropatías periféricas (35 %).

El repotrectinib puede dirigirse contra *ROS1*, *NTRK* o *ALK* y tiene actividad en el SNC. Los modelos preclínicos mostraron actividad antitumoral frente a metástasis cerebrales, tumores sin tratamiento previo, tumores resistentes al ceritinib y tumores con mutación resistente a 1G2032R.<sup>36</sup> Está en marcha un ensayo clínico de fase 1 y 2.

El ensartinib (X-396) es un inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) con eficacia demostrada contra *ALK*,<sup>37</sup> y un ensayo de fase 2 de CPNM positivo para *ROS1* mostró una eficacia baja con una TRG del 27 % pero actividad en el SNC en tres cuartas partes de los pacientes.<sup>38</sup>

### Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia en la diana incluyen mutaciones adquiridas del *ROS1*,<sup>39-45</sup> siendo G2032R la más común seguida de D2033N, y ambas son mutaciones de frente solvente. Cabe destacar que L2086F se está convirtiendo en una mutación de resistencia importante, ya que confiere resistencia a todos los TKI *ROS1* de tipo I (crizotinib, lorlatinib, talectrectinib).<sup>43-45</sup> Otras mutaciones de resistencia adquirida poco comunes incluyen las mutaciones “gatekeeper” L2026M, G2032K, S1986F/Y, L2000V y F2004V.<sup>39-45</sup>

El lorlatinib es eficaz contra las mutaciones de resistencia K1991E o S1986F, pero es más limitado contra la mutación G2032R33,<sup>33,46</sup> y tras el fracaso con entrectinib.<sup>47</sup> El uso secuencial de crizotinib y lorlatinib ha dado lugar a mutaciones compuestas de G2032R/L2086F, pero afortunadamente se espera que el cabozantinib supere estas mutaciones compuestas.<sup>44,48</sup> Se dirige selectivamente a MET, VEGFR2, RET, *ROS1* y AXL, con buena penetración cerebral. Puede utilizarse para superar la resistencia contra crizotinib, ceritinib y entrectinib a pesar de la presencia de mutaciones de resistencia, como D2033N o G2032R.<sup>30,49,50</sup> El brigatinib, otro inhibidor de *ROS1*, ha demostrado actividad antitumoral contra varios mecanismos de resistencia a crizotinib,<sup>51</sup> incluida la mutación L2026M, pero no contra la mutación G2032R.<sup>51-53</sup> El talectrectinib es un inhibidor de *ROS1* y *NTRK* dirigido a CPNM resistentes con reordenamiento de *ROS1*,<sup>48</sup> con actividad *in vitro* frente a las mutaciones G2032R, L1951R, S1986F y L2026M, pero menor frente a la mutación D2033N.

Los mecanismos de resistencia fuera de la diana incluyen la amplificación de *MET*, las mutaciones de *KRAS* y la transformación de pequeñas células del pulmón.<sup>46,54,55</sup> Por último, como en todos los CPNM con fusión RTK positiva, la progresión en el SNC es siempre un mecanismo de resistencia,<sup>56</sup> y los TKI *ROS1* que confieren actividad en el SNC

y superan muchas de las mutaciones de *ROS1* adquiridas pronosticadas en los CPNM con reordenamiento de *ROS1* deberían ser el tratamiento de elección en este entorno.

Recientemente, durante el Congreso Europeo sobre Cáncer de Pulmón (ELCC) del 2022, se dieron a conocer los datos de TQ-B3101, un nuevo inhibidor de RTK de molécula pequeña dirigido a ALK, *ROS1* y MET, que demostró que en 111 pacientes con CPNM con reordenamiento de *ROS1* puede alcanzar una TRG del 78,4 % y una TCE del 87,4 %. La mediana de SLP fue de 15,6 meses y la mediana de DOR fue de 20,3. La mediana de SG no se ha alcanzado y la tasa de SG a 12 y 24 meses fue del 98,1 % y 88,1 %, respectivamente. Aún no se han publicado datos sobre la resistencia.<sup>57</sup>

## Referencias

1. Drilon A, Jenkins C, Iyer S, et al. *ROS1*-dependent cancers: biology, diagnostics and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(1):35-55.
2. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for *ROS1* in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch*. 2016;469(5):489-503.
3. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: *ROS1* fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(15):4040-4045.
4. Cui M, Han Y, Li P, et al. Molecular and clinicopathological characteristics of *ROS1*-rearranged non-small-cell lung cancers identified by next-generation sequencing. *Mol Oncol*. 2020;14(11):2787-2795.
5. Gendarme S, Bylicki O, Chouaid C, Guisier F. *ROS1*-1 fusions in non-small-cell lung cancer: evidence to date. *Curr Oncol*. 2022;29(2):641-658.
6. Lambros L, Guibourg B, Uguen A. *ROS1*-rearranged non-small cell lung cancers with concomitant oncogenic driver alterations: about some rare therapeutic dilemmas. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(1):e73-74.
7. Zhang Q, Wu C, Ding W, et al. Prevalence of *ROS1* fusion in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2019;10(1):47-53.
8. Cai W, Li X, Su C, et al. *ROS1* fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(7):1822-1827.
9. Patil T, Smith DE, Bunn PA, et al. The incidence of brain metastases in stage IV *ROS1*-rearranged non-small cell lung cancer and rate of central nervous system progression on crizotinib. *J Thorac Oncol*. 2018;13(11):1717-1726.
10. Park E, Choi YL, Ahn MJ, Han J. Histopathologic characteristics of advanced-stage *ROS1*-rearranged non-small cell lung cancers. *Pathol Res Pract*. 2019;215(7):152441.
11. Zhu VW, Zhao JJ, Gao Y, et al. Thromboembolism in ALK+ and *ROS1*+ NSCLC patients: a systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer*. 2021;157:147-155.
12. Woodford R, Lu M, Beydoun N, et al. Disseminated intravascular coagulation complicating diagnosis of *ROS1*-mutant non-small cell lung cancer: a case report and literature review. *Thorac Cancer*. 2021;12(17):2400-2403.
13. Mescam-Mancini L, Lantuéjoul S, Moro-Sibilot D, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of *ROS1*-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer*. 2014;83(2):168-173.
14. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, et al. Immunohistochemical detection of *ROS1* is useful for identifying *ROS1* rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol*. 2014;27(5):711-720.
15. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/ International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):911-919.
16. Fielder T, Butler J, Tierney G, et al. *ROS1* rearrangements in lung adenocarcinomas are defined by diffuse strong immunohistochemical expression of *ROS1*. *Pathology*. 2022;54(4):399-403.
17. Mitiushkina NV, Romanko AA, Preobrazhenskaya EV, et al. Comprehensive evaluation of the test for 5'-/3'-end mRNA unbalanced expression as a screening tool for ALK and *ROS1* fusions in lung cancer. *Cancer Med*. 2022;11(17):3226-3237.
18. Paz-Ares L, Gonds A, Saldana D, et al. Genomic testing among patients with newly diagnosed advanced non-small cell lung cancer in the United States: a contemporary clinical practice patterns study. *Lung Cancer*. 2022;167:41-48.

19. Lee JK, Hazar-Rethinam M, Decker B, et al. The pan-tumor landscape of targetable kinase fusions in circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res.* 2022;28(4):728-737.
20. FDA approves entrectinib for NTRK solid tumors and ROS-1 NSCLC [news release]. US Food and Drug Administration, August 16, 2019. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-entrectinib-ntrk-solid-tumors-and-ros-1-nsclc>.
21. FDA approves crizotinib capsules [news release]. US Food and Drug Administration, March 11, 2016. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-crizotinib-capsules>.
22. Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) October 19-22, 2015. European Medicines Agency, October 23, 2015. <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-19-22-october-2015>.
23. Fan Y, Drilon A, Chiu C-H, et al. Entrectinib in patients with ROS1 fusion-positive (ROS1-fp) NSCLC: updated efficacy and safety analysis. *J Thorac Oncol.* 2022;17(9 suppl):S89-S90.
24. Shaw AT, Ou SHI, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1963-1971.
25. Moro-Sibilot D, Cozic N, Pérol M, et al. Crizotinib in c-MET- or ROS1-positive NSCLC: results of the AcSé phase II trial. *Ann Oncol.* 2019;30(12):1985-1991.
26. Michels S, Massutí B, Schildhaus HU, et al. Safety and efficacy of crizotinib in patients with advanced or metastatic ROS1-rearranged lung cancer (EUCROSS): a European phase II clinical trial. *J Thorac Oncol.* 2019;14(7):1266-1276.
27. Chiari R, Ricciuti B, Landi L, et al. ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer is associated with a high rate of venous thromboembolism: analysis from a phase II, prospective, multicenter, two-arms trial (METROS). *Clin Lung Cancer.* 2020;21(1):15-20.
28. Wu YL, Yang JCH, Kim DW, et al. Phase II study of crizotinib in east Asian patients with ROS1-positive advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(14):1405-1411.
29. Shaw AT, Kim TM, Crinò L, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):874-886.
30. Drilon A, Somwar R, Wagner JP, et al. A novel crizotinib-resistant solvent-front mutation responsive to cabozantinib therapy in a patient with ROS1-rearranged lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(10):2351-2358.
31. Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, et al. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):261-270.
32. Dziadziuszko R, Krebs MG, De Braud F, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in locally advanced or metastatic ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2021;39(11):1253-1263.
33. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(12):1590-1599.
34. Shaw AT, Solomon BJ, Chiari R, et al. Lorlatinib in advanced ROS1-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(12):1691-1701.
35. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(12):1654-1667.
36. Yun MR, Kim DH, Kim SY, et al. Repotrectinib exhibits potent antitumor activity in treatment-naïve and solvent-front-mutant ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(13):3287-3295.
37. Horn L, Infante JR, Reckamp KL, et al. Ensartinib (X-396) in ALK-positive non-small cell lung cancer: results from a first-in-human phase I/II, multicenter study. *Clin Cancer Res.* 2018;24(12):2771-2779.
38. Ai X, Wang Q, Cheng Y, et al. Safety but limited efficacy of ensartinib in ROS1-positive NSCLC: a single-arm, multicenter phase 2 study. *J Thorac Oncol.* 2021;16(11):1959-1963.
39. Awad MM, Katayama R, McTigue M, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med.* 2013;368(25):2395-2401.
40. Gainor JF, Tseng D, Yoda S, et al. Patterns of metastatic spread and mechanisms of resistance to crizotinib in ROS1-positive non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol.* 2017;2017:PO.17.00063.

41. Dagogo-Jack I, Rooney M, Nagy RJ, et al. Molecular analysis of plasma from patients with ROS1-positive NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2019;14(5):816-824.
42. Dimou A, Ou SHI, Doebele RC. Dramatic response to lorlatinib in a patient with CD74-ROS1-positive lung adenocarcinoma with acquired F2004V mutation. *JCO Precis Oncol.* 2019;3:PO.19.00013.
43. Zhang Y, Huang Z, Zeng L, et al. Disease progression patterns and molecular resistance mechanisms to crizotinib of lung adenocarcinoma harboring ROS1 rearrangements. *NPJ Precis Oncol.* 2022;6(1):20.
44. Lin JJ, Choudhury NJ, Yoda S, et al. Spectrum of mechanisms of resistance to crizotinib and lorlatinib in ROS1 fusion-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(10):2899-2909.
45. Papadopoulos KP, Borazanci E, Shaw AT, et al. U.S. Phase I first-in-human study of taltrectinib (DS-6051b/AB-106), a ROS1/TRK inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2020;26(18):4785-4794.
46. Wu X, Wang Y, Wan S, Zhang J. Investigation on the binding mechanism of lorlatinib with the c-ros oncogene 1 (ROS1) receptor tyrosine kinase via molecular dynamics simulation and binding free energy calculations. *J Biomol Struct Dyn.* 2018;36(12):3106-3113.
47. Facchinetti F, Levy A, Ammari S, et al. Meningeal "Lazarus response" to lorlatinib in a ROS1-positive NSCLC patient progressing to entrectinib. *Cancer Manag Res.* 2021;13:2805-2810.
48. Li W, Yang N, Ma H-W, et al. The efficacy and safety of taltrectinib in patients with TKI-naïve or crizotinib-pretreated ROS1-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) [abstract 8572]. *J Clin Oncol.* 2022;40(suppl 16):8572. doi:10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.8572.
49. Sun TY, Niu X, Chakraborty A, Neal JW, Wakelee HA. Lengthy progression-free survival and intracranial activity of cabozantinib in patients with crizotinib and ceritinib-resistant ROS1-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(2):e21-24.
50. Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, et al. Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(1):166-174.
51. Zhang S, Anjum R, Squillace R, et al. The potent ALK inhibitor brigatinib (AP26113) overcomes mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2016;22(22):5527-5538.
52. Hegde A, Hong DS, Behrang A, et al. Activity of brigatinib in crizotinib and ceritinib-resistant ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *JCO Precis Oncol.* 2019;3:PO.18.000267.
53. Camidge DR, Kim DW, Tiseo M, et al. Exploratory analysis of brigatinib activity in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer and brain metastases in two clinical trials. *J Clin Oncol.* 2018;36(26):2693-2701.
54. McCoach CE, Le AT, Gowan K, et al. Resistance mechanisms to targeted therapies in ROS1+ and ALK+ non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(14):3334-3347.
55. Lin JJ, Langenbucher A, Gupta P, et al. Small cell transformation of ROS1 fusion-positive lung cancer resistant to ROS1 inhibition. *NPJ Precis Oncol.* 2020;4:21.
56. Ou SHI, Zhu VW. CNS metastasis in ROS1+ NSCLC: an urgent call to action, to understand, and to overcome. *Lung Cancer.* 2019;130:201-207.
57. Lu S, Pan H, Wu L, et al. The efficacy and safety of TQ-B3101 monotherapy in the first-line treatment in patients with ROS1-positive non-small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2022;33(suppl 2):S27-S70. doi:10.1016/annonc/annonc856.

## Estructura, señalización y función de los genes

El gen V-raf homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino (*BRAF*) codifica la quinasa BRAF, un miembro de la familia RAF de serina/treonina quinasas que son componentes de la vía de señalización del factor de crecimiento RTK-RAS-RAF-MEK-ERK (señalización RAS/MAPK)<sup>1</sup>. La quinasa BRAF es un paso importante en la señalización intracelular después de la activación del EGFR. BRAF es una proteína serina/treonina quinasa de 95 kDa codificada en el brazo largo del cromosoma 7 (7q). A nivel global, BRAF desempeña un papel central en la regulación de la proliferación, división y muerte celular. En los tejidos normales, la quinasa BRAF suele silenciarse por medio de retroalimentación negativa una vez que la señal ha pasado al siguiente punto en el flujo descendente. Las mutaciones de *BRAF* provocan la activación de la vía RAS-RAF-MEK-ERK, lo que da lugar a un crecimiento y una proliferación celular descontrolados.

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

### Mutaciones

Se han identificado cerca de 300 mutaciones distintas de *BRAF* en diversos tumores y líneas de células cancerosas, incluyendo el melanoma, cáncer colorrectal, cáncer papilar de tiroides y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La mayoría de estas mutaciones se producen en el bucle de activación, cerca del codón V600, o en el bucle de unión a fosfato, en los residuos 464 a 469, y se han clasificado en 3 clases.<sup>2</sup> Las clases de mutaciones del *BRAF* se notifican de acuerdo con aspectos clave: (1) actividad quinasa, (2) estado de dimerización, y (3) dependencia de RAS.

Las mutaciones del *BRAF* de clase I se consideran independientes del RAS debido a su elevada actividad quinasa incluso en su estado monomérico. A esta clase pertenecen las mutaciones puntuales en el codón 600 del exón 15 (*BRAF* V600), que dan lugar a la sustitución de valina por otros aminoácidos como glutamato (V600E), lisina (V600K), aspartato (V600D),

metionina (V600M), leucina (V600L) y arginina (V600R). Los mutantes de clase I promueven la activación constitutiva de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), provocando una fuerte activación de la quinasa BRAF. Este tipo de mutaciones suelen ser altamente sensibles a los inhibidores de quinasa BRAF y MAPK (MEK).

Las mutaciones del *BRAF* de clase II se caracterizan por una actividad quinasa intermedia que permite la independencia de RAS pero requiere la formación de homodímeros para estar completamente activa. Los mutantes de clase II, incluidas las mutaciones *K601*, *L597*, *G464* y *G469*, se localizan en el segmento de activación o bucle P y señalizan como dímeros independientes de RAS.

Las mutaciones del *BRAF* de clase III tienen una actividad quinasa comprometida, por lo que requieren la activación de RAS y la formación del heterodímero CRAF de tipo salvaje para ser plenamente funcionales. Los mutantes de clase III se producen en el bucle P, el bucle catalítico o el motivo DFG, y tienen una actividad quinasa de BRAF deficiente. Las mutaciones de clase II y III son mutaciones no V600. Aproximadamente el 50 % de las mutaciones del *BRAF* en el CPNM son mutaciones no V600.

### **Mutaciones concurrentes en CPNM con mutación del *BRAF***

Se pueden identificar alteraciones genéticas simultáneas en hasta el 90 % de los pacientes con CPNM con *BRAF* mutante. El *TP53*, *STK11*, *KRAS*, *NF1* y algunos receptores de tirosina quinasa son los genes que presentan con mayor frecuencia alteraciones simultáneas tanto en muestras de tejido como en el ADN libre de células (cfADN). Las alteraciones en *SMAD4* y *PIK3CA* se asocian con *BRAF* V600E, mientras que las alteraciones en *KEAP1*, *NF1*, *MET*, *RICTOR*, *KRAS*, *MYC*, *STK11* y *TP53* se producen con mayor frecuencia con mutaciones del *BRAF* no V600E.

### **Deleciones**

Las mutaciones de delección del *BRAF* se pueden producir en tumores sólidos y pueden servir como un tipo de mecanismo de resistencia a los inhibidores de BRAF y a los inhibidores de MEK. Las mutaciones de delección ocurren adyacentes a la hélice  $\alpha C$  en el dominio quinasa de *BRAF*, dando lugar a una mayor actividad de quinasa al suprimir la hélice  $\alpha C$  en su conformación activa.

### **Fusiones**

Se han encontrado al menos 18 fusiones asociadas 5' diferentes en distintos tipos de cáncer, incluido el CPNM. La fusión asociada más común es del *AGK* en el CPNM. La tasa de aparición de fusiones de *BRAF* es inferior al 1 % en el CPNM, y todos los CPNM con fusiones de *BRAF* son adenocarcinomas.<sup>3</sup> La mayoría de los patrones de fusión de *BRAF* están dentro del marco de lectura con puntos de rotura en el dominio quinasa de BRAF. Las fusiones del *BRAF* activadoras se producen por el truncado del dominio autoinhibitorio N-terminal CR1, lo que conduce a la activación constitutiva de la vía BRAF que se asemeja a los mutantes *BRAF* de clase II.

## Amplificaciones

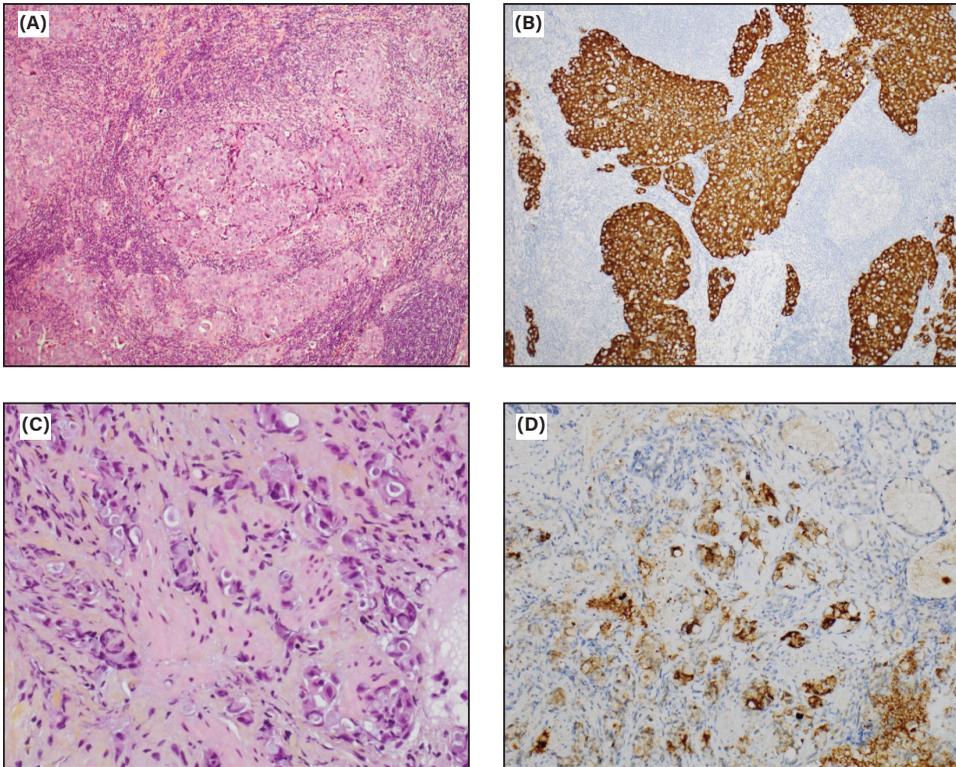
La resistencia adquirida a los inhibidores de MEK1/2 (MEKi) surge a través de la amplificación de *BRAF* V600E o *KRAS* para restablecer la señalización ERK1/2. La amplificación de *BRAF* V600E y la resistencia a MEKi son reversibles tras la retirada del fármaco. Las células con una amplificación de *BRAF* V600E son adictas a MEKi para mantener un nivel preciso de señalización ERK1/2 que es óptimo para la proliferación y supervivencia celular y el crecimiento tumoral *in vivo*. La amplificación de *BRAF* V600E confiere una desventaja selectiva tras la retirada del fármaco, lo que valida la dosificación intermitente para prevenir la resistencia.

## Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Las mutaciones del *BRAF* se presentan en el 8 % de los cánceres humanos, de forma predominante en la leucemia de células pilosas (100 %), el melanoma (40 % a 50 %), el carcinoma de tiroides (10 % a 70 %, dependiendo del subtipo histológico), el cáncer colorrectal (10 %), y el CPNM (3 % a 8 %).

En el CPNM, las mutaciones del *BRAF* se detectan en el 3,7 % de los pacientes varones y en el 4 % de las mujeres.<sup>4,5</sup> Las mutaciones del *BRAF* se han asociado a antecedentes de tabaquismo y se detectan en aproximadamente el 4,7 % de los exfumadores o fumadores actuales y en el 3 % de las personas que nunca han fumado. El adenocarcinoma representa el patrón histológico más frecuente, ya que las mutaciones del *BRAF* se detectan en alrededor del 4 % de los adenocarcinomas y en el 0,6 % de los no adenocarcinomas.<sup>4,5</sup> Las mutaciones del *BRAF* se detectan en aproximadamente 4 % de los pacientes con enfermedad en estadio I o II y en el 7,6 % de los pacientes con cánceres en estadio III o IV. Las mutaciones *BRAF* V600E representan el 54 % de todas las mutaciones del *BRAF* en el CPNM, con una mayor prevalencia en pacientes de sexo femenino (71 % frente al 38 % en los casos masculinos con mutaciones del *BRAF*) y en la enfermedad en estadio III o IV (57% frente al 48 % en los casos con mutaciones del *BRAF* en estadio I-II). A nivel global, las mutaciones del *BRAF* están mayormente asociadas a pacientes de sexo femenino, pero las mutaciones no V600E parecen ocurrir con mayor frecuencia en pacientes masculinos.<sup>5</sup> La mayoría de los pacientes con mutaciones del *BRAF* en el CPNM son fumadores o exfumadores pero con diferencias en la prevalencia: entre el 20 % y 30 % de los pacientes portadores de mutaciones V600E son personas que nunca han fumado, y casi todos los pacientes con alteraciones no V600E son fumadores crónicos.<sup>5</sup>

El CPNM con mutación del *BRAF* es propenso a afectar al sistema nervioso central. Cabe notar, que la incidencia de metástasis cerebrales en el momento del diagnóstico es significativamente más baja en pacientes con alteraciones clase I en comparación con las clases II y III. La significación pronóstica de mutaciones del *BRAF* en el CPNM no es clara. En estadios tempranos, los pacientes resecaados por CPNM con mutación *BRAF* V600E muestran tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (SG) más cortas en comparación con los pacientes con mutaciones de tipo salvaje, pero tal diferencia no surgió al comparar a todos los pacientes con mutaciones de *BRAF* (tanto V600E como no V600E) con la población de tipo salvaje. En el contexto metastásico, no se han identificado diferencias en la supervivencia libre de progresión ni en la SG entre los pacientes con enfermedad con



**Figura 10-1.** (A y B) Adenocarcinoma sólido (resección de tumor pulmonar, 40×). (A) Hematoxilina y eosina (H&E). (B) Inmunoperoxidasa (anti-BRAF V600E; clon VE1). (C y D) Adenocarcinoma mucinoso invasivo (biopsia bronquial). (C) H&E. (D) Inmunoperoxidasa (anti-BRAF V600E; clon VE1).

mutaciones en *BRAF* y los de tipo salvaje, pero se ha informado de un peor resultado clínico tras la quimioterapia basada en platino en los pacientes con tumores con mutaciones en *BRAF* V600E en comparación con los no V600E.

## Estrategias de prueba

### Inmunohistoquímica

El anticuerpo utilizado para la inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína *BRAF* mutante es el clon VE1 (figura 10-1).<sup>6</sup> El objetivo de la IHQ es identificar un cambio cualitativo (es decir, la presencia o ausencia de la proteína). La limitación de esta prueba es que solo puede detectar la mutación *BRAF* V600E y no las mutaciones no V600E.<sup>7-9</sup> Los datos son limitados, pero el clon VE1 tiene el potencial de teñir entre el 90 % y el 100 % de los adenocarcinomas con mutación p.V600E.<sup>10</sup> En la actualidad, no se ha establecido ninguna recomendación estándar o consenso para el uso de la prueba IHQ de *BRAF* p.V600E en el CPNM.

### Pruebas moleculares

Las mutaciones del *BRAF* se identifican mediante técnicas de secuenciación del ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de alelo o la secuenciación de nueva generación (NGS). Estos 2 métodos poseen una sensibilidad, especificidad y tasa de concordancia comparables en muestras de tejido; sin embargo, debido a su capacidad para identificar simultáneamente múltiples alteraciones oncogénicas, la NGS se considera ampliamente la prueba preferida.

### Reacción en cadena de la polimerasa

La prueba utilizada más comúnmente es la PCR con transcripción inversa (RT-PCR). En la actualidad, la prueba Cobas 4800 de mutación *BRAF* V600 (Roche Diagnostics) y el kit THxID-BRAF (Biomérieux) son pruebas diagnósticas con fines terapéuticos aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). También se han utilizado otras pruebas desarrolladas en laboratorios para comprobar el estado de la mutación del *BRAF*, dependiendo de las aprobaciones locales, otros métodos pueden o no ser necesarios a efectos de reembolso. Las principales ventajas de la RT-PCR son su rapidez en el tiempo de respuesta, su reproducibilidad, especificidad, sensibilidad y menor costo en comparación con los métodos de secuenciación de genes. Sin embargo, algunos de estos métodos se limitan a la mutación *BRAF* V600E localizada en el exón 15. Por lo tanto, pueden carecer de la capacidad de detectar mutaciones del exón 11 que también se observan en el CPNM.

### Secuenciación de nueva generación

La NGS con un panel de genes múltiples se debe utilizar para evaluar la mutación *BRAF* V600E y las mutaciones no V600E que pueden producirse en el exón 11 y el exón 15.<sup>11</sup> Además, con el descubrimiento de nuevos genes conductores poco frecuentes, hay una mayor necesidad de pruebas multigénicas en comparación con los enfoques de un solo gen. Entre las ventajas de la NGS están:

- Requiere relativamente poco tejido tumoral
- Facilita la prueba de múltiples biomarcadores
- Incluye biomarcadores emergentes para el reclutamiento en ensayos clínicos
- Puede detectar mutaciones concomitantes que se producen con las mutaciones *BRAF*

Generalmente, también es más económica que las pruebas secuenciales. Sin embargo, debido a la cantidad de datos, la interpretación de los informes de la NGS puede ser compleja, y la NGS no está disponible de forma universal. El tiempo de respuesta de la NGS es más largo que el de las pruebas de RT-PCR e IHQ.

### Pruebas del *BRAF* con biopsias líquidas

Las mutaciones *BRAF* V600E se pueden detectar en el cfADN mediante PCR digital en gotas o RT-PCR.<sup>12</sup> Las mutaciones *BRAF* V600E y no V600E también se pueden detectar mediante NGS en el ADN libre circulante. Faltan datos sobre si el cfADN podría ser un analito alternativo para identificar mutaciones del *BRAF* si no se dispone de muestras de tejido. El emparejamiento de plasma con muestras tumorales fijadas en formalina e incrustadas en parafina dio como resultado una alta tasa de concordancia para las mutaciones del *BRAF* cuando se utilizaron técnicas de PCR o NGS.<sup>13</sup>

### Implicaciones clínicas

El tratamiento de pacientes con CPNM con mutación del *BRAF* se divide principalmente en 2 tipos, uno para la mutación *BRAF* V600, el otro para los casos de mutación *BRAF* no V600. Los actuales fármacos dirigidos aprobados se diseñaron específicamente en torno a la estructura de *BRAF* V600E, mientras que se siguen explorando nuevas estrategias terapéuticas para *BRAF* no V600E de clase II/III en ensayos clínicos.

### Terapia dirigida

La identificación de las mutaciones del *BRAF* y la implicación de la vía MAPK en el CPNM han conducido al desarrollo de varios inhibidores de MAPK altamente potentes y selectivos que compiten con el trifosfato de adenosina (ATP), diseñados específicamente para unirse al bolsillo de unión al ATP de la conformación activa del *BRAF*, especialmente *BRAF* V600E, como vemurafenib o dabrafenib.<sup>14</sup> Sin embargo, a pesar de su eficaz actividad antitumoral, con el tiempo se desarrollan resistencias a los inhibidores de BRAF, principalmente debido a la reactivación de la vía descendente MEK/REK. La adición de inhibidores de MEK1/2, como el trametinib, mejoró significativamente los resultados del tratamiento (tasa de respuesta global [TRG] y mediana de supervivencia sin progresión [SLPm] del 33 % y 5,4 meses frente al 68 % y 10,2 meses para dabrafenib o dabrafenib más trametinib, respectivamente, en pacientes con CPNM metastásico con mutación *BRAF* V600E previamente tratados).<sup>15,16</sup> Hasta la fecha, la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) han aprobado el tratamiento dirigido dual (dabrafenib y trametinib) para el CPNM con mutación *BRAF* V600E, que también recomiendan las guías de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO).<sup>17-21</sup>

### Inmunoterapia

Muy pocos datos acerca del beneficio de inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) están disponibles en la población con mutaciones del *BRAF*. Los resultados de los estudios retrospectivos generalmente son decepcionantes. El estudio internacional IMMUNOTARGET mostró resultados deficientes en pacientes con enfermedades con mutación *BRAF*, con una TRG del 24 % y una SLPm de 3,1 meses.<sup>22</sup> En otro estudio retrospectivo, la TRG a ICI fue del 9 % en los tumores con alteraciones de clase I y del 26 % en los de clase II/III, con una mediana de tiempo en tratamiento de 1,9 meses en ambos grupos.<sup>23</sup> Se necesitan ensayos clínicos prospectivos para identificar el uso óptimo de ICI con o sin terapia dirigida a BRAF para estos pacientes.<sup>23</sup> Los resultados refuerzan el fuerte lugar de las terapias dirigidas en pacientes con CPNM con mutación *BRAF* V600E.

### Quimioterapia

Los resultados de la quimioterapia son poco conocidos en esta población. No hay pruebas claras de que el estado de *BRAF* influya en la SLP o la SG de los pacientes tratados con quimioterapia.<sup>24</sup>

### Mecanismos de resistencia

Al igual que ocurre con otras terapias dirigidas para el CPNM, inevitablemente se produce resistencia a los inhibidores de la vía BRAF, lo que conduce a la progresión de la enfermedad.<sup>2,25,26</sup> Los mecanismos subyacentes de resistencia a los inhibidores de BRAF siguen siendo poco conocidos en el contexto del CPNM. La reactivación de la señalización de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) a través de la vía MAPK representa el principal mecanismo que implica la resistencia secundaria a los inhibidores BRAF y puede producirse tanto ascendente como descendentemente de las quinasas BRAF. Los mecanismos implicados incluyen mutaciones secundarias en otros genes implicados en la vía de señalización MAPK que conducen a la reactivación independiente de BRAF de la señalización ERK, como mutaciones *NRAS/KRAS* o *MEK1/2* o variantes de empalme de *BRAF* y amplificaciones de

genes que aumentan el nivel de homodímeros *BRAF* V600E. La mutación adquirida en el gen *BRAF* rara vez se describe como un mecanismo de resistencia. La activación por derivación es la principal causa de resistencia secundaria de la terapia dirigida. Las alteraciones de falta de función del homólogo de la fosfatasa y la tensina (*PTEN*) pueden contribuir a la resistencia a las combinaciones de dabrafenib y trametinib en tumores *BRAF* V600E.

## Referencias

1. Poulidakos PI, Sullivan RJ, Yaeger R. Molecular pathways and mechanisms of BRAF in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2022;28(21):4618-4628. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-2138.
2. Riudavets M, Cascetta P, Planchard D. Targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer: current status and future directions. *Lung Cancer.* 2022;169:102-114. doi:10.1016/j.lungcan.2022.05.014.
3. Kazdal D, Hofman V, Christopoulos P, et al. Fusion-positive non-small cell lung carcinoma: biological principles, clinical practice, and diagnostic implications. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022;61(5):244-260. doi:10.1002/gcc.23022.
4. Chen D, Zhang LQ, Huang JF, et al. BRAF mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(6):e101354. doi:10.1371/journal.pone.0101354.
5. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011;29(26):3574-3579. doi:10.1200/JCO.2011.35.9638.
6. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: a review. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):400-408. doi:10.1053/j.semmp.2015.02.010.
7. Ilie M, Long E, Hofman V, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAFV600E mutation in primary lung adenocarcinoma Caucasian patients. *Ann Oncol.* 2013;24(3):742-748. doi:10.1093/annonc/mds534.
8. Hofman V, Benzaquen J, Heeke S, et al. Real-world assessment of the BRAF status in non-squamous cell lung carcinoma using VE1 immunohistochemistry: a single laboratory experience (LPCE, Nice, France). *Lung Cancer.* 2020;145:58-62. doi:10.1016/j.lungcan.2020.04.024.
9. Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, et al. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2013;82(1):51-54. doi:10.1016/j.lungcan.2013.06.014.
10. Gow CH, Hsieh MS, Lin YT, Liu YN, Shih JY. Validation of immunohistochemistry for the detection of BRAF V600E-mutated lung adenocarcinomas. *Cancers (Basel).* 2019;11(6):866. doi:10.3390/cancers11060866.
11. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31(11):1491-1505. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014.
12. Iaccarino A, Pisapia P, Pepe F, et al. Liquid biopsy for BRAF mutations testing in non-small cell lung cancer: a retrospective study. *J Clin Pathol.* 2022;75(1):58-60. doi:10.1136/jclinpath-2020-207107.
13. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical utility of comprehensive cell-free DNA analysis to identify genomic biomarkers in patients with newly diagnosed metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4691-4700. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0624.
14. Tabbò F, Pisano C, Mazieres J, et al; BOLERO Consortium. How far we have come targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev.* 2022;103:102335. doi:10.1016/j.ctrv.2021.102335.
15. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, et al. Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016A;17(5):642-50. doi:10.1016/S1470-2045(16)00077-2.
16. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):984-993. doi:10.1016/S1470-2045(16)30146-2.
17. Johnson BE, Baik CS, Mazieres J, et al. Clinical outcomes with dabrafenib plus trametinib in a clinical trial versus real-world standard of care in patients with BRAF-mutated advanced

- NSCLC. *JTO Clin Res Rep.* 2022;3(5):100324. doi:10.1016/j.jtocrr.2022.100324.
18. Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev.* 2018;66:82-94. doi:10.1016/j.ctrv.2018.04.006.
  19. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1307-1316. doi:10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
  20. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Phase 2 study of dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF V600E-mutant metastatic NSCLC: updated 5-year survival rates and genomic analysis. *J Thorac Oncol.* 2022;17(1):103-115. doi:10.1016/j.jtho.2021.08.011.
  21. Yan N, Guo S, Zhang H, et al. BRAF-mutated non-small cell lung cancer: current treatment status and future perspective. *Front Oncol.* 2022;12:863043. doi:10.3389/fonc.2022.863043.
  22. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1321-1328. doi:10.1093/annonc/mdz167.
  23. Murciano-Goroff YR, Pak T, Mondaca S, et al. Immune biomarkers and response to checkpoint inhibition of BRAFV600 and BRAF non-V600 altered lung cancers. *Br J Cancer.* 2022;126(6):889-898. doi:10.1038/s41416-021-01679-1.
  24. Couraud S, Barlesi F, Fontaine-Deraluelle C, et al; Biomarkers France Contributors. Clinical outcomes of non-small-cell lung cancer patients with BRAF mutations: results from the French Cooperative Thoracic Intergroup biomarkers France study. *Eur J Cancer.* 2019;116:86-97. doi:10.1016/j.ejca.2019.04.016.
  25. Facchinetti F, Lacroix L, Mezquita L, et al. Molecular mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2020;132:211-223. doi:10.1016/j.ejca.2020.03.025.
  26. Ortiz-Cuaran S, Mezquita L, Swalduz A, et al. Circulating tumor DNA genomics reveal potential mechanisms of resistance to BRAF-targeted therapies in patients with BRAF-mutant metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(23):6242-6253. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1037.

## Estructura y función de los genes

Los genes del receptor neurotrópico de la quinasa para la tropomiosina (neurotrophic tropomyosin receptor kinase, *NTRK*), *NTRK1* en 1q21-22, *NTRK2* en 9q22.1, y *NTRK3* en 15q25, codifican TRKA, TRKB y TRKC, respectivamente. Estas proteínas pertenecen a la familia de los receptores tirosina quinasa (receptor tyrosine kinase, RTK). Al igual que otros RTK, el TRK (en lo sucesivo TRKA, TRKB y TRKC) tiene dominios quinasa de unión al ligando a nivel extracelular, transmembrana e intracelular. La unión del ligando de neurotropina y la activación de TRK conducen a la homodimerización del receptor y a la señalización descendente, incluidas las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la fosfoinositol 3-quinasa (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) y/o la proteína quinasa C (protein kinase C, PKC).<sup>1,2</sup> Los receptores TRK están implicados en el desarrollo del sistema nervioso central, incluidas la proliferación, la migración, la diferenciación y la apoptosis celular. En los tejidos del adulto, la expresión de TRK está restringida al tejido neuronal y a los testículos.<sup>3</sup>

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

Las fusiones activadoras del *NTRK* conducen a una sobreexpresión constitutiva de las proteínas TRK y son altamente predictivas de la respuesta a los inhibidores de TRK. En dichas fusiones de genes oncogénicos, el dominio tirosina quinasa C-terminal del *NTRK* se fusiona con la región 5' de un gen compañero, y la proteína quimérica conduce a la activación constitutiva de las vías descendentes de forma independiente del ligando. Las fusiones oncogénicas del *NTRK* pueden dar lugar a una fuerte sobreexpresión de la proteína TRK detectable mediante inmunohistoquímica (IHQ).<sup>4,5</sup> Hasta la fecha se han descrito más de 80 fusiones asociadas del *NTRK* diferentes en varios tipos de tumores. Las asociaciones específicas pueden variar según el tipo de tumor. En particular, el *ETV6-NTRK3* es prevalente en el 90 % de los carcinomas secretores de mama y los carcinomas secretores de las glándulas salivales (anteriormente

conocidos como carcinoma análogo secretor de mama) para los que la fusión sirve tanto de marcador diagnóstico como predictivo. En el cáncer de pulmón se han identificado al menos 16 fusiones asociadas de *NTRK1*, *NTRK2*, o *NTRK3*.<sup>2,4,6-9</sup>

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Las fusiones del *NTRK* son muy poco frecuentes y solo se han encontrado en el 0,1 % al 0,3 % de los casos de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).<sup>10</sup> Aunque los datos sobre la distribución de las fusiones en los 3 genes *NTRK* son aún escasos, la fusión puede implicar a cualquiera de los 3 genes. Las fusiones del *NTRK1* y *NTRK3* parecen ser más frecuentes que las del *NTRK2*.<sup>4</sup> Las fusiones del *NTRK* se enriquecen en cánceres con ausencia de mutaciones conductoras canónicas.<sup>7,11</sup> Aunque las fusiones del *NTRK* se han encontrado sobre todo en adenocarcinomas de pulmón, también pueden darse en otras histologías como los carcinomas de células escamosas y los carcinomas neuroendocrinos.<sup>12</sup> Aunque las fusiones del *NTRK* se consideran mutuamente excluyentes con otros conductores *de novo* en el CPNM, pueden surgir como mecanismos de resistencia a la terapia con inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitor, TKI), como los TKI del EGFR de tercera generación.<sup>13</sup> Las fusiones del *NTRK* se han informado sobre todo en no fumadores de mediana edad o en personas que nunca han fumado, pero también pueden darse en cualquier paciente con CPNM.<sup>12</sup>

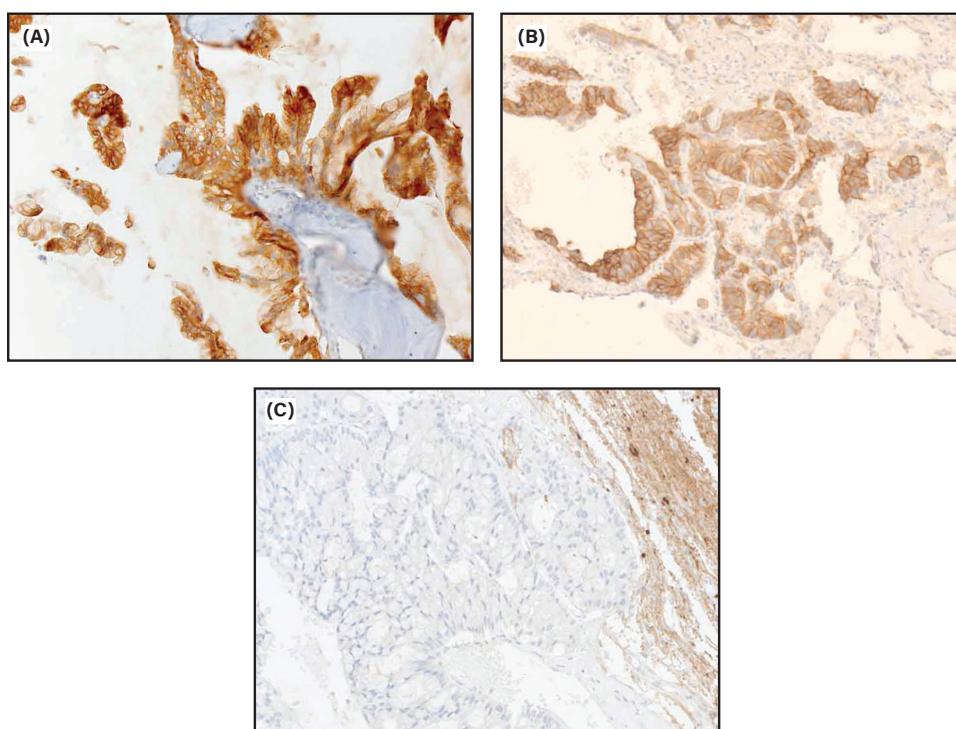
### Estrategias de prueba

Existen varios métodos para detectar las fusiones del gen *NTRK*. Cada técnica tiene sus méritos y limitaciones, y la elección de las pruebas depende de los recursos y del contexto clínico.<sup>14</sup> Por lo general, el perfil molecular integral (secuenciación basada en ácidos nucleicos mediante paneles de secuenciación de nueva generación [next-generation sequencing, NGS] adecuados) es el método recomendado para las pruebas del *NTRK* en tumores en los que las fusiones del *NTRK* son poco frecuentes, como el CPNM.<sup>14</sup> La NGS basada en ARN es preferible a la NGS basada en ADN, ya que esta última no puede cubrir grandes regiones intrónicas del *NTRK3*, lo que conduce a una sensibilidad reducida. Además, en la NGS basada en ARN se tolera un menor nivel de pureza debido a la sobreexpresión de la fusión genética. Por el contrario, la calidad inestable del ARN puede ser motivo de preocupación, especialmente en material envejecido y archivado. También existen otros métodos basados en el ARN, como la tecnología de código de barras digital multiplexado con código de colores (nCounter [NanoString]) en un corte tisular.<sup>15,16</sup> La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) se ha utilizado principalmente para detectar fusiones canónicas del *ETV6-NTRK3* en tipos tumorales enriquecidos para detectar dichas alteraciones.<sup>17</sup>

La hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) es un método bien establecido para detectar fusiones genéticas. En el caso del *NTRK*, es necesario realizar pruebas separadas para *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3*. La prueba FISH se utiliza principalmente para el análisis de confirmación en el entorno de alta prevalencia (es decir, para tumores con una alta probabilidad de contener una fusión del gen *NTRK*), pero no es la primera opción para el CPNM.

La expresión de la proteína pan-TRK detectada mediante IHQ es un sustituto de la presencia de una fusión del *NTRK*, ya que la TRK de tipo salvaje no se expresa altamente

en muchos tejidos no neoplásicos. Los clones comercialmente disponibles de pan-TRK son EPR17341 (Abcam) y A7H6R (Cell Signaling Technology). También está disponible una prueba pan-TRK de diagnóstico *in vitro* (in vitro diagnostic, IVD) Ventana (Roche Tissue Diagnostics). La IHQ es rentable, tiene un tiempo de respuesta rápido y puede integrarse fácilmente en los flujos de trabajo de los laboratorios de diagnóstico. Además, la IHQ solo requiere un número relativamente pequeño de células tumorales en cortes tisulares o muestras citológicas.<sup>18</sup> La expresión de TRK por IHQ puede mostrar una intensidad y una localización subcelular variables (citoplasmática, nuclear o membranosa), que podrían depender del gen de fusión 5' asociado.<sup>14</sup> La IHQ puede servir como herramienta de cribado útil para tipos tumorales con una prevalencia baja, especialmente cuando la NGS no está disponible o no se realiza de forma rutinaria (figura 11-1).



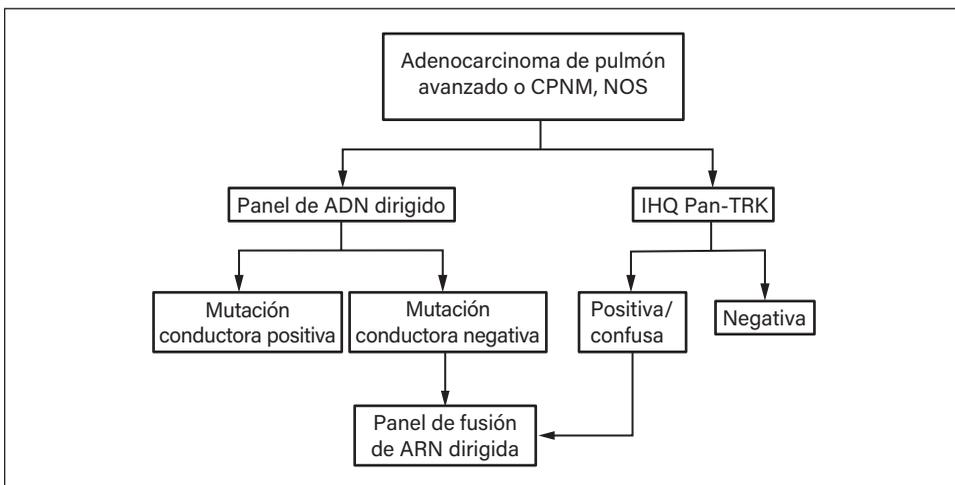
**Figura 11-1.** Ejemplos de inmunohistoquímica (IHQ) utilizando el anticuerpo pan-TRK 17341 (Ventana [Roche Tissue Diagnostics]). **(A)** Metástasis ósea de adenocarcinoma de pulmón con fuerte presencia citoplasmática de TRK. Fusión *CLIP1-NTRK1* confirmada (secuenciación de nueva generación [NGS] basada en ARN mediante kit Archer FusionPlex Custom [Diagnóstica Longwood]). **(B)** Adenocarcinoma de pulmón con tinción TRK membranosa característica. La fusión del *NTRK* no se confirmó a pesar de utilizar varios métodos (NGS basada en ARN por Archer y OncoPrint [ThermoFisher Scientific] integral, e hibridación fluorescente *in situ* [FISH] utilizando 3 sondas FISH contra *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3*). **(C)** Metástasis cerebral pan-TRK IHQ-negativa de adenocarcinoma de pulmón; el tejido cerebral neuronal adyacente sirve como control interno positivo de tinción.

Se han publicado pocos estudios sobre el protocolo de tinción, la sensibilidad y la especificidad de la IHQ de TRK. La sensibilidad actualmente informada de la IHQ para TRK para las fusiones del *NTRK1* o *NTRK2* es del 96 % y el 100 %, respectivamente, pero solo del 55 % al 79 % para el *NTRK3*.<sup>4,8</sup> Mientras que la especificidad de la IHQ para TRK en el CPNM fue del 100 % (24:24) en 1 estudio, otros informaron de la tinción de TRK en

ausencia de una fusión del *NTRK* en aproximadamente el 1,8 % (11/617) de los casos, lo que corresponde a un valor predictivo positivo estimado del 10 %.<sup>15</sup> La prevalencia y significación de la expresión de TRK en ausencia de una fusión del *NTRK* requiere más estudios. Curiosamente, entre el 3 % y el 4 % de los CPNM albergan una amplificación genética del *NTRK1* según cBioPortal.<sup>19</sup> Queda por estudiar si tales amplificaciones pueden explicar la expresión de TRK en el CPNM. Cabe destacar que se informó de una respuesta parcial al inhibidor de TRK larotrectinib en un carcinoma esofágico amplificado con *NTRK*.<sup>20</sup>

La mayoría de los estudios han utilizado un valor de corte de al menos un 1 % de tinción de la célula tumoral por encima del fondo.<sup>5</sup> Sin embargo, actualmente no hay consenso sobre la mejor manera de definir la positividad de TRK por IHQ. Así pues, cualquier expresión por IHQ requiere confirmación mediante una prueba ortogonal, preferiblemente basada en ácidos nucleicos.<sup>4</sup>

La figura 11-2 muestra una propuesta de algoritmo de pruebas diagnósticas para el CPNM no escamoso. Este algoritmo se ajusta a las recomendaciones de la Sociedad Europea de Oncología Médica (European Society for Medical Oncology, ESMO)<sup>14</sup> y con las guías sobre pruebas moleculares amplias recomendadas para detectar alteraciones predictivas, incluidas mutaciones o reordenamientos oncogénicos. En la mayoría de los carcinomas de células escamosas de pulmón avanzados, las pruebas moleculares amplias aún no son un estándar; sin embargo, debería considerarse la realización de pruebas moleculares que incluyan al *NTRK* en función del perfil clínico (paciente joven y que nunca ha fumado o que es fumador moderado).



**Figura 11-2.** Algoritmo de pruebas diagnósticas propuesto para las fusiones del gen *NTRK* en el adenocarcinoma de pulmón o el CPNM, NOS. Como alternativa a las pruebas secuenciales, las pruebas NGS simultáneas basadas en ADN y ARN son una opción que depende del entorno de la práctica local y de la cobertura de los costos adicionales. Abreviaturas: IHQ = inmunohistoquímica; NGS = secuenciación de nueva generación; CPNM, NOS = cáncer de pulmón no microcítico, no especificado. (Adaptado de Koehne de González *et al.*<sup>21</sup>)

## Implicaciones clínicas

Los inhibidores de TRK son muy activos en pacientes con cánceres positivos para la fusión del *NTRK*. En muchos pacientes se alcanza rápidamente la respuesta y se observa un control duradero de la enfermedad. La tasa de respuesta global (TRG) al larotrectinib en todos los cánceres positivos para fusión del *NTRK* es del 75 %, independientemente de la edad del paciente o del tipo de tumor.<sup>22</sup> En los cánceres de pulmón positivos para la fusión del *NTRK*, la TRG es del 83 %, con una mediana de duración de la respuesta (median duration of response, DOR) y una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) que no se han alcanzado. La mediana de supervivencia global es de aproximadamente 41 meses. En pacientes con tumores sólidos positivos para la fusión del *NTRK*, la TRG del entrectinib, un inhibidor de TRK y TROS1, es del 57 %.<sup>23</sup> En los cánceres de pulmón positivos para la fusión del *NTRK*, la TRG es del 69 %, la mediana de DOR no se ha alcanzado, la mediana de la SLP es de 15 meses y la mediana de supervivencia global (SG) es de 15 meses.

Estos estudios condujeron a las aprobaciones históricas por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency, EMA) de los inhibidores de TRK de primera generación, larotrectinib y entrectinib, en pacientes de diversas edades con tumores sólidos avanzados positivos a la fusión del *NTRK*, independientemente de la histología del tumor. De hecho, el uso de un inhibidor de TRK en cánceres positivos a la fusión del *NTRK* está actualmente aprobado o autorizado en hasta 40 países de todo el mundo.

## Mecanismos de resistencia

A pesar de estas respuestas rápidas y duraderas a los inhibidores de TRK, lamentablemente se desarrolla resistencia en la mayoría de los pacientes. Los mecanismos de resistencia conocidos son, en la diana o fuera de ella. La resistencia en la diana implica mutaciones del *NTRK1/2/3* que dan lugar a sustituciones de aminoácidos en diferentes regiones: el frente solvente, el “gatekeeper” o el motivo DFG caracterizado por 3 aminoácidos secuenciales, ácido aspártico (D), fenilalanina (F) y glicina (G), del dominio quinasa de TRK.<sup>24</sup> Estas mutaciones dentro de la diana pueden ser el objetivo de los inhibidores de TRK de nueva generación, como selitrectinib, repotrectinib y taletrectinib, entre otros.<sup>2</sup> Los mecanismos fuera de la diana implican mutaciones o amplificaciones adquiridas de la vía MAPK, como las mutaciones *KRAS G12D*, *BRAF V600E* o *MEK*, o la amplificación del *MET*.<sup>2,25,26</sup> Aún no se han descrito los datos relativos al espectro de mecanismos fuera de la diana en el CPNM, pero las terapias dirigidas combinadas (por ejemplo, un inhibidor de TRK con una segunda molécula pequeña dirigida contra la resistencia a la derivación) han demostrado una actividad de prueba de concepto en pacientes seleccionados con resistencia fuera de la diana.<sup>26</sup>

## Referencias

1. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(12):731-747.
2. Qin H, Patel MR. The challenge and opportunity of NTRK inhibitors in non-small cell lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6).
3. Kheder ES, Hong DS. Emerging targeted therapy for tumors with NTRK fusion proteins. *Clin Cancer Res*. 2018;24(23):5807-5814.
4. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*. 2020;33(1):38-46.

5. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan-TRK immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(11):1547-1551.
6. Zhang L, Liu H, Tian Y, Wang H, Yang X. A novel NCOR2-NTRK1 fusion detected in a patient of lung adenocarcinoma and response to larotrectinib: a case report. *BMC Pulm Med*. 2021;21(1):125.
7. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1469-1472.
8. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*. 2019;32(1):147-153.
9. Farago AF, Le LP, Zheng Z, et al. Durable clinical response to entrectinib in NTRK1-rearranged non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(12):1670-1664.
10. Forsythe A, Zhang W, Phillip Strauss U, et al. A systematic review and meta-analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase gene fusion frequencies in solid tumors. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920975613.
11. Rosen EY, Goldman DA, Hechtman JF, et al. TRK fusions are enriched in cancers with uncommon histologies and the absence of canonical driver mutations. *Clin Cancer Res*. 2020;26(7):1624-1632.
12. Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer harboring an NTRK gene fusion. *JCO Precis Oncol*. 2018;2018:PO.18.00037.
13. Xia H, Xue X, Ding H, et al. Evidence of NTRK1 fusion as resistance mechanism to EGFR TKI in EGFR+ NSCLC: results from a large-scale survey of NTRK1 fusions in Chinese patients with lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2020;21(3):247-254.
14. Marchio C, Scaltriti M, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417-1427.
15. Elfving H, Brostrom E, Moens LNJ, et al. Evaluation of NTRK immunohistochemistry as a screening method for NTRK gene fusion detection in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2021;151:53-59.
16. Ali G, Bruno R, Savino M, et al. Analysis of fusion genes by NanoString system: a role in lung cytology? *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(4):480-489.
17. Skalova A, Vanecek T, Simpson RH, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: molecular analysis of 25 ETV6 gene rearranged tumors with lack of detection of classical ETV6-NTRK3 fusion transcript by standard RT-PCR: report of 4 cases harboring ETV6-X gene fusion. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(1):3-13.
18. Matter MS, Chijioke O, Savic S, Bubendorf L. Narrative review of molecular pathways of kinase fusions and diagnostic approaches for their detection in non-small cell lung carcinomas. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(6):2645-2655.
19. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-404.
20. Hempel D, Wieland T, Solfrank B, et al. Antitumor activity of larotrectinib in esophageal carcinoma with NTRK gene amplification. *Oncologist*. 2020;25(6):e881-e886.
21. Koehne de González A, Mansukhani MM, Fernandes H, Hsiao SJ. Pan-tumor screening for NTRK gene fusions using pan-TRK immunohistochemistry and RNA NGS fusion panel testing. *Cancer Genet*. 2022;262-263:47-52.
22. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med*. 2018;378(8):731-739.
23. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol*. 2020;21(2):271-282.
24. Russo M, Misale S, Wei G, et al. Acquired resistance to the TRK inhibitor entrectinib in colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(1):36-44.
25. Drilon A, Nagasubramanian R, Blake JF, et al. A next-generation TRK kinase inhibitor overcomes acquired resistance to prior TRK kinase inhibition in patients with TRK fusion-positive solid tumors. *Cancer Discov*. 2017;7(9):963-972.
26. Cocco E, Schram AM, Kulick A, et al. Resistance to TRK inhibition mediated by convergent MAPK pathway activation. *Nat Med*. 2019;25(9):1422-1427.

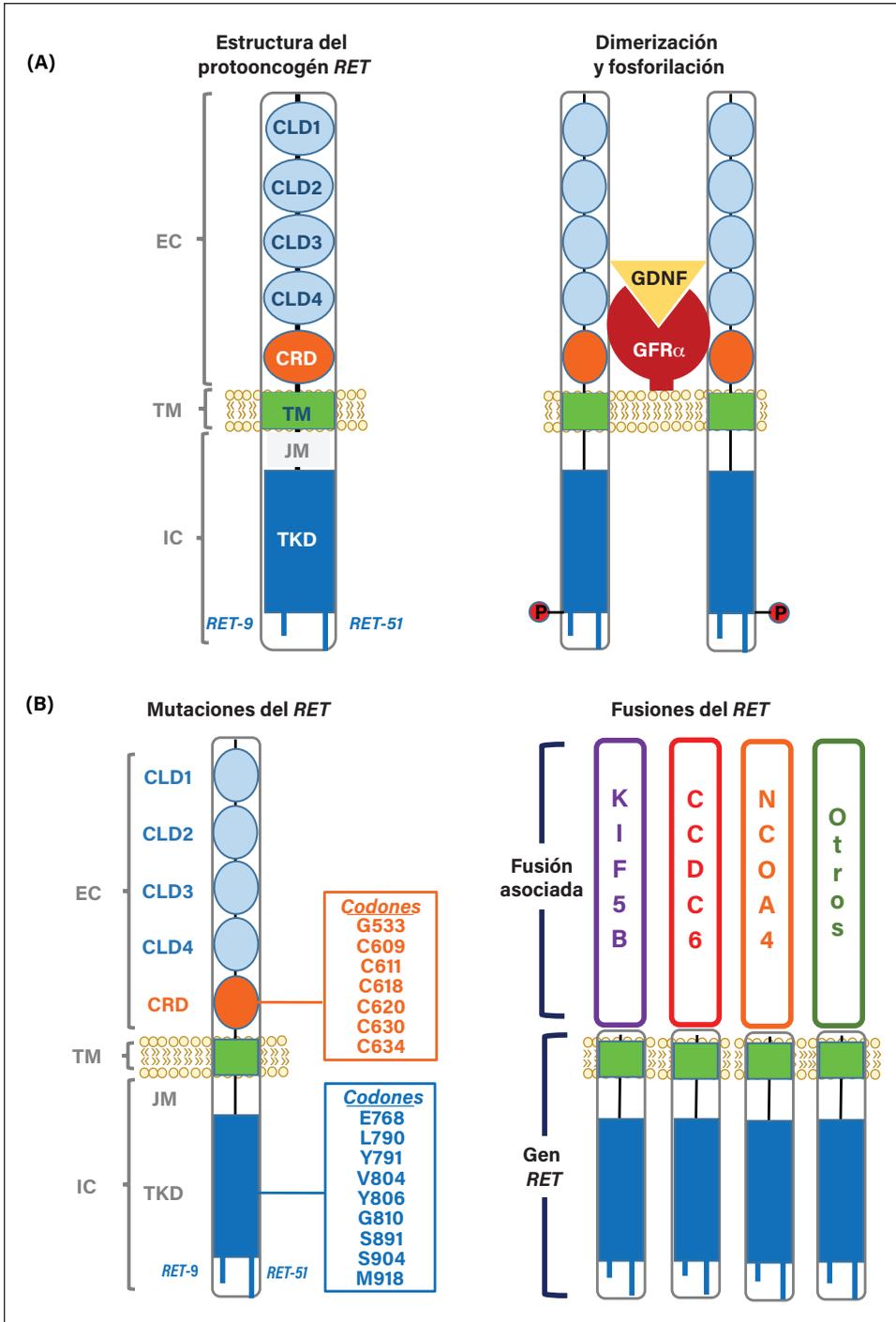
### **Estructura y función de los genes**

El gen de REordenamiento durante la Transfección (*RET*) del cromosoma 10q11.21 se identificó originalmente mediante una prueba de transfección de una línea celular de fibroblastos NIH3T3 con ADN de linfoma humano. Su producto es un receptor de membrana que contiene dominios extracelulares (con 4 repeticiones similares a las cadherinas, 1 sitio de unión al calcio y un sitio rico en cisteína), transmembrana e intracelulares (figura 12-1). Este último contiene una porción yuxtamembrana, la tirosina quinasa, y 2 colas *RET* (*RET-9* y *RET-51*) generadas por empalme alternativo, que determinan 2 isoformas de la proteína RET. Los ligandos de RET incluyen la familia del factor neurotrópico derivado de la glía (glial-derived neurotrophic factor, GDNF) que se une al correceptor GFRa y al GDF15, que se une al correceptor del receptor tipo  $\alpha$  de la familia GDNF (GFRAL), formando un complejo ternario con el dominio extracelular de RET y desencadenando la dimerización de RET y la fosforilación y activación de la tirosina. La transducción descendente de señales implica a las vías RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT. Fisiológicamente, el *RET* desempeña un papel en el desarrollo de los riñones y el sistema nervioso entérico.<sup>1,2</sup>

### **Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis**

Se encontraron mutaciones, fusiones y amplificaciones del *RET* en el 39 %, 31 % y 25 % de los tumores, respectivamente, según un amplio estudio de más de 4800 cánceres diversos.<sup>3</sup> Las mutaciones de la línea germinal del *RET* causan enfermedades y tumores hereditarios, incluida la neoplasia endocrina múltiple (multiple endocrine neoplasia, MEN) tipos 2A y 2B. En todas las neoplasias malignas se producen alteraciones somáticas, incluidas mutaciones y fusiones.<sup>4</sup>

Las mutaciones de ganancia de función del *RET* que dan lugar a una activación aberrante de RET se producen en el carcinoma medular de tiroides (medullary thyroid carcinoma, MTC) esporádico o hereditario y rara vez se describen en otros cánceres. Estas mutaciones afectan a la porción rica en cisteína del dominio extracelular en el caso del MTC familiar y la MEN2A o al dominio tirosina quinasa en el caso de la MEN2B y casos esporádicos.



**Figura 12-1. (A)** Estructura del oncógeno *RET* e interacciones entre ligando y receptor. **(B)** Las alteraciones genéticas incluyen mutaciones y reordenamientos genéticos con diferentes compañeros. Abreviaturas: CLD = dominio similar a la cadherina; CRD = dominio rico en cisteína; EC = porción extracelular; GDNF = factor neurotrófico derivado de la glía; GFR $\alpha$  = coreceptor alfa 1 del factor GDNF; IC = porción intracelular; JM = segmento yuxtamembrana; P = sitio de fosforilación; TKD = dominio tirosina quinasa; TM = porción transmembrana. (Adaptado de Ferrara *et al* y Radonic *et al*.<sup>1,5</sup>)

Las fusiones del *RET* suelen implicar reordenamientos intracromosómicos, pero rara vez pueden implicar reordenamientos intercromosómicos, lo que da lugar a la fusión de la región que codifica el dominio quinasa del *RET* en el extremo 3' con la región 5'-terminal de varios genes compañeros.<sup>4</sup> Estas fusiones dan lugar a una oncoproteína de fusión quimérica constitutivamente activa. Se han descrito fusiones del *RET* en el carcinoma papilar de tiroides y en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), además de en otros tipos de tumores como los adenocarcinomas colorrectales, de glándulas salivales y de ovario. En el cáncer de pulmón, las fusiones asociadas al *RET* más comunes son *KIF5B* (72 %), *CCDC6* (23 %), *NCOA4* (2 %), *EPHA5* (1 %) y *PICALM* (1 %).<sup>6</sup> En cambio, en el cáncer papilar de tiroides, *CCDC6* y *NCOA4* son los genes compañeros ascendentes más comunes.<sup>7-10</sup>

Raramente se ha informado de amplificaciones del *RET* en carcinomas pancreáticos y de mama (entre otros), con una expresión elevada pero heterogénea de la proteína RET incluso en ausencia de una fusión del *RET*.<sup>11</sup>

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Se han identificado fusiones del *RET* en el 1 % y el 2 % de los adenocarcinomas de pulmón.<sup>6</sup> Los pacientes con cánceres de pulmón positivos para fusión del *RET* tienden a ser más jóvenes ( $\leq 60$  años) con una distribución por sexos relativamente igual. La mayoría de los pacientes nunca han fumado, aunque se ha informado de la incidencia en fumadores actuales y exfumadores.<sup>12</sup> No se ha observado ninguna asociación con la exposición a la radiación terapéutica en los adenocarcinomas de pulmón con fusiones del *RET*.<sup>13</sup>

### Estrategias de prueba

Aún no se han estandarizado los métodos de cribado para detectar fusiones del *RET*. Para identificar las fusiones del *RET* se ha utilizado inmunohistoquímica (IHQ), reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH) y secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) basada en ADN/ARN. Cabe destacar que, a diferencia de la IHQ para ALK, la IHQ para RET tiene una sensibilidad baja (55 %-65 %) y una especificidad variable (40 %-85 %).<sup>11,13,14</sup> La sensibilidad de la IHQ también puede variar según la fusión asociada.<sup>11</sup> Por lo tanto, actualmente no se recomienda la IHQ para RET para cribado de fusiones o mutaciones del *RET* en el adenocarcinoma de pulmón.<sup>15</sup>

La prueba FISH para *RET* suele ser muy sensible (100 %), aunque con una sensibilidad menor para la fusión poco frecuente *NCOA4-RET* (66,7 %).<sup>11</sup> Se ha informado de que la especificidad de la prueba FISH para el *RET* oscila entre el 55 % y el 100%.<sup>13,14</sup> Dado que las fusiones del *RET* en los cánceres de pulmón pueden implicar una variedad de genes compañeros, se prefieren las sondas de rotura a las sondas de fusión. Las guías para la prueba FISH del *RET* y su puntaje son similares a las de la detección de otros genes de fusión. La prueba es positiva si más del 15 % de las células tumorales muestran señal dividida o señal 3' única.

Aunque la RT-PCR es específica, está limitada a la detección de fusiones conocidas. Las pruebas basadas en NGS ofrecen la ventaja de identificar fusiones del *RET*, incluso con fusiones asociadas novedosas, y además permiten realizar pruebas multiplex para otras dianas susceptibles a una intervención preventiva.<sup>16</sup> La NGS basada en ADN tiene limitaciones a la hora de identificar

fusiones complejas, y aquí, la NGS basada en ARN puede añadir valor. Las pruebas basadas en NGS del ADN libre de células (cfADN) también pueden detectar fusiones del *RET*, y se debe considerar un resultado positivo como indicativo de la presencia de una fusión del *RET*.<sup>17,18</sup>

### **Orientación terapéutica de las fusiones del *RET* en el CPNM**

Los esfuerzos iniciales para actuar sobre *RET* en el CPNM positivo para fusión del *RET* se centraron en la reconversión de los inhibidores de multiquinasa con actividad anti-*RET* (por ejemplo, vandetanib, cabozantinib, lenvatinib).<sup>19-24</sup> Aunque se informaron grados variables de eficacia, las respuestas fueron típicamente modestas. Además, la tolerabilidad se vio limitada por toxicidades relacionadas con la inhibición de la multiquinasa, como la del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2).

El selpercatinib (antes LOXO-292) y el pralsetinib (antes BLU-667) son inhibidores orales de la tirosina quinasa (TKI) desarrollados para actuar de forma potente y selectiva contra las fusiones y mutaciones oncogénicas del *RET*. En consonancia con su selectividad, el selpercatinib y el pralsetinib demostraron unos perfiles de seguridad favorables en ensayos de fase 1 y 2.<sup>25,26</sup> En el ensayo LIBRETTO-001 de fase 1 y 2 de registro, el selpercatinib demostró una eficacia sólida en el CPNM avanzado positivo para fusión del *RET*, con unas tasas de respuesta global (TRG) del 85 % entre los pacientes sin tratamiento previo y del 64 % entre los pacientes pretratados con quimioterapia basada en platino.<sup>25</sup> En el ensayo ARROW de fase 1 y 2 de registro, el pralsetinib tuvo una eficacia similar, con TRG del 70 % y el 61 %, respectivamente, en estas poblaciones.<sup>26</sup> Cabe destacar que tanto el selpercatinib como el pralsetinib mostraron actividad contra las metástasis cerebrales. Con base en estos resultados, el selpercatinib y el pralsetinib han recibido aprobaciones condicionales de línea agnóstica por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el tratamiento del CPNM avanzado positivo para fusión del *RET*. Estos agentes han recibido además autorizaciones condicionales por parte de la Agencia Europea de Medicamentos para la indicación de pretratamiento con inmunoterapia o quimioterapia basada en platino para el selpercatinib y para la indicación de línea agnóstica para el pralsetinib.

### **Mecanismos de resistencia a los inhibidores selectivos de *RET***

A pesar de su eficacia, la aparición de resistencia a los TKI de *RET* sigue siendo un desafío importante. Se han identificado mecanismos de resistencia tanto dentro la diana como fuera de ella. El primer mecanismo de resistencia del que se informó fue la mutación G810 del frente solvente del *RET*, que causa una interferencia estérica con la unión de los TKI y se ha identificado entre el 7 % y el 11 % de las biopsias posteriores a la progresión.<sup>27-30</sup> Las mutaciones Y806C/N en la región bisagra del *RET* también causan resistencia al selpercatinib y al pralsetinib.<sup>30,31</sup> Se han identificado mutaciones L730V/I en la región del techo en muestras resistentes al pralsetinib, pero se prevé que sigan siendo sensibles al selpercatinib.<sup>28,32</sup> Hay novedosos inhibidores de *RET* en fase de desarrollo clínico que pueden ayudar a abordar la resistencia dentro de la diana (por ejemplo, LOXO-260 [NCT05241834], TAS0953/HM06 [NCT04683250], TPX-0046 [NCT04161391]).

También se están delineando los mecanismos de resistencia a selpercatinib y pralsetinib fuera de la diana y hasta ahora parecen predominar en comparación con los mecanismos dentro

de la diana (83 %-90 % en comparación con 10 %-17 %, respectivamente).<sup>28-30</sup> La amplificación del *MET* se ha identificado de forma recurrente en pacientes que presentan progresión con selpercatinib y pralsetinib.<sup>28-30,33</sup> Los informes de casos sugieren que la inhibición dual de RET y MET puede representar un enfoque terapéutico viable en estos casos.<sup>33</sup> También se han identificado amplificación o mutaciones del *KRAS*, mutación *BRAF* V600E, amplificación del *FGFR1* y fusión del *NTRK3*.<sup>28-30,34</sup> Sin embargo, los mecanismos de resistencia a los TKI selectivos de RET siguen sin determinarse en una proporción sustancial (40 %-80 %) de los casos, lo que subraya la necesidad de realizar más estudios para dilucidar la biología y las estrategias de tratamiento óptimas para los cánceres resistentes a los TKI de RET.

## Referencias

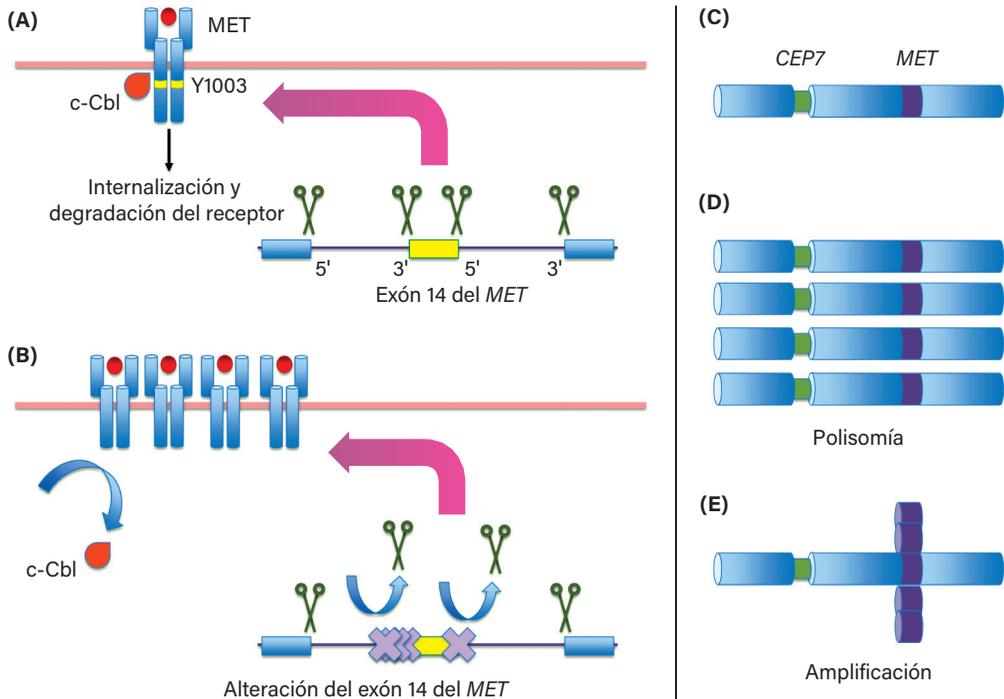
- Ferrara R, Auger N, Auclin E, Besse B. Clinical and translational implications of RET rearrangements in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(1):27-45.
- Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(5):296-306.
- Kato S, Subbiah V, Marchlik E, et al. RET aberrations in diverse cancers: next-generation sequencing of 4,871 patients. *Clin Cancer Res.* 2017;23(8):1988-1997.
- Shi M, Wang W, Zhang J, et al. Identification of RET fusions in a Chinese multicancer retrospective analysis by next-generation sequencing. *Cancer Sci.* 2022;113(1):308-318.
- Radonic T, Geurts-Giele WRR, Samsom KG, et al. RET fluorescence in situ hybridization analysis is a sensitive but highly unspecific screening method for RET fusions in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2021;16(5):798-806. doi:10.1016/j.jtho.2021.01.1619.
- Gautschi O, Milia J, Filleron T, et al. Targeting RET in patients with RET-rearranged lung cancers: results from the global, multicenter RET registry. *J Clin Oncol.* 2017;35(13):1403-1410.
- Li F, Feng Y, Fang R, et al. Identification of RET gene fusion by exon array analyses in “pan-negative” lung cancer from never smokers. *Cell Res.* 2012;22(5):928-931.
- Cai W, Su C, Li X, et al. KIF5B-RET fusions in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer.* 2013;119(8):1486-1494.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012;18(3):378-381.
- Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2012;18(3):375-377.
- Yang SR, Aypar U, Rosen EY, et al. A performance comparison of commonly used assays to detect RET fusions. *Clin Cancer Res.* 2021;27(5):1316-1328.
- Michels S, Scheel AH, Scheffler M, et al. Clinicopathological characteristics of RET rearranged lung cancer in European patients. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):122-127.
- Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(35):4352-4359.
- Tsuta K, Kohno T, Yoshida A, et al. RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1571-1578.
- Belli C, Penault-Llorca F, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect RET fusions and mutations in daily practice and clinical research. *Ann Oncol.* 2021;32(3):337-350.
- Feng J, Li Y, Wei B, et al. Clinicopathologic characteristics and diagnostic methods of RET rearrangement in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res.* 2022;11(4):617-631.
- Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: analysis of over 8000 cases. *Cancer.* 2020;126(14):3219-3228.
- Rich TA, Reckamp KL, Chae YK, et al. Analysis of cell-free DNA from 32,989 advanced cancers reveals novel co-occurring activating RET alterations and oncogenic signaling pathway aberrations. *Clin Cancer Res.* 2019;25(19):5832-5842.
- Drilon A, Hu ZI, Lai GGY, Tan DSW. Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving pre-clinical and clinical landscapes. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(3):150.

20. Drilon A, Rekhtman N, Arcila M, et al. Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):1653-1660.
21. Lee SH, Lee JK, Ahn MJ, et al. Vandetanib in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer-harboring RET rearrangement: a phase II clinical trial. *Ann Oncol.* 2017;28(2):292-297.
22. Yoh K, Seto T, Satouchi M, et al. Vandetanib in patients with previously treated RET-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (LURET): an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Respir Med.* 2017;5(1):42-50.
23. Hida T, Velcheti V, Reckamp KL, et al. A phase 2 study of lenvatinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2019;138:124-130.
24. Horiike A, Takeuchi K, Uenami T, et al. Sorafenib treatment for patients with RET fusion-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2016;93:43-46.
25. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, et al. Efficacy of selpercatinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(9):813-824.
26. Gainor JF, Curigliano G, Kim DW, et al. Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2021;22(7):959-969.
27. Solomon BJ, Tan L, Lin JJ, et al. RET solvent front mutations mediate acquired resistance to selective RET inhibition in RET-driven malignancies. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):541-549.
28. Gainor JF, Curigliano G, Kim DW, et al. OA05.02 Analysis of resistance mechanisms to pralsetinib in patients with RET fusion-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) from the ARROW study. *J Thorac Oncol.* 2021;16(S1):S31-S32.
29. Lin JJ, Liu SV, McCoach CE, et al. Mechanisms of resistance to selective RET tyrosine kinase inhibitors in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2020;31(12):1725-1733.
30. Rosen EY, Won HH, Zheng Y, et al. The evolution of RET inhibitor resistance in RET-driven lung and thyroid cancers. *Nat Commun.* 2022;13(1):1450.
31. Subbiah V, Shen T, Terzyan SS, et al. Structural basis of acquired resistance to selpercatinib and pralsetinib mediated by non-gatekeeper RET mutations. *Ann Oncol.* 2021;32(2):261-268.
32. Shen T, Hu X, Liu X, et al. The L730V/I RET roof mutations display different activities toward pralsetinib and selpercatinib. *NPJ Precis Oncol.* 2021;5(1):48.
33. Rosen EY, Johnson ML, Clifford SE, et al. Overcoming MET-dependent resistance to selective RET inhibition in patients with RET fusion-positive lung cancer by combining selpercatinib with crizotinib. *Clin Cancer Res.* 2021;27(1):34-42.
34. Subbiah V, Shen T, Tetzlaff M, et al. Patient-driven discovery and post-clinical validation of NTRK3 fusion as an acquired resistance mechanism to selpercatinib in RET fusion-positive lung cancer. *Ann Oncol.* 2021;32(6):817-819.

## Estructura y función de los genes

El protooncogén MET receptor tirosina quinasa (receptor tyrosine kinase, *MET*), también conocido como *receptor del factor de crecimiento de hepatocitos*, es el responsable de la codificación de la proteína MET, un receptor del factor de crecimiento que se expresa predominantemente en células endoteliales y epiteliales con papeles esenciales en el desarrollo, la regeneración y la homeostasis. La desregulación de MET es un conductor bien establecido de la oncogénesis en muchos tipos de cáncer, incluido el de pulmón.<sup>1,2</sup> Clonado inicialmente a partir de una fusión oncogénica inducida en una línea celular de osteosarcoma, MET y su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor, HGF), se dieron a conocer posteriormente por sus papeles en la morfogénesis (ramificación tubular, incluso en el hígado, el riñón y el pulmón), la motilidad y la invasión (carcinoma) y la mitogénesis (incluida la regeneración de hepatocitos).<sup>3-7</sup>

MET es una proteína receptora transmembrana de paso único definida por un dominio de unión al ligando extracelular (Sema); un dominio de plexina-semaforina-integrina (PSI); un dominio de factor de transcripción de plexina similar a inmunoglobulina; y dominios transmembrana, yuxtamembrana intracelular y tirosina quinasa.<sup>7</sup> Tras la unión de su ligando, el HGF, MET se homodimeriza, lo que conduce a la fosforilación de las tirosinas 1234/1235 (dominio quinasa) y 1349/1356 (dominio de acoplamiento), con la subsiguiente activación descendente de las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK) y PI3K-mTOR-AKT.<sup>8</sup> Fundamentalmente, la regulación de la expresión de la proteína MET en la superficie celular está mediada por la ligasa de ubiquitina E3, Cbl, que se une al Y1003 fosforilado en el dominio yuxtamembrana del receptor.<sup>9</sup> La ubiquitinación mediada por Cbl desencadena la endocitosis del receptor<sup>10</sup> (figura 13-1); curiosamente, el tránsito de MET al compartimento endosomal parece necesario para la activación de todo el rango de señales descendentes, incluso a través de la quinasa regulada por señales extracelulares-1, -2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) y el transductor de señales y activador de la transcripción-3 (signal transducer and activator of transcription-3, STAT3).<sup>11</sup>

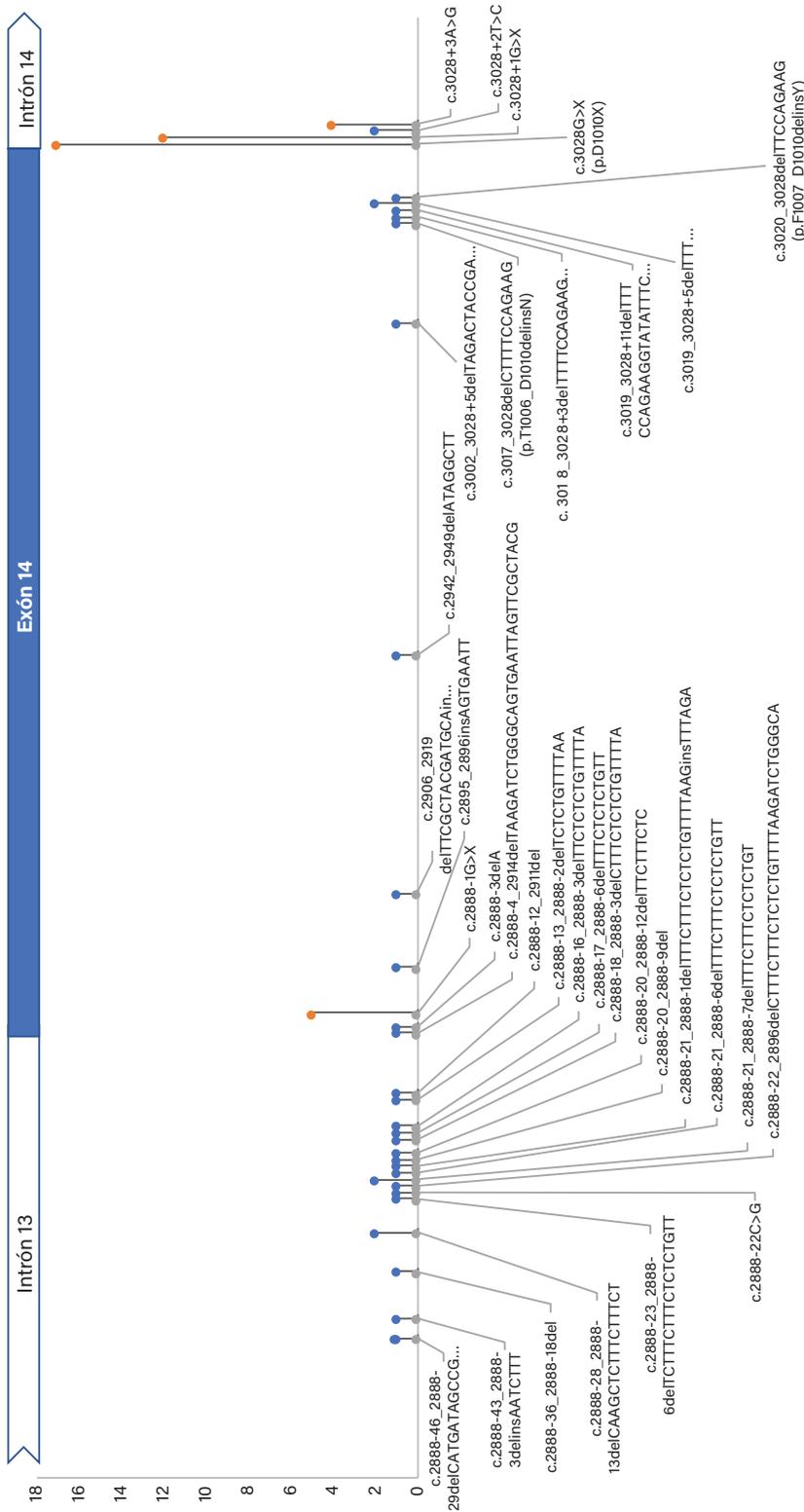


**Figura 13-1.** Representación esquemática de los modos más comunes de activación del gen *MET*. **(A)** Tras la unión del ligando, la expresión superficial de Met se regula normalmente a la baja por la unión de Cbl a la tirosina fosforilada en el codón 1003 en el dominio yuxtamembrana de Met, lo que conduce a su internalización y degradación. **(B)** Las mutaciones de omisión del exón 14 de MET afectan de forma preferencial a las regiones de empalme que flanquean el exón 14, lo que conduce a la delección de la región yuxtamembrana que contiene Y1003 e impide la interacción con Cbl. De forma alternativa o concomitante, **(C)** MET puede sufrir un aumento relativo del número de copias, causado por el cromosoma 7 **(D)** que sufre una o más rondas de reduplicación que conducen a la polisomía o **(E)** causado por la amplificación focal de MET. Esta última está más fuertemente asociada con la activación de Met y la dependencia oncogénica. (Adaptado de Drilon *et al.*<sup>12</sup>)

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

La disregulación de la vía MET en el cáncer de pulmón se produce a través de varios mecanismos moleculares que incluyen mutaciones genéticas, amplificaciones, sobreexpresión de proteínas y fusiones.<sup>13</sup> Se han descrito varios mecanismos mutacionales de oncogénesis en el *MET*, incluso en los *hotspots* del dominio quinasa (F1200I, Y1230X y M1250T) en el carcinoma papilar de células renales y potencialmente dentro del dominio extracelular Sema en varios tipos de tumores.<sup>14,15</sup> Sin embargo, el mecanismo dominante en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es la introducción de una diversidad de mutaciones con cambio de sentido y de delección-inserción en y alrededor de los sitios de empalme que flanquean el exón 14, que conducen a la “omisión del exón 14” y a la pérdida del dominio regulador yuxtamembrana que contiene el sitio de unión de Cbl<sup>16</sup> en Y1003 (figura 13-2). La señalización oncogénica persistente a través del receptor MET unido a la superficie se asocia con un aumento de la invasión celular y la metástasis.<sup>16,17</sup>

Las amplificaciones del *MET* se pueden clasificar principalmente en 2 subtipos: *de novo* y adquiridas. La amplificación del *MET de novo* se produce entre el 1 % y el 5 % de los CPNM y se asocia a un mal pronóstico.<sup>18,19</sup> Cabe destacar que la prevalencia de las amplificaciones del *MET* varía entre los distintos estudios, dependiendo del valor de corte y de las pruebas diagnósticas utilizadas. En un subconjunto de casos, las mutaciones de omisión del exón 14



**Figura 13-2.** Gráfico de piruletas que representa la diversidad de mutaciones detectadas en el intrón 13, el exón 14 y el intrón 14 del gen *MET* que dan lugar a la omisión del exón 14 de *MET* y a la pérdida del dominio regulador yuxtamembrana, incluido el sitio de unión a Cbl en Y1003. Los *hotspots* se designan con piruletas *naranja*. Los datos de 71 pacientes proceden de la prueba de secuenciación de nueva generación OncoPanel del Dana Farber Cancer Institute desde el 2017 hasta el 2021. (Los datos están disponibles públicamente en AACR Project Genie<sup>23</sup>).

van acompañadas de una amplificación selectiva del alelo mutado, un acontecimiento que probablemente facilita el estado de adicción del oncogén.<sup>20-22</sup>

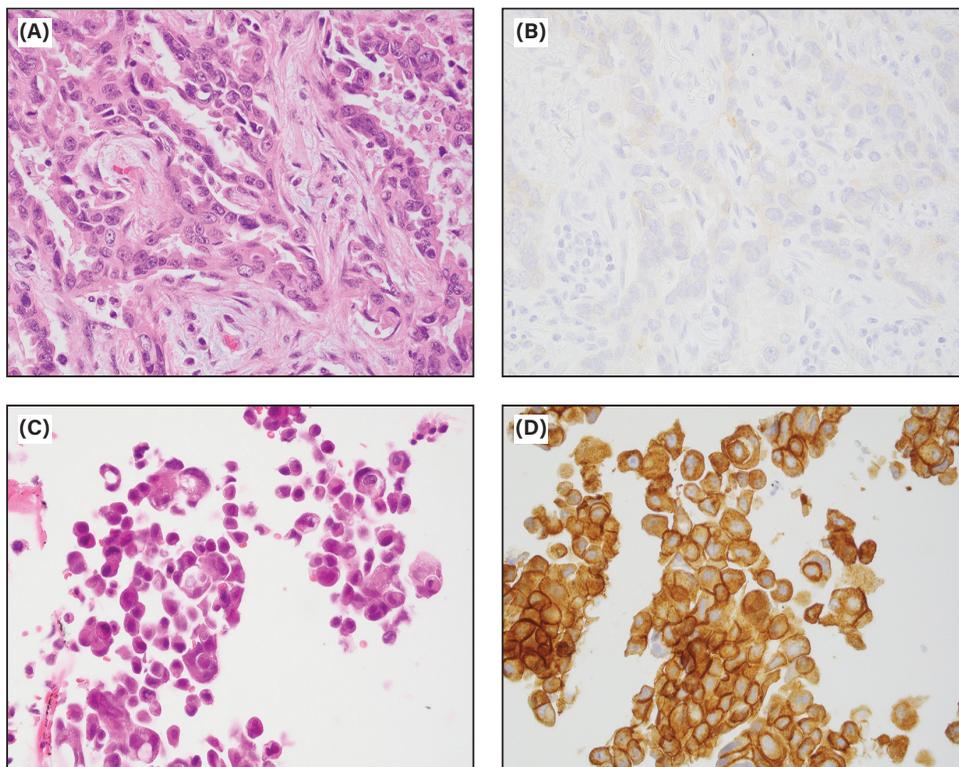
En raras ocasiones, la amplificación del *MET de novo* de tipo salvaje está implicada como el único factor oncogénico; lo más típico es que la amplificación del *MET* se observe con una alteración del factor mitogénico concurrente, incluso en el *EGFR* y el *KRAS*.<sup>24</sup> La amplificación adquirida del *MET* se puede identificar en entre el 5 % y el 20 % de los pacientes con CPNM con mutación en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) tras la progresión con inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) del *EGFR* de primera, segunda y tercera generación,<sup>25-27</sup> y ahora se reconoce como un mecanismo recurrente de resistencia adquirida a las terapias dirigidas contra *ALK*, *RET* y *ROS1*.<sup>28</sup>

Las fusiones intergénicas que afectan al *MET* son poco frecuentes, pero se han identificado diversas fusiones asociadas. Tales fusiones se han descrito en gran medida en tumores distintos al CPNM, incluidos el glioma, el carcinoma papilar de células renales y el tiroideo.<sup>29</sup> La frecuencia exacta de la fusión del *MET* en el CPNM está mal definida; las mejores estimaciones sugieren que se producen en el 0,5 % de los adenocarcinomas de pulmón que, por lo demás, son negativos para oncogenes.<sup>30</sup> Los puntos de rotura dentro del gen *MET* parecen estar enriquecidos en el intrón 14, y los productos de fusión yuxtaponen un compañero 5' que contiene un dominio de hélice superenrollada para facilitar la homodimerización con un dominio de *Met* quinasa intacto.<sup>29,30</sup> Las pruebas relativas al papel predictivo de las fusiones del *MET* para las terapias dirigidas a *Met* se derivan en gran medida de informes de casos y series pequeñas, pero sugieren que estas estrategias son prometedoras.<sup>31</sup>

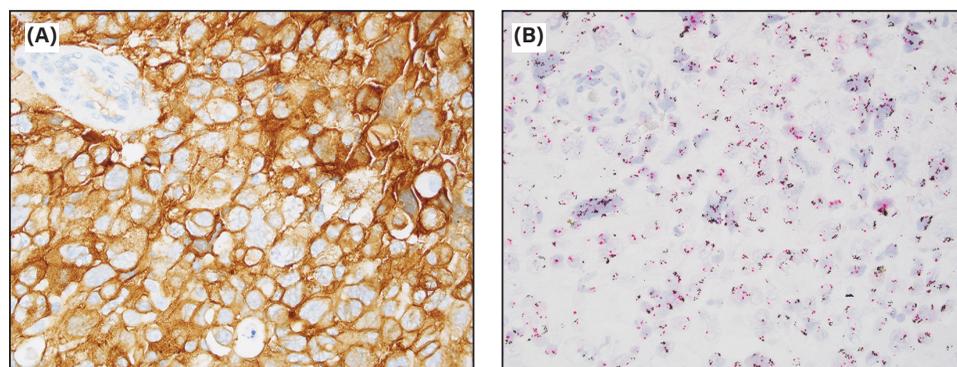
La sobreexpresión de *MET* es frecuente en el CPNM y se puede detectar aproximadamente entre el 20 % y el 48 % de los pacientes mediante inmunohistoquímica (IHQ).<sup>32-35</sup> Sin embargo, la correlación entre la sobreexpresión de *MET* y las alteraciones o amplificación del *MET* es débil, y solo un subconjunto de tumores positivos a la mutación de omisión del exón 14 del *MET* demuestran una expresión significativa de la proteína *MET* (figura 13-3A-D). Además, se puede observar una expresión de alto nivel en el contexto de otras alteraciones del factor oncogénico<sup>21,36,37</sup> (figura 13-4A,B).

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Las mutaciones de omisión del exón 14 del *MET* se producen entre el 3 % y el 4 % de los pacientes con CPNM en poblaciones blancas, mientras que, en China, la frecuencia es solo del 0,9 %.<sup>38-40</sup> La limitada secuenciación sistemática en otras poblaciones impide realizar estimaciones fiables de la frecuencia de mutaciones del exón 14 del *MET*. Los esfuerzos de secuenciación a gran escala han descubierto un posible enriquecimiento de las mutaciones y amplificaciones del *MET* en pacientes de ascendencia judía asquenazí.<sup>41</sup> Las mutaciones de omisión del exón 14 del *MET* se informan con mayor frecuencia en adenocarcinomas de pulmón, pero también se informan en carcinomas de células escamosas de pulmón, donde posiblemente estén enriquecidas en pacientes con antecedentes como fumadores moderados o que nunca han fumado.<sup>42,43</sup> Varios estudios han identificado un aparente enriquecimiento en el carcinoma sarcomatoide pulmonar entre el 5 % y el 32 % de los casos.<sup>21,44,45</sup> La mediana de la edad de los pacientes con mutaciones de omisión del exón 14 del *MET* (>70) es elevada en relación con la de aquellos con otros tumores impulsados por oncogenes.<sup>21,23</sup> La mayoría de los estudios indican que las mutaciones del *MET* se producen independientemente del hábito de fumar.<sup>23,41</sup> Las mutaciones de omisión del exón 14 del *MET* suelen ser mutuamente excluyentes con otras mutaciones conductoras de oncogenes; sin embargo, se ha informado de comutaciones de *KRAS* G12X en aproximadamente el 4 % de los casos.<sup>21,23,38,46</sup>



**Figura 13-3.** Dos ejemplos de adenocarcinomas de pulmón con alteraciones de omisión del exón 14 de MET y niveles muy variables de expresión de la proteína MET (clon inmunohistoquímico SP44 [Spring Bioscience]). (A) Resección pulmonar que muestra un adenocarcinoma de pulmón de predominio acinar con (B) niveles apenas perceptibles de expresión total de la proteína MET. (C) Biopsia pulmonar con aguja gruesa que muestra racimos desprendidos de adenocarcinoma de pulmón poco diferenciado con características micropapilares y (D) expresión fuerte y difusa de la proteína MET.



**Figura 13-4.** Adenocarcinoma de pulmón con mutación de KRAS que muestra una expresión fuerte y difusa de la proteína MET y amplificación de MET en forma de racimos de señales (regiones de tinción homogénea) mediante hibridación cromogénica *in situ* (señales negras = MET; señales rojas = CEN 7).

### Estrategias de prueba

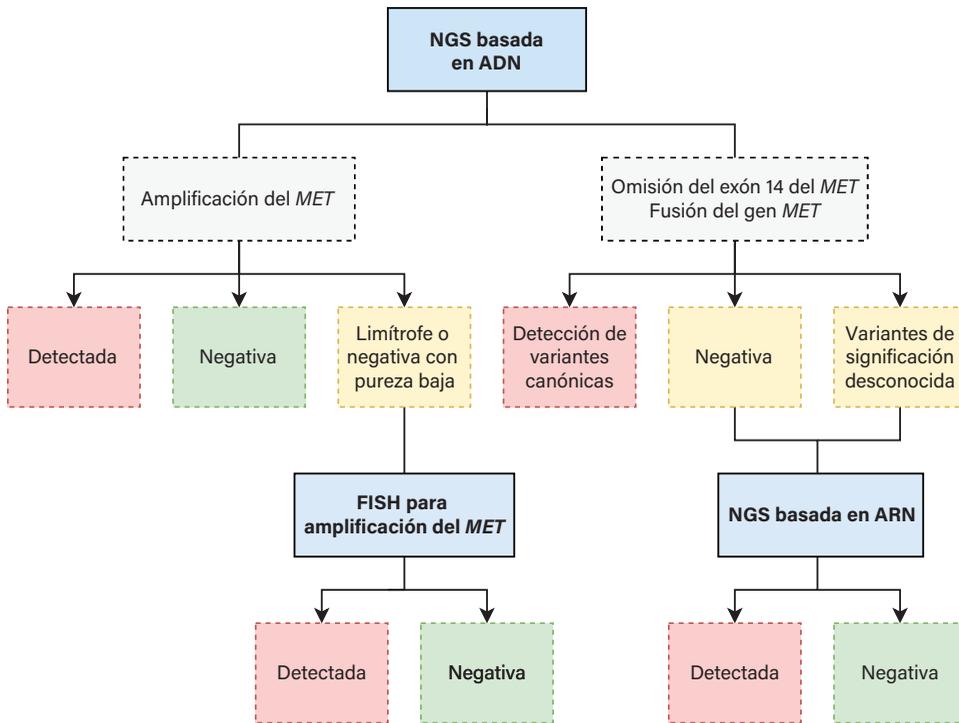
Dada la diversidad de alteraciones activadoras del *MET*, la evaluación integral de los biomarcadores del *MET* (susceptibles a una intervención preventiva) requiere un enfoque diagnóstico integrado. Es importante tener en cuenta la idoneidad y las limitaciones de cada prueba e implementar una estrategia de pruebas que garantice una amplia cobertura de las

**Tabla 13-1.** Pruebas clínicas para la detección de biomarcadores del *MET*

Prueba	Amplificación	Omisión del exón 14	Fusión genética	Sobreexpresión
Pruebas basadas en tejidos	ADN-NGS FISH	ADN-NGS ARN-NGS RT-PCR	ADN-NGS ARN-NGS FISH RT-PCR	IHQ
Pruebas basadas en líquido/plasma <sup>a</sup>	ADNtc-NGS	ADNtc-NGS	ADNtc-NGS	N/A

Abreviaturas: ADNtc = ADN tumoral circulante; FISH = hibridación fluorescente *in situ*; IHQ = inmunohistoquímica; N/A = no aplicable; NGS = secuenciación de nueva generación; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

<sup>a</sup> Aunque los métodos de biopsia líquida con ADNtc se pueden utilizar para detectar la amplificación del *MET*, la omisión del exón 14 y las fusiones, la sensibilidad limitada para el análisis del número de copias y la detección de fusiones requiere que los resultados negativos se confirmen en tejido.



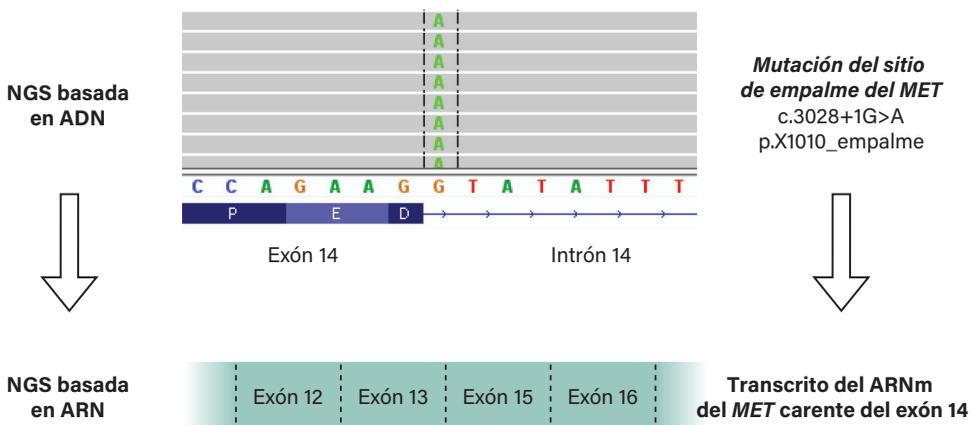
**Figura 13-5.** Posible estrategia de prueba para detectar biomarcadores del *MET*. Abreviaturas: FISH = hibridación fluorescente *in situ*; NGS = secuenciación de nueva generación.

diferentes clases de alteraciones del *MET*, incluidas la amplificación, las mutaciones, los transcritos alternativos y las fusiones (tabla 13-1).

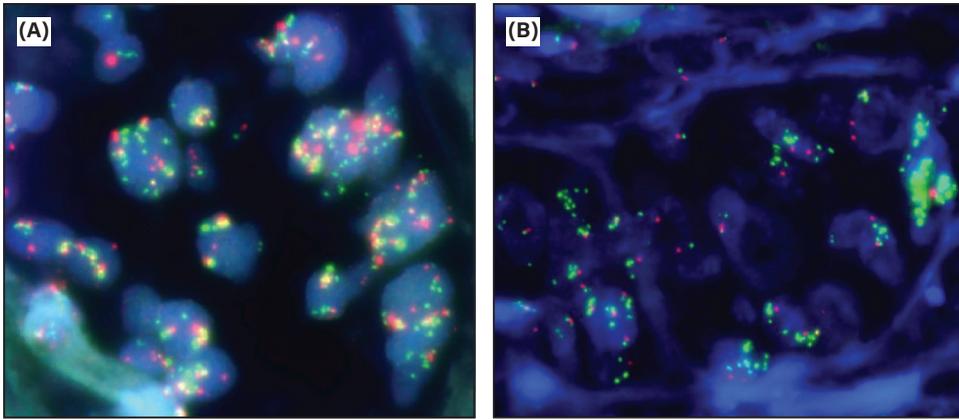
En la figura 13-5 se muestran conceptos diagnósticos importantes para detectar alteraciones patogénicas del *MET* en la clínica y una estrategia de pruebas. Dada la creciente adopción de la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) basada en ADN como prueba diagnóstica estándar para el CPNM y su capacidad para detectar múltiples tipos de alteraciones del *MET*, proponemos un posible flujo de trabajo diagnóstico utilizando la NGS basada en ADN como prueba de cribado inicial para el perfil del *MET*.

Al evaluar la amplificación del *MET*, la amplificación de alto nivel y la ausencia de amplificación en el contexto de una pureza tumoral suficiente representan resultados fiables que no requieren pruebas adicionales. Sin embargo, en los casos con amplificación limítrofe o ausencia de amplificación en un caso con baja pureza tumoral, la realización de pruebas adicionales mediante hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH) puede proporcionar un análisis más granular y ayudar a confirmar los resultados de la NGS. Para la omisión del exón 14 del *MET* y las fusiones del *MET*, la detección de variantes canónicas proporciona información suficiente para el manejo clínico. Sin embargo, los resultados negativos y las variantes de significación desconocida deben evaluarse más a fondo mediante pruebas basadas en ARN. Por otra parte, los enfoques de pruebas que ofrecen análisis paralelos basados en ADN y ARN pueden eludir la necesidad de seguir una estrategia de pruebas secuenciales. Las pruebas basadas en ARN optimizadas para la detección de fusiones pueden descubrir fusiones ocultas pasadas por alto por la NGS basada en ADN y proporcionar confirmación funcional para variantes de patogenicidad incierta.

La omisión del exón 14 del *MET* está mediada por mutaciones patogénicas en los sitios de empalme donantes/aceptores y grandes deleciones genómicas que dan lugar a un transcrito del *MET* alternativo que carece del exón 14. En la mayoría de los casos, estas alteraciones se pueden detectar mediante NGS basada en ADN si existe una cobertura suficiente de los sitios de empalme y de las regiones intrónicas que flanquean al exón 14.<sup>47</sup> Dado que existen mutaciones crípticas que alteran el empalme en regiones intrónicas profundas, puede ser necesaria una cobertura completa de los intrones 13 y 14 (además del exón 14) para obtener una sensibilidad óptima.<sup>38,48</sup> Sin embargo, esto puede suponer un desafío debido al gran tamaño de los intrones y a la presencia de secuencias repetitivas, dos factores que pueden afectar la precisión de la secuenciación basada en ADN. Por esta y otras razones, se prefiere la NGS basada en captura híbrida a la NGS basada en amplicones, debido a problemas técnicos como el sesgo de secuenciación y el abandono de alelos.<sup>49,50</sup> Sin embargo, incluso con la NGS basada en captura híbrida, se sabe que la secuenciación



**Figura 13-6.** La secuenciación de nueva generación (NGS) basada en ADN y en ARN detecta la mutación del sitio de empalme y el evento de omisión de exón a nivel de los transcritos de ARN, respectivamente. La estrategia de secuenciación basada en ARN ofrece pruebas directas de una anomalía de empalme, mientras que los efectos de una mutación a nivel del ADN solo se pueden inferir basándose en la localización dentro de la región de empalme.



**Figura 13-7. (A)** Señales aumentadas en *MET* (verde) y CEP7 (rojo) que sugieren polisomía del cromosoma 7. **(B)** Heterogeneidad de la amplificación del *MET*. La célula tumoral del extremo derecho muestra niveles elevados de copias del *MET* en comparación con otras células tumorales con niveles variables de ganancia y amplificación del *MET*.

de ADN pasa por alto las alteraciones de omisión del exón 14 y puede detectar variantes nuevas y no canónicas cuyo efecto sobre el empalme no está claro.<sup>51</sup>

Por el contrario, la secuenciación basada en ARN y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) pueden sortear estos desafíos asociados al análisis a nivel del ADN y evaluar directamente el producto oncogénico del empalme alterado, lo cual permite un enfoque más sensible y funcional<sup>52</sup> (figura 13-6). De ahí que las pruebas basadas en ARN puedan ser importantes para confirmar los resultados negativos de la NGS basada en ADN y para evaluar más a fondo las mutaciones intrónicas no canónicas. Sin embargo, se han observado falsos positivos de bajo nivel en la omisión del exón 14;<sup>53,54</sup> por lo tanto, para los casos de mutación negativa, puede ser importante incorporar un umbral inferior validado para la detección de la omisión del exón 14 a nivel del ARN para garantizar la especificidad y correlacionar estos hallazgos con los datos de secuenciación del ADN.

La amplificación genética del *MET* se ha evaluado tradicionalmente mediante FISH. Se han propuesto diferentes sistemas de puntaje que incluyen el número de copias del gen (gene copy number, GCN) *MET* y la relación *MET*/CEP7, siendo este último método capaz de distinguir la amplificación de la polisomía del cromosoma 7.<sup>55,56</sup> Aunque no existen umbrales estandarizados para la amplificación del *MET* que se utilicen para guiar la terapia, los estudios han mostrado que la amplificación del *MET* de alto nivel definida por una relación *MET*/CEP7 de 4 a 6 o más y/o un GCN de 10 o más puede predecir la respuesta a la inhibición de *MET* en entornos de resistencia *de novo* y adquirida.<sup>57-59</sup>

Más recientemente, la NGS basada en ADN se ha utilizado cada vez más para el cribado de la amplificación del *MET*.<sup>60,61</sup> Al igual que ocurre con la prueba FISH, no existe consenso sobre la metodología y los valores de corte para determinar la amplificación del *MET*. Las ventajas de la NGS sobre la FISH incluyen la capacidad de proporcionar (1) una evaluación más integral del número de copias en todo el corte tumoral, superando así la heterogeneidad potencial y (2) el análisis multiplexado de alteraciones adicionales en el *MET* y otros genes susceptibles a una intervención preventiva. Sin embargo, el análisis del número de copias basado en NGS está limitado por los requisitos de pureza del tumor para la determinación fiable del número

de copias (~20 % de pureza del tumor).<sup>62</sup> Los casos negativos con bajo contenido tumoral o resultados limítrofes de la NGS se pueden beneficiar de pruebas FISH adicionales, ya que proporcionan un análisis de mayor resolución a nivel unicelular (figura 13-7A,B).

Las fusiones del gen *MET* se pueden detectar mediante diversos métodos basados en ADN y ARN. La técnica FISH de rotura representa un método rápido y económico para identificar reordenamientos genéticos en los que interviene el *MET*. Sin embargo, esta técnica no revela la fusión asociada, el punto de rotura o la localización del dominio quinasa, que pueden ser importantes para confirmar la patogenicidad. Por otra parte, la NGS basada en ADN se puede utilizar para detectar variantes estructurales (structural variants, SV) que se prevé que formen fusiones patogénicas. Al igual que ocurre con otras fusiones genéticas, los puntos de rotura genómica subyacentes a las fusiones del *MET* se producen en su mayoría en intrones, lo que limita la sensibilidad de la secuenciación basada en ADN.<sup>30,63</sup> Además, la especificidad puede ser un problema en el caso de fusiones novedosas o complejas de significación incierta. En general, estas limitaciones se pueden resolver mediante métodos basados en ARN que evalúan directamente los transcritos de la fusión oncogénica. Mientras que la RT-PCR suele requerir el conocimiento de la fusión asociada y del punto de rotura, la NGS basada en ARN carece de estos requisitos y puede detectar fusiones con compañeros y puntos de rotura novedosos.

Muchos estudios han mostrado que la sobreexpresión proteica de *MET* por IHQ es un mal sustituto de la amplificación del *MET* y de la omisión del exón 14 del *MET*.<sup>34,37,64</sup> Sin embargo, hay datos emergentes que sugieren que la sobreexpresión de *MET* puede predecir la sensibilidad a las terapias dirigidas a *MET* en pacientes con alteraciones de omisión del exón 14 del *MET*.<sup>65</sup> Aunque actualmente la IHQ de *MET* no tiene ningún papel como biomarcador sustituto, la importancia terapéutica de la expresión de *MET* en pacientes con alteraciones activadoras del *MET* puede evolucionar con datos futuros.

### Implicaciones clínicas

Los TKI de *MET* se dividen en 2 grupos que se distinguen por el mecanismo de unión.<sup>50</sup> Los inhibidores de *Met* de tipo I (por ejemplo, crizotinib, capmatinib, tepotinib, savolitinib) tienen como diana a *MET* en su configuración activa. Entre los TKI de tipo I, el crizotinib es único en su dependencia de las interacciones con el residuo G1163, lo que ha llevado a su designación como inhibidor de tipo Ia para distinguirlo del resto de inhibidores de tipo I, que se consideran agentes de tipo Ib. A diferencia de los inhibidores de *MET* de tipo I, los inhibidores de tipo II (por ejemplo, cabozantinib, merestinib, glesatinib) se unen a *MET* en su conformación inactiva.

Hasta la fecha, los estudios clínicos prospectivos que evalúan los inhibidores de *MET* en el CPNM con alteración del *MET* han examinado en gran medida la eficacia de los inhibidores de tipo I. Estos estudios han evaluado de forma independiente la eficacia en pacientes con CPNM que presentaban amplificación del *MET* o alteraciones de omisión del exón 14 del *MET*. Cabe destacar que, en ausencia de una definición estandarizada de la amplificación del *MET*, los criterios utilizados para definir este evento genético han variado en los distintos estudios clínicos. La eficacia de los inhibidores de *MET* de tipo I, incluida la actividad intracraneal, ha sido especialmente alentadora en el subconjunto de tumores que albergan alteraciones de omisión del exón 14.

Por ejemplo, se informó de respuestas objetivas inducidas por capmatinib en el 41 % de los pacientes tratados previamente en el estudio GEOMETRY mono-1 de fase 1 y 2, con una

mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 5,4 meses.<sup>57</sup> Entre los pacientes con CPNM no tratados que recibieron capmatinib, la tasa de respuesta global (TRG) y la mediana de SLP fueron de 68 % y 12,4 meses.<sup>57</sup> En el estudio de fase 2 VISION, se observó una TRG del 46 % y una mediana de SLP de 8,5 meses con el tepotinib, con una eficacia comparable en todas las líneas de terapia previa.<sup>66</sup> Con base en estos 2 estudios, el capmatinib y el tepotinib obtuvieron las aprobaciones reguladoras mundiales de línea agnóstica para el tratamiento de los CPNM que albergan la omisión del exón 14 del *MET*. El TKI de *MET* multiquinasa tipo Ia crizotinib también ha demostrado una actividad prometedora en cohortes de pacientes con CPNM con exón 14 del *MET* positivo (TRG del 32 %) o con *MET* amplificado (TRG del 28,9 %) en el estudio PROFILE 1001.<sup>59,67</sup> Tanto en el estudio PROFILE 1001 como en el GEOMETRY mono-1, la actividad de los TKI de *MET* fue mayor en los tumores con mayor nivel de amplificación del *MET*.<sup>57</sup> Por ejemplo, la TRG del capmatinib mejoró del 12 % al 40 % y la mediana de la SLP aumentó de 2,7 a 4,1 meses cuando el valor de corte del GCN *MET* se amplió de 6 a 9 copias hasta 10 o más copias.<sup>57</sup>

Además de los TKI de *MET*, los anticuerpos contra el *MET* y los fármacos inmunoconjugados también se han sometido a ensayos clínicos en el CPNM con *MET* alterado, incluido el CPNM con sobreexpresión de *MET*. Históricamente, los anticuerpos anti-*MET* han demostrado una eficacia limitada.<sup>68,69</sup> Sin embargo, los fármacos inmunoconjugados del *MET* en fase de investigación y los anticuerpos biespecíficos con actividad *MET* han mostrado resultados iniciales prometedores en pacientes con CPNM con sobreexpresión de *MET* o mutaciones del exón 14 de *MET* en estudios en curso.<sup>70</sup>

### Mecanismos de resistencia

Como se describió anteriormente, los TKI del *MET* se clasifican en varios grupos en función de la mecánica de unión. Los 2 TKI del *MET* aprobados (capmatinib y tepotinib) se unen al receptor en su conformación activa en una configuración que se basa en interacciones con la región bisagra del receptor y el residuo Y1230 del bucle de activación de la quinasa. La unión se ve facilitada por un puente salino, en el que intervienen los residuos D1228 y K1110, que estabiliza el bucle de activación. Se han identificado mutaciones recurrentes que implican a D1228 e Y1230, que se prevé que desestabilicen el puente salino o alteren la posición de Y1230, en muestras clínicas de pacientes que han desarrollado resistencia a los inhibidores de tipo I, incluidos el capmatinib y el crizotinib.<sup>71-73</sup> Dado que estas mutaciones confieren resistencia cruzada a los inhibidores de tipo I, los beneficios de la terapia secuencial con los TKI del *MET* de tipo I existentes son limitados.<sup>65,74</sup>

Por el contrario, los estudios preclínicos y los informes de casos sugieren que los TKI de *MET* de tipo II (por ejemplo, cabozantinib, merestinib, glesatinib y foretinib) no dependen de las interacciones con el bucle de activación y, por tanto, conservan la eficacia contra las mutaciones D1228 e Y1230 del *MET*.<sup>72,75,76</sup> Además de estas mutaciones más frecuentes, se ha identificado la mutación G1163R del *MET* en una muestra resistente al crizotinib.<sup>77</sup> El residuo G1163 del frente solvente es crítico para la unión del crizotinib pero no es tan esencial para la unión de otros TKI de *MET*.

Además de las alteraciones adquiridas dentro de la diana, los mecanismos de resistencia independientes de *MET* contribuyen a la resistencia tanto adquirida como intrínseca a los inhibidores selectivos de *MET*.<sup>66</sup> Los mecanismos de derivación descritos hasta la fecha incluyen la reactivación de la vía MAPK y la amplificación de *EGFR/ERBB2/ERBB3*.<sup>46,65,77,78</sup> La identificación de mutaciones de G12X del *KRAS* en un pequeño subconjunto de CPNM con

omisión del exón 14 de MET en el entorno de pretratamiento destaca la activación de KRAS como una forma de resistencia primaria a la terapia dirigida a MET.<sup>46</sup> Las mutaciones y amplificaciones del KRAS representan aproximadamente un tercio de los mecanismos de resistencia secundaria a las terapias dirigidas a MET.<sup>72</sup> Se han observado tanto amplificaciones del KRAS como del EGFR en pacientes con omisión del exón 14 del MET con progresión en la terapia con crizotinib; curiosamente, los estudios de FISH en este contexto demuestran que los eventos de amplificación se producen en poblaciones celulares independientes, lo que sugiere un papel para la señalización paracrina entre diferentes poblaciones de células resistentes a los fármacos.<sup>79</sup> La inhibición de MET en el contexto de la activación de la vía KRAS parece impulsar la señalización preferente a través de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K); las mutaciones de la vía PI3K (incluidas las de PIK3CA y fosfatasa y tensina homóloga [PTEN]) también representan mecanismos frecuentes de resistencia adquirida a las terapias dirigidas a MET.<sup>80</sup> Se está investigando el papel de la terapia combinada que utiliza MET con inhibidores de EGFR o PI3K.<sup>80,81</sup>

## Referencias

1. Maroun CR, Rowlands T. The Met receptor tyrosine kinase: a key player in oncogenesis and drug resistance. *Pharmacol Ther.* 2014;142(3):316-338.
2. Graveel CR, Tolbert D, Vande Woude GF. MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(7).
3. Peschard P, Park M. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene.* 2007;26(9):1276-1285.
4. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, et al. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature.* 1998;391(6664):285-288.
5. Ohmichi H, Koshimizu U, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchyme-derived morphogenic factor during fetal lung development. *Development.* 1998;125(7):1315-1324.
6. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit Rev Oncog.* 1992;3(1-2):27-54.
7. Matsumoto K, Umitsu M, De Silva DM, Roy A, Bottaro DP. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Sci.* 2017;108(3):296-307.
8. Recondo G, Che J, Janne PA, Awad MM. Targeting MET dysregulation in cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(7):922-934.
9. Peschard P, Ishiyama N, Lin T, Lipkowitz S, Park M. A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29565-29571.
10. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, et al. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature.* 2002;416(6877):187-190.
11. Barrow-McGee R, Kermorgant S. Met endosomal signalling: in the right place, at the right time. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;49:69-74.
12. Drilon A, Cappuzzo F, Ou S-HI, Camidge R. Targeting MET in lung cancer: will expectations finally be MET? *J Thorac Oncol.* 2016;12(1):15-26. doi:10.1016/j.jtho.2016.10.014.
13. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(1 suppl):S7-S19.
14. Sattler M, Reddy MM, Hasina R, Gangadhar T, Salgia R. The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(4):171-184.
15. Lin J, Lyu Y, Li L, et al. Crizotinib inhibits activation of MET pathway caused by MET extracellular SEMA domain duplication. *Lung Cancer.* 2020;147:64-70.
16. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66(1):283-289.
17. Wang F, Liu Y, Qiu W, et al. Functional analysis of MET Exon 14 skipping alteration in cancer invasion and metastatic dissemination. *Cancer Res.* 2022;82(7):1365-1379.

18. Schildhaus HU, Schultheis AM, Ruschoff J, et al. MET amplification status in therapy-naive adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.* 2015;21(4):907-915.
19. Go H, Jeon YK, Park HJ, et al. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(3):305-313.
20. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, et al. MET exon 14 mutations in non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stage-dependent MET genomic amplification and c-Met overexpression. *J Clin Oncol.* 2016;34(7):721-730.
21. Lee JK, Madison R, Classon A, et al. Characterization of non-small-cell lung cancers with MET exon 14 skipping alterations detected in tissue or liquid: clinicogenomics and real-world treatment patterns. *JCO Precis Oncol.* 2021;5:PO.21.00122.
22. Bittoni M, Yang JC, Shih JY, et al. Real-world insights into patients with advanced NSCLC and MET alterations. *Lung Cancer.* 2021;159:96-106.
23. AACR Project Genie: data. American Association for Cancer Research (AACR); 2022. Updated July 22, 2022. <https://www.aacr.org/professionals/research/aacr-project-genie/aacr-project-genie-data/>.
24. Aisner DL, Sholl LM, Berry LD, et al. The impact of smoking and TP53 mutations in lung adenocarcinoma patients with targetable mutations—the Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC2). *Clin Cancer Res.* 2018;24(5):1038-1047.
25. Yu HA, Arcila ME, Rekhman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2240-2247.
26. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, et al. Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib. *JAMA Oncol.* 2018;4(11):1527-1534.
27. Schoenfeld AJ, Chan JM, Rizvi H, et al. Tissue-based molecular and histological landscape of acquired resistance to osimertinib given initially or at relapse in patients with EGFR-mutant lung cancers. *J Clin Oncol.* 2019;37(15 suppl):9028-9028.
28. Coleman N, Hong L, Zhang J, et al. Beyond epidermal growth factor receptor: MET amplification as a general resistance driver to targeted therapy in oncogene-driven non-small-cell lung cancer. *ESMO Open.* 2021;6(6):100319.
29. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014;5:4846.
30. Plenker D, Bertrand M, de Langen AJ, et al. Structural alterations of MET trigger response to MET kinase inhibition in lung adenocarcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2018;24(6):1337-1343.
31. Liu LF, Deng JY, Lizaso A, Lin J, Sun S. Effective response to crizotinib of concurrent KIF5B-MET and MET-CDR2-rearranged non-small cell lung cancer: a case report. *World J Clin Cases.* 2022;10(8):2529-2536.
32. Li A, Gao HF, Wu YL. Targeting the MET pathway for potential treatment of NSCLC. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(5):663-674.
33. Park S, Koh J, Kim DW, et al. MET amplification, protein expression, and mutations in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2015;90(3):381-387.
34. Mignard X, Ruppert AM, Antoine M, et al. c-MET overexpression as a poor predictor of MET amplifications or exon 14 mutations in lung sarcomatoid carcinomas. *J Thorac Oncol.* 2018;13(12):1962-1967.
35. Li A, Niu FY, Han JF, et al. Predictive and prognostic value of de novo MET expression in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2015;90(3):375-380.
36. Baldacci S, Figeac M, Antoine M, et al. High MET overexpression does not predict the presence of MET exon 14 splice mutations in NSCLC: results from the IFCT PREDICT.amm study. *J Thorac Oncol.* 2020;15(1):120-124.
37. Guo R, Berry LD, Aisner DL, et al. MET IHC is a poor screen for MET amplification or MET exon 14 mutations in lung adenocarcinomas: data from a tri-institutional cohort of the Lung Cancer Mutation Consortium. *J Thorac Oncol.* 2019.
38. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, et al. Characterization of 298 patients with lung cancer harboring MET exon 14 skipping alterations. *J Thorac Oncol.* 2016;11(9):1493-1502.
39. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511(7511):543-550.

40. Liu SY, Gou LY, Li AN, et al. The unique characteristics of MET exon 14 mutation in Chinese patients with NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2016;11(9):1503-1510.
41. Adib E, Nassar AH, Abou Alaiwi S, et al. Variation in targetable genomic alterations in non-small cell lung cancer by genetic ancestry, sex, smoking history, and histology. *Genome Med.* 2022;14(1):39.
42. Sands JM, Nguyen T, Shivdasani P, et al. Next-generation sequencing informs diagnosis and identifies unexpected therapeutic targets in lung squamous cell carcinomas. *Lung Cancer.* 2020;140:35-41.
43. Lam VK, Tran HT, Banks KC, et al. Targeted tissue and cell-free tumor DNA sequencing of advanced lung squamous-cell carcinoma reveals clinically significant prevalence of actionable alterations. *Clin Lung Cancer.* 2019;20(1):30-36.e33.
44. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol.* 2016;34(8):794-802.
45. Fujino T, Suda K, Sakai K, et al. Intra-tumor and inter-tumor heterogeneity in MET Exon 14 skipping mutations and co-mutations in pulmonary pleomorphic carcinomas. *Clin Lung Cancer.* 2022;23(3):e185-e195.
46. Suzawa K, Offin M, Lu D, et al. Activation of KRAS mediates resistance to targeted therapy in MET exon 14-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(4):1248-1260.
47. Pruis MA, Geurts-Giele WRR, von der Thüsen JH, et al. Highly accurate DNA-based detection and treatment results of MET exon 14 skipping mutations in lung cancer. *Lung Cancer.* 2020;140:46-54.
48. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015;5(8):850-859.
49. Poirot B, Doucet L, Benhenda S, et al. MET exon 14 alterations and new resistance mutations to tyrosine kinase inhibitors: risk of inadequate detection with current amplicon-based NGS panels. *J Thorac Oncol.* 2017;12(10):1582-1587.
50. Guo R, Luo J, Chang J, et al. MET-dependent solid tumours—molecular diagnosis and targeted therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(9):569-587.
51. Benayed R, Offin M, Mullaney K, et al. High yield of RNA sequencing for targetable kinase fusions in lung adenocarcinomas with no mitogenic driver alteration detected by DNA sequencing and low tumor mutation burden. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4712-4722.
52. Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, et al. DNA-based versus RNA-based detection of MET exon 14 skipping events in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(4):737-741.
53. Nosi V, Luca A, Milan M, et al. MET exon 14 skipping: a case study for the detection of genetic variants in cancer driver genes by deep learning. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
54. Manthei DM, Kleyman-Smith Y, Brown NA, Betz BL. Improved detection of MET exon 14 skipping mutations in lung adenocarcinoma with combined DNA/RNA testing and refined analysis methods [abstract ST009]. *J Mol Diagn.* 2019;19(30391-5):S1525-S1578.
55. Noonan SA, Berry L, Lu X, et al. Identifying the appropriate FISH criteria for defining MET copy number-driven lung adenocarcinoma through oncogene overlap analysis. *J Thorac Oncol.* 2016;11(8):1293-1304.
56. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2009;27(10):1667-1674.
57. Wolf J, Seto T, Han JY, et al. Capmatinib in MET exon 14-mutated or MET-amplified non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(10):944-957.
58. Wu YL, Zhang L, Kim DW, et al. Phase Ib/II study of capmatinib (INC280) plus gefitinib after failure of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor therapy in patients with EGFR-mutated, MET factor-dysregulated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(31):3101-3109.
59. Camidge DR, Otterson GA, Clark JW, et al. Crizotinib in patients with MET-amplified NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(6):1017-1029.
60. Peng LX, Jie GL, Li AN, et al. MET amplification identified by next-generation sequencing and its clinical relevance for MET inhibitors. *Exp Hematol Oncol.* 2021;10(1):52.
61. Schmitt C, Schulz AA, Winkelmann R, Smith K, Wild PJ, Demes M. Comparison of MET gene amplification analysis by next-generation sequencing and fluorescence in situ hybridization. *Oncotarget.* 2021;12(22):2273-2282.

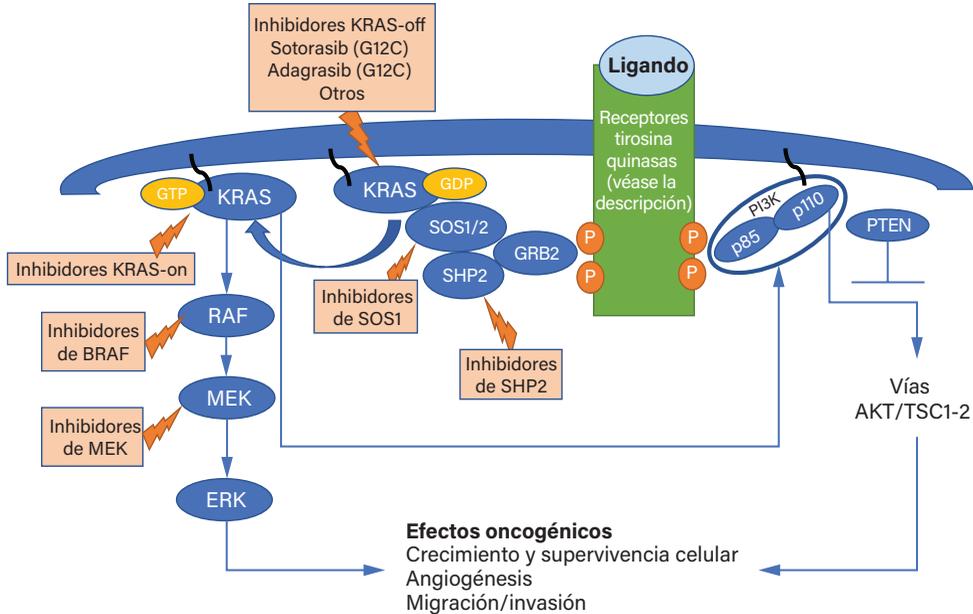
62. Solomon JP, Yang SR, Choudhury NJ, et al. Bioinformatically-expanded next-generation sequencing analysis optimizes identification of therapeutically relevant MET copy number alterations in >50,000 tumors. *Clin Cancer Res.* 2022.
63. Pan Y, Zhang Y, Ye T, et al. Detection of novel NRG1, EGFR, and MET fusions in lung adenocarcinomas in the Chinese population. *J Thorac Oncol.* 2019;14(11):2003-2008.
64. Bubendorf L, Dafni U, Schobel M, et al. Prevalence and clinical association of MET gene overexpression and amplification in patients with NSCLC: results from the European Thoracic Oncology Platform (ETOP) Lungscape project. *Lung Cancer.* 2017;111:143-149.
65. Guo R, Offin M, Brannon AR, et al. MET exon 14-altered lung cancers and MET inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 2021;27(3):799-806.
66. Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in non-small-cell lung cancer with MET exon 14 skipping mutations. *N Engl J Med.* 2020;383(10):931-943.
67. Drilon A, Clark JW, Weiss J, et al. Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. *Nat Med.* 2020;26(1):47-51.
68. Wakelee H, Zvirbule Z, De Braud F, et al. Efficacy and safety of onartuzumab in combination with first-line bevacizumab- or pemetrexed-based chemotherapy regimens in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2017;18(1):50-59.
69. Hirsch FR, Govindan R, Zvirbule Z, et al. Efficacy and safety results from a phase II, placebo-controlled study of onartuzumab plus first-line platinum-doublet chemotherapy for advanced squamous cell non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2017;18(1):43-49.
70. Camidge DR, Bar J, Horinouchi H, et al. Telisotuzumab vedotin (Teliso-V) monotherapy in patients (pts) with previously treated c-Met-overexpressing (OE) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2022;40(16 suppl):9016-9016.
71. Villaruz LC, Socinski MA, Abberbock S, et al. Clinicopathologic features and outcomes of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations in the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer.* 2015;121(3):448-456.
72. Recondo G, Bahcall M, Spurr LE, et al. Molecular mechanisms of acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors in patients with MET exon 14-mutant NSCLC. *Clin Cancer Res.* 2020;26(11):2615-2625.
73. Heist RS, Sequist LV, Borger D, et al. Acquired resistance to crizotinib in NSCLC with MET exon 14 skipping. *J Thorac Oncol.* 2016;11(8):1242-1245.
74. Rotow JK, Gui P, Wu W, et al. Co-occurring alterations in the RAS-MAPK pathway limit response to MET inhibitor treatment in MET exon 14 skipping mutation-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(2):439-449.
75. Fujino T, Suda K, Koga T, et al. Foretinib can overcome common on-target resistance mutations after capmatinib/tepotinib treatment in NSCLCs with MET exon 14 skipping mutation. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):79.
76. Bahcall M, Sim T, Paweletz CP, et al. Acquired METD1228V mutation and resistance to MET inhibition in lung cancer. *Cancer Discov.* 2016;6(12):1334-1341.
77. Dagogo-Jack I, Moonsamy P, Gainor JF, et al. A phase 2 study of capmatinib in patients with MET-altered lung cancer previously treated with a MET inhibitor. *J Thorac Oncol.* 2021;16(5):850-859.
78. Yoda S, Lin JJ, Lawrence MS, et al. Sequential ALK inhibitors can select for lorlatinib-resistant compound ALK mutations in ALK-positive lung cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(6):714-729.
79. Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, et al. Amplification of wild-type KRAS imparts resistance to crizotinib in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(23):5963-5976.
80. Jamme P, Fernandes M, Copin MC, et al. Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations. *J Thorac Oncol.* 2020;15(5):741-751.
81. Krebs M, Spira AI, Cho BC, et al. Amivantamab in patients with NSCLC with MET exon 14 skipping mutation: updated results from the CHRYSALIS study. *J Clin Oncol.* 2022;40(16 suppl):9008-9008.

## Estructura y función de los genes

El RAS (homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata) codifica una proteína unida a membrana, descrita inicialmente por Harvey<sup>1</sup> y Kristen<sup>2</sup> como un oncogén retroviral implicado en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.<sup>3</sup> El RAS pertenece a una clase de proteína denominada *guanósín trifosfatasa* (GTPasa) pequeña, que se expresa en todas las células de mamíferos.<sup>4,5</sup> La familia de genes RAS consta de 3 miembros (*HRAS*, *NRAS* y *KRAS*) que codifican las isoformas correspondientes.<sup>5</sup> Sin embargo, en particular, la isoforma *KRAS* (oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten) representa aproximadamente entre el 75 % y el 80 % de todas las mutaciones del *RAS* en el cáncer, seguida de la *NRAS* (12 %) e, irregularmente, de la *HRAS* (3 %).<sup>6,7</sup> La proteína RAS está compuesta por 3 elementos principales:

1. El dominio G está muy conservado entre las isoformas del RAS y contiene los bucles de conmutación 1 y 2. Es responsable del intercambio guanósín trifosfato (guanosine triphosphate, GTP)-guanósín difosfato (guanosine diphosphate, GDP).
2. El dominio C-terminal, denominado *región hipervariable*, muestra variaciones significativas entre las isoformas del RAS.
3. La caja CaaX C-terminal impulsa las modificaciones postraduccionales.<sup>8-11</sup>

La proteína RAS actúa como un conmutador molecular, cambiando entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP.<sup>8,12</sup> La conversión de la proteína RAS a su forma activa es facilitada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (guanine nucleotide exchange factors, GEF) mientras que las proteínas activadoras de GTPasa (GTPase-activating proteins, GAP) tienen un papel en el mantenimiento del RAS en su estado inactivo a través de la activación de RAS-GTPasa y la hidrólisis de GTP.<sup>8,12</sup> Cuando *KRAS* está mutado, la proteína RAS se bloquea en la forma activa unida a GTP, que a su vez activa de forma constitutiva las vías de señalización descendentes, como las vías RAF-MEK-ERK y PI3K-AKT-mTOR, confiriendo un fenotipo maligno<sup>8,12</sup> (figura 14-1).

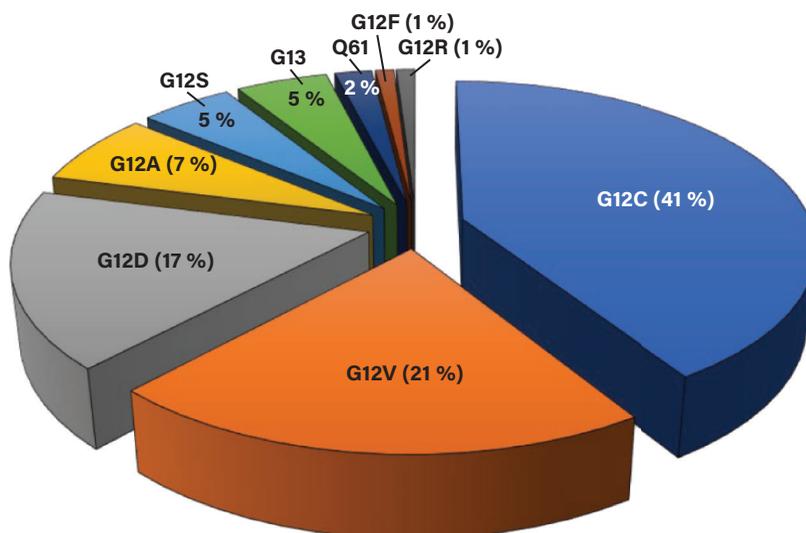


**Figura 14-1.** Una representación diagramática de la proteína KRAS unida a la membrana celular y algunas de sus relaciones con otras proteínas y vías de señalización. (Nota: la representación genérica del receptor tirosina quinasa [RTK] de membrana es solo ilustrativa). Existen muchos ligandos y RTK, incluida la familia EGFR/HER, que pueden formar homo y heterodímeros (véanse los capítulos pertinentes). El KRAS de tipo salvaje puede activarse a su estado unido a guanósín trifosfato (GTP), facilitando la señalización descendente a través de RAF/MEK/ERK y a través de PI3K/AKT/TSC1-2. Esta activación está mediada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), de los que SOS1 es uno de los principales, y proteínas relacionadas como GRB2 y SHP2. Las mutaciones en KRAS provocan una disminución tanto de la hidrólisis del GTP como de la interacción con las proteínas activadoras de la guanósín trifosfatasa (GTPasa) (GAP) (*no se muestran en el diagrama*). Estos cambios mantienen a la proteína KRAS en un estado activado, impulsando la oncogénesis. Se están explotando terapéuticamente varios puntos de esta compleja vía (véase el texto). Los más avanzados clínicamente en este entorno son fármacos como el sotorasib y el adagrasib, que funcionan para mantener a KRAS en un estado inactivo unido a GDP.<sup>3,13</sup> Abreviatura: PTEN = homólogo de fosfatasa y tensina. (Adaptado de Puneekar *et al*<sup>13</sup>).

## Tipo de alteraciones y papel en la oncogénesis (mutaciones, fusiones, amplificación, expresión proteica)

El *KRAS* es el oncogén mutado con mayor frecuencia en el cáncer.<sup>14</sup> Asimismo, las mutaciones activadoras en el *KRAS* son los factores oncogénicos más prevalentes tanto en el adenocarcinoma de pulmón temprano como en el avanzado, produciéndose entre aproximadamente el 25 % y el 32 % de los tumores.<sup>15,16</sup> La mayoría de las mutaciones puntuales del *KRAS* se producen en los exones 2 y 3, afectando principalmente a los codones G12, G13 y Q61.<sup>6</sup> En el cáncer de pulmón, la G12C (es decir, la mutación del aminoácido glicina a cisteína) es la más común (41 %), mientras que G12V y G12D representan el 21 % y el 17 % de las mutaciones del *KRAS*, respectivamente<sup>17</sup> (figura 14-2). La significación biológica y clínica de las mutaciones del *KRAS* varía en función del subtipo de mutación en el cáncer de pulmón. Por ejemplo, G12C y G12D tienen afinidades significativas para unirse a las vías RASGDS-Ral-FLIP y PI3K-AKT-mTOR, respectivamente.<sup>18</sup> Además, las mutaciones del *KRAS* G12C mostraron una mayor fosforilación de la quinasa regulada por señal extracelular 1 y 2 (extracellular signal-regulated kinase-1 and -2, ERK1/2) que aquellas con *KRAS* G12D.<sup>19</sup>

Como se ha visto con otras mutaciones conductoras susceptibles a una intervención preventiva en el adenocarcinoma de pulmón, las mutaciones del *KRAS* no suelen coexistir



**Figura 14-2.** Prevalencia de las mutaciones del *KRAS* más comunes en el adenocarcinoma pulmonar.

en el contexto de otros oncogenes conductores, como los tumores determinados por *EGFR*, *ALK* y *ROS*. Aunque las mutaciones del *KRAS* y del *EGFR* suelen producirse de forma mutuamente excluyente en el cáncer de pulmón,<sup>17,20</sup> informes empíricos muestran pruebas de la coocurrencia de mutaciones del *KRAS* y del *EGFR* en pacientes con cáncer de pulmón.<sup>21-23</sup> Se han descrito mutaciones del *KRAS* en el cáncer de pulmón con translocación del *ALK*, en su mayoría asociadas a mecanismos de resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) de la *ALK*.<sup>24</sup> La mutación del *KRAS* G12C y otras mutaciones de este ocurren con mayor frecuencia junto con la amplificación del *MET* tanto en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) localizado<sup>25</sup> como en el metastásico<sup>26</sup> sin tratamiento previo. La amplificación de *ERBB2* ( $P = 0,002$ ) y las mutaciones de *ERBB4* ( $P = 0,025$ ) se encontraron con mayor frecuencia en los tumores con mutación del *KRAS* G12C en comparación con los tumores sin dicha mutación.<sup>3,26</sup>

También se ha informado en el CPNM de alteraciones en el número de copias del *KRAS*, incluido el desequilibrio alélico y el aumento del número de copias.<sup>27,28</sup> La amplificación del *KRAS* también demostró ser un mecanismo de resistencia a los TKI del receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR).<sup>28</sup> Las mutaciones concomitantes en el gen *KRAS* son frecuentes, ya que se observaron en aproximadamente el 3,4 % de los tumores con una mutación del *KRAS* y en el 8 % de los tumores con mutación del *KRAS* G12C. Las mutaciones concurrentes más frecuentes asociadas al *KRAS* G12C fueron el *KRAS* G12F y G12V.<sup>29</sup> En este estudio, la presencia de una mutación concurrente provocó un aumento de la resistencia a un inhibidor específico de G12C. En aproximadamente la mitad de los tumores con mutaciones del *KRAS*, y especialmente en los que se producen en fumadores, pueden encontrarse también otras mutaciones, las llamadas mutaciones concomitantes, que pueden tener significación biológica.<sup>3,26</sup>

Los datos actuales muestran que las alteraciones genéticas concurrentes tienen un impacto significativo en la evolución biológica, los resultados clínicos y la respuesta a los tratamientos.<sup>15,30-34</sup> Los estudios de secuenciación a gran escala han establecido un censo de las principales mutaciones concomitantes del *KRAS* en el adenocarcinoma de pulmón.<sup>15</sup>

Las mutaciones concomitantes en el *TP53* (~40 %), *STK11* (es decir, la serina/treonina quinasa 11; 20 %) y *KEAP1* (es decir, la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch; 13 %-24 %) son las más frecuentes.<sup>26,30</sup> Estos 3 subconjuntos se asocian a diferentes propiedades biológicas y sensibilidades terapéuticas<sup>15</sup> y podrían actuar a través de vías de señalización RAS intrínsecas, así como sobre el microentorno tumoral. En particular, el CPNM con mutación del *KRAS/TP53* demostró mayores niveles de marcadores inflamatorios y moléculas efectoras de puntos de control inmunitario, mientras que el *KRAS/KEAP1* mostró menores niveles de marcadores inmunitarios, incluido el ligando 1 de muerte programada (programmed death–ligand 1, PD-L1).<sup>15</sup>

Además de promover la tumorigénesis a través de efectores descendentes, se ha descubierto que las células con mutaciones del *KRAS* interactúan con el microentorno tumoral. En los cánceres colorrectales, las mutaciones del *KRAS* pueden mediar en la regulación a la baja de la expresión de la molécula principal de histocompatibilidad de clase 1, un efecto que consiste en interferir en el cebado y la presentación del antígeno tumoral de las células T.<sup>3,35</sup>

Del mismo modo, las mutaciones del *KRAS* se asocian a una mayor expresión del PD-L1 en el CPNM, contribuyendo así al agotamiento de las células T.<sup>36,37</sup> Cabe destacar que se ha informado de una puntuación de proporción tumoral (tumor proportion score, TPS) del PD-L1 del 50 % o más en un rango del 34 % al 41 % para los pacientes con mutación del *KRAS* G12C en comparación con entre el 20 % y el 26 % de los pacientes con tumores de tipo salvaje del *KRAS*.<sup>38,39</sup> En líneas celulares de CPNM con mutaciones del *KRAS*, se descubrió que la expresión ectópica del PD-L1 estaba modulada por las vías MAPK y STAT3 descendentes del *KRAS*.<sup>3,40</sup>

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

La distribución de las mutaciones del *KRAS* suele ser específica del tipo de cáncer, y las frecuencias son relativamente estables en todo el mundo en varios tipos de cáncer, con la excepción del CPNM, en particular en la histología del adenocarcinoma.<sup>7</sup> Se han observado diferencias geográficas en la prevalencia del *KRAS* en el CPNM en todo el mundo, con la incidencia más alta en Europa, seguida de Norteamérica, y la más baja en las regiones de Asia Oriental y la India.<sup>6,7</sup> Esto contrasta con la prevalencia del *EGFR*, lo que sugiere el impacto de la genética o el entorno, con una creciente investigación actualmente en curso.<sup>7</sup> Asimismo, se informó que las mutaciones del *KRAS* G12C fueron más frecuentes en pacientes negros y blancos que en pacientes asiáticos ( $P < 0,001$ ), mientras que en el CPNM, las mutaciones del *KRAS* son más frecuentes en la histología del adenocarcinoma (32 %)<sup>6,25,41</sup> y muy pocas veces ( $\leq 1$  %) informadas en el carcinoma de células escamosas cuando se realiza una evaluación patológica rigurosa.<sup>39,42,43</sup>

En el adenocarcinoma, se han descrito frecuencias más altas de mutaciones del *KRAS* en carcinomas mucinosos invasivos (61 %-71 %).<sup>44,45</sup> Las mutaciones del *KRAS* en el CPNM se asocian a menudo con los antecedentes de tabaquismo (es decir, 7 % en personas que nunca han fumado en comparación con 32 % y 37 % en exfumadores y fumadores actuales, respectivamente<sup>46</sup>), y la distribución del tipo de variante en el CPNM varía entre fumadores y personas que nunca han fumado.<sup>39</sup> En el caso de la mutación del *KRAS* G12C, comúnmente vista en la población fumadora (41 % de las mutaciones del *KRAS*), se ha relacionado con la firma 4 (una firma relacionada con el tabaquismo), que se asocia con transiciones C>A.<sup>47</sup> Además, la mutación del *KRAS* G12C parece ser más frecuente en mujeres (es decir, 43 %;

$P = 0,007$ ) y pacientes más jóvenes (es decir, mediana de edad de 63 años;  $P = 0,0092$ ) en comparación con otras mutaciones del *KRAS*<sup>25,42</sup> y *KRAS* de tipo salvaje. Las mutaciones G12D se dan sobre todo en personas que nunca han fumado, con un 56 % de las mutaciones del *KRAS*.<sup>41</sup> A pesar de algunos resultados contradictorios,<sup>38,45,46</sup> las mutaciones del *KRAS* en el CPNM parecen estar asociadas a un peor pronóstico.<sup>47-49</sup> Se ha informado que los pacientes con CPNM con mutación G12C tienen un peor pronóstico en comparación con los casos con otras mutaciones del *KRAS* o con *KRAS* de tipo salvaje.<sup>25</sup> Además, los pacientes con mutación del *KRAS* G12C positiva presentan una mayor tasa de metástasis en el momento del diagnóstico en comparación con los pacientes con *KRAS* de tipo salvaje (es decir, 94 % frente a 88 %).<sup>38</sup>

### Estrategias de prueba

La detección de la mutación del *KRAS*, incluida la variante G12C, en el cáncer de pulmón, a partir de ADN extraído de tejido tumoral, muestras celulares (citología) y ADN libre de células (cfADN) obtenido de sangre y otros fluidos (es decir, derrame pleural, líquido cefalorraquídeo) es sencilla. Las mutaciones puntuales del *KRAS* se albergan en *hotspots* en codones (12, 13 y 61), que se cubren fácilmente utilizando paneles de genes sondeados tanto por la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) como por la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS).<sup>48-51</sup> Cuando se utilizan con una entrada adecuada de ácido nucleico (10-100 ng de ADN y un contenido tumoral del 5 %-15 %), la mayoría de las diferentes plataformas comerciales, ya sean basadas en PCR o NGS, mostraron una precisión general excelente y un alto nivel o concordancia, aunque la NGS parece mostrar un rendimiento ligeramente superior en comparación con las pruebas no NGS.<sup>52-57</sup> Tal y como recomiendan varias guías, para el diagnóstico de tejido tumoral, los paneles de NGS son un enfoque preferente. El cfADN se podría utilizar como enfoque complementario alternativo cuando la muestra de tejido se haya agotado, el tumor no sea accesible para una biopsia o el rendimiento del tumor o del ADN no sea suficiente para realizar pruebas moleculares adecuadas.<sup>51</sup> El análisis molecular se podría utilizar para identificar mecanismos de resistencia relacionados con el genoma que surjan de los enfoques terapéuticos dirigidos a *KRAS*, como los inhibidores del *KRAS* G12C.

### Implicaciones clínicas

A pesar de las exhaustivas investigaciones preclínicas y clínicas, las mutaciones del *KRAS* se han considerado durante mucho tiempo un objetivo no susceptible de tratamiento con fármacos. Sin embargo, recientemente se han desarrollado varios inhibidores covalentes de *KRAS* G12C, como el AMG510 (sotorasib) y el MRTX849 (adagrasib), para tumores con mutación del *KRAS* G12C.<sup>58-60</sup> La acción de estos agentes dirigidos a G12C se basa en la unión covalente a la cistina 12 y a la región del bolsillo de unión del conmutador 2 cuando *KRAS* G12C se encuentra en su estado inactivo del GDP.<sup>61</sup> Varios estudios han demostrado que los inhibidores de *KRAS* G12C atrapan al *KRAS* en su estado inactivo unido a GDP reduciendo su susceptibilidad a los factores de intercambio de nucleótidos<sup>62,63</sup> y que la eficacia de la inhibición de *KRAS* G12C requiere una actividad GTPasa intacta.<sup>62,63</sup> Cabe destacar que el ensayo clínico CodeBreaK100 demostró un efecto beneficioso del sotorasib en pacientes con CPNM avanzado portadores de mutaciones *KRAS* G12C,<sup>64</sup> y en mayo del 2021,

la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) aprobó el sotorasib para pacientes con CPNM con mutación del *KRAS* G12C que hubieran recibido al menos 1 terapia sistémica previa.

Por el contrario, los inhibidores del *KRAS* G12C no proporcionan respuestas duraderas, y la mediana de la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes con CPNM tratados con sotorasib fue de 6,8 meses.<sup>64</sup> En el ensayo de fase 3 CodeBreak 200, el sotorasib demostró una mejora de la SLP en comparación con el docetaxel en pacientes con CPNM con mutación del *KRAS* G12C que habían presentado progresión tras una quimioterapia previa basada en platino y un inhibidor de puntos de control (cociente de riesgo [hazard ratio, HR], 0,66; IC del 95 %, 0,51-0,86;  $P = 0,002$ ), también con una tasa de respuesta global (TRG; 28,1 % frente a 13,2 %) mayor y un perfil de seguridad más favorable.<sup>65</sup> Sin embargo, no se observaron diferencias en la supervivencia global (SG) entre ambos grupos, aunque el estudio no tuvo potencia para determinar la SG y se permitió el cruce (que afectó al 34 % de los pacientes).

El Adagrasib es el segundo inhibidor irreversible y selectivo del *KRAS* G12C que ha pasado a ensayos clínicos, mostrando eficacia clínica (TRG, 42,9 %; SLP, 6,5 meses), sin nuevas señales de seguridad en ensayos clínicos de un solo grupo,<sup>66</sup> lo que condujo a la aprobación de la FDA en diciembre del 2022 para el CPNM localmente avanzado o metastásico con mutación de *KRAS* G12C, según lo determinado por una prueba aprobada por la FDA, para pacientes que hayan recibido al menos una terapia sistémica previa; este fármaco se optimizó para mostrar una vida media larga y una amplia distribución tisular.<sup>67,68</sup> Actualmente se están llevando a cabo varios estudios que evalúan la eficacia de estos inhibidores de *KRAS* G12C en comparación con la terapia convencional en estudios de fase 3 y también otros ensayos clínicos tempranos que buscan sinergias con combinaciones con otras terapias (por ejemplo, inmunoterapia, quimioterapia, etc.). Curiosamente, se ha demostrado que las mutaciones del *STK11* y *KEAP1* confieren peores resultados clínicos a la inhibición de puntos de control inmunitarios<sup>69</sup> y a la quimioterapia<sup>70</sup> entre los pacientes con mutaciones del *KRAS*, incluida la variante G12C.<sup>70</sup>

## Mecanismos de resistencia

Las TRG obtenidas para sotorasib o adagrasib son notablemente inferiores en comparación con las obtenidas con la inhibición de EGFR y ALK en el CPNM,<sup>71,72</sup> lo que sugiere la presencia de mecanismos intrínsecos de resistencia a los inhibidores de *KRAS* G12C. Aunque todavía se están investigando, se han informado varios mecanismos intrínsecos de resistencia a ambos inhibidores, incluida la reactivación adaptativa por retroalimentación de las vías de señalización de RAS, como RAS-MAPK.<sup>73</sup> En cuanto a los mecanismos adquiridos de resistencia, tanto el uso de modelos de laboratorio como el análisis de muestras tumorales de pacientes tratados sugieren 3 mecanismos principales:

1. Mecanismos en la diana, representados por la detección de otras mutaciones activadoras del *KRAS* (es decir, sotorasib, G13D, R68M y A59S; adagrasib, Q99L, Y96D y R68S0).<sup>24,74-76</sup>
2. Mecanismos de derivación, incluida la activación de receptores tirosina quinasas y vías de señalización descendentes del RAS, a través de mecanismos relacionados con MET (incluida la amplificación genética) y el factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor, HGF),<sup>77</sup> el receptor 1 del factor de crecimiento similar a la

insulina (insulin-like growth factor receptor-1, IGFR-1) y el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor receptor-1, FGFR-1).<sup>68</sup>

3. Plasticidad de linaje y adquisición de características de transición epitelial a mesenquimal, incluidos los informes iniciales de cambio de histología de adenocarcinoma a carcinoma de células escamosas<sup>76</sup> y la regulación a la baja de la cadherina E y al alza de la vimentina,<sup>68</sup> respectivamente.

## Referencias

1. Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*. 1964;204:1104-1105.
2. Kirsten WH, Mayer LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst*. 1967;39(2):311-335.
3. Désage A-L, Léonce C, Swalduz A, Ortiz-Cuaran S. Targeting KRAS mutant in non-small cell lung cancer: novel insights into therapeutic strategies. *Front Oncol*. 2022;12:796832. doi:10.3389/fonc.2022.796832.
4. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170(1):17-33.
5. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-465.
6. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The frequency of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2020;80(14):2969-2974.
7. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(4):1029-1038.
8. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*. 2010;10(12):842-857.
9. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-225.
10. Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D. Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature*. 1993;363(6424):88-92.
11. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294(5545):1299-1304.
12. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 2013;93(1):269-309.
13. Puneekar SR, Velcheti V, Neel BG, Wong KK. The current state of the art and future trends in RAS-targeted cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(10):637-655. doi:10.1038/s41571-022-00671-9.
14. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22.
15. Skoulidis F, Byers LA, Diao L, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov*. 2015;5(8):860-877.
16. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550.
17. Soh J, Toyooka S, Matsuo K, et al. Ethnicity affects EGFR and KRAS gene alterations of lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2015;10(3):1775-1782.
18. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(3):228-239.
19. Li S, Liu S, Deng J, et al. Assessing therapeutic efficacy of MEK inhibition in a KRAS(G12C)-driven mouse model of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4854-4864.
20. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*. 2005;23(11):2556-2568.
21. Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(15):4273-4281.

22. Choughule A, Sharma R, Trivedi V, et al. Coexistence of KRAS mutation with mutant but not wild-type EGFR predicts response to tyrosine-kinase inhibitors in human lung cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(11):2203-2204.
23. Ortiz-Cuaran S, Scheffler M, Plenker D, et al. Heterogeneous mechanisms of primary and acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2016;22(19):4837-4847.
24. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(5):268-277.
25. Finn SP, Addeo A, Dafni U, et al. Prognostic impact of KRAS G12C mutation in patients with NSCLC: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Thorac Oncol*. 2021;16(6):990-1002.
26. Scheffler M, Ihle MA, Hein R, et al. K-ras mutation subtypes in NSCLC and associated co-occurring mutations in other oncogenic pathways. *J Thorac Oncol*. 2019;14(4):606-616.
27. Soh J, Okumura N, Lockwood WW, et al. Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells. *PLoS One*. 2009;4(10):e7464.
28. Nakatani K, Yamaoka T, Ohba M, et al. KRAS and EGFR amplifications mediate resistance to rociletinib and osimertinib in acquired afatinib-resistant NSCLC harboring exon 19 deletion/T790M in EGFR. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(1):112-126.
29. Vaclova T, Chakraborty A, Sherwood J, et al. Concomitant KRAS mutations attenuate sensitivity of non-small cell lung cancer cells to KRAS G12C inhibition. *Sci Rep*. 2022;12(1):2699.
30. Arbour KC, Jordan E, Kim HR, et al. Effects of co-occurring genomic alterations on outcomes in patients with KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(2):334-340.
31. Kitajima S, Ivanova E, Guo S, et al. Suppression of STING associated with LKB1 loss in KRAS-driven lung cancer. *Cancer Discov*. 2019;9(1):34-45.
32. Romero R, Sayin VI, Davidson SM, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med*. 2017;23(11):1362-1368.
33. Wang X, Min S, Liu H, et al. Nf1 loss promotes Kras-driven lung adenocarcinoma and results in Psat1-mediated glutamate dependence. *EMBO Mol Med*. 2019;11(6).
34. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, et al. *STK11/LKB1* mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018 Jul;8(7):822-835. doi:10.1158/2159-8290.
35. Miura Y, Sunaga N. Role of immunotherapy for oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(8):245.
36. Chen N, Fang W, Lin Z, et al. KRAS mutation-induced upregulation of PD-L1 mediates immune escape in human lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(9):1175-1187.
37. Li D, Zhu X, Wang H, Li N. Association between PD-L1 expression and driven gene status in NSCLC: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(7):1372-1379.
38. Sebastian M, Eberhardt WEE, Hoffknecht P, et al. KRAS G12C-mutated advanced non-small cell lung cancer: a real-world cohort from the German prospective, observational, nation-wide CRISP registry (AIO-TRK-0315). *Lung Cancer*. 2021;154:51-61.
39. Judd J, Abdel Karim N, Khan H, et al. Characterization of KRAS mutation subtypes in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(12):2577-2584.
40. Sumimoto H, Takano A, Teramoto K, Daigo Y. RAS-mitogen-activated protein kinase signal is required for enhanced PD-L1 expression in human lung cancers. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166626.
41. Dogan S, Shen R, Ang DC, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6169-6177.
42. Acker F, Stratmann J, Aspacher L, et al. KRAS mutations in squamous cell carcinomas of the lung. *Front Oncol*. 2021;11:788084.
43. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):1167-1176.
44. Hwang DH, Sholl LM, Rojas-Rudilla V, et al. KRAS and NKX2-1 mutations in invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Oncol*. 2016;11(4):496-503.

45. Kadota K, Yeh YC, D'Angelo SP, et al. Associations between mutations and histologic patterns of mucin in lung adenocarcinoma: invasive mucinous pattern and extracellular mucin are associated with KRAS mutation. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):1118-1127.
46. Wood K, Hensing T, Malik R, Salgia R. Prognostic and predictive value in KRAS in non-small-cell lung cancer: a review. *JAMA Oncol*. 2016;2(6):805-812.
47. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421.
48. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):911-919.
49. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-859.
50. Singh N, Temin S, Baker S Jr, et al. Therapy for stage IV non-small-cell lung cancer without driver alterations: ASCO living guideline. *J Clin Oncol*. 2022;40(28):3323-3343.
51. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2018;20(2):129-159.
52. Gao J, Wu H, Wang L, et al. Validation of targeted next-generation sequencing for RAS mutation detection in FFPE colorectal cancer tissues: comparison with Sanger sequencing and ARMS-scorpion real-time PCR. *BMJ Open*. 2016;6(1):e009532.
53. Gao J, Wu H, Shi X, et al. Comparison of next-generation sequencing, quantitative PCR, and Sanger sequencing for mutation profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in clinical lung tumors. *Clin Lab*. 2016;62(4):689-696.
54. Cainap C, Balacescu O, Cainap SS, Pop LA. Next generation sequencing technology in lung cancer diagnosis. *Biology (Basel)*. 2021;10(9):864.
55. Hinrichs JW, van Blokland WT, Moons MJ, et al. Comparison of next-generation sequencing and mutation-specific platforms in clinical practice. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(4):573-578.
56. Merker JD, Devereaux K, Iafrate AJ, et al. Proficiency testing of standardized samples shows very high interlaboratory agreement for clinical next-generation sequencing-based oncology assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(4):463-471.
57. Surrey LF, Oakley FD, Merker JD, et al. Next-generation sequencing (NGS) methods show superior or equivalent performance to non-NGS methods on BRAF, EGFR, and KRAS proficiency testing samples. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(8):980-984.
58. Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575(7781):217-223.
59. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, et al. The KRAS(G12C) inhibitor MRTX849 provides insight toward therapeutic susceptibility of KRAS-mutant cancers in mouse models and patients. *Cancer Discov*. 2020;10(1):54-71.
60. Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor. *Cell*. 2018;172(3):578-589e17.
61. Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, et al. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science*. 1984;223(4637):661-664.
62. Lito P, Solomon M, Li LS, Hansen R, Rosen N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science*. 2016;351(6273):604-608.
63. Patricelli MP, Janes MR, Li LS, et al. Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state. *Cancer Discov*. 2016;6(3):316-329.
64. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p.G12C mutation. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2371-2381.
65. Johnson M, De Langen J, Waterhouse D, et al., editors. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small cell lung cancer with KRAS G12C mutation: CodeBreak 200 phase III study [abstract LBA10]. *Ann Oncol*. 2022;33(suppl 7):S808-S869.

66. Janne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, et al. Adagrasib in non-small-cell lung cancer harboring a KRAS(G12C) mutation. *N Engl J Med.* 2022;387(2):120-131.
67. Konen JM, Rodriguez BL, Padhye A, et al. Dual inhibition of MEK and AXL targets tumor cell heterogeneity and prevents resistant outgrowth mediated by the epithelial-to-mesenchymal transition in NSCLC. *Cancer Res.* 2021;81(5):1398-1412.
68. Adachi Y, Ito K, Hayashi Y, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a cause of both intrinsic and acquired resistance to KRAS G12C inhibitor in KRAS G12C-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(22):5962-5973.
69. Ricciuti B, Arbour KC, Lin JJ, et al. Diminished efficacy of programmed death-(ligand)1 inhibition in STK11- and KEAP1-mutant lung adenocarcinoma is affected by KRAS mutation status. *J Thorac Oncol.* 2022;17(3):399-410.
70. Cooper AJ, Muzikansky A, Lennerz J, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes for patients with KRAS G12D-mutant NSCLC. *JTO Clin Res Rep.* 2022;3(9):100390.
71. Soria JC, Ramalingam SS. Osimertinib in EGFR mutation-positive advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378(13):1262-1263.
72. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(9):829-838.
73. Ryan MB, Fece de la Cruz F, Phat S, et al. Vertical pathway inhibition overcomes adaptive feedback resistance to KRAS(G12C) inhibition. *Clin Cancer Res.* 2020;26(7):1633-43.
74. Koga T, Suda K, Fujino T, et al. KRAS secondary mutations that confer acquired resistance to KRAS G12C inhibitors, sotorasib and adagrasib, and overcoming strategies: insights from in vitro experiments. *J Thorac Oncol.* 2021;16(8):1321-1332.
75. Tanaka N, Lin JJ, Li C, et al. Clinical acquired resistance to KRAS(G12C) inhibition through a novel KRAS switch-II pocket mutation and polyclonal alterations converging on RAS-MAPK reactivation. *Cancer Discov.* 2021;11(8):1913-1922.
76. Awad MM, Liu S, Rybkin II, et al. Acquired resistance to KRAS<sup>G12C</sup> inhibition in cancer. *N Engl J Med.* 2021;384(25):2382-2393.
77. Suzuki S, Yonesaka K, Teramura T, et al. KRAS inhibitor resistance in MET-amplified KRAS (G12C) non-small cell lung cancer induced by RAS- and non-RAS-mediated cell signaling mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2021;27(20):5697-5707.

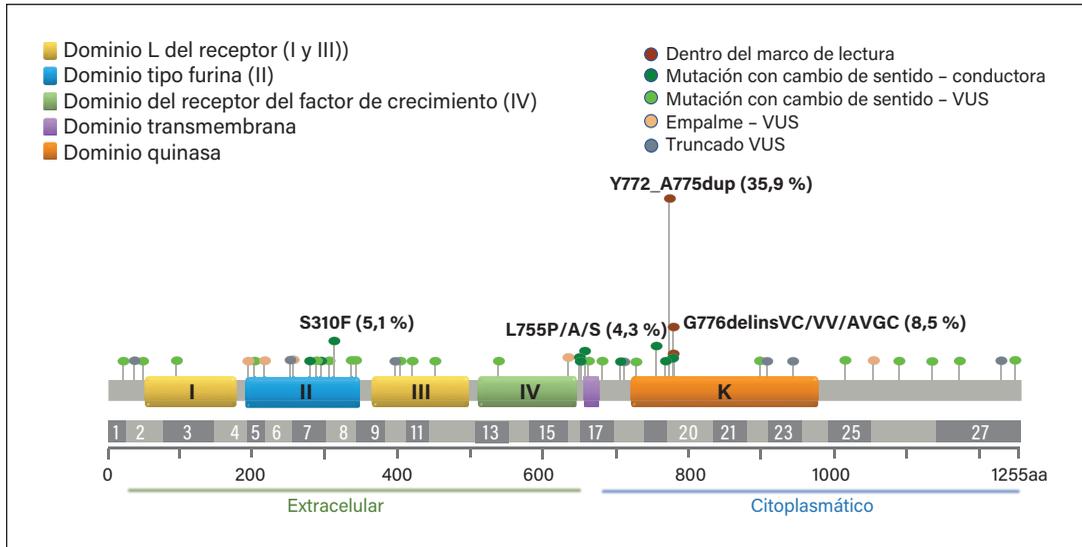
## Estructura y función de los genes

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/ERBB2) es un receptor tirosina quinasa de la familia ERBB, que interviene en el control del crecimiento, la supervivencia, la diferenciación y la migración celular.<sup>1,2</sup> Codificada por el gen *ERBB2* (*v-erb-b2 oncogén viral homólogo 2 de la leucemia eritroblástica aviar*) en el brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2-q12), esta proteína comparte una amplia homología estructural con los demás miembros de su familia, tanto a lo largo del dominio intracelular catalítico como de las regiones extracelulares putativas de unión al ligando (figuras 15-1 y 15-2). Sin embargo, a diferencia de otros miembros, HER2 no tiene un ligando directo identificado y, en su lugar, funciona como el compañero de dimerización preferido para todos los demás receptores de la familia ERBB.<sup>3-5</sup> La unión del ligando al dominio extracelular de EGFR (HER1), HER3 y HER4 da lugar a la formación de homo y heterodímeros catalíticamente activos, que a su vez activan varias vías descendentes que facilitan la señalización de la proliferación celular. Además de la capacidad superior de heterodimerización observada, el HER2 también es menos propenso a la internalización y la degradación, lo que le confiere una actividad quinasa activada y una transducción de señales más prolongadas.

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

La desregulación del gen *HER2*, a través de la sobreexpresión proteica, la amplificación genética y las mutaciones, ha sido bien descrita en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).<sup>6-8</sup> En contraste con otros tumores sólidos, la biología del HER2 en el CPNM parece más compleja, y los papeles explícitos de algunas alteraciones siguen sin estar claros. La consecuencia común de las alteraciones oncogénicas del *HER2* es la hiperactivación del receptor, que conduce a una proliferación celular descontrolada. Las mutaciones se producen principalmente en el dominio intracelular dentro del exón 20, siendo la variante A775\_G776insYVMA la más frecuente. Se han identificado otras mutaciones en los dominios intracelular, transmembrana

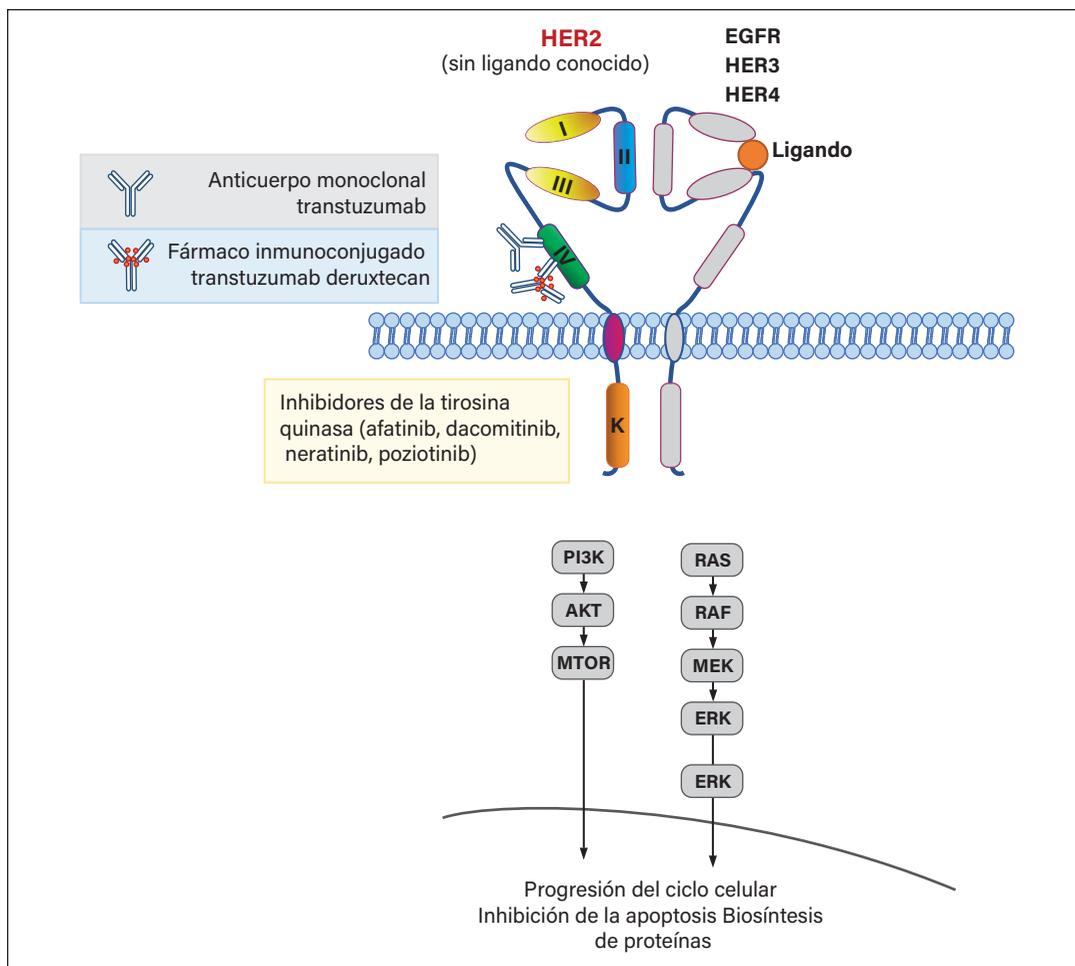
y extracelular (figura 15-1; tabla 15-1),<sup>9,10</sup> aunque con frecuencias mucho menores, y muchas se clasifican como variantes de significación desconocida.



**Figura 15-1.** El esquema representa la estructura del *HER2* (*ERBB2*), la distribución de los dominios y la prevalencia de las alteraciones somáticas más comunes en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Se muestran los dominios estructurales que codifican los componentes extracelular, transmembrana y citoplasmático de la proteína. La proteína *HER2* tiene 185 kDa y está compuesta por 1255 aminoácidos (aa), codificados por 27 exones. El dominio extracelular de unión al ligando (aa 1-652), el dominio transmembrana (aa 653-675) y el dominio intracelular (aa 676-1255) comparten una homología estructural significativa con miembros de la misma familia. La prevalencia de las mutaciones más comunes del *HER2* en el CPNM no escamoso y su ubicación se muestran basándose en los datos disponibles públicamente de cBioPortal.<sup>11</sup> Las mutaciones más frecuentes son inserciones en el exón 20; la duplicación Y772\_A775, también denominada A775\_G776insYVMA es la más frecuente, seguida de las inserciones en el codón G776. Las mutaciones de aminoácido en los exones 8, 17 y 19 se observan con frecuencias de entre el 2 % y el 5 %. Las mutaciones poco frecuentes fuera de estas regiones se clasifican principalmente como variantes de significación desconocida (variants of unknown significance, VUS).

## Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Las tasas de incidencia tanto de la amplificación como de la sobreexpresión de *HER2* varían ampliamente según los estudios. La amplificación se ha demostrado en entre el 2 % y el 22 % de los casos de CPNM, mientras que la sobreexpresión se informa entre el 2,4 % y el 38 %.<sup>12-15</sup> Esta variación puede estar influida por el método de evaluación, el país o la región, así como por el entorno clínico y patológico, y se justifica una mayor investigación. A diferencia de otras neoplasias malignas, sobre todo los carcinomas de mama y de la unión gástrica/gastroesofágica (gastroesophageal junction, GEJ), en los que la amplificación genética y la sobreexpresión de proteínas en la membrana celular están muy correlacionadas, esta asociación es escasa en el cáncer de pulmón. Mientras que algunos estudios documentan asociaciones significativas,<sup>16-18</sup> otros las informan como eventos no relacionados.<sup>15,19,20</sup> De forma similar, varios estudios demuestran una asociación negativa entre las mutaciones del *HER2* y la amplificación,<sup>15,21</sup> con solo una proporción menor de informes que muestran mutaciones concurrentes con la amplificación.<sup>22-24</sup> En general, esta escasa concordancia sugiere que cada una de las alteraciones puede representar subconjuntos clinicopatológicos distintos.



**Figura 15-2.** Estructura, señalización y dianas de tratamiento del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El HER2 se activa mediante la formación de homodímeros o heterodímeros con otros receptores de la misma familia. La dimerización da lugar a la fosforilación de residuos específicos de tirosina en los dominios intracelulares, lo que, a su vez, conduce a la activación de la proteína quinasa activada por Ras/Raf/mitógeno, la fosfoinositol 3-quinasa/Akt y otras vías. Han surgido varias estrategias dirigidas para inhibir el HER2: (1) anticuerpos monoclonales de un solo epítipo que se unen a un único dominio extracelular, como el trastuzumab (unión al dominio IV); (2) fármacos inmunoconjugados, como el trastuzumab deruxtecan; y (3) inhibidores de moléculas pequeñas, como afatinib, dacomitinib, neratinib, poziotinib, diseñados para unirse al dominio tirosina quinasa intracelular del HER2.

**Tabla 15-1.** Lista de mutaciones comunes en *HER2* (*ERBB2*)

Ubicación	Tipo	Mutación
Exón 8	SNV	p.S310F
Exón 19	SNV	p.D769H, p.D769N, p.D769Y, p.I767M/F, p.L755A/M/P/S/W
	Indel	p.L755_E757delinsS, p.L755_T759delLRENT
Exón 20	SNV	p.I767M, p.G776C, p.G776S, p.G776V, p.V777L, p.V777M p.T798I
	Indel	p.A775_G776insV, p.A775_G776insYVMA (p.Y772_A775dup), p.A775_G776insTVMA (p.Y772_V773VMAT), p.G776_V777insL, p.G776_V777insVC, p.G776_V777insVGC (p.G778_S779CVG), p.G776>LC, p.G776delinsVC (p.G776>VC), p.G778dup (p.V777_G778insG), p.G778_P780dup (p.P780_Y781GSP, V777_G778insGSP), p.G778_S779insCPG (p.V777_G778insGCP), p.G778_S779insLPS, p.S779_P780insVGS, p.V777_G778insCG

Abreviaturas: indel = inserción y/o deleción; SNV = variante de nucleótido único.

La amplificación del *HER2* se puede identificar como una alteración *de novo* en aproximadamente el 2 % al 3 % de los casos de CPNM sin tratamiento previo<sup>15</sup> o como un mecanismo de resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) del EGFR de primera generación, donde puede encontrarse hasta en el 13 % de los pacientes.<sup>25</sup> En general, no se observan características clinicopatológicas distintas en los pacientes con amplificación de *HER2* o expresión de *HER2* en el entorno *de novo*<sup>16,19,22,26</sup> mientras que, en el entorno de la resistencia, las características están determinadas por el conductor sensibilizante original.

Las mutaciones del *HER2* se detectan en menos del 2 % de todos los CPNM y se han asociado principalmente con la histología del adenocarcinoma, la condición de no fumador o que nunca ha fumado y el sexo femenino. Los pacientes con tumores con mutaciones del *HER2* suelen desarrollar metástasis cerebrales, notificadas hasta en el 47 % de los casos.<sup>27</sup> Las mutaciones son mutuamente excluyentes con otras alteraciones moleculares conductoras y no se suelen asociar a la amplificación o sobreexpresión del *HER2*.<sup>21,28,29</sup> El porcentaje de pacientes con mutaciones concurrentes del *HER2* y expresión de PD-L1 (puntuación de proporción tumoral [tumor proportion score, TPS]  $\geq 1$  %) es menor en comparación con otros tumores adictos a oncogenes, y no más del 20 % de los casos muestran niveles altos de expresión (TPS  $\geq 50$  %).<sup>30</sup> En contraste con la amplificación del *HER2*, las mutaciones del *HER2* o la sobreexpresión de *HER2* no se han asociado con resistencia adquirida a terapias dirigidas.

### Estrategias de prueba

Los métodos utilizados para evaluar las alteraciones del *HER2* varían en función del tipo de alteración y abarcan diversas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) y en la secuenciación (secuenciación de nueva generación [next-generation sequencing, NGS] y no NGS), la inmunohistoquímica (IHQ) y la hibridación fluorescente *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH).<sup>25,31-35</sup> En la tabla 15-2 se presenta un resumen de la metodología, junto con los criterios actuales sugeridos para la interpretación de la IHQ y la FISH.<sup>36</sup> El tejido tumoral es el patrón preferido para las pruebas de *HER2*. Sin embargo, cuando no se dispone de tejido o este es demasiado limitado, se puede utilizar ADN libre de células<sup>35-37</sup> y permite la detección de mutaciones y amplificaciones, si hay suficiente ADN tumoral circulante (ADNtc), pero impide la evaluación de la expresión de *HER2*.

### Implicaciones clínicas

Las implicaciones pronósticas de las mutaciones del *HER2*, en su conjunto, siguen siendo controvertidas, ya que los datos disponibles son aún escasos y contradictorios. En algunos estudios se ha observado una tendencia a un efecto pronóstico negativo,<sup>29,38</sup> mientras que otros informan de un posible resultado indolente para los casos mutados cuando se comparan con una población de CPNM no seleccionada.<sup>28</sup> Cuando se estratifica en subconjuntos, la mutación específica puede influir en el pronóstico, como se informó en un estudio reciente que identificó una peor supervivencia asociada con A775\_G776insYVMA en comparación con alteraciones menos frecuentes del *HER2*.<sup>39</sup> En general, los tumores con mutación del *HER2* parecen menos sensibles al pemetrexed,<sup>40</sup> un agente generalmente eficaz en otros CPNM adictos a oncogenes. Los datos disponibles sobre la sensibilidad a la inmunoterapia,

en gran medida retrospectivos, también sugieren que los tumores con mutación del *HER2* son menos sensibles a los inhibidores de puntos de control, de forma similar a los hallazgos en el CPNM con mutación del *EGFR* o reordenamiento de la *ALK*.<sup>41,42</sup>

Varias terapias dirigidas han mostrado actividad en pacientes con tumores con mutaciones del *HER2*. Han surgido tres estrategias de tratamiento dominantes: los TKI, los anticuerpos monoclonales y los fármacos inmunoconjugados (antibody-drug conjugates, ADC; figura 15-2). Los TKI de *HER2*, incluidos afatinib, dacomitinib, neratinib y poziotinib, han mostrado una actividad modesta con una toxicidad consistente.<sup>13,43,44</sup> Se han observado resultados más prometedores con anticuerpos monoclonales, como trastuzumab, en combinación con quimioterapia, demostrando una actividad notable solo en investigaciones retrospectivas.<sup>31,45</sup>

**Tabla 15-2.** Resumen de los métodos para la detección de alteraciones del *HER2* (*ERBB2*) e implicaciones clínicas

Alteración genética	Mutaciones	Amplificación	Sobreexpresión
<b>Descripción</b>	Mutaciones puntuales Inserciones	Número anormalmente elevado de copias del gen <i>HER2</i> ( <i>ERBB2</i> )	Expresión anormalmente alta del receptor de la proteína en la superficie de las células tumorales
<b>Método de prueba</b>	Secuenciación: <ul style="list-style-type: none"> <li>de Sanger</li> <li>NGS (preferida)</li> </ul> Otros: <ul style="list-style-type: none"> <li>Análisis de fragmentos</li> <li>ARMS-PCR</li> <li>dPCR</li> </ul>	FISH: método preferido y recomendado para las pruebas en estudios clínicos relacionados con el CPNM Criterios de amplificación del <i>HER2</i> por FISH <sup>a</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>Proporción del <i>HER2</i> con respecto a <i>CEP17</i> &gt;2,0 o señales del <i>HER2</i> conectadas en racimos: amplificación del <i>HER2</i> positiva</li> <li>Proporción del <i>HER2</i> con respecto a <i>CEP17</i> &lt;2,0; número de copias del <i>HER2</i> ≥6,0: amplificación del <i>HER2</i> positiva</li> <li>Número de copias de <i>HER2</i> &lt;4,0: amplificación del <i>HER2</i> negativa</li> <li>Número de copias del <i>HER2</i> ≥4,0 pero &lt;6,0: no se puede determinar el estado de la amplificación</li> </ul> Otros métodos: qPCR, NGS <ul style="list-style-type: none"> <li>En la práctica clínica actual, la NGS es un método de uso frecuente para detectar la amplificación del <i>HER2</i> en el CPNM</li> <li>Criterios de interpretación aún no desarrollados</li> </ul>	La IHQ es el método estándar y puede puntuarse de la misma forma que para el carcinoma de mama; sin embargo, la IHQ de <i>HER2</i> no está indicada actualmente en la práctica clínica para el CPNM
<b>Implicación clínica</b>	Factores oncogénicos, mutuamente excluyentes con otros conductores Trastuzumab deruxtecan aprobado por la FDA para el tratamiento de segunda línea en el CPNM avanzado con mutación del <i>HER2</i> ( <i>ERBB2</i> )	Factor oncogénico <i>de novo</i> o secundario como mecanismo de resistencia Implicaciones del tratamiento en fase de investigación	La amplificación y la expresión son independientes, a diferencia del carcinoma de mama, y actualmente no hay implicaciones clínicas para evaluar la expresión de <i>HER2</i> en el CPNM

Abreviaturas: ARMS-PCR = sistema de mutaciones refractarias a la amplificación-reacción en cadena de la polimerasa; CEP17 = centrómero del cromosoma 17; dPCR = PCR digital; FDA = Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; FISH = hibridación fluorescente *in situ*; *HER2* = receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; IHQ = inmunohistoquímica; NGS = secuenciación de nueva generación; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico; qPCR = PCR cuantitativa.

<sup>a</sup> Los valores de corte para la FISH del *HER2* no están estrictamente establecidos para el CPNM. Se han adaptado los criterios del cáncer de mama.

Más recientemente, se demostró que el trastuzumab deruxtecan, un ADC HER2, proporcionaba una actividad anticancerosa duradera en pacientes con CPNM con mutación del *HER2* previamente tratados,<sup>32</sup> lo que le convirtió en el primer fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) para el tratamiento del CPNM con mutación del *HER2*. Se observó eficacia en la mayoría de los pacientes independientemente de la expresión IHQ de HER2 o del estado de amplificación.<sup>46,47</sup>

Cabe destacar que la eficacia diferencial de los regímenes de tratamiento dirigido en tipos de mutación específicos es un área de investigación activa, pero sigue sin estar totalmente definida. En estudios anteriores se ha observado que los tumores que albergan la mutación A775\_G776insYVMA del *HER2* son los que menos responden al tratamiento con TKI dirigidos al *HER2*.<sup>48,49</sup> En cambio, recientemente se ha informado de una mayor supervivencia global y una mejor respuesta para esta mutación, en comparación con alteraciones menos comunes cuando se utilizan terapias basadas en trastuzumab en una cohorte retrospectiva del mundo real de un solo centro.<sup>39</sup>

### Mecanismos de resistencia

Históricamente, la amplificación del *HER2* se ha considerado uno de los mecanismos de resistencia de derivación de los TKI del EGFR, detectada en el 13 % de los pacientes que presentaron progresión tras el tratamiento.<sup>25</sup> En la actualidad, el grado en que la amplificación puede conferir resistencia sigue estando mal definido, ya que los resultados de los estudios son controvertidos y algunos de ellos informan incluso de una mejor respuesta a los TKI del EGFR en los tumores con amplificación del *HER2*.<sup>50</sup>

En el entorno de los CPNM con *HER2* alterado *de novo* tratados con terapias dirigidas, actualmente son escasas las pruebas de mecanismos de resistencia secundaria. Un estudio *in vitro*, en el que se investigó una resistencia adquirida al poziotinib, un inhibidor del *HER2*, identificó la mutación secundaria del *HER2*, C805S, en el sitio de unión covalente del fármaco como un mecanismo potencial de resistencia adquirida, y los inhibidores del HSP90 presentan una posible estrategia terapéutica.<sup>51</sup>

Con la excepción de unas pocas mutaciones, la mayoría de las inserciones en el exón 20 del *HER2* han mostrado resistencia primaria a los TKI pan-HER disponibles. Aunque los mecanismos de resistencia siguen en gran medida sin definirse, los análisis estructurales y de dinámica molecular sugieren que el panorama conformacional de la inserción que afecta al dominio quinasa tiene efectos variables en la afinidad y la sensibilidad a los TKI.<sup>49</sup> La mutación A775\_G776insYVMA, por ejemplo, conduce a una gran rigidez conformacional que hace que el sitio de unión del adenosín trifosfato (adenosine triphosphate, ATP) sea menos accesible a los TKI de moléculas pequeñas en comparación con otras mutaciones.

### Referencias

1. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487. doi:10.1038/sj.onc.1210477
2. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human *c-erbB-2* gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232(4758):1644-1646. doi:10.1126/science.3012781

3. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *Embo J*. 1996;15(10):2452-2467.
4. Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5276-5287. doi:10.1128/mcb.16.10.5276
5. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):4995-5000. doi:10.1073/pnas.96.9.4995
6. Shimamura T, Ji H, Minami Y, et al. Non-small-cell lung cancer and Ba/F3 transformed cells harboring the ERBB2 G776insV\_G/C mutation are sensitive to the dual-specific epidermal growth factor receptor and ERBB2 inhibitor HKI-272. *Cancer Res*. 2006;66(13):6487-6491. doi:10.1158/0008-5472.Can-06-0971
7. Perera SA, Li D, Shimamura T, et al. HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(2):474-479. doi:10.1073/pnas.0808930106
8. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550. doi:10.1038/nature13385
9. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):pl1. doi:10.1126/scisignal.2004088
10. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-404. doi:10.1158/2159-8290.Cd-12-0095
11. Most common *HER2* mutations in non-squamous NSCLC, prevalence and location data. cBioPortal for Cancer Genomics;2022. <https://www.cbioportal.org/>.
12. Cappuzzo F, Gregorc V, Rossi E, et al. Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC. *J Clin Oncol*. 2003;21(14):2658-2663. doi:10.1200/jco.2003.01.039
13. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, et al. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature*. 2018;554(7691):189-194. doi:10.1038/nature25475
14. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Shim HS. The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171280. doi:10.1371/journal.pone.0171280
15. Li BT, Ross DS, Aisner DL, et al. HER2 amplification and HER2 mutation are distinct molecular targets in lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2016;11(3):414-419. doi:10.1016/j.jtho.2015.10.025
16. Heinmöller P, Gross C, Beyser K, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res*. 2003;9(14):5238-5243.
17. Cox G, Vyberg M, Melgaard B, et al. Herceptest: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2001;92(4):480-483. doi:10.1002/ijc.1214
18. Tan D, Deeb G, Wang J, et al. HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2003;12(4):201-211. doi:10.1097/00019606-200312000-00004
19. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer*. 2002;86(9):1449-1456. doi:10.1038/sj.bjc.6600286
20. Nakamura H, Saji H, Ogata A, et al. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003;103(1):61-66. doi:10.1002/ijc.10795
21. Arcila ME, Chaff JE, Nafa K, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(18):4910-4918. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0912
22. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, et al. HER2 status in lung adenocarcinoma: a comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations. *Lung Cancer*. 2014;85(3):373-378. doi:10.1016/j.lungcan.2014.06.007

23. Suzuki M, Shiraishi K, Yoshida A, et al. HER2 gene mutations in non-small cell lung carcinomas: concurrence with Her2 gene amplification and Her2 protein expression and phosphorylation. *Lung Cancer*. 2015;87(1):14-22. doi:10.1016/j.lungcan.2014.10.014.
24. Meert AP, Martin B, Verdebout JM, et al. Is there a relationship between c-erbB-1 and c-erbB-2 amplification and protein overexpression in NSCLC? *Lung Cancer*. 2005;47(3):325-336. doi:10.1016/j.lungcan.2004.07.047.
25. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2240-2247. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
26. Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, et al. HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10, pt 1):3645-3652.
27. Offin M, Feldman D, Ni A, et al. Frequency and outcomes of brain metastases in patients with HER2-mutant lung cancers. *Cancer*. 2019;125(24):4380-4387. doi:10.1002/cncr.32461.
28. Mazières J, Peters S, Lepage B, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: Epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*. 2013;31(16):1997-2003. doi:10.1200/JCO.2012.45.6095.
29. Pillai RN, Behera M, Berry LD, et al. HER2 mutations in lung adenocarcinomas: a report from the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer*. 2017;123(21):4099-4105. doi:10.1002/cncr.30869.
30. Negrao MV, Skoulidis F, Montesion M, et al. Oncogene-specific differences in tumor mutational burden, PD-L1 expression, and outcomes from immunotherapy in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*. 2021;9(8):e002891. doi:10.1136/jitc-2021-002891.
31. Mazieres J, Barlesi F, Filleron T, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol*. 2016;27(2):281-286. doi:10.1093/annonc/mdv573.
32. Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(3):241-251. doi:10.1056/NEJMoa2112431.
33. Ignatius Ou SH, Madison R, Robichaux JP, et al. Characterization of 648 non-small cell lung cancer (NSCLC) cases with 28 unique HER2 exon 20 insertions [abstract]. *J Clin Oncol*. 2019;37(15 suppl):9063. doi:10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.9063.
34. Yang S, Wang Y, Zhao C, et al. Exon 20 YVMA insertion is associated with high incidence of brain metastasis and inferior outcome of chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients with HER2 kinase domain mutations. *Transl Lung Cancer Res*. 2021;10(2):753-765. doi:10.21037/tlcr-20-559.
35. Lee J, Franovic A, Shiotsu Y, et al. Detection of *ERBB2* (HER2) gene amplification events in cell-free DNA and response to anti-HER2 agents in a large Asian cancer patient cohort. *Front Oncol*. 2019;9:212. doi:10.3389/fonc.2019.00212.
36. Ren S, Wang J, Ying J, et al. Consensus for HER2 alterations testing in non-small-cell lung cancer. *ESMO Open*. 2022;7(1):100395. doi:10.1016/j.esmoop.2022.100395.
37. Li BT, Janku F, Jung B, et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol*. 2019;30(4):597-603. doi:10.1093/annonc/mdz046.
38. Jebbink M, de Langen AJ, Boelens MC, Monkhorst K, Smit EF. The force of HER2—a druggable target in NSCLC? *Cancer Treat Rev*. 2020;86:101996. doi:10.1016/j.ctrv.2020.101996.
39. Waliany S, Wakelee H, Ramchandran K, et al. Characterization of ERBB2 (HER2) alterations in metastatic non-small cell lung cancer and comparison of outcomes of different trastuzumab-based regimens. *Clin Lung Cancer*. 2022;23(6):498-509. doi:10.1016/j.clcc.2022.05.015.
40. Wang Y, Zhang S, Wu F, et al. Outcomes of pemetrexed-based chemotherapies in HER2-mutant lung cancers. *BMC Cancer*. 2018;18(1):326. doi:10.1186/s12885-018-4277-x.
41. Guisier F, Dubos-Arvis C, Vinas F, et al. Efficacy and safety of Anti-PD-1 immunotherapy in patients with advanced NSCLC with BRAF, HER2, or MET mutations or RET translocation: GFPC 01-2018. *J Thorac Oncol*. 2020;15(4):628-636. doi:10.1016/j.jtho.2019.12.129.

42. Mazieres J, Drilon A, Lusque A, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1321-1328. doi:10.1093/annonc/mdz167.
43. Dziadziuszko R, Smit EF, Dafni U, et al. Afatinib in NSCLC with HER2 mutations: results of the prospective, open-label phase II NICHE trial of European Thoracic Oncology Platform (ETOP). *J Thorac Oncol.* 2019;14(6):1086-1094. doi:10.1016/j.jtho.2019.02.017.
44. Elamin YY, Robichaux JP, Carter BW, et al. Poziotinib for patients with HER2 exon 20 mutant non-small-cell lung cancer: results from a phase II trial. *J Clin Oncol.* 2022;40(7):702-709. doi:10.1200/JCO.21.01113.
45. Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2619-2621. doi:10.1056/NEJMc060020.
46. Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(3):241-251. doi:10.1056/NEJMoa2112431.
47. Smit EF, Felip E, Uprety D, et al. Trastuzumab deruxtecan in patients (pts) with HER2-overexpressing (HER2-OE) metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): results from the DESTINY-Lung01 trial. *Ann Oncol.* 2022; 33(suppl 7):S448-S554. doi:10.1016/annonc/annonc1064.
48. Robichaux JP, Elamin YY, Tan Z, et al. Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nat Med.* 2018;24(5):638-646. doi:10.1038/s41591-018-0007-9.
49. Zhao S, Fang W, Pan H, et al. Conformational landscapes of HER2 exon 20 insertions explain their sensitivity to kinase inhibitors in lung adenocarcinoma. Article. *J Thorac Oncol.* 2020;15(6):962-972. doi:10.1016/j.jtho.2020.01.020.
50. Zhao J, Xia Y. Targeting HER2 alterations in non-small-cell lung cancer: a comprehensive review. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:411-425. doi:10.1200/PO.19.00333.
51. Koga T, Kobayashi Y, Tomizawa K, et al. Activity of a novel HER2 inhibitor, poziotinib, for HER2 exon 20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance: an in vitro study. *Lung Cancer.* 2018;126:72-79. doi:10.1016/j.lungcan.2018.10.019.51.



## Estructura y función de los genes

El gen de la neuregulina-1 (*NRG1*), situado en el cromosoma 8, tiene aproximadamente 1,4 Mb de longitud y representa uno de los genes humanos más grandes.<sup>1</sup> El gen contiene grandes regiones intrónicas y solo el 0,3 % del gen codifica la proteína (neuregulina-1), que representa 1 de las 4 proteínas de la familia de la neuregulina que interactúan con la familia de receptores ErbB.<sup>1</sup> La proteína *NRG1* se produce en al menos 31 isoformas diferentes como resultado del empalme alternativo; sin embargo, todas las isoformas comparten un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF), que les permite unirse y activar el ErbB3 (HER3) y, con menor frecuencia, el ErbB4 (HER4).<sup>2-4</sup> Tras la unión del ligando, los receptores del ErbB3 forman homodímeros o heterodímeros con el ErbB2 (HER2), lo que conduce a la activación de las vías PIK3-AKT y MAPK.<sup>5,6</sup> Las distintas isoformas de la *NRG1* son esenciales durante la embriogénesis y desempeñan un papel central en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células gliales, las neuronas y los cardiomiocitos.<sup>1</sup>

## Tipos de alteraciones y papel en la oncogénesis

Las alteraciones del factor oncogénico que implican al *NRG1* se producen en forma de fusiones. Las fusiones del *NRG1* pueden implicar a muchos genes compañeros diferentes, siendo el *CD74* el compañero más frecuente, que representa aproximadamente el 30 % de los casos.<sup>7-9</sup> El componente *NRG1* contribuye con el dominio similar al EGF, que sirve como ligando para el ErbB3, mientras que el gen compañero contribuye típicamente con un dominio transmembrana que une la proteína quimérica a la membrana celular.<sup>7</sup> La proteína quimérica conserva su dominio similar al EGF, lo que le permite interactuar con el ErbB3 en la misma célula o en una célula adyacente y conduce a la activación de las vías descendentes.<sup>7</sup>

**Tabla 16-1.** Estrategias de prueba

Tipo de prueba	Ventajas	Desventajas
FISH <sup>10</sup>	Técnica disponible en la mayoría de los laboratorios Tiempo de respuesta corto (2-3 días)	Prueba de un solo gen Tiempo práctico extenso Requiere experiencia en la interpretación No proporciona información sobre la fusión asociada
NGS dirigida basada en ADN <sup>7,9</sup>	La prueba multigénica proporciona información sobre otros conductores	Baja sensibilidad para la fusión del <i>NRG1</i> debido a la escasa cobertura/falta de cobertura
NGS dirigida basada en ARN <sup>9</sup>	Máxima sensibilidad La prueba multigénica proporciona información sobre otros conductores	Requiere una calidad adecuada del ARN (las muestras más antiguas son subóptimas debido a la degradación del ARN)

Abreviaturas: FISH = hibridación fluorescente *in situ*; NGS = secuenciación de nueva generación.

### Características epidemiológicas, clínicas e histológicas

Las fusiones del *NRG1* se producen con baja frecuencia en múltiples tipos de tumores, con una incidencia global en tumores sólidos del 0,2 %.<sup>9</sup> Entre los cánceres de pulmón no microcíticos (CPNM), las fusiones del *NRG1* se producen con una tasa del 0,3 %.<sup>9</sup> Las fusiones del *NRG1* se producen principalmente en personas que nunca han fumado y en tumores con el histotipo de adenocarcinomas mucinosos invasivos (invasive mucinous adenocarcinomas, IMA), anteriormente conocidos como carcinomas bronquioloalveolares mucinosos.<sup>8,11-13</sup> Entre los IMA, las fusiones del *NRG1* se producen con una frecuencia del 7 % y son mutuamente excluyentes con las mutaciones del *KRAS* y otros factores oncogénicos. Entre los IMA de tipo salvaje para el *KRAS*, la frecuencia de fusión del *NRG1* es del 17 % al 25 %.<sup>11,13</sup>

Entre los IMA, las fusiones del *NRG1* se asocian a características histológicas y clínicas más agresivas, incluida una mayor tasa de metástasis a distancia y una peor supervivencia en comparación con los IMA que albergan mutaciones del *KRAS*.<sup>13</sup>

Aunque poco frecuentes, las fusiones del *NRG1* también se producen en otros tipos de tumores sólidos, como el adenocarcinoma pancreático, el carcinoma de vesícula biliar, el carcinoma de células renales, el carcinoma ovárico, el carcinoma de mama y el carcinoma y sarcoma de vejiga; la incidencia de fusiones del *NRG1* en estos tumores es del 0,1 % al 0,5 %.<sup>9</sup> De forma similar al adenocarcinoma de pulmón, las fusiones del *NRG1* en el adenocarcinoma pancreático son mutuamente excluyentes con las mutaciones del *KRAS* y, por lo tanto, están altamente enriquecidas en los tumores *KRAS* de tipo salvaje.<sup>14</sup>

La tabla 16-1 resume las estrategias de prueba para los tumores positivos para *NRG1*.

### Implicaciones clínicas

La presencia de una fusión del *NRG1* en el CPNM se ha asociado a malos resultados en la terapia estándar. En el Registro Multicéntrico Global eNRGy1 de más de 100 casos de CPNM con fusión del *NRG1* positiva, la respuesta a la quimioterapia con doblete de platino fue solo del 13 %, con una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 5,8 meses.<sup>12</sup> La mediana de SLP con quimioinmunoterapia fue aún más corta, de solo 3,3 meses. Sin embargo, existen opciones terapéuticas emergentes que se dirigen a la vía HER2/HER3 desencadenada por la proteína de fusión *NRG1*. El afatinib, un inhibidor de la quinasa pan-ErbB, ha demostrado una clara eficacia con una tasa de respuesta (response rate, RR) del 25 % en el registro retrospectivo eNRGy1.<sup>12</sup>

Múltiples informes de casos y series también han demostrado respuestas al afatinib en tumores positivos para la fusión del *NRG1*,<sup>15-17</sup> con estudios prospectivos en curso. El anticuerpo biespecífico de HER2-HER3 zenocutuzumab mostró una eficacia temprana en tumores positivos para la fusión del *NRG1*, incluyendo respuestas tanto en CPNM como en cáncer de páncreas.<sup>18</sup> El ensayo de fase 2 eNRGy en curso informó de una RR inicial del 34 % (n = 79) con una mediana de duración de la respuesta de 9,1 meses.<sup>18</sup> El anticuerpo monoclonal HER3 seribantumab se está estudiando en tumores positivos para la fusión del *NRG1* y ha informado de una RR del 33 % (n = 12).<sup>19</sup> Tanto el zenocutuzumab como el seribantumab recibieron la designación de vía rápida por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA).

### Mecanismos de resistencia

Se sabe poco sobre la resistencia adquirida o intrínseca a cualquiera de los agentes de investigación precedentes, y esta sigue siendo un área de estudio activo.

### Referencias

1. Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):14-30.
2. Meyer D, Yamaai T, Garratt A, et al. Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development*. 1997;124(18):3575-3586.
3. Steinhorsdottir V, Stefansson H, Ghosh S, et al. Multiple novel transcription initiation sites for *NRG1*. *Gene*. 2004;342(1):97-105.
4. Tan W, Wang Y, Gold B, et al. Molecular cloning of a brain-specific, developmentally regulated neuregulin 1 (*NRG1*) isoform and identification of a functional promoter variant associated with schizophrenia. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24343-24351.
5. Kim HG, Lee CK, Cho SM, et al. Neuregulin 1 up-regulates the expression of nicotinic acetylcholine receptors through the ErbB2/ErbB3-PI3K-MAPK signaling cascade in adult autonomic ganglion neurons. *J Neurochem*. 2013;124(4):502-513.
6. Tzahar E, Levkowitz G, Karunakaran D, et al. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/herectin isoforms. *J Biol Chem*. 1994;269(40):25226-25233.
7. Drilon A, Somwar R, Mangatt BP, et al. Response to ERBB3-directed targeted therapy in *NRG1*-rearranged cancers. *Cancer Discov*. 2018;8(6):686-695.
8. Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, et al. CD74-*NRG1* fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2014;4(4):415-422.
9. Jonna S, Feldman RA, Swensen J, et al. Detection of *NRG1* gene fusions in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(16):4966-4972.
10. Duruisseau M, McLeer-Florin A, Antoine M, et al. *NRG1* fusion in a French cohort of invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Cancer Med*. 2016;5(12):3579-3585.
11. Chang JC, Offin M, Falcon C, et al. Comprehensive molecular and clinicopathologic analysis of 200 pulmonary invasive mucinous adenocarcinomas identifies distinct characteristics of molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2021;27(14):4066-4076.
12. Drilon A, Duruisseau M, Han JY, et al. Clinicopathologic features and response to therapy of *NRG1* fusion-driven lung cancers: the eNRGy1 Global Multicenter Registry. *J Clin Oncol*. 2021;39(25):2791-2802.
13. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, et al. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(12):3087-3093.
14. Jones MR, Williamson LM, Topham JT, et al. *NRG1* gene fusions are recurrent, clinically actionable gene rearrangements in *KRAS* wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4674-4681.
15. Cadranel J, Liu SV, Duruisseau M, et al. Therapeutic potential of afatinib in *NRG1* fusion-driven solid tumors: a case series. *Oncologist*. 2021;26(1):7-16.
16. Cheema PK, Doherty M, Tsao MS. A case of invasive mucinous pulmonary adenocarcinoma with a CD74-*NRG1* fusion protein targeted with afatinib. *J Thorac Oncol*. 2017;12(12):e200-e202.

17. Wu X, Zhang D, Shi M, et al. Successful targeting of the *NRG1* fusion reveals durable response to afatinib in lung adenocarcinoma: a case report. *Ann Transl Med.* 2021;9(19):1507.
18. Schram AM, Goto K, Kim D-W, et al. Efficacy and safety of zenocutuzumab, a HER2 x HER3 bispecific antibody, across advanced *NRG1* fusion (*NRG1+*) cancers. *J Clin Oncol.* 2022;40(16 suppl):105.
19. Carrizosa DR, Burkard ME, Elamin YY, et al. CRESTONE: initial efficacy and safety of seribantumab in solid tumors harboring *NRG1* fusions. *J Clin Oncol.* 2022;40(16 suppl):3006.

# Nuevas dianas y tecnologías

Por Kurt A. Schalper y David M. Hwang

# 17

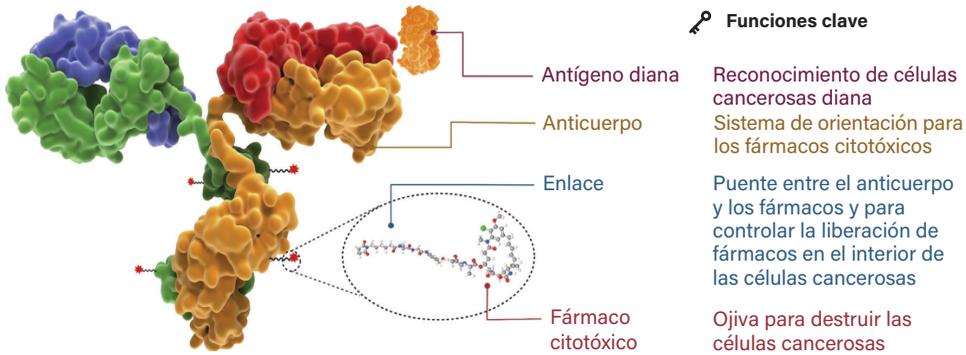
Las vías terapéuticas novedosas y emergentes para tratar a los pacientes con cáncer de pulmón comprenden un amplio abanico de estrategias, que aprovechan las características moleculares tumorales de diversas maneras, entre ellas:

- La explotación de la expresión diferencial de proteínas en el tumor con respecto a las células no tumorales para dirigir y enriquecer localmente los agentes citotóxicos mediante fármacos inmunoconjugados (antibody-drug conjugates, ADC).
- El uso de moléculas pequeñas para dirigirse a proteínas mutantes presentes en las células cancerosas con efecto oncogénico o implicadas en procesos metabólicos críticos (por ejemplo, KRAS [no G12C], PIK3CA, STK11, KEAP1).
- La provisión de terapias inmunoestimuladoras que modulen los receptores coestimuladores de las células T o las enzimas reguladoras, utilizando citoquinas proinflamatorias modificadas con índices terapéuticos favorables, vacunas dirigidas a neoantígenos específicos del tumor o el reconocimiento selectivo y la eliminación de células tumorales que expresen proteínas de superficie específicas utilizando células T con receptores quiméricos de antígenos (chimeric antigen receptor, CAR) modificadas.

Gracias a ellas, los ADC han mostrado una actividad clínica destacada en múltiples tipos de tumores, incluido el cáncer de pulmón, lo que conlleva la necesidad potencial de nuevas pruebas de biomarcadores y enfoques diagnósticos. Además, las novedosas plataformas de análisis molecular que permiten la interrogación simultánea de numerosas alteraciones con alta sensibilidad, resolución unicelular y/o preservación del contexto espacial están ampliando el arsenal de herramientas para descubrir y desarrollar biomarcadores novedosos para la selección y el monitoreo de pacientes.

## **Fármacos inmunoconjugados**

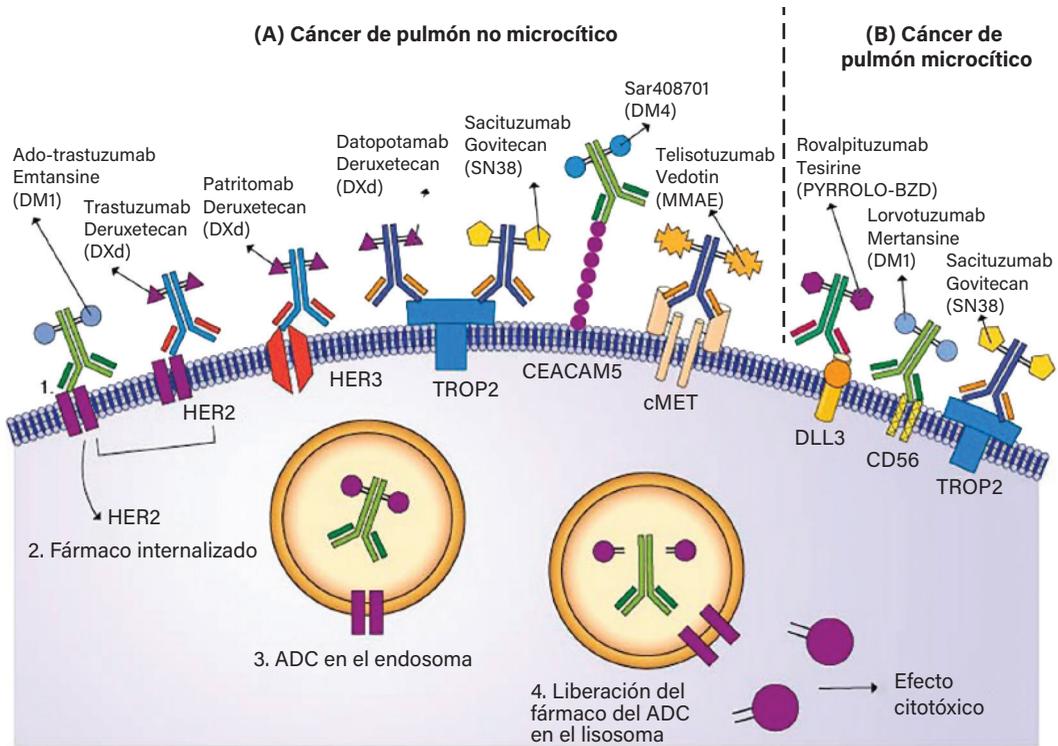
Los ADC constan de 3 componentes fundamentales: (1) un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido a un antígeno que se sobreexpresa en las células tumorales pero que muestra una



**Figura 17-1.** Estructura y características de los fármacos inmunoconjugados (Fuente: Fu *et al*<sup>3</sup>).

expresión limitada o está ausente en las células normales, (2) una carga útil del fármaco citotóxico y (3) un enlace covalente que une el agente citotóxico al anticuerpo<sup>1-4</sup> (figura 17-1). En la actualidad, las dianas de los ADC en desarrollo clínico para el cáncer de pulmón incluyen numerosas proteínas expresadas en células tumorales como HER2, HER3, MET, TROP2, CEACAM5, DLL3, mesotelina, EGFR y PTK7. Los componentes de la carga útil citotóxica de los ADC se dividen a grandes rasgos en 3 categorías basadas en el mecanismo de acción: inhibidores de los microtúbulos (por ejemplo, DM1, la carga útil del fármaco emtansina), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, DXd, la carga útil del fármaco deruxtecán) y agentes de escisión del ADN (por ejemplo, calicheamicina, ozogamicina).<sup>2,4</sup> Se está investigando activamente un número creciente de ADC para el tratamiento tanto del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) como del cáncer de pulmón microcítico (CPM)<sup>4</sup> (figura 17-2), entre los que se incluyen:

- ADC dirigidos al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2 o ERBB2): la ado-trastuzumab emtansina y el trastuzumab deruxtecán se han estudiado en tumores con sobreexpresión de la proteína HER2<sup>5-7</sup> y/o con mutación del *HER2*<sup>5,8,9</sup>, y se ha demostrado una mayor actividad en tumores con mutación del *HER2*, con o sin sobreexpresión demostrable de la proteína HER2.<sup>8,9</sup> En agosto del 2022, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) concedió la aprobación condicional del trastuzumab deruxtecán para pacientes adultos que habían recibido terapia sistémica previa para CPNM no extirpable o metastásico con mutaciones activadoras del *HER2* (*ERBB2*), detectadas mediante una prueba aprobada por la FDA.<sup>10</sup> Las pruebas diagnósticas con fines terapéuticos aprobadas por la FDA para esta indicación fueron la prueba Oncomine Dx Target (ThermoFisher Scientific) para pruebas basadas en tejidos y la Guardant360 CDx (Guardant Health) para pruebas basadas en plasma.
- ADC dirigidos al receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3 o ERBB3): Aunque la HER3 muestra una expresión aberrante en múltiples tipos de cáncer, ha despertado interés como diana de ADC principalmente en el entorno de los cánceres de pulmón con mutación del *EGFR* que han desarrollado resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa (tyrosine kinase inhibitors, TKI) del EGFR.<sup>11</sup> El patritumab deruxtecán es un ADC dirigido a la HER3 que ha demostrado actividad en tumores con mecanismos de resistencia a los TKI del EGFR tanto conocidos como desconocidos en



**Figura 17-2.** Mecanismos de varios fármacos inmunoconjugados (ADC) que se están estudiando en el cáncer de pulmón no microcítico y microcítico (Fuente: Desai *et al.*<sup>4</sup> © 2021 Elsevier B.V. Todos los derechos reservados).

todo un rango de expresión de la proteína HER3.<sup>12</sup> En diciembre del 2021, el patritumab deruxetecan recibió la designación de terapia innovadora de la FDA para el tratamiento de pacientes con CPNM metastásico o localmente avanzado con mutación del *EGFR* con progresión de la enfermedad en o después del tratamiento con un TKI de tercera generación y terapias basadas en platino.<sup>13</sup>

- ADC dirigidos al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (MET): en otra parte de este atlas se han debatido diversas alteraciones del factor oncogénico MET en el CPNM (véase el capítulo 13). La monoterapia con telisotuzumab vedotin demostró una prometedora actividad antitumoral en pacientes con tumores con sobreexpresión de MET evaluados mediante inmunohistoquímica (IHQ)<sup>14</sup> y se está investigando activamente en varios entornos, incluido el CPNM con mutación del *EGFR* que demuestra sobreexpresión de MET.<sup>15</sup> En enero del 2022, el telisotuzumab vedotin recibió la designación de terapia innovadora por parte de la FDA para el tratamiento de pacientes con CPNM no escamoso avanzado/metastásico con *EGFR* de tipo salvaje con niveles elevados de MET, cuya enfermedad progresó con o después de una terapia basada en platino.<sup>16</sup>
- ADC dirigidos al antígeno 2 de superficie celular del trofoblasto (trophoblast cell surface antigen 2, TROP2): el TROP2 es una glicoproteína transmembrana sobreexpresada en muchos tumores, incluido el cáncer de pulmón. El datopotamab deruxetecan es un ADC dirigido al TROP2 que se está investigando en el CPNM, tanto con<sup>17</sup> como sin<sup>18</sup> alteraciones genómicas susceptibles a una intervención preventiva. El sacituzumab govitecan es otro ADC dirigido al TROP2 que se está investigando en varios ensayos clínicos para CPNM<sup>4</sup> y también ha demostrado actividad en pacientes con CPM en un ensayo colectivo.<sup>19</sup>

- ADC dirigidos a la molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CEACAM5, o CD66e): La CEACAM5 es una glicoproteína que demuestra una expresión aumentada en algunos cánceres de pulmón. El SAR408701 (tusamitamab ravtansina) mostró una prometedora actividad antitumoral y se está evaluando en un ensayo de fase 3 para el CPNM no escamoso positivo para CEACAM5.<sup>20</sup>
- ADC dirigidos a la proteína delta tipo 3 (delta-like protein 3, DLL3) del ligando NOTCH: la DLL3 se expresa ampliamente en la mayoría de los CPM. La rovalpituzumab tesirina mostró actividad modesta contra los CPM que expresan DLL3 en un ensayo de fase 2 de tercera línea,<sup>21</sup> pero presentó unas tasas de supervivencia global inferiores en comparación con las del topotecán en el entorno de segunda línea.<sup>22</sup> Se están investigando la rovalpituzumab tesirina y otros ADC dirigidos contra DLL3 en diversos entornos de tratamiento del CPM.<sup>4</sup>

### **Agentes novedosos dirigidos contra las mutaciones oncogénicas**

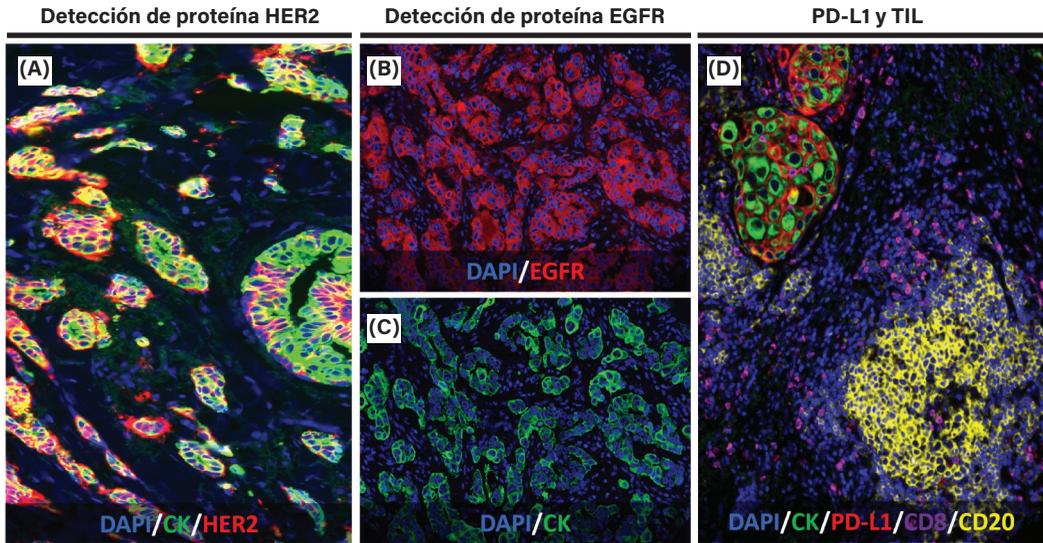
Se están realizando múltiples esfuerzos para atacar eficazmente las mutaciones oncogénicas comúnmente reconocidas en los carcinomas de pulmón, como las variantes del *KRAS* no G12C y *PIK3CA* (véase el capítulo 14). Estas estrategias terapéuticas muestran resultados variables e incluyen el ataque directo a la(s) proteína(s) mutante(s) mediante inhibidores de moléculas pequeñas o la modulación de señales de activación descendentes como MEK, AKT, mTOR, SOS1 y SHP2.<sup>23-25</sup> Se están realizando estudios adicionales para atacar genes frecuentemente mutados concomitantes en carcinomas de pulmón y asociados a alteraciones metabólicas intracelulares y a un peor pronóstico como *STK11* y *KEAP1*.<sup>23,24,26</sup> Hasta la fecha, estas terapias están en fase de investigación y no han recibido la aprobación reguladora para su uso clínico.

### **Terapias inmunoestimuladoras novedosas**

Aunque se han propuesto innumerables estrategias nuevas de inmunoterapia para tratar a pacientes con tumores sólidos, actualmente se están evaluando, en pacientes con CPNM, anticuerpos monoclonales dirigidos contra 1 o más receptores coestimuladores de células T/natural killer (NK) o enzimas inmunosupresoras, como LAG3, TIM3, TIGIT, NKG2A y CD73.<sup>27-32</sup> Actualmente, estas terapias se están probando en diferentes entornos de tratamiento y no han recibido la aprobación reguladora para su uso clínico.

### **Nuevas tecnologías de análisis molecular con potencial diagnóstico**

La creciente incorporación de modalidades y dianas terapéuticas ha sido equiparada por el rápido desarrollo de novedosas herramientas de análisis molecular para interrogar la expresión/ubicación de dichas dianas terapéuticas o identificar marcadores adicionales con potencial biomarcador. Estos avances incluyen (1) la ampliación de la capacidad de multiplexado de las pruebas para dar cabida simultáneamente a numerosos marcadores, (2) el aumento de la sensibilidad de la identificación del marcador o marcadores para mejorar el límite de detección/cuantificación, (3) la implementación de herramientas de análisis molecular de alta dimensión con preservación del contexto espacial y/o resolución unicelular, y (4) la interrogación de la morfología tumoral mediante inteligencia artificial



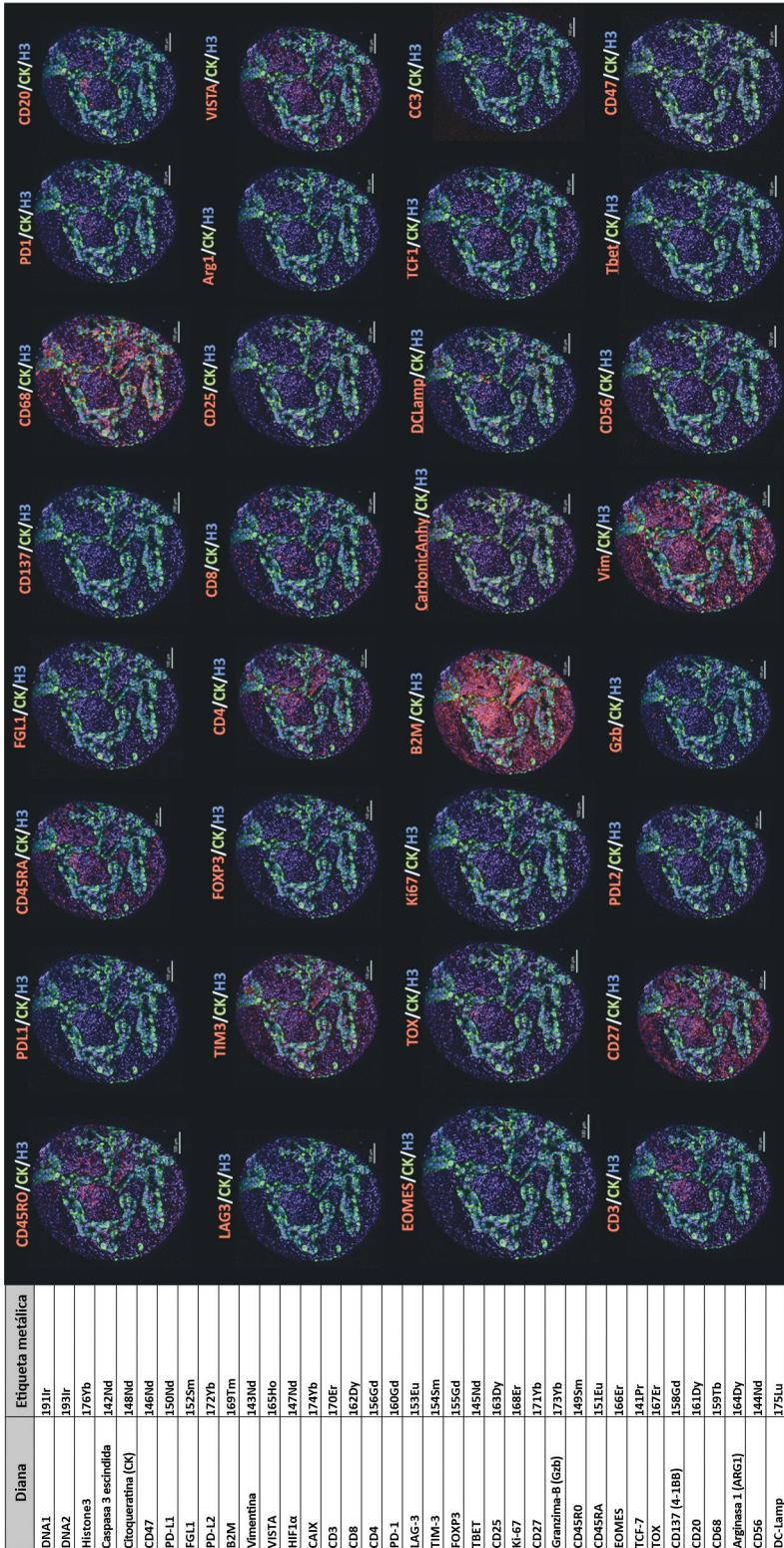
**Figura 17-3.** Análisis localizado de dianas terapéuticas y linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) en CPNM humano mediante inmunofluorescencia multiplex. **(A)** Expresión y colocalización de la proteína HER2 (rojo) en células tumorales positivas para citoqueratina (CK, verde). Los núcleos se tiñen con DAPI. **(B)** Tinción de la proteína EGFR (rojo) con patrón membranoso/perinuclear en células de adenocarcinoma de pulmón. **(C)** Mismo tumor y campo de visión que en el panel B teñido con citoqueratina (verde) y DAPI (azul). **(D)** Carcinoma de pulmón poco diferenciado con tinción simultánea para DAPI (azul), citoqueratina (verde), PD-L1 (rojo), CD8 (magenta), y TIL CD20+ (amarillo).

para predecir eventos de mutación o fusión genética. Para interpretar los resultados suelen ser necesarios marcados avances en los métodos computacionales para extraer sistemáticamente la información e integrar los datos de alta dimensión.

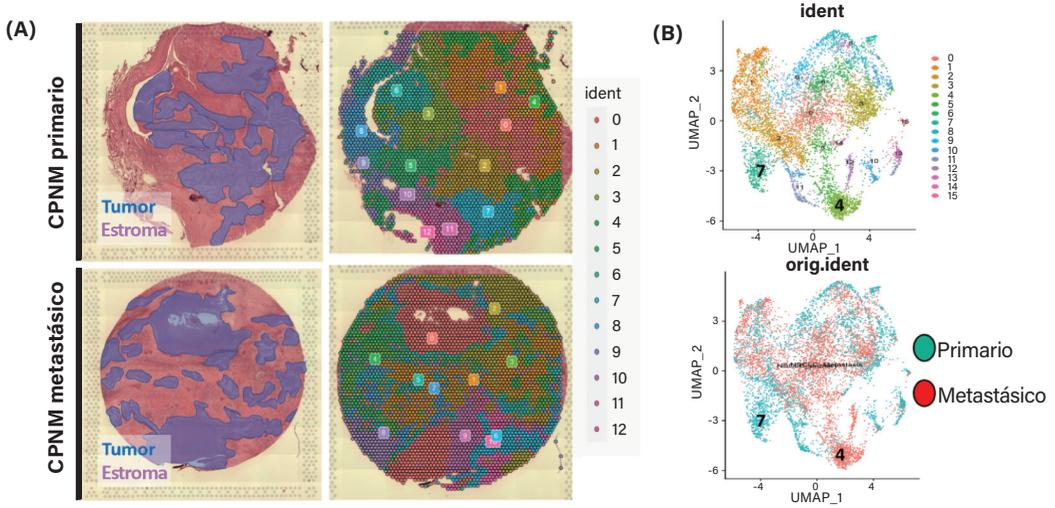
### Análisis molecular cuantitativo y espacial de muestras tumorales

Las plataformas utilizadas tradicionalmente para el análisis *in situ* de marcadores moleculares en cortes histológicos fijados con preservación del contexto morfológico incluyen la IHQ cromogénica y la hibridación *in situ* (in situ hybridization, ISH o fluorescencia ISH [FISH]) de segmentos de ADN o transcritos de ARN mensajero (ARNm). El uso extendido de la patología digital ha incrementado el empleo de herramientas informáticas, como la inteligencia artificial, para cuantificar la tinción IHQ/ISH/FISH mediante pasos de segmentación tisular, unidos a la enumeración de células individuales y la medición de la intensidad de la señal en compartimentos tisulares definidos por el usuario. Las ventajas de estos análisis incluyen su resultado cuantitativo, su naturaleza objetiva y su mayor capacidad de reproducirse en relación con el puntaje semicuantitativo de la señal basado en el patólogo. Se ha examinado la automatización de la evaluación de señales a partir de portaobjetos teñidos con IHQ para dianas terapéuticas como HER2 y PD-L1.<sup>33-37</sup> Las principales limitaciones de estas plataformas incluyen los desafíos que plantea la implementación, la consecución de una segmentación tisular/celular coherente y rápida, y la presencia de incertidumbres sobre la información óptima de los puntajes continuos y el marco normativo.

La inmunofluorescencia multiplex (multiplex immunofluorescence, mIF) se ha utilizado cada vez más en la investigación traslacional y para la identificación de biomarcadores. Este método es conceptualmente similar a la IHQ y utiliza anticuerpos conjugados con fluoróforos para detectar proteínas o ácidos nucleicos en portaobjetos con tejidos. Sin embargo,



**Figura 17-4.** Detección simultánea y localización de múltiples marcadores proteicos mediante citometría de masas por imágenes. Los cortes de adenocarcinoma de pulmón se tiñeron simultáneamente con un panel que contenía 37 anticuerpos conjugados con isótopos metálicos para detectar marcadores tumorales y de células inmunitarias como se indica en la tabla del recuadro (izquierda). La tinción representativa de los marcadores se muestra en las microfotografías (derecha).



**Figura 17-5.** Análisis transcriptómico espacial pareado del CPNM primario y metastásico. **(A)** Se estudiaron cortes fijados de carcinoma pulmonar mediante tinción con hematoxilina y eosina (*izquierda*) para el contexto morfológico y mediante análisis transcriptómico completo con la plataforma Visium (*derecha*). **(B)** El análisis no supervisado identificó racimos transcriptómicos espaciales multidimensionales individuales, algunos de los cuales estaban representados de forma diferencial en la lesión primaria (*verde*) y metastásica (*rojo*). En cada racimo espacial se identificaron transcritos de ARNm y vías específicas que indicaban su identidad de tipo celular y su significación biológica.

y a diferencia de la IHQ, la mIF es un método de generación de señal emisiva que aumenta su sensibilidad y rango dinámico.<sup>38,39</sup> Además, la señal de la mIF se evalúa generalmente utilizando microscopios multispectrales que contienen filtros de fluorescencia específicos, lo que permite la separación objetiva de los canales de señal y la medición independiente de múltiples marcadores incluidos en la misma prueba/panel.

Múltiples estudios han analizado la expresión de dianas terapéuticas como HER2, PD-L1 y EGFR dentro de poblaciones celulares específicas o compartimentos de tejido tumoral definidos por la tinción conjunta simultánea de marcadores adicionales<sup>40-42</sup> (figura 17-3). También es posible la identificación de poblaciones celulares específicas con potencial biomarcador, como los linfocitos infiltrantes tumorales (tumor infiltrating lymphocytes, TIL).<sup>43,44</sup> Los desafíos actuales para el uso clínico sistemático de la mIF incluyen la identificación de pruebas con un claro valor biomarcador más allá de las pruebas IHQ clínicas de un solo complejo, la implementación de protocolos de tinción automatizados y sólidos en los laboratorios clínicos, la estandarización en el puntaje de la señal y la elaboración de informes; así como la disponibilidad de un marco normativo que apoye el uso clínico.

Otros avances en la obtención de imágenes moleculares espaciales de muestras tisulares incluyen el uso de métodos de alto complejo para medir simultáneamente numerosas proteínas y/o transcritos de ARNm mediante el etiquetado metálico de anticuerpos o sondas de ARN seguido de la ablación tisular de alta energía<sup>45-47</sup> (figura 17-4), protocolos de tinción cíclica con o sin microfluidos,<sup>48-50</sup> y el uso de enfoques de códigos de barras moleculares para aumentar la capacidad de multiplexado de las pruebas y minimizar las interferencias moleculares durante la tinción.<sup>51-57</sup> Estas plataformas permiten la detección simultánea de numerosos marcadores que van desde decenas a cientos de proteínas y hasta varios miles de transcritos de ARNm (figura 17-5). Aunque la mayoría de estas plataformas se utilizan actualmente en el entorno de la investigación, se espera que se incorporen progresivamente a entornos de tipo clínico.

La capacidad de estas plataformas para detectar simultáneamente proteínas y ácidos nucleicos con resolución espacial abre nuevas posibilidades para mapear dianas terapéuticas y alteraciones moleculares susceptibles a una intervención preventiva en células tumorales, así como la medición de poblaciones celulares adicionales y características del microentorno tumoral. Los desafíos para la implementación de estas plataformas de alta dimensión incluyen su elevado costo, su rendimiento limitado, su difícil validación/estandarización y el complejo análisis de los datos, que suele requerir personal y recursos especializados.

## Conclusión

Constantemente surgen nuevas dianas terapéuticas y enfoques novedosos para abordarlas. Aunque la tecnología existente, como la secuenciación de nueva generación y la IHQ, puede ser suficiente para algunos, sigue siendo posible que los enfoques multiplex emergentes proporcionen nuevos datos que puedan informar mejor la selección de algunos fármacos. Aunque una tecnología cada vez más compleja, unida a herramientas sofisticadas de análisis de datos, puede proporcionar biomarcadores hasta ahora imposibles de definir, siempre hay que tener en cuenta las implicaciones prácticas de una prestación de servicios clínicos oportuna y rentable.

## Referencias

- Pettinato MC. Introduction to antibody-drug conjugates. *Antibodies (Basel)*. 2021;10(4):42.
- Tong JTW, Harris PWR, Brimble MA, Kavianinia I. An insight into FDA approved antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Molecules*. 2021;26:5847.
- Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7:93.
- Desai A, Abdayem P, Adjei AA, Planchard D. Antibody-drug conjugates: a promising novel therapeutic approach in lung cancer. *Lung Cancer*. 2022;163:96-106.
- Hotta K, Aoe K, Kozuki T, et al. A phase II study of trastuzumab emtansine in HER2-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13: 273-279.
- Peters S, Stahel R, Bubendorf L, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with previously treated HER2-overexpressing metastatic non-small cell lung cancer: efficacy, safety, and biomarkers. *Clin Cancer Res*. 2019;25:64-72.
- Nakagawa K, Nagasaka M, Felip E, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-overexpressing metastatic non-small cell lung cancer: interim results of DESTINY-Lung01. *J Thorac Oncol*. 2021;16(3S):S109-110.
- Li BT, Shen R, Buonocore D, et al. Ado-trastuzumab emtansine for patients with HER2-mutant lung cancers: results from a phase II basket trial. *J Clin Oncol*. 2018;36:2532-2537.
- Li BT, Smit EF, Goto Y, et al; DESTINY-Lung01 Trial Investigators. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2022;386:241-251.
- FDA grants accelerated approval to fam-trastuzumab deruxtecan-nxki for HER2-mutant non-small cell lung cancer. US Food and Drug Administration; August 16, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki-her2-mutant-non-small-cell-lung>.
- Mishra R, Patel H, Alanazi S, Yuan L, Garrett JT. HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncol Rev*. 2018;12:355.
- Jänne PA, Baik C, Su WC, et al. Efficacy and safety of patritumab deruxtecan (HER3-DXd) in EGFR inhibitor-resistant, EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2022;12:74-89.
- Tucker N. Patritumab deruxtecan granted FDA breakthrough therapy designation for metastatic or locally advanced EGFR+ NSCLC. Targeted Oncology; December 28, 2021. <https://www.targetedonc.com/view/patritumab-deruxtecan-granted-fda-breakthrough-therapy-designation-for-metastatic-or-locally-advanced-egfr-nsclc>.

14. Strickler JH, Weekes CD, Nemunaitis J, et al. First-in-human phase I, dose-escalation and -expansion study of telisotuzumab vedotin, an antibody-drug conjugate targeting c-Met, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2018;36:3298-3306.
15. Camidge DR, Barlesi F, Goldman JW, et al. Phase Ib study of telisotuzumab vedotin in combination with erlotinib in patients with c-Met protein-expressing non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2022;JCO2200739. doi:10.1200/JCO.22.00739.
16. Tucker N. FDA grants breakthrough therapy designation to telisotuzumab vedotin for advanced EGFR wild type nsqNSCLC. Targeted Oncology; January 5, 2022. <https://www.targetedonc.com/view/fda-grants-breakthrough-therapy-designation-to-telisotuzumab-vedotin-for-advanced-egfr-wild-type-nsqnsclc>.
17. Study of DS-1062a in advanced or metastatic non-small cell lung cancer with actionable genomic alterations (TROPION-Lung05). ClinicalTrials.gov identifier: NCT04484142. Updated December 1, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04484142>.
18. Study of DS-1062a versus docetaxel in previously treated advanced or metastatic non-small cell lung cancer with or without actionable genomic alterations (TROPION-LUNG01). ClinicalTrials.gov identifier NCT04656652. Updated November 14, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04656652>.
19. Bardia A, Messersmith WA, Kio EA, et al. Sacituzumab govitecan, a Trop-2-directed antibody-drug conjugate, for patients with epithelial cancer: final safety and efficacy results from the phase I/II IMMU-132-01 basket trial. *Ann Oncol.* 2021;32:746-756.
20. SAR408701 versus docetaxel in previously treated, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (CEACAM5) positive metastatic non-squamous non-small cell lung cancer patients (CARMEN-LC03). ClinicalTrials.gov identifier: NCT04154956. Updated December 13, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04154956>.
21. Morgensztern D, Besse B, Greillier L, et al. Efficacy and safety of rovalpituzumab tesirine in third-line and beyond patients with DLL3-expressing, relapsed/refractory small-cell lung cancer: results from the phase II TRINITY study. *Clin Cancer Res.* 2019;25:6958-6966.
22. Blackhall F, Jao K, Greillier L, et al. Efficacy and safety of rovalpituzumab tesirine compared with topotecan as second-line therapy in DLL3-high SCLC: results from the phase 3 TAHOE study. *J Thorac Oncol.* 2021;16:1547-1558.
23. Jacobs F, Cani M, Malapelle U, et al. Targeting KRAS in NSCLC: old failures and new options for “non-G12c” patients. *Cancers (Basel).* 2021;13:6332.
24. Cucurull M, Notario L, Sanchez-Cespedes M, et al. Targeting KRAS in lung cancer beyond KRAS G12C inhibitors: the immune regulatory role of KRAS and novel therapeutic strategies. *Front Oncol.* 2022;11:793121.
25. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer.* 2020;11(3):511-518.
26. Reck M, Carbone DP, Garassino M, Barlesi F. Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Ann Oncol.* 2021;32:1101-1110.
27. Mamdani H, Matosevic S, Khalid AB, Durm G, Jalal SI. Immunotherapy in lung cancer: current landscape and future directions. *Front Immunol.* 2022;13:823618.
28. Huo JL, Wang YT, Fu WJ, Lu N, Liu ZS. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. *Front Immunol.* 2022;13:956090.
29. Acharya N, Sabatos-Peyton C, Anderson AC. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e000911.
30. Chauvin JM, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e000957.
31. van Hall T, André P, Horowitz A, et al. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer.* 2019;7:263.
32. Herbst RS, Majem M, Barlesi F, et al. COAST: an open-label, phase II, multidrug platform study of durvalumab alone or in combination with oleclumab or monalizumab in patients with unresectable, stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2022;40:3383-3393.
33. Lara H, Li Z, Abels E, et al. Quantitative image analysis for tissue biomarker use: a white paper from the Digital Pathology Association. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021;29:479-493.
34. Han Z, Lan J, Wang T, et al. A deep learning quantification algorithm for HER2 scoring of gastric cancer. *Front Neurosci.* 2022;16:877229.

35. Bankhead P, Fernández JA, McArt DG, et al. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Lab Invest.* 2018;98:15-26.
36. Cheng G, Zhang F, Xing Y, et al. Artificial intelligence-assisted score analysis for predicting the expression of the immunotherapy biomarker PD-L1 in lung cancer. *Front Immunol.* 2022;13:893198.
37. Widmaier M, Wiestler T, Walker J, et al. Comparison of continuous measures across diagnostic PD-L1 assays in non-small cell lung cancer using automated image analysis. *Mod Pathol.* 2020;33:380-390.
38. Rimm DL. What brown cannot do for you. *Nat Biotechnol.* 2006;24:914-916.
39. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Neumeister VM, Rimm DL. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab Invest.* 2015;95:385-396.
40. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* 2014;94:107-116.
41. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, et al. Quantitative assessment of the heterogeneity of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2:46-54.
42. Dimou A, Agarwal S, Anagnostou V, et al. Standardization of epidermal growth factor receptor (EGFR) measurement by quantitative immunofluorescence and impact on antibody-based mutation detection in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol.* 2011;179:580-589.
43. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107:dju435.
44. Lopez de Rodas M, Nagineni V, Ravi A, Datar IJ, et al. Role of tumor infiltrating lymphocytes and spatial immune heterogeneity in sensitivity to PD-1 axis blockers in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer.* 2022;10:e004440.
45. Giesen C, Wang HA, Schapiro D, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods.* 2014;11:417-422.
46. Angelo M, Bendall SC, Finck R, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med.* 2014;20:436-442.
47. Schulz D, Zanotelli VRT, Fischer JR, et al. Simultaneous multiplexed imaging of mRNA and proteins with subcellular resolution in breast cancer tissue samples by mass cytometry. *Cell Syst.* 2018;6:531.
48. Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A, et al. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:11982-11987.
49. Lin JR, Izar B, Wang S, et al. Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *Elife.* 2018;7:e31657.
50. Migliozi D, Pelz B, Dupouy DG, et al. Microfluidics-assisted multiplexed biomarker detection for in situ mapping of immune cells in tumor sections. *Microsyst Nanoeng.* 2019;5:59.
51. Vasaturo A, Galon J. Multiplexed immunohistochemistry for immune cell phenotyping, quantification and spatial distribution in situ. *Methods Enzymol.* 2020;635:51-66.
52. Van TM, Blank CU. A user's perspective on GeoMx™ digital spatial profiling. *Immuno-oncol Technol.* 2019;1:11-18.
53. Gupta S, Zugazagoitia J, Martinez-Morilla S, Fuhrman K, Rimm DL. Digital quantitative assessment of PD-L1 using digital spatial profiling. *Lab Invest.* 2020;100:1311-1317.
54. Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science.* 2016;353:78-82.
55. Rodrigues SG, Stickels RR, Goeva A, et al. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science.* 2019;363:1463-1467.
56. Liu Y, Yang M, Deng Y, et al. High-spatial-resolution multi-omics sequencing via deterministic barcoding in tissue. *Cell.* 2020;183:1665-1681.e18.
57. Taube JM, Akturk G, Angelo M, et al; Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Pathology Task Force. The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e000155.

# Resultados de las pruebas moleculares y papel de las juntas multidisciplinarias de tumores moleculares 18

Por Paul Hofman, Chien-Feng Li, Andrew G. Nicholson y Shani Shilo

Las pruebas moleculares en oncología torácica son cada vez más complejas y requieren un enfoque bien estructurado para traducirse en recomendaciones diagnósticas o terapéuticas adecuadas.

## Informe de los resultados de las pruebas moleculares

Los informes moleculares deben enumerar los nombres de los genes y los loci, exones o *hotspots* específicos analizados; las secuencias intrónicas analizadas para los genes que se producen en la translocación que genera genes de fusión; y, si procede, el espacio genómico cubierto para evaluar la carga mutacional tumoral y el tipo de microsatélites analizados para evaluar su inestabilidad.<sup>1</sup> Siempre se debe proporcionar la interpretación de los resultados. Tres escalas para clasificar las alteraciones moleculares con base en su posible utilidad clínica clasifican las dianas moleculares en un nivel de susceptibilidad clínica a una intervención preventiva:

1. Recomendación consensuada conjunta de la Association for Molecular Pathology (AMP), el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), la American Society of Clinical Oncology y el College of American Pathologists para la notificación de variantes genéticas en el cáncer
2. Escala de la Sociedad Europea de Oncología Médica para la susceptibilidad clínica a una intervención preventiva de las dianas moleculares
3. OncoKB que distingue 4 niveles de susceptibilidad a una intervención preventiva y 3 niveles de resistencia<sup>1-3</sup>

Este escalado facilitaría una eventual convergencia hacia estándares comunes para anotar las decisiones sobre el tratamiento.<sup>4</sup> Todos los hallazgos moleculares se deben clasificar según las pruebas más actualizadas para distinguir las alteraciones benignas o neutras de las patógenas, incluso confirmadas o probables. Para ello, existen diferentes bases de datos en línea,

entre las que se incluyen ClinVar, My Cancer Genome, Cosmic u OncoKB.<sup>2,5-7</sup> En particular, OncoKB es el primer archivo de mutaciones somáticas aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.<sup>8</sup> Cabe destacar que se pueden identificar ciertas alteraciones genómicas de significación médica potencial que no están relacionadas con el propósito principal de las pruebas (hallazgos secundarios), en especial con pruebas de paneles más grandes. El ACMG ha recomendado una lista de hallazgos genéticos secundarios (secondary genetic findings, SF) que se deben informar en la secuenciación genómica clínica con base en el fenotipo, la capacidad de penetración y la susceptibilidad a una intervención preventiva.<sup>9-12</sup> Basándose en la lista actualizada de SF v3.1 del ACMG, se deben informar determinados genes relacionados con fenotipos de cáncer, fenotipos cardiovasculares, fenotipos de errores innatos del metabolismo y fenotipos diversos (por ejemplo, amiloidosis hereditaria de TTR).<sup>12</sup> En consecuencia, los sujetos con hallazgos secundarios confirmados deben remitirse para una evaluación y manejo adicionales por el aumento del riesgo de enfermedad.<sup>13</sup>

### **Juntas multidisciplinarias de tumores moleculares e interpretación de los resultados de los biomarcadores tumorales**

Las juntas multidisciplinarias de tumores, también conocidas como *equipos multidisciplinarios* (multidisciplinary teams, MDT), se reúnen para evaluar a los pacientes con un enfoque organizativo basado en pruebas para implementar una práctica más eficaz en oncología. En estas juntas de tumores participan distintos especialistas. Normalmente, en los MDT de oncología torácica participan oncólogos clínicos, patólogos, cirujanos torácicos, radiólogos, oncólogos radioterapeutas, neumólogos y personal de enfermería, entre otros. Los mismos miembros también deberían participar en las juntas de tumores moleculares (molecular tumor boards, MTB), pero junto a otros especialistas como patólogos genéticos, científicos moleculares, biólogos en ciencias de la información y farmacéutas en oncología. Por último, dado que se puede acceder a los fármacos a través de ensayos clínicos, en la MTB puede participar un coordinador de investigación/ensayos clínicos. Por lo tanto, estas juntas son herramientas poderosas para fomentar el debate, la discusión y la comunicación en general entre distintos profesionales, lo que supone un importante facilitador hacia el desarrollo de la oncología torácica de precisión.

Las reuniones de las MTB suelen decidir los tratamientos estándar de atención (standard-of care, SOC) para los pacientes con cáncer de pulmón precoz o avanzado,<sup>14</sup> por lo que las MTB se consideran herramientas valiosas para promover la calidad de la atención en oncología torácica reduciendo la vulnerabilidad de una sola persona y promoviendo equipos y sistemas sólidos. Además, los miembros de la MTB identifican y debaten todas las posibles estrategias terapéuticas basadas en análisis genéticos para los pacientes.<sup>15-18</sup> Por lo tanto, se puede consultar a las MTB si es necesario incluir a pacientes con cáncer de pulmón avanzado en ensayos clínicos.<sup>16,19</sup> Las MTB proporcionan recomendaciones que siempre se basan en un debate multidisciplinario, incluyendo las alteraciones moleculares específicas del cáncer de pulmón, así como todas las características relativas al paciente (por ejemplo, estado funcional y comorbilidades).

Los miembros de las MTB debaten los resultados de la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) junto con cualquier otra prueba molecular relevante, que puede incluir pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), hibridación genómica comparativa en matriz o incluso secuenciación del exoma completo. Las MTB suelen ocuparse de pacientes

con casos difíciles, y las recomendaciones deben estar claramente documentadas y pueden incluir parámetros como:

- Mutaciones conductoras/número de copias/variaciones estructurales, incluidos los genes de fusión.
- Alteraciones moleculares susceptibles de tratamiento con fármacos.
- Inestabilidad de microsatélites.
- Carga mutacional tumoral.
- Alteraciones que indiquen resistencia a los fármacos.
- Expresión de proteínas en el corte tisular, especialmente PD-L1.
- Conclusiones y recomendaciones de la MTB.
- Posibles ensayos clínicos.

El tratamiento debe debatirse en función de la patogenicidad de la variante o variantes detectadas. La patogenicidad de una variante viene determinada por su capacidad de causar enfermedad.<sup>20</sup> En el caso del cáncer de pulmón, una variante es patogénica cuando se sabe que contribuye a la transformación maligna. En este contexto, la patogenicidad se clasifica utilizando una versión adaptada de las guías del ACMG/AMP del 2015, que proponían un esquema de 5 niveles (patogénica, probablemente patogénica, variante de significación clínica desconocida o incierta [variant of unknown or uncertain clinical significance, VUS], probablemente benigna, benigna).<sup>21</sup> Sin embargo, hasta ahora no ha habido un verdadero consenso (inter)nacional sobre cómo se debe hacer la interpretación de la patogenicidad. Además, es importante buscar e informar de las distintas variantes patogénicas de línea germinal, ya que algunas de ellas se pueden asociar a relevancia terapéutica.<sup>22</sup>

Algunas plataformas pueden utilizar la innovadora tecnología de MTB virtual basada en la nube, que incluye una base de conocimientos y un entorno de colaboración para la atención del cáncer basada en la oncología de precisión.<sup>23</sup> La MTB también se podría utilizar como herramienta educativa clave en hospitales universitarios o de enseñanza, donde la presentación de casos difíciles da inicio a la consulta.<sup>24</sup>

### **Juntas multidisciplinarias de tumores moleculares y calidad de la atención y resultados de los pacientes con cáncer de pulmón**

Las MTB son críticas, tanto en el diagnóstico como en la progresión tumoral, para algunos pacientes, como los que presentan alteraciones moleculares muy poco frecuentes o complejas, los pacientes con tumores portadores de alteraciones sin aprobación de fármacos dirigidos en la práctica clínica, los pacientes con neoplasias adictas a oncogenes que no responden a los fármacos moleculares disponibles o los pacientes con neoplasias torácicas poco frecuentes sin enfoques terapéuticos reconocidos. Por lo tanto, es importante gestionar el tiempo de respuesta tanto de las pruebas como de las MTB a la hora de generar resultados. Es obligatorio contar con un tiempo de respuesta adecuado para garantizar el inicio de la terapia dirigida en un plazo beneficioso. Según las guías internacionales, las pruebas de biomarcadores obligatorias para un tratamiento inicial óptimo del cáncer de pulmón no microcítico no escamoso avanzado se deben completar en un plazo de 10 días laborables.<sup>25</sup>

En el momento de la progresión del tumor, puede ser apropiado seguir debatiendo con el paciente en la MTB. También puede ser pertinente realizar pruebas moleculares adicionales,

posiblemente con paneles de genes más amplios; y así, se requiere un equilibrio entre la urgencia del tratamiento y el retraso necesario para recopilar datos y tomar una decisión informada sobre los siguientes pasos del tratamiento.

Además, un acceso adecuado a la MTB, que facilite las mejores prácticas en oncología torácica, también debería proporcionar beneficios a la comunidad oncológica en general, y no solo a los pacientes hospitalizados en centros académicos. Por lo tanto, la creación de una MTB global virtual puede ser beneficiosa en oncología torácica.<sup>26</sup> Los pacientes que reciben terapia basada en la MTB se ajustan mejor a la diferente alteración genómica que aquellos que solo tienen la elección de un único médico.<sup>15,27</sup> En consecuencia, aquellos pacientes manejados mediante una MTB (en comparación con la elección de un único médico) tienen unas tasas de supervivencia global y libres de progresión significativamente mayores.<sup>15,27</sup>

### **Desafíos de las juntas multidisciplinarias de tumores en oncología torácica**

A pesar de la organización recomendada de la atención al paciente con cáncer de pulmón basada en el debate de la MTB, siguen existiendo algunos desafíos. No todos los servicios de cáncer de pulmón funcionan mediante una MTB. Esto se puede deber a la falta de recursos adecuados o incluso, en algunas situaciones, a la falta de voluntad para abrir debates sobre el manejo. Lo más pertinente para este debate es saber si es posible hacer funcionar una MTB, y cómo podría interactuar cualquier MTB en funcionamiento con el MDT torácico. Algunos servicios consiguen integrar los debates sobre datos moleculares en el MDT principal, otros organizan reuniones separadas. En este último escenario, la MTB puede ser un debate especializado en tumores torácicos o una MTB general que considere una serie de casos de tumores, incluido el cáncer de pulmón.

La cuestión del tiempo de respuesta clínicamente importante tanto para las pruebas moleculares como para la evaluación de casos del MDT/MTB sigue siendo pertinente. Muchos pacientes corren el riesgo de sufrir un rápido deterioro clínico debido a la progresión de su cáncer de pulmón subyacente, por lo que incluso pequeños retrasos pueden ser muy perjudiciales. Sin embargo, el número cada vez mayor de opciones de tratamiento determinadas por biomarcadores y la incompatibilidad de algunas de ellas entre sí por el aumento de la toxicidad, hacen que sea difícil esperar a que se disponga de toda la información necesaria. La situación en los casos con recidiva de la enfermedad puede ser aún más difícil, con retrasos en la obtención de biopsias repetidas, la repetición de los análisis de NGS y la consideración de ensayos clínicos (que suelen requerir la repetición obligatoria de la biopsia). En cuanto a los ensayos clínicos, los complejos criterios de inclusión, los largos procedimientos de cribado y los análisis de laboratorio central obligatorios también pueden añadir retrasos, sobre todo porque muchos ensayos clínicos, en particular los patrocinados por la industria, exigen pruebas de laboratorio centralizadas para la confirmación de biomarcadores en lugar de aceptar análisis realizados en laboratorios locales acreditados.

A pesar de que existen datos moleculares de un paciente que podrían apoyar el uso de fármacos ampliamente aprobados o el acceso a un ensayo clínico o a un tratamiento fuera de indicación, algunos sistemas de salud ofrecen un acceso relativamente restringido a tratamientos que pueden estar disponibles en otros lugares; nunca hay un acceso universal a ensayos que puedan aprovechar cualquier perfil molecular adecuado. El acceso a un fármaco puede ser un impedimento mayor para la prestación de servicios terapéuticos basada en biomarcadores que el

acceso a las pruebas o a un debate adecuado. Las MTB pueden desarrollar y utilizar herramientas digitales para ayudar a integrar los perfiles clínicos y genómicos y buscar ensayos clínicos disponibles, y estos desarrollos podrían, en el futuro, utilizar la inteligencia artificial para mejorar la toma de decisiones. Cuando los recursos lo permitan, las MTB deberían incluir personal que facilite el acceso a los fármacos, como se llevó a cabo con éxito en el ensayo I-PREDICT.<sup>28</sup>

En la actualidad, no existen guías internacionales para informar sobre las pruebas moleculares y los informes de las operaciones de la MTB, lo que da lugar a una considerable heterogeneidad de un país a otro y de una institución a otra.<sup>29</sup> Por lo tanto, se requiere un esfuerzo considerable para estandarizar mejor la presentación e interpretación de las alteraciones moleculares en términos de susceptibilidad a una intervención preventiva, indicaciones terapéuticas y, posteriormente, el valioso registro de los datos de resultados.

Por último, dado que las recomendaciones de la MTB pueden trascender los tratamientos basados en guías, es muy importante revisar, evaluar y auditar las operaciones y recomendaciones de la MTB y su implementación. Desarrollar un registro de revisiones de casos y resultados puede ayudar a este esfuerzo, debería reforzar el valor educativo de las MTB y ayudar en la evaluación de patrones de respuesta en cohortes de pacientes con cáncer de pulmón con variantes poco frecuentes susceptibles a una intervención preventiva. En definitiva, las recomendaciones de la MTB pueden beneficiar tanto al paciente individual como, a través de la investigación, a las futuras generaciones de pacientes con cáncer de pulmón.

## Referencias

- Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(1):4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
- Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: a precision oncology knowledge base. *JCO Precis Oncol.* 2017;2017:PO.17.00011. doi:10.1200/PO.17.00011.
- Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31(11):1491-1505. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014.
- Li X, Warner JL. A review of precision oncology knowledgebases for determining the clinical actionability of genetic variants. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:48. doi:10.3389/fcell.2020.00048.
- Holt ME, Mittendorf KF, LeNoue-Newton M, et al. My cancer genome: coevolution of precision oncology and a molecular oncology knowledge base. *JCO Clin Cancer Inform.* 2021;5:995-1004. doi:10.1200/CCI.21.00084.
- Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D835-D844. doi:10.1093/nar/gkz972.
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-D947. doi:10.1093/nar/gky1015.
- FDA recognizes Memorial Sloan-Kettering database of molecular tumor marker information. US Food and Drug Administration. November 10, 2021. [www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-recognizes-memorial-sloan-kettering-database-molecular-tumor-marker-information](http://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-recognizes-memorial-sloan-kettering-database-molecular-tumor-marker-information).
- Green RC, Berg JS, Grody WW, et al; American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med.* 2013;15(7):565-574. doi:10.1038/gim.2013.73.
- Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2017;19(2):249-255. doi:10.1038/gim.2016.

11. Miller DT, Lee K, Gordon AS, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2021 update: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2021;23(8):1391-1398. doi:10.1038/s41436-021-01171-4.
12. Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2022;24(7):1407-1414. doi:10.1016/j.gim.2022.04.006.
13. Katz AE, Nussbaum RL, Solomon BD, et al. Management of secondary genomic findings. *Am J Hum Genet.* 2020;107(1):3-14. doi:10.1016/j.ajhg.2020.05.002.
14. Tan AC, Tan DSW. Targeted therapies for lung cancer patients with oncogenic driver molecular alterations. *J Clin Oncol.* 2022;40(6):611-625. doi:10.1200/JCO.21.01626.
15. Larson KL, Huang B, Weiss HL, et al. Clinical outcomes of molecular tumor boards: a systematic review. *JCO Precis Oncol.* 2021;5:PO.20.00495. doi:10.1200/PO.20.00495.
16. Rolfo C, Manca P, Salgado R, et al. Multidisciplinary molecular tumour board: a tool to improve clinical practice and selection accrual for clinical trials in patients with cancer. *ESMO Open.* 2018;3(5):e000398. doi:10.1136/esmoopen-2018-000398.
17. Trédan O, Wang Q, Pissaloux D, et al; ProfILER investigators. Molecular screening program to select molecular-based recommended therapies for metastatic cancer patients: analysis from the ProfILER trial. *Ann Oncol.* 2019;30(5):757-765. doi:10.1093/annonc/mdz080.
18. Tuxen IV, Rohrberg KS, Oestrup O, et al. Copenhagen Prospective Personalized Oncology (CoPPO)—clinical utility of using molecular profiling to select patients to phase I trials. *Clin Cancer Res.* 2019 Feb 15;25(4):1239-1247. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1780.
19. Basse C, Morel C, Alt M, et al. Relevance of a molecular tumour board (MTB) for patients' enrollment in clinical trials: experience of the Institut Curie. *ESMO Open.* 2018;3(3):e000339. doi:10.1136/esmoopen-2018-000339.
20. Andrivon D. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology.* 1993;83:889-839.
21. Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30.
22. Cobain EF, Wu YM, Vats P, et al. Assessment of clinical benefit of integrative genomic profiling in advanced solid tumors. *JAMA Oncol.* 2021;7(4):525-533. doi:10.1001/jamaoncol.2020.7987.
23. Pishvaian MJ, Blais EM, Bender RJ, et al. A virtual molecular tumor board to improve efficiency and scalability of delivering precision oncology to physicians and their patients. *JAMIA Open.* 2019;2(4):505-515. doi:10.1093/jamiaopen/ooz045.
24. Harada S, Arend R, Dai Q, et al. Implementation and utilization of the molecular tumor board to guide precision medicine. *Oncotarget.* 2017;8(34):57845-57854. doi:10.18632/oncotarget.18471.
25. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(3):321-346. doi:10.5858/arpa.2017-0388-CP.
26. Jain NM, Schmalz L, Cann C, et al. Framework for implementing and tracking a molecular tumor board at a National Cancer Institute-designated comprehensive cancer center. *Oncologist.* 2021;26(11):e1962-e1970. doi:10.1002/onco.13936.
27. Kato S, Kim KH, Lim HJ, et al. Real-world data from a molecular tumor board demonstrates improved outcomes with a precision N-of-One strategy. *Nat Commun.* 2020;11(1):4965. doi:10.1038/s41467-020-18613-3.
28. Sicklick JK, Kato S, Okamura R, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study. *Nat Med.* 2019;25(5):744-750. doi:10.1038/s41591-019-0407-5.
29. Koopman B, Groen HJM, Ligtenberg MJL, et al. Multicenter comparison of molecular tumor boards in The Netherlands: definition, composition, methods, and targeted therapy recommendations. *Oncologist.* 2021;26(8):e1347-e1358. doi:10.1002/onco.13580.

# Algoritmos para las pruebas de biomarcadores moleculares

# 19

Por Ming-Sound Tsao, Fernando Lopez-Rios, Erik Thunnissen, Jhanelle E. Gray, Yasushi Yatabe, Teh-Ying Chou, Justin F. Gainor e Ivy Elkins

Con un número cada vez mayor de nuevas terapias guiadas por biomarcadores que reciben la aprobación para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón, los algoritmos de pruebas moleculares en cáncer de pulmón siguen evolucionando. Este capítulo se centra principalmente en los algoritmos de pruebas que implican biopsias de tejido tumoral o muestras de resección, ya que los algoritmos que implican biopsia líquida se tratan en el capítulo 4.

Las pruebas basadas en inmunohistoquímica para biomarcadores proteicos predictivos también se incluyen en este capítulo como parte de las pruebas moleculares. Existen muchos algoritmos potenciales que podrían lograr el fin requerido. Este capítulo presenta algunas posibilidades, pero también los principios sobre los que se pueden desarrollar otras versiones que se adapten a las necesidades locales. Se remite a los lectores a los capítulos pertinentes para obtener detalles sobre los problemas de las pruebas relacionadas con genes específicos.

## **Algoritmos de pruebas moleculares en el diagnóstico del cáncer de pulmón**

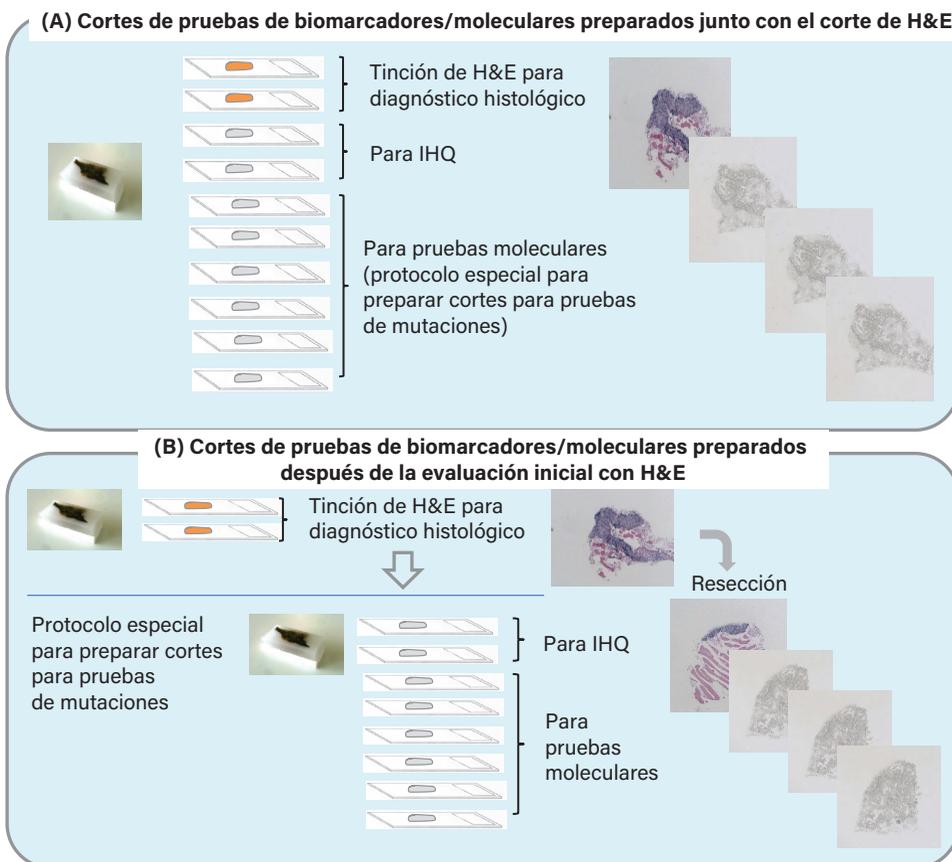
Las pruebas de biomarcadores predictivos para guiar las terapias solo se deben realizar una vez establecido el diagnóstico de cáncer; no se deben utilizar para establecer el diagnóstico. En el cáncer de pulmón, la mayoría de las pruebas moleculares se realizan en muestras de biopsia porque entre el 60 % y el 70 % de los pacientes se diagnostican clínicamente en un estadio avanzado (IIIB-IV). En todo este proceso, tanto si se realizan pruebas limitadas como extensas, hay 3 principios fundamentales en juego:

1. Rapidez: el tiempo de respuesta es primordial, ya que los pacientes con cáncer de pulmón avanzado se pueden deteriorar rápidamente.
2. Precisión: importante tanto en términos de diagnóstico del cáncer como de un correcto perfil molecular.

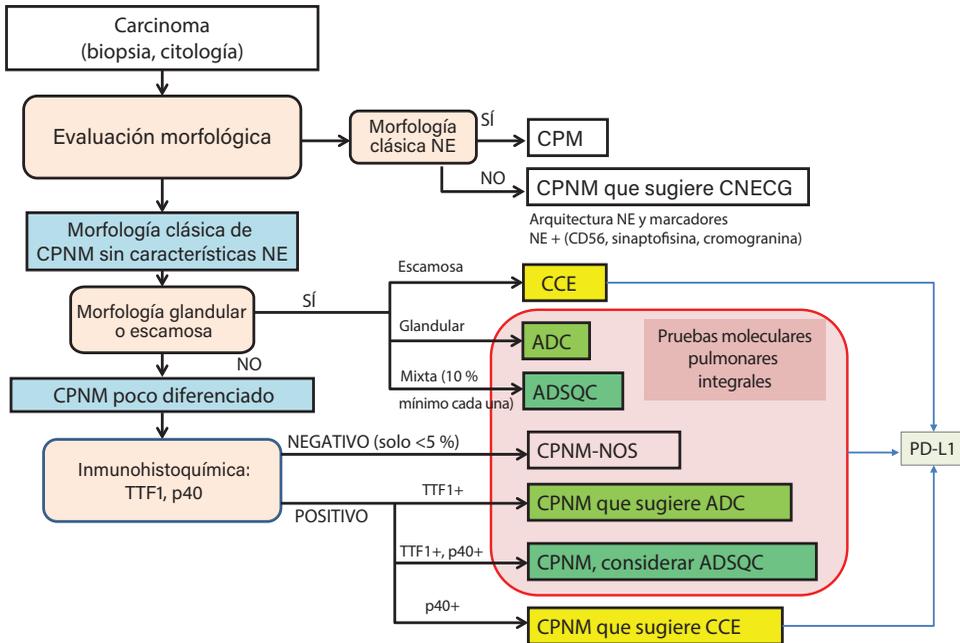
3. Pruebas adecuadas: perfil genético completo para cubrir todas las dianas para las que se dispone de fármacos.

En este entorno, es fundamental que los patólogos conozcan la consideración de las mejores prácticas en patología, introducida en el 2011 por los expertos multidisciplinares de la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC), que recomendaba que “las muestras de tejido se deben manejar no solo para el diagnóstico, sino también para maximizar la cantidad de tejido disponible para estudios moleculares”.<sup>1</sup> Este principio se ha adoptado posteriormente en la cuarta y quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre cánceres de pulmón y torácicos.<sup>2,3</sup> De conformidad con este principio, en anteriores atlas de la IASLC se han introducido algoritmos (figura 19-1) para el corte inicial de bloques de biopsias tumorales fijadas en formalina e incrustadas en parafina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).<sup>4,5</sup>

El principio también anima a realizar un conjunto mínimo de marcadores diagnósticos para la clasificación patológica del cáncer de pulmón, pero solo cuando sea necesario, ya que el uso de TTF1 y p40 puede reducir el número de casos de cáncer de pulmón no microcítico,



**Figura 19-1.** Estrategias para maximizar el tejido para el diagnóstico y las pruebas de biomarcadores moleculares. El número de cortes sin teñir que se deben preparar viene determinado por la estrategia institucional/departamental para el uso óptimo del tejido con el fin de reducir la pérdida de muestras tisulares y el tiempo de respuesta. Muchos laboratorios hacen los cortes para la extracción de ADN/ARN en un micrótomos dedicado para evitar la contaminación cruzada. Abreviaturas: H&E = hematoxilina y eosina; IHQ = inmunohistoquímica. (Fuente: Tsao *et al.*<sup>3</sup>).



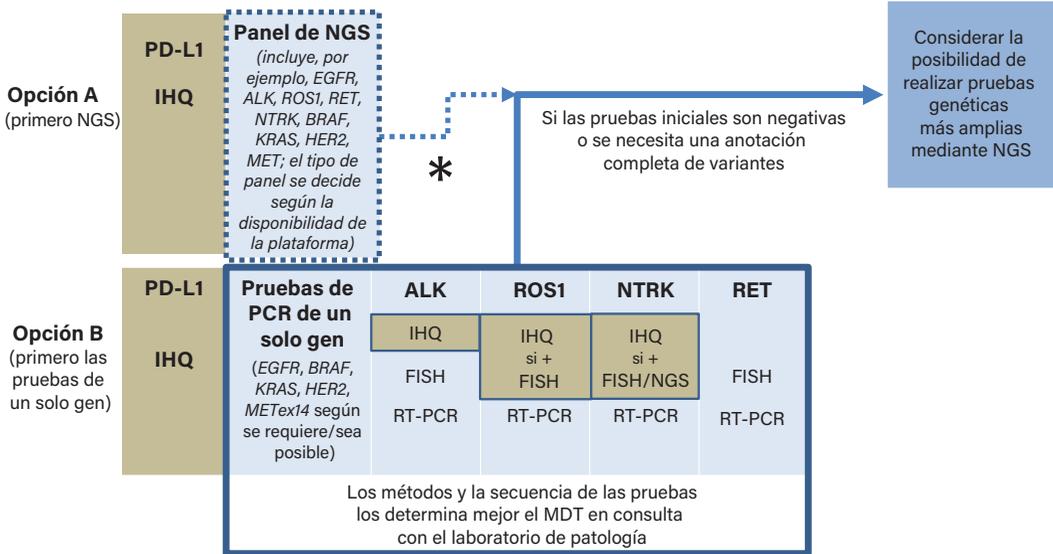
**Figura 19-2.** Algoritmo diagnóstico para guiar las pruebas moleculares predictivas en el cáncer de pulmón. Todos los CPNM no escamosos se deberían someter a pruebas moleculares integrales. En algunos entornos, el CCE y el CNECG también se deberían considerar para pruebas moleculares (por ejemplo, CCE en un no fumador o en una persona que nunca ha fumado). Abreviaturas: ADC = adenocarcinoma; ADSQC = carcinoma adenoescamoso; CNECG= carcinoma neuroendocrino de células grandes; NE = neuroendocrino; NOS = no especificado; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico; CPM = cáncer de pulmón microcítico; CCE= carcinoma de células escamosas. (Adaptado de Travis *et al* y Junta Editorial de la Clasificación de Tumores [Classification of Tumours Editorial Board] de la OMS<sup>2,3</sup>).

no especificado (CPNM-NOS) a menos del 5 % o el 10 % (figura 19-2).<sup>6</sup> En esta línea, se han publicado recomendaciones de mejores prácticas para la inmunohistoquímica diagnóstica en el cáncer de pulmón.<sup>7</sup>

### Pruebas moleculares en el cáncer de pulmón no microcítico en estadio avanzado

El algoritmo de pruebas más utilizado se basa en las guías actuales de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), la Sociedad Europea de Oncología Médica (*European Society for Medical Oncology*, ESMO) y el *College of American Pathologists* (CAP)/IASLC/*Association for Molecular Pathology* (AMP), que son principalmente para pacientes con CPNM en estadio avanzado (véase también el capítulo 6). La figura 19-3 ilustra gráficamente 2 opciones para los flujos de trabajo de las pruebas: la opción A utiliza un ensayo de panel de secuenciación de nueva generación (*next-generation sequencing*, NGS) más completo como tecnología principal para el perfil molecular, y la opción B utiliza una combinación de pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) de un solo analito y pruebas de inmunohistoquímica/hibridación fluorescente *in situ* (IHQ/FISH) (ALK, ROS1, RET, NTRK). La elección del panel de NGS en la opción A y de las pruebas de marcadores individuales en la opción B viene determinada en gran medida por múltiples consideraciones locales, como el mecanismo de financiación disponible, la cantidad de tejido, la plataforma técnica/analítica y la experiencia para las distintas pruebas, la prevalencia en la población local de alteraciones específicas (por ejemplo, mutaciones del *EGFR*), el número de terapias

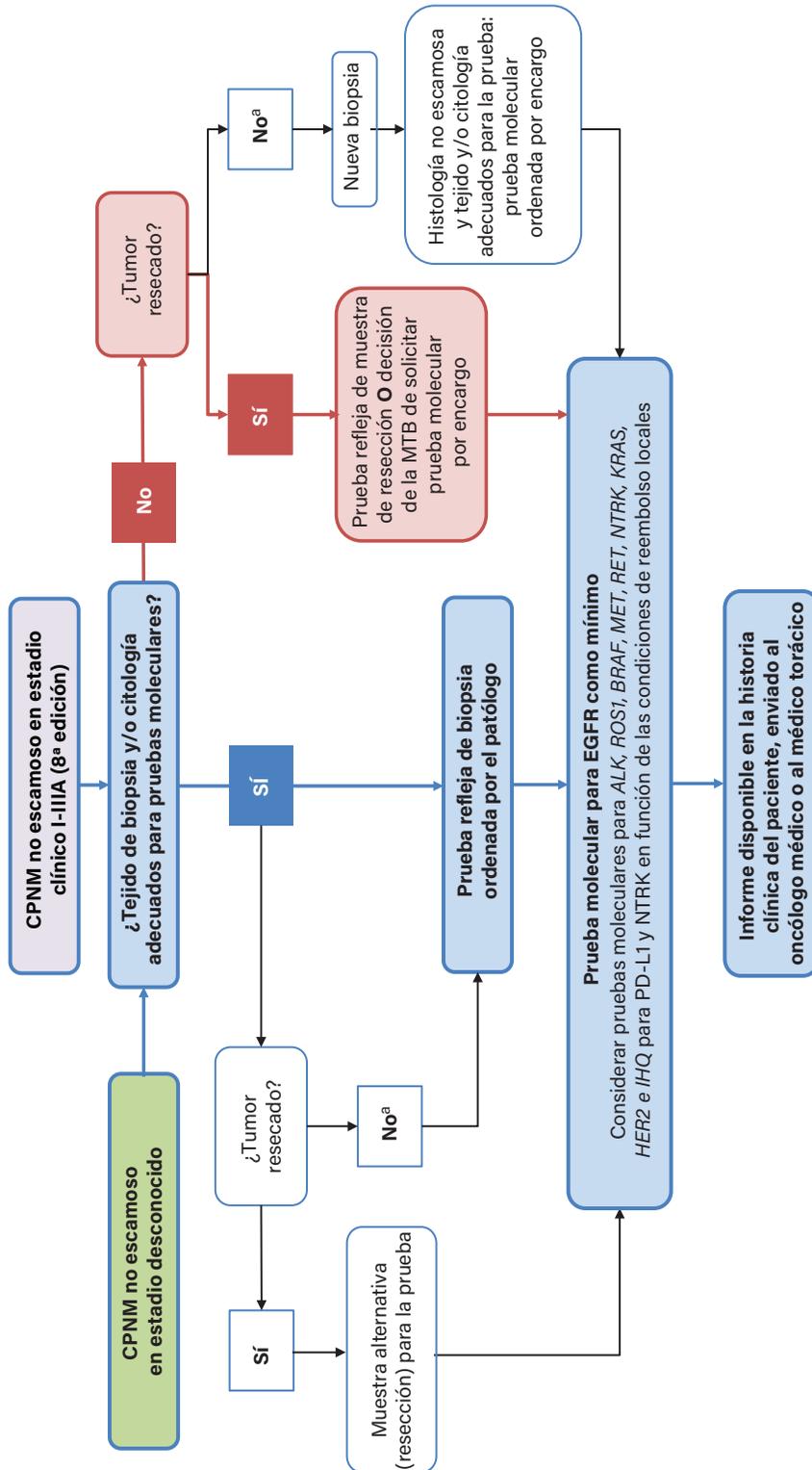
aprobadas con marcadores seleccionados y el tiempo de respuesta necesario. En general, con un gran número de marcadores moleculares que deban analizarse (por ejemplo, como recomiendan actualmente la *American Society of Clinical Oncology* [ASCO], la ESMO y la NCCN), la opción A (primero la NGS) es más eficiente y rentable que la combinación de pruebas de un solo analito.<sup>9-11</sup>



**Figura 19-3.** Flujos de trabajo de pruebas para pacientes con CPNM avanzado. (Opción A) Se realiza NGS e IHQ de PD-L1 por adelantado. Los genes exactos en los primeros paneles de NGS pueden variar y dependen de las plataformas/paneles disponibles y del enfoque de ADN en comparación con ARN. (Véase también el capítulo 5). (Opción B) Se inician las pruebas de un solo analito. Los genes exactos para las pruebas de un solo gen, la elección de la prueba y el orden de las pruebas dependen de los recursos locales, la probabilidad de identificar una mutación (prevalencia local, por ejemplo, EGFR [véase el texto relacionado]) y la preferencia del MDT. El contenido de células tumorales en una muestra también puede determinar el enfoque óptimo. La NGS de captura híbrida tiene una sensibilidad de hasta el 20 % del contenido tumoral. Las pruebas dirigidas sensibles, como la PCR digital en gotas, la PCR en tiempo real y algunas NGS basadas en amplicones, tienen una sensibilidad de hasta el 5 %. (asterisco) También se puede considerar un segundo panel de NGS más amplio, si es posible, en caso de que el primer panel de NGS no incluya genes/mutaciones adicionales con terapia disponible, incluso en ensayos clínicos. Abreviaturas: FISH = hibridación fluorescente *in situ*; IHQ = inmunohistoquímica; MDT = equipo multidisciplinario; NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR = PCR con transcripción inversa.

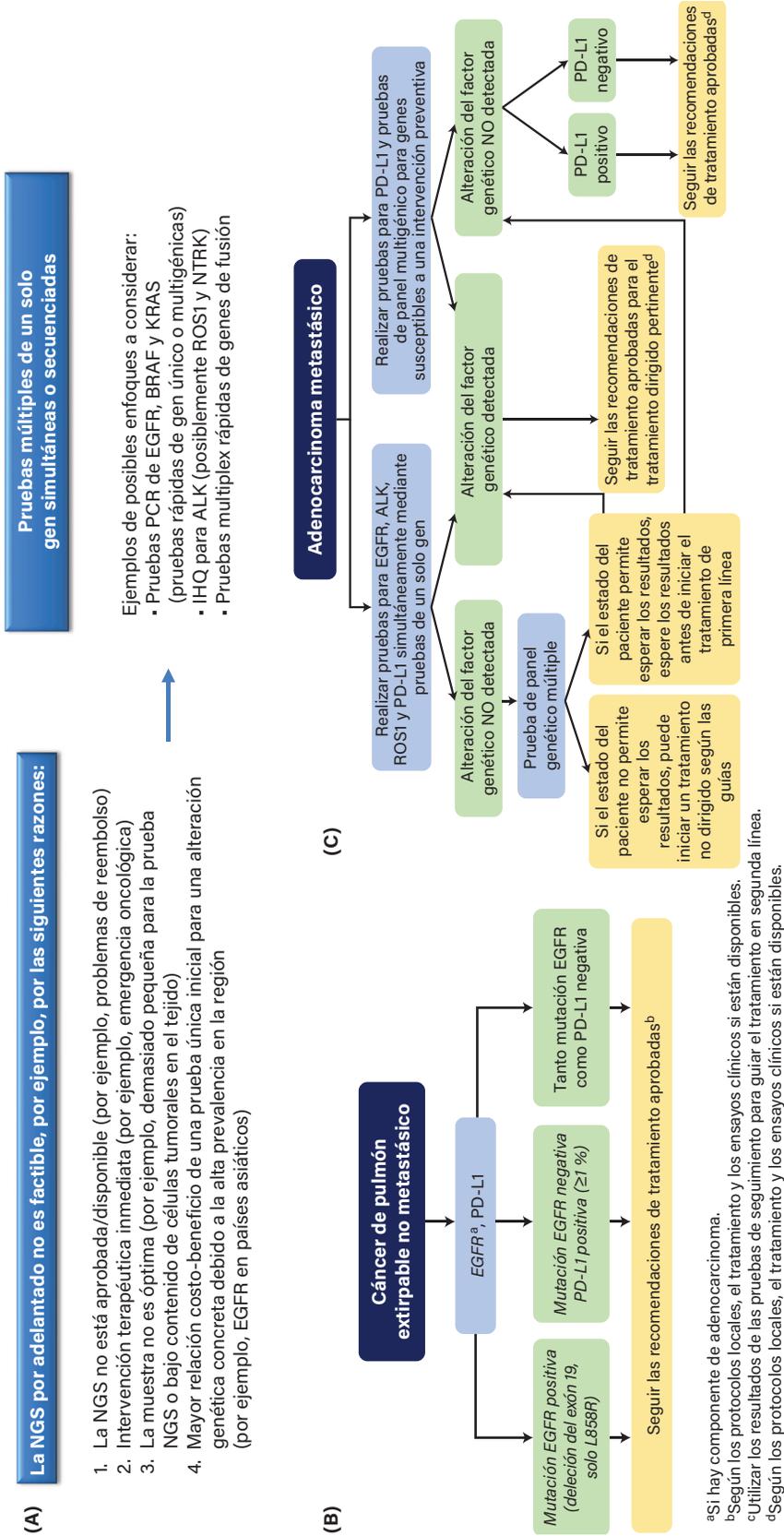
### Pruebas moleculares en el CPNM en estadio temprano y/o reflejo desconocido

Las pruebas reflejas de biomarcadores predictivos se suelen realizar de forma rutinaria en el momento del diagnóstico (véase también el capítulo 6). En tal situación, la información sobre la estadificación clínica puede ser incompleta o desconocida para el patólogo que solicita la prueba de biomarcadores; así, el algoritmo podría ser agnóstico de estadio, pero también se podría aplicar a pacientes con CPNM en estadio temprano (I-IIIa) que potencialmente podrían someterse a resección (figura 19-4). Las pruebas reflejas tienen la ventaja de permitir que los resultados de las pruebas de biomarcadores estén disponibles más rápido para la toma de decisiones terapéuticas<sup>12,13</sup> y, en el contexto de la enfermedad temprana, para identificar a los pacientes que pueden ser candidatos a inmunoterapia neoadyuvante o terapia dirigida adyuvante. No obstante, todo el equipo multidisciplinario debe ser consciente de los desafíos que plantean las pruebas de biomarcadores predictivos en el escenario perioperatorio.<sup>14</sup>



<sup>a</sup> Paciente no apto para cirugía (tumor no extirpable o paciente médicamente inoperable) o rechaza la cirugía

**Figura 19-4.** Algoritmo de prueba cuando se desconoce el estadio clínico del tumor en la biopsia inicial o cuando la estadificación clínica indica un CPNM potencialmente extirpable en estadio temprano (estadio I-IIIa). Abreviaturas: IHC = inmunohistoquímica; MTB = junta multidisciplinaria de tumores; CPNM = cáncer de pulmón no microcítico. (Adaptado de Aggarwal *et al.*<sup>17</sup>).



**Figura 19-5.** Los algoritmos de pruebas alternativos se centran en maximizar el rendimiento de las pruebas para las terapias basadas en biomarcadores disponibles para los pacientes afectados. Abreviaturas: IHQ = inmunohistoquímica; NGS = secuenciación de nueva generación; PCR = reacción en cadena de la polimerasa. (Adaptado de Mitsudomi *et al.*<sup>15</sup>).

## Pruebas moleculares en circunstancias especiales y en países con alta prevalencia de mutaciones del EGFR

Aunque las guías (por ejemplo, NCCN, ESMO, CAP/IASLC/AMP, ASCO, etc.) se suelen elaborar con base en las últimas pruebas clínicas disponibles y son adecuadas para países con sistemas de salud con buenos recursos, existen muchas circunstancias (figura 19-5A) en las que no es factible o no se dispone de pruebas moleculares integrales mediante NGS. En tales situaciones, se pueden adoptar algoritmos de pruebas alternativos simplificados o más prácticos (figura 19-5A). En lugares en los que la mutación sensibilizante del *EGFR* es muy prevalente (por ejemplo, los países del este asiático), los algoritmos de pruebas que dan prioridad al *EGFR* y al PD-L1 también pueden ser más rentables<sup>15,16</sup> (figura 19-5B,C). Sin embargo, la adopción de estos algoritmos de pruebas alternativos solo debería seguir una decisión consensuada multidisciplinaria. Otra práctica emergente que ahorra costos, basada en la exclusividad mutua de los factores oncogénicos adictivos, consiste en utilizar en primer lugar un panel de ADN-NGS y, solo cuando este no identifique una mutación conductora, realizar la ARN-NGS para genes de fusión (y posiblemente mutaciones de omisión del exón 14 de *MET*). Sin embargo, toda secuenciación de las pruebas implica un retraso en la identificación de las dianas cubiertas por los pasos posteriores.

## Conclusión

Para conseguir los beneficios más óptimos de la oncología de precisión para los pacientes con cáncer de pulmón, es imprescindible realizar pruebas de biomarcadores predictivos. Aunque es deseable realizar pruebas moleculares integrales que incluyan el uso de NGS para *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK*, *BRAF*, *KRAS*, *MET*, *HER2* y PD-L1 mediante IHQ, muchas circunstancias pueden influir en la viabilidad de este algoritmo de pruebas completo. Entre ellas se incluyen la disponibilidad de tejidos, la financiación, las plataformas disponibles, los conocimientos técnicos y, no menos importante, la disponibilidad de los fármacos para el tratamiento basado en biomarcadores. En general, se recomienda que la adopción de cualquier algoritmo de pruebas se base en aportaciones multidisciplinarias que tengan en cuenta estos factores.

## Referencias

1. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(2):244-285. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221.
2. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.* 4th ed. International Agency for Research on Cancer; 2015.
3. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Thoracic Tumours.* WHO Classification of Tumours. Vol. 5. 5th ed. International Agency for Research on Cancer; 2021.
4. Nicholson AG, Kerr K, Wistuba I, Yatabe Y. Sample acquisition, processing, and general diagnostic procedures. In: Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, eds. *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer.* 2nd ed. International Association for the Study of Lung Cancer; 2016.
5. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR, eds. *IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer.* International Association for the Study of Lung Cancer; 2017.
6. Loo PS, Thomas SC, Nicholson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):442-447. doi:10.1097/JTO.0b013e3181d40fac.

7. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407. doi:10.1016/j.jtho.2018.12.005.
8. Tsao MS, Nicholson AG, Hirsch FR. Implementation of PD-L1 testing for personalized therapy for lung cancer. In: Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR, eds. *IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer*. International Association for the Study of Lung Cancer; 2017.
9. Pennell NA, Mutebi A, Zhou ZY, et al. Economic impact of next-generation sequencing versus single-gene testing to detect genomic alterations in metastatic non-small-cell lung cancer using a decision analytic model. *JCO Precis Oncol.* 2019;3:1-9. doi:10.1200/PO.18.00356.
10. Vanderpoel J, Stevens AL, Emond B, et al. Total cost of testing for genomic alterations associated with next-generation sequencing versus polymerase chain reaction testing strategies among patients with metastatic non-small cell lung cancer. *J Med Econ.* 2022;25(1):457-468. doi:10.1080/13696998.2022.2053403.
11. Tan AC, Lai GGY, Tan GS, et al. Utility of incorporating next-generation sequencing (NGS) in an Asian non-small cell lung cancer (NSCLC) population: incremental yield of actionable alterations and cost-effectiveness analysis. *Lung Cancer.* 2020;139:207-215. doi:10.1016/j.lungcan.2019.11.022.
12. Lim C, Tsao MS, Le LW, et al. Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(7):1415-1421. doi:10.1093/annonc/mdv208.
13. Cheema PK, Menjak IB, Winterton-Perks Z, et al. Impact of reflex EGFR/ALK testing on time to treatment of patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Oncol Pract.* 2017;13(2):e130-e138. doi:10.1200/JOP.2016.014019.
14. Conde E, Hernandez S, Lopez-Rios F. Rethinking the role of biomarkers for operable non-small cell lung carcinoma: an effective collaboration with artificial intelligence algorithms. *Mod Pathol.* 2022;35(12):1754-1756. doi:10.1038/s41379-022-01167-8.
15. Mitsudomi T, Tan D, Yang JC, et al. Expert consensus recommendations on biomarker testing in metastatic and nonmetastatic NSCLC in Asia. *J Thorac Oncol.* 2022;S1556-0864(22)01905-0. doi:10.1016/j.jtho.2022.10.021.
16. Yang SC, Yeh YC, Chen YL, Chiu CH. Economic analysis of exclusionary EGFR test versus up-front NGS for lung adenocarcinoma in high EGFR mutation prevalence areas. *J Natl Compr Canc Netw.* 2022;20(7):774-782.e4. doi:10.6004/jnccn.2021.7120.
17. Aggarwal C, Bubendorf L, Cooper WA, et al. Molecular testing in stage I-III non-small cell lung cancer: approaches and challenges. *Lung Cancer.* 2021;162:42-53. doi:10.1016/j.lungcan.2021.09.003.

## Resumen y perspectivas futuras

# 20

Por Ming-Sound Tsao, James Chih-Hsin Yang, Lynette M. Sholl,  
Wendy A. Cooper, Daniel SWTan y Keith M. Kerr

En la oncología de precisión, las pruebas moleculares son el motor que impulsa la implementación de terapias dirigidas basadas en biomarcadores. En apenas una década, hemos pasado de la necesidad de analizar un único marcador (*EGFR*) en el cáncer de pulmón a analizar al menos 10 marcadores (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *KRAS*, *RET*, *NTRK*, *MET*, *HER2*, *PD-L1*). Afortunadamente, se han desarrollado en paralelo notables avances en las tecnologías de pruebas moleculares. Aunque los atlas anteriores de la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) sobre pruebas de biomarcadores predictivos en el cáncer de pulmón han abarcado individualmente 1 o 2 marcadores (*ALK*, *ALK/ROS1*, *EGFR*, *PD-L1*), ya no resulta práctico ni realista publicar atlas separados sobre marcadores individuales. Esta edición específica es un intento de cristalizar la vanguardia de la ciencia en las pruebas moleculares en el cáncer de pulmón para terapias dirigidas.

Debería ser evidente que las pruebas de biomarcadores son complejas e implican a muchas partes interesadas con experiencia en la adquisición y procesamiento de muestras, tecnologías y desarrollo de pruebas, implementación y utilidad clínica. Desde un punto de vista crítico, las estrategias de pruebas deben ser relevantes y accesibles para los pacientes que se beneficiarían de los resultados. Por ello, los distintos capítulos han sido compuestos intencionadamente por un equipo multidisciplinario de coautores. Algunos de los capítulos incluidos en este atlas se han tratado en 1 o más atlas anteriores de la IASLC, ya que representan requisitos fundamentales para las mejores prácticas en las pruebas de biomarcadores moleculares. Entre ellos se incluyen la adquisición de muestras y los problemas preanalíticos de procesamiento, información e interpretación de los resultados de las pruebas y los requisitos para el aseguramiento de la calidad analítica.

En esta edición, hemos ampliado el capítulo sobre la tecnología de las pruebas a la secuenciación de nueva generación, la plataforma analítica más avanzada en la actualidad para las pruebas multiplex de un gran número de aberraciones genómicas en los cánceres. Dada la creciente complejidad de la oncología clínica, en la que se dispone de múltiples fármacos de clase similar o de diferentes generaciones, hemos incluido para cada gen tratable la descripción de las

terapias de vanguardia para proporcionar contexto a las pruebas de biomarcadores descritas. La complejidad de la prestación de servicios para realizar pruebas de biomarcadores moleculares también se ha tratado en los capítulos sobre perspectivas globales en las guías y algoritmos de las pruebas, aunque de forma bastante simplista para ajustarse a la naturaleza de esta publicación.

No cabe duda que con los rápidos avances en nuestros conocimientos sobre la patobiología molecular del cáncer de pulmón, las nanotecnologías, la computación y la informática, las pruebas moleculares seguirán expandiéndose en alcance, profundidad y amplitud. Dicha expansión ya ha comenzado, y es probable que su avance sea rápido y exponencial. A continuación, se debaten brevemente los desafíos y potenciales futuros.

### **Futuro de las pruebas genómicas en tejido tumoral**

Aunque la biopsia líquida es actualmente el primer enfoque preferido para identificar posibles mecanismos de resistencia en terapias dirigidas en la progresión terapéutica, existen esfuerzos para elevar este enfoque a las pruebas de referencia en el diagnóstico inicial.<sup>1-3</sup> Este último sigue estando algo limitado por la sensibilidad de las pruebas, especialmente para las fusiones y el número de copias de genes,<sup>4</sup> que podría superarse con avances tecnológicos adicionales, por ejemplo, el uso de ARN plasmático libre de células o derivado de exosomas para la detección de fusiones de genes.<sup>5,6</sup>

Aunque aparentemente la biopsia líquida podría sustituir o hacer redundantes las pruebas de tejido tumoral, es más probable que las pruebas de tejido y sangre evolucionen en paralelo como enfoques complementarios.<sup>7</sup> El diagnóstico del tumor, la subtipificación y los biomarcadores inmunohistoquímicos son requisitos fundamentales. En la actualidad, la biopsia líquida presenta problemas de sensibilidad y especificidad con respecto a algunas alteraciones genómicas y no puede proporcionar un diagnóstico y una clasificación categórica de los tumores. La implementación de pruebas paralelas de tejidos y líquidos solo es factible si el costo y la financiación no son un problema; sin embargo, es probable que esto suponga una barrera importante para la mayoría de los pacientes de todo el mundo, lo que requiere una deliberación más profunda para desarrollar futuros algoritmos de pruebas, incluido el desafío de asimilar los datos derivados y comprender las implicaciones.

### **Detección de la enfermedad residual mínima y monitoreo de la eficacia terapéutica y la progresión de la enfermedad**

En la actualidad se están realizando grandes esfuerzos centrados en la aplicación de la biopsia líquida para detectar la enfermedad residual mínima (minimal residual disease, MRD) y utilizarla para monitorear la progresión de la enfermedad, pronosticar el resultado probable de los pacientes y, potencialmente, alterar el curso de la terapia (véase la sección “Aplicación clínica” en el capítulo 4). La naturaleza no invasiva de este enfoque ha acelerado la evaluación de su utilidad clínica.<sup>8</sup> Entre los problemas fundamentales que se deben abordar para hacer realidad la promesa de la biopsia líquida para el análisis de la MRD se incluyen la sensibilidad y la especificidad de dicha tecnología. Aunque los trabajos actuales se centran principalmente en el ADN genómico para las pruebas, se están llevando a cabo investigaciones más amplias utilizando ADN/ARN metilado y ARN circular.<sup>9-11</sup>

### **Detección temprana del cáncer de pulmón**

La tecnología de vanguardia actual para la detección temprana del cáncer de pulmón utiliza la tomografía computarizada (TC) helicoidal de baja dosis, que sigue siendo considerablemente

costosa y de bajo rendimiento, y tiene una especificidad subóptima. La aplicación de radiómica e inteligencia artificial para mejorar el rendimiento del cribado por TC es un área de gran interés para la investigación.<sup>12</sup> La adición de pruebas complementarias con alta sensibilidad y especificidad (como para los marcadores (epi)genómicos en la sangre o compuestos orgánicos volátiles en el aliento) podría ampliar drásticamente la capacidad de implementación de programas de detección temprana basados en la población.<sup>13,14</sup> El ADN tumoral circulante está siendo ampliamente investigado como plataforma de detección temprana del cáncer de pulmón, aunque su sensibilidad y especificidad son subóptimas para la detección de tumores en estadio temprano.<sup>15</sup> De forma similar a la detección de MRD, también se están investigando nuevos marcadores que incluyen ADN metilado y el ARN circular.<sup>16,17</sup>

### **Aprendizaje automático e inteligencia artificial**

Con unas pruebas genómicas cada vez más integrales que requieren una bioinformática más sofisticada y que requiere mucho tiempo, es probable que la inteligencia artificial y las técnicas de aprendizaje automático se utilicen cada vez más en el diagnóstico genómico clínico. Esto podría incluir varios pasos en los análisis genómicos, como la identificación y clasificación de variantes, la anotación del genoma y las predicciones del genotipo-fenotipo.<sup>18</sup>

### **Pruebas en otros tipos de cáncer de pulmón y cánceres torácicos**

Aparte de circunstancias especiales, la práctica actual en materia de perfiles genómicos se centra en gran medida en los cánceres de pulmón no microcíticos no escamosos, pero falta determinar el impacto de las pruebas de biomarcadores predictivos en los carcinomas de células escamosas, el carcinoma microcítico y otras neoplasias malignas torácicas, como el mesotelioma y los tumores tímicos. Probablemente surgirán cuando se identifiquen nuevas vulnerabilidades terapéuticas y las terapias correspondientes, como las que afectan al metabolismo tumoral, la vía de respuesta al estrés oxidativo y los componentes celulares y no celulares del microentorno tumoral.<sup>19-21</sup>

### **Conclusión**

En este *Atlas de pruebas moleculares para terapias dirigidas en cáncer de pulmón de la IASLC*, hemos proporcionado una descripción general de los genes individuales actualmente relevantes para la terapia dirigida en el cáncer de pulmón, así como de los factores que influyen en su evaluación, como la adquisición de muestras, las técnicas de prueba, los enfoques de los algoritmos de prueba y las variaciones globales en las pruebas moleculares. Hemos proporcionado un resumen actualizado de las pruebas moleculares clínicamente relevantes que será de utilidad para una amplia variedad de profesionales de la atención de salud especializados en el cáncer de pulmón y sus pacientes, y que esperamos sienta las bases para nuevos avances en la atención clínica del cáncer de pulmón.

### **Referencias**

1. Choudhury Y, Tan MH, Shi JL, et al. Complementing tissue testing with plasma mutation profiling improves therapeutic decision-making for patients with lung cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:758464. doi:10.3389/fmed.2022.758464.
2. Park S, Olsen S, Ku BM, et al. High concordance of actionable genomic alterations identified between circulating tumor DNA-based and tissue-based next-generation sequencing testing in advanced non-small cell lung cancer: the Korean Lung Liquid Versus Invasive Biopsy Program. *Cancer*. 2021;127(16):3019-3028. doi:10.1002/cncr.33571.

3. Li BT, Janku F, Jung B, et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol*. 2019;30(4):597-603. doi:10.1093/annonc/mdz046.
4. Song P, Wu LR, Yan YH, et al. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nat Biomed Eng*. 2022;6(3):232-245. doi:10.1038/s41551-021-00837-3.
5. Kok VC, Yu CC. Cancer-derived exosomes: their role in cancer biology and biomarker development. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:8019-8036. doi:10.2147/IJN.S272378.
6. Larson MH, Pan W, Kim HJ, et al. Author correction: a comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection. *Nat Commun*. 2022;13(1):2553. doi:10.1038/s41467-022-30329-0.
7. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, et al. Liquid biopsy for advanced NSCLC: a consensus statement from the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2021;16(10):1647-1662. doi:10.1016/j.jtho.2021.06.017.
8. Chae YK, Oh MS. Detection of minimal residual disease using ctDNA in lung cancer: current evidence and future directions. *J Thorac Oncol*. 2019;14(1):16-24. doi:10.1016/j.jtho.2018.09.022.
9. Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA methylation-based testing in liquid biopsies as detection and prognostic biomarkers for the four major cancer types. *Cells*. 2020;9(3):624. doi:10.3390/cells9030624.
10. Yin H, Hong H, Yin P, et al. Increased levels of N6-methyladenosine in peripheral blood RNA: a perspective diagnostic biomarker and therapeutic target for non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2022;61(3):473-484. doi:10.1515/cclm-2022-1033.
11. Kristensen LS, Jakobsen T, Hager H, Kjems J. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(3):188-206. doi:10.1038/s41571-021-00585-y.
12. Binczyk F, Prazuch W, Bozek P, Polanska J. Radiomics and artificial intelligence in lung cancer screening. *Transl Lung Cancer Res*. 2021;10(2):1186-1199. doi:10.21037/tlcr-20-708.
13. Seijo LM, Peled N, Ajona D, et al. Biomarkers in lung cancer screening: achievements, promises, and challenges. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):343-357. doi:10.1016/j.jtho.2018.11.023.
14. Scheepers MHMC, Al-Difaie Z, Brandts L, et al. Diagnostic performance of electronic noses in cancer diagnoses using exhaled breath: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2022;5(6):e2219372. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.19372.
15. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC—challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(9):577-586. doi:10.1038/s41571-018-0058-3.
16. Shen SY, Singhanian R, Fehring G, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature*. 2018;563(7732):579-583. doi:10.1038/s41586-018-0703-0.
17. Pedraz-Valdunciel C, Giannoukakos S, Giménez-Capitán A, et al. Multiplex analysis of CircRNAs from plasma extracellular vesicle-enriched samples for the detection of early-stage non-small cell lung cancer. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2034. doi:10.3390/pharmaceutics14102034.
18. Dias R, Torkamani A. Artificial intelligence in clinical and genomic diagnostics. *Genome Med*. 2019;11(1):70. doi:10.1186/s13073-019-0689-8.
19. Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell*. 2022;40(11):1279-1293. doi:10.1016/j.ccell.2022.09.018.
20. Hellyer JA, Padda SK, Diehn M, Wakelee HA. Clinical implications of KEAP1-NFE2L2 mutations in NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2021;16(3):395-403. doi:10.1016/j.jtho.2020.11.015.
21. Suzuki J, Tsuboi M, Ishii G. Cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2022;22(2):169-182. doi:10.1080/14737140.2022.2019018.

*Divulgación:* La Dra. Ahn no tiene nada que divulgar. La Dra. Bazhenova informa de honorarios personales de *ORIC Pharmaceuticals, Turning Point Therapeutics, Newogen, Daiichi Sankyo, Janssen, Merck*, subvenciones de *BeyondSpring*, honorarios personales de *Regeneron, Boehringer Ingelheim, Novartis, Genentech, Sanofi, Novocure, InterVenn Biosciences, Elevation Oncology, Janssen y Bayer* ajenos al trabajo presentado. La Dra. Beasley no tiene nada que divulgar. La Dra. Berezowska informa de subvenciones de *Roche, Basilea Pharmaceutica*, otras de *Daiichi Sankyo* y otras de *Eli Lilly* ajenas al trabajo presentado. El Dr. Bubendorf informa de honorarios personales de *AstraZeneca, Bayer, Eli Lilly, Merck, Bristol Myers Squibb, Amgen, Takeda*, subvenciones de *Roche, Novartis*, subvenciones y honorarios personales de *Systems Oncology*, honorarios personales de *Janssen* y de *Thermo Fisher Scientific* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Cappuzzo divulga los siguientes conflictos de intereses: honorarios por membresía en una junta asesora o conferencias de *Roche, AstraZeneca, Bristol Myers Squibb, Pfizer, Takeda, Lilly, Bayer, Amgen, Sanofi, PharmaMar, Novocure, Mirati Therapeutics, Galecto, OSE Pharma* y *MSD*. El Dr. Chang no tiene nada relevante que divulgar. El Dr. Chou no tiene nada que divulgar. La Dra. Chung no tiene nada que divulgar. La Dra. Cooper informa que ha participado en juntas asesoras de *AbbVie, Amgen, AstraZeneca, Bayer y Merck* sin recibir compensación económica alguna. La Dra. Dacic informa de honorarios personales de *AstraZeneca, Genentech, Merck, AbbVie, Janssen* y *Takeda* fuera del ámbito del trabajo presentado. La Dra. Dagogo-Jack no tiene nada que divulgar. La Dra. Donington no tiene nada relevante que divulgar. El Dr. Drilon informa de subvenciones de los Institutos Nacionales de Salud/*National Cancer Institute* durante la realización del estudio; honorarios personales de *Ignitya/Genentech/Roche, Loxo/Bayer/Lilly, Takeda/Ariad/Millennium, Turning Point Therapeutics, AstraZeneca, Pfizer, Blueprint Medicines, Helsinn, BeiGene, BerGenBio, Hengrui Therapeutics, Exelixis, Tyra Biosciences, Verastem, MORE Health, AbbVie, 14ner Elevation Oncology, Remedica Ltd., ArcherDx, Monopteros Therapeutics, Novartis, EMD Serono, Melendi, Liberum, Repare RX, Nuvalent, Merus, Axis Pharma, Chugai Pharmaceutical, EPG Health, Harborside Nexus, RV MORE, Ology, ToucheIME, Janssen, Amgen, Entos Pharmaceuticals, Treeline Bio*; honorarios personales y de CME de *Medscape, OncoLive, PeerVoice, Physicians Education Resources, Targeted Oncology, Research to Practice, Axis, Peerview Institute, Paradigm Medical Communications, WebMD, MJH Life Sciences, Med Learning, Imedex, Answers in CME, Clinical Care Options, EPG Health, JNCC/Harborside, Liberum, Remedica Ltd.*, y *Applied Pharmaceutical Science Inc.*; honorarios personales de *Prelude, AICME, i3 Health* ajenos al trabajo presentado, e investigación asociada pagada a la institución de *Pfizer, Exelixis, GlaxoSmithKline, Teva, Taiho Oncology* y *PharmaMar*; investigación de *Foundation Medicine*; regalías de *Wolters Kluwer*; y otros apoyos de *Merck, Puma, Merus* y *Boehringer Ingelheim*. La Sra. Elkins informa de honorarios personales de *AstraZeneca, Bayer, Bristol Myers Squibb, Blueprint Medicines, Boehringer Ingelheim, Daiichi Sankyo, Janssen, Merck* y *Mirati Therapeutics*. El Dr. Fong informa de subvenciones de *Competitive Research Grants* ajenas al trabajo presentado; y revisor de *UpToDate* y *Cochrane Clinical Answers*; apoyo de *Olympus* con el préstamo de un broncoscopio con fines de estudio de investigación y sin financiación económica; y licencia del software *MeVis Veolity* para la investigación del diagnóstico asistido por computadora en el *International Lung Screen Trial (ILSTI)*. El Dr. Gainer informa de honorarios personales y otros de *Bristol Myers Squibb, Merck, Genentech/Roche, AstraZeneca, Blueprint Medicines, Loxo/Lilly, Jounce Therapeutics*, honorarios personales de *Mirati Therapeutics, Silverback Therapeutics, Sanofi, GlydeBio*, honorarios personales y otros de *Moderna*, honorarios personales de *Takeda, Regeneron, Curie Therapeutics, Merus* ajenos al trabajo presentado; y un familiar directo (cónyuge) es empleada de *Ironwood Pharmaceuticals* y posee acciones. El Dr. Gandara no tiene nada relevante que divulgar. La Dra. Gill no tiene nada relevante que divulgar. El Dr. Gogna informa de honorarios personales de *Amgen Medical* y honorarios personales de *Sirtex Medical* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Goto informa de subvenciones de *AstraZeneca, Pfizer, AbbVie, Eli Lilly, Bristol Myers Squibb, ONO, Novartis, Kyorin, Daiichi Sankyo*; honorarios de *Lilly, Chugai Pharmaceutical, Boehringer Ingelheim, ONO, Bristol Myers Squibb, Pfizer, MSD, Novartis, Merck, Thermo Fisher Scientific*; participación en juntas asesoras para *AstraZeneca, Chugai Pharmaceutical, Boehringer Ingelheim, Eli Lilly, Taiho Oncology, Pfizer, Novartis, Guardant Health, Illumina, Daiichi Sankyo, Bristol Myers Squibb* y *MSD* fuera del ámbito de trabajo. La Dra. Gray no tiene nada relevante que divulgar. La Dra. Han no tiene nada que divulgar. La Dra. Hendriks informa de honorarios personales de *Benecke, Medtalks y VJ Oncology*; honorarios personales de *AstraZeneca*; otros de *Janssen*; otros de *Amgen, Bristol Myers Squibb, Boehringer Ingelheim, Janssen, Lilly, Merck, MSD, Novartis, Pfizer, Roche* y *Takeda*; otros de *Roche*; otros de *Takeda*; subvenciones de *AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Roche, Takeda, Merck* y *Pfizer*; otras de *AbbVie, AstraZeneca, Blueprint Medicines, Gilead Sciences, GlaxoSmithKline, Merck Serono, Mirati Therapeutics, MSD, Novartis, Roche* y *Takeda* ajenas al trabajo presentado. El Dr. Hesketh no tiene nada que divulgar. El Dr. Hirsch no informa de ningún conflicto de intereses relevante. El Dr. Hofman no tiene nada que divulgar. El Dr. Hwang informa de honorarios personales de *Merck, GlaxoSmithKline*, subvenciones y honorarios personales de *Pfizer, AstraZeneca*, honorarios personales de *Novartis, Eli Lilly, Roche, Amgen*, subvenciones de *EMD Serono*, honorarios personales de *Bayer* y *Bristol Myers Squibb* ajenos al trabajo presentado. La Dra. Itchins informa de honorarios personales de *Merck y Roche*; honorarios de *Pfizer, AstraZeneca, Takeda, Novartis, Bristol Myers Squibb, MSD y Bayer*; participación en juntas asesoras de *Pfizer, Takeda, Bayer, MSD, Amgen, Merck, Roche* y *BeiGene* fuera del ámbito de trabajo. La Dra. Jain no tiene nada que divulgar. El Dr. Joubert no tiene nada que divulgar. El Dr. Karkouri no tiene nada que divulgar. El Dr. Kerr informa de honorarios personales de *MSD*, honorarios personales de *Bristol Myers Squibb, Roche* y *AstraZeneca* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Kim informa de subvenciones de *Alpha Biopharma*, subvenciones y honorarios personales de *Amgen, AstraZeneca, BridgeBio, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, Chong Kun Dang, Daiichi Sankyo, GlaxoSmithKline*, subvenciones de *Han Mi*, subvenciones y honorarios personales de *Janssen, Merck, Merus*, subvenciones de *Mirati Therapeutics*, subvenciones y honorarios personales de *MSD*, subvenciones y honorarios personales de *Novartis*, subvenciones de *ONO Pharmaceutical*, subvenciones y honorarios personales de *Pfizer, Roche, Takeda, Turning Point Therapeutics*, subvenciones de *Xcovery*, subvenciones y honorarios personales de *Yuhan*, y subvenciones de *inopharma* ajenas al trabajo presentado. La Dra. Lantuejoul informa de honorarios personales de *AbbVie, MSD, Janssen, Lilly, Bristol Myers Squibb, AstraZeneca* y *Oncologica*. La Dra. Leighl no tiene nada relevante que divulgar. El Dr. Li no tiene nada que divulgar. El Dr. D. Lin no tiene nada que divulgar. La Dra. J. Lin informa de honorarios personales de *Pfizer*, honorarios personales y otros de *Novartis*, otros de *Hengrui Therapeutics*, honorarios personales y otros de *Turning Point Therapeutics*, otros de *Neon Therapeutics*, otros de *Relay Therapeutics*, honorarios personales y otros de *Genentech/Roche*, otros de *Linnaeus Therapeutics*, honorarios personales y otros de *Nuvalent*, honorarios personales de *C4 Therapeutics, Mirati Therapeutics, Regeneron* y *Blueprint Medicines* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Liu informa de honorarios personales de *Amgen*, honorarios personales de *AstraZeneca*, subvenciones y honorarios personales de *Bayer*, honorarios personales de *BeiGene*, subvenciones y honorarios personales de *Blueprint Medicines*, honorarios personales de *Boehringer Ingelheim*, subvenciones y honorarios personales de *Bristol Myers Squibb*, honorarios personales de *Catalyst Pharmaceuticals, Daiichi Sankyo, Eisai*, subvenciones y honorarios personales de *Elevation Oncology, Genentech/Roche, Gilead Sciences*, honorarios personales de *Guardant Health, Janssen, Jazz Pharmaceuticals, Lilly*, subvenciones y honorarios personales de *Merck/MSD*, honorarios personales de *Novartis, Regeneron, Sanofi, Takeda*, subvenciones y honorarios personales de *Turning Point Therapeutics*, subvenciones de *Alkermes, Merus, Nuvalent, Pfizer*, subvenciones de *RAPT* y honorarios personales de *Candel Therapeutics* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Lopez-Rios informa de subvenciones y honorarios personales de *Thermo Fisher Scientific, Roche, Lilly, Pfizer, Takeda, Janssen, MSD, AstraZeneca, Bristol Myers Squibb* y *Bayer* ajenos al trabajo presentado. La Dra. Mezquita informa de subvenciones, honorarios personales, apoyo no financiero y otros procedentes de subvenciones/financiación de la investigación: *Bristol Myers Squibb, Boehringer Ingelheim, Amgen, Stilla, Invivata* y *AstraZeneca*; asesoría/consultoría: *Roche* y *Takeda*; actividades de educación: *Bristol Myers Squibb* y *Takeda*; *Foundation Medicine: Janssen*; viajes/alojamiento/gastos: *Roche, Takeda, Bristol Myers Squibb* y *Janssen*, ajenos al trabajo presentado. La Dra. Mino-Kenudson informa de honorarios personales de *AstraZeneca, Sanofi, Bristol Myers Squibb, Janssen Oncology* y *Elsevier*, ajenos al trabajo presentado. El Dr. Nicholson informa de honorarios personales de *Merck, Boehringer Ingelheim*, subvenciones y honorarios personales de *Pfizer*, honorarios personales de *Novartis, AstraZeneca, Bristol Myers Squibb, Roche, AstraZeneca, AbbVie, Oncologica, UpToDate*, honorarios personales de la Sociedad Europea de Oncología Médica, honorarios personales de *Liberum, Takeda UK* y *Sanofi* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Ou informa de otros honorarios de *Turning Point Therapeutics*, honorarios personales y otros de *Elevation Oncology*, honorarios personales de *Pfizer, Johnson & Johnson/Janssen, Lilly* y *BeiGene* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Papotti informa de honorarios personales de *Eli Lilly*, honorarios personales de *Roche*, honorarios personales de *AstraZeneca* y honorarios personales de *Pfizer* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Planchard informa de honorarios personales de *AstraZeneca, Bristol Myers Squibb, Celgene, Daiichi Sankyo, Eli Lilly, Merck, Novartis, Pfizer, prIME Oncology, Peer CME, Roche, Samsung, AbbVie, Janssen* y *GlaxoSmithKline* ajenos al trabajo presentado; e investigación en ensayos clínicos (como investigador principal o coinvestigador) para *AstraZeneca, AbbVie, Bristol Myers Squibb, Boehringer Ingelheim, GlaxoSmithKline, Eli Lilly, Merck, Novartis, Pfizer, Roche, MedImmune, Sanofi-Aventis, Taiho Oncology, Novocure, Daiichi Sankyo* y *Janssen*. El Dr. Raez informa de

subvenciones de *Bristol Myers Squibb*, subvenciones de *AstraZeneca*, subvenciones de *Genentech*, subvenciones de *Merck*, subvenciones de *Amgen*, subvenciones de *Guardant Health*, subvenciones de *Natera* y subvenciones de *NantHealth* ajenas al trabajo presentado. La Dra. Rekhman no tiene nada relevante que divulgar. El Dr. Remon informa de otros honorarios de MSD, otros de *Boehringer Ingelheim*, otros de *Pfizer*, honorarios personales y otros de *OSE Immunotherapeutics*, otros de *Bristol Myers Squibb*, otros de *AstraZeneca*, otros de *Roche*, otros de *Takeda* y otros de *Janssen* ajenos al trabajo presentado. La Dra. Roden informa de honorarios personales de *UpToDate* y honorarios personales de *Pathology Learning Center* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Rolfo informa de honorarios personales de *Boehringer Ingelheim*, *LUNgevity*, *Amgen*, *MedSTAR*, *Janssen Scientific Affairs*, *MH UVE EVENTS*, *Guardant Health*, *Diverse Hub*, *Regeneron*, *General Dynamics Information Technology* (GDIT), *Bayer*, *EMD Serono*, *AstraZeneca*, honorarios personales de CEA, honorarios personales de *Roche*, honorarios personales de *COR2ED*, honorarios personales de *BostonGene*, *Sanofi-Genzyme*, *Intellisphere*, *Physicians Education Resource*, *Daiichi Sankyo Europe GmbH*, *OncoLive*, *EMD Serono*, *Mirati Therapeutics*, *Eisai*, *Boston Pharmaceuticals*, *Novartis*, *Bristol Myers Squibb*, *Merck EMD Serono*, *livanta* y *ArcherDx* ajenos al trabajo presentado. La Dra. Rotow informa de subvenciones y honorarios personales de *AstraZeneca*, honorarios personales de *Pfizer*, subvenciones y honorarios personales de *AbbVie*, honorarios personales de *Gritstone Oncology*, honorarios personales de *Lilly*, honorarios personales de *Takeda*, honorarios personales de *Sanofi-Genzyme*, honorarios personales de *Genentech*, honorarios personales de *Guardant Health*, honorarios personales de *Janssen*, subvenciones y honorarios personales de *BioAtla*, subvenciones de *RedCloud*, subvenciones de *Blueprint Medicines* y subvenciones de *Bicycle Therapeutics* ajenas al trabajo presentado. El Dr. Schalper informa de subvenciones de *Navigate Biopharma*, *Tesaro/GlaxoSmithKline*, *Moderna Inc*, *Takeda*, *Surface Oncology*, *Pierre-Fabre Research Institute*, *Merck*, *Bristol Myers Squibb*, *AstraZeneca*, *Ribon Therapeutics*, *Eli Lilly*, *Boehringer Ingelheim*, *Roche* y *Akoya Biosciences*; honorarios personales de Clínica Alemana Santiago, *Shattuck Labs*, *AstraZeneca*, *EMD Serono*, *Takeda*, *Torque/Repertoire Therapeutics*, *Agenus*, *Genmab*, *OnCusp*, *Parthenon Therapeutics*, *Bristol Myers Squibb*, *Roche*, *CDR-Life*, *Sensei Therapeutics*, *Molecular Templates* y *Merck*; honorarios personales de *Takeda*, *Fluidigm*, *Merck*, *Bristol Myers Squibb*, *PeerView* y *Forefront* por colaboración ajena al trabajo presentado. La Dra. Sequist informa de subvenciones y honorarios personales de *AstraZeneca*, subvenciones y honorarios personales de *Genentech*, subvenciones de *Novartis*, subvenciones de *Delfi Diagnostics*, honorarios personales de *Janssen* y honorarios personales de *Pfizer* ajenos al trabajo presentado. La Sra. Shilo no tiene nada que divulgar. La Dra. Sholl informa de subvenciones de *Genentech*, subvenciones de *Bristol Myers Squibb*, honorarios personales de *AstraZeneca*, otros de *Genentech*, otros de *Lilly* y honorarios personales de *GV20 Therapeutics* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Skanderup no tiene nada que divulgar. El Dr. Solomon no tiene nada que divulgar. La Dra. Stone informa de honorarios de *AstraZeneca*, *MSD*, *Limbic* y *Bristol Myers Squibb*; y de honorarios personales de *AstraZeneca* y *Pinnacle Healthcare* fuera del ámbito de trabajo. El Dr. Tan informa de subvenciones y honorarios personales de *Novartis*, subvenciones y honorarios personales de *Bayer*, honorarios personales de *Boehringer Ingelheim*, subvenciones y honorarios personales de *AstraZeneca*, honorarios personales de *Eli Lilly*, honorarios personales de *Loxo*, honorarios personales de *Merck*, subvenciones y honorarios personales de *Pfizer*, honorarios personales de *Roche*, honorarios personales de *Takeda*, subvenciones de *GlaxoSmithKline* y honorarios personales de *Merrimack* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Thunnissen no tiene nada que divulgar. El Dr. Tsao no tiene nada que divulgar. El Dr. Van Schil informa de honorarios personales de *Bristol Myers Squibb*, honorarios personales de MSD, otros de *AstraZeneca*, otros de *Janssen* y honorarios personales de *Roche* ajenos al trabajo presentado; y presidente electo de la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) y tesorero de la *Belgian Association for Cardiothoracic Surgery* (BACTS). La Dra. Wakelee informa de honorarios personales de *AstraZeneca*, honorarios personales de *Blueprint Medicines*, honorarios personales de *Mirati Therapeutics*, subvenciones y apoyo no financiero de *Genentech/Roche*, subvenciones y apoyo no financiero de *Merck*, subvenciones de *ACEA Biosciences*, subvenciones de *Arrys Therapeutics*, subvenciones de *AstraZeneca/MedImmune*, subvenciones de *Bristol Myers Squibb*, subvenciones de *Clovis Oncology*, subvenciones de *Novartis*, subvenciones de *Seagen*, subvenciones de *Xcovery* y subvenciones de *Helsinn* ajenas al trabajo presentado. El Dr. Wistuba informa de subvenciones y honorarios personales de *Genentech/Roche*, subvenciones y honorarios personales de *Bayer*, subvenciones y honorarios personales de *Bristol Myers Squibb*, subvenciones y honorarios personales de *AstraZeneca*, subvenciones y honorarios personales de *Pfizer*, subvenciones y honorarios personales de *HTG Molecular Diagnostics*, honorarios personales de *Asuragen*, subvenciones y honorarios personales de *Merck*, subvenciones y honorarios personales de *GlaxoSmithKline*, subvenciones y honorarios personales de *Guardant Health*, honorarios personales de *Flame Biosciences*, subvenciones y honorarios personales de *Novartis*, subvenciones y honorarios personales de *Sanofi*, honorarios personales de *Daiichi Sankyo*, subvenciones y honorarios personales de *Amgen*, honorarios personales de *Oncocyte*, honorarios personales de MSD, honorarios personales de *Platform Health*, subvenciones de *Adaptive Biotechnologies*, subvenciones de *Adaptimmune*, subvenciones de *EMD Serono*, subvenciones de *Takeda*, subvenciones de *Karus*, subvenciones de *Johnson & Johnson*, subvenciones de *4D Pharma*, subvenciones de *Iovance*, subvenciones de *Akoya Biosciences*, honorarios personales de *Janssen*, honorarios personales de *Regeneron* y honorarios personales de *Merus* ajenos al trabajo presentado. El Dr. Wu informa de subvenciones, honorarios personales y otros de *AstraZeneca*; subvenciones y honorarios personales de *BeiGene*; subvenciones, honorarios personales y otros de *Boehringer Ingelheim*; subvenciones y honorarios personales de *Bristol Myers Squibb*; subvenciones de *Hengrui Therapeutics*; subvenciones y honorarios personales de *Roche*; otros de *Novartis*; otros de *Takeda*; honorarios personales de *Eli Lilly*, honorarios personales de MSD, honorarios personales de *Pfizer* y honorarios personales de *Sanofi* ajenos al trabajo presentado. El Dr. J. Yang informa de honorarios personales y otros de *Amgen*; subvenciones, honorarios personales y otros de *AstraZeneca*; honorarios personales y otros de *Bayer*; honorarios personales y otros de *Boehringer Ingelheim*; honorarios personales y otros de *Bristol Myers Squibb*; honorarios personales y otros de *Daiichi Sankyo*; otros de *Eli Lilly*; honorarios personales y otros de *Merck KGaA*, *Darmstadt*, Alemania; honorarios personales y otros de *Merck Sharp & Dohme*; honorarios personales y otros de *Novartis*, honorarios personales de *ONO Pharmaceutical*, honorarios personales de *Pfizer*, honorarios personales y otros de *Genentech/Roche*, honorarios personales y otros de *Takeda Oncology*, honorarios personales y otros de *Yuhan Pharmaceuticals*; otros de *Johnson & Johnson*, otros de *Puma Technology*, otros de *Gilead Sciences*, y otros de *GlaxoSmithKline* ajenos al trabajo presentado. El Dr. S-R. Yang informa de honorarios personales de *PRIME Education*, LLC ajenos al trabajo presentado; estudios contratados con *ArcherDx*, *Chugai Pharmaceutical*, *Thermo Fisher Scientific*, *NEC* y *Konica Minolta*; honorarios por junta asesora de *AbbVie*; honorarios por conferencias de *Bayer*, *Eli Lilly*, *Pfizer*, *Agilent Dako*, *ArcherDx*, *Sysmex*, *Boehringer Ingelheim*, *Yansen-Pharma* y *Roche/Ventana*; honorarios por junta asesora y conferencias de *Amgen*, *ONO Pharma*, *Daiichi Sankyo*, *Merck biopharma*, *MSD*, *Novartis*, *AstraZeneca*, *Chugai Pharmaceutical*, *Thermo Fisher Scientific* y *Takeda*. La Dra. Yu informa de subvenciones y honorarios personales de *AstraZeneca*, *Daiichi Sankyo*, *Cullinan Oncology*, *Novartis*, *Black Diamond*, *Blueprint Medicines*, *Janssen*, *Pfizer*, *Erasca*, *Taiho Oncology* y *AbbVie* fuera del ámbito del trabajo presentado.