

# Biomarcadores moleculares y genómica en el cáncer de pulmón

Javier de Castro Carpeño

RUTINARIO	RECOMENDABLES	EVIDENCIA INSUFICIENTE INVESTIGACIONALES
<ul style="list-style-type: none"><li>• Determinación de mutaciones de EGFR</li><li>• Determinación de reordenamientos de ALK</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Determinación de translocación de ROS 1 (1)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mutaciones de K-Ras</li><li>• Mutaciones de BRAF</li><li>• Translocaciones de RET</li><li>• Amplificación de MET</li><li>• Mutación de HER-2</li><li>• Translocaciones de NRTK</li><li>• Otros métodos de determinación de las alteraciones de EGFR</li><li>• Otras alteraciones en estudio</li><li>• Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento</li><li>• Biomarcadores predictivos de respuesta a la Inmunoterapia</li><li>• Nuevas técnicas de detección de alteraciones genéticas</li></ul>
<p>(1) En un subtipo concreto de pacientes seleccionados: tipos histológicos.</p> <p>Importancia del diagnóstico patológico en cáncer de pulmón: valor predictivo y pronóstico (pag 17).</p>		

## BIOMARCADORES RUTINARIOS

Los tipos de Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (CPCNP) avanzado portadores de mutaciones de EGFR o reordenamientos de ALK han demostrado: un comportamiento y una evolución clínica diferente al CPCNP convencional, una respuesta elevada a los inhibidores tirosina kinasa (ITK) específicos que produce un aumento de la supervivencia libre de progresión y, posiblemente, un aumento de la supervivencia global.

Por tanto, actualmente, se recomienda la realización del estudio de mutaciones de EGFR y los reordenamientos de ALK a todos los pacientes con CPCNP en estadio avanzado en los que se pueda sospechar su existencia. Fundamentalmente estos pacientes deben ser todos aquellos que tengan un carcinoma de histología no escamosa o los que no hayan sido fumadores, con independencia de que pueda hacerse a cualquier paciente con CPCNP en los que se estime necesario el estudio genético para valorar potenciales tratamientos dirigidos o adoptar una decisión terapéutica.

### 1. Determinación de mutaciones de EGFR

EGFR es uno de los cuatro miembros de la familia de receptores de membrana con actividad tirosina kinasa (TK) conocidos de forma global como ErbB. La activación de este receptor supone tanto un beneficio de proliferación como un importante freno a la apoptosis, al estimular rutas oncogénicas como MAPK y PI3K/Akt/PTEN/mTOR.

En 2004, se describió por primera vez la existencia de mutaciones activadoras de EGFR en CPCNP, situadas en los exones 18-21, en la región codificante para el dominio intracitoplasmático TK del receptor, que producían una activación permanente de la vía de señalización mediada por EGFR<sup>1,2,3</sup>. De hecho, aquellos tumores portadores de esta mutación parecían depender en su origen y evolución de esta vía oncogénica, por lo que fueron unos de los primeros tumores que se denominaron “adictos al oncogén” por esta dependencia. Como consecuencia de ello, la inhibición del crecimiento de estos tumores mediante agentes ITK de EGFR fue demostrada tanto a nivel experimental como en la práctica clínica<sup>4,5</sup>. Posteriormente, la correlación entre la presencia de mutaciones de EGFR y la respuesta a Gefitinib y Erlotinib ha quedado patente en estudios retrospectivos, con respuestas superiores al 65% y medianas de supervivencia de 20 a 30 meses<sup>6,7</sup>.

Varios estudios prospectivos y aleatorizados en fase III que han comparado la quimioterapia de primera línea frente a ITK en pacientes con CPCNP avanzado que presentan mutación EGFR, han demostrado el beneficio de los inhibidores al obtener una mayor tasa de respuesta (hasta un 70%) y de la supervivencia libre de progresión (9-15 meses). Estos estudios se han realizado con dos ITK reversibles, Gefitinib<sup>8,9,10</sup> y Erlotinib<sup>11,12</sup>, y uno irreversible, Afatinib<sup>13,14</sup>. Por dicho motivo, estos tres inhibidores Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca, Macclesfield, Reino Unido), Erlotinib (Tarceva®, OSI/Genentech, Boulder, CO/South San Francisco, California, EE. UU.) y Afatinib (Giotrif®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania) tienen indicación en la actualidad para el tratamiento de pacientes con CPCNP que presentan mutaciones de EGFR.

Como se ha señalado previamente, las mutaciones activadoras de EGFR se localizan entre los exones 18 al 21 en la región codificante para el dominio TK del receptor. El 90% de estas mutaciones son pequeñas deleciones en el exón 19 (donde se localizan los codones 747-750), o mutaciones puntuales en el exón 21 (L858R). El resto son inserciones “*in-frame*” en el exón 20 (del 5 al 8%) o mutaciones puntuales en los exones 18 y 20 (del 2 al 5%).

Por tanto, las mutaciones de EGFR que se describen con más frecuencia son:

- en el exón 18 del *EGFR*: mutaciones E709 y G719.
- en el exón 19: deleciones de 9-, 12-, 15- y 24-bp (codones 746-753); o inserciones poco comunes de 15-bp y 18-bp (codones 746-753).
- en el exón 20: inserciones (codones 763-764, codones 767-774), S768I, T790M.
- en el exón 21: L858R, T854 y las mutaciones L861Q y L861R.

Las mutaciones del exón 19 (pequeñas deleciones) son las que presentan mayor sensibilidad a los ITK y hay mutaciones que ofrecen una resistencia *de novo* o adquirida a los mismos como las T790M, G719A y L861Q.

Actualmente, diferentes guías clínicas y recomendaciones de expertos aconsejan identificar todas aquellas mutaciones individuales de EGFR que tienen una frecuencia de un 1% o superior<sup>15</sup>.

Como se ha demostrado en los estudios previos con los inhibidores de EGFR de primera o segunda generación, al cabo de un periodo que tiene como mediana 10-15 meses, los pacientes van a presentar progresión de su enfermedad. Esto es debido a la adquisición neoplásica de mecanismos de resistencia que fundamentalmente pueden ser: adquisición de una mutación de resistencia, activación de nuevas vías de señalización, transformación en carcinoma de células pequeñas pero, hasta en un 30% de casos, las causas de la progresión son desconocidas.

La aparición de una nueva mutación de resistencia es el mecanismo más frecuente ya que se puede encontrar hasta en cerca de un 60% de pacientes. En la mayoría de casos, se trata de la mutación T790M, una sustitución de treonina por metionina en el exón 20. La aparición de esta mutación provoca un cambio en la región de acoplamiento del receptor al ATP, favoreciendo su unión al tiempo que reduce la inhibición competitiva por el ATP de los inhibidores EGFR reversibles convencionales.<sup>(16,17)</sup>

Con el fin de vencer la resistencia establecida por la mutación T790M se han probado inhibidores de EGFR irreversibles y de tercera generación. Afatinib demostró una modesta eficacia con solo un 10% de respuestas y una supervivencia libre de 4 meses.<sup>(18)</sup>

También, se demostró que la combinación de Afatinib con Cetuximab alcanzaba una tasa de respuesta del 30% en pacientes que habían progresado a inhibidores de primera generación y cuyos tumores fueran portadores de la mutación T790M, pero esta asociación mostró una alta toxicidad cutánea y digestiva.<sup>(19)</sup>

Merece mención especial, la combinación de un agente anti-EGFR con un antiangiogénico. En un estudio fase II aleatorizado la adición de Bevacizumab a Erlotinib alcanzó una mediana de supervivencia libre de progresión muy significativa, 16 meses, frente a los 9 conseguidos por Erlotinib en monoterapia<sup>(20)</sup>.

En esta misma línea, el estudio BELIEF ha demostrado el beneficio de esta combinación de Erlotinib y Bevacizumab en tumores con presencia de mutación T790M, 16 meses, frente a los 10,5 meses de los casos que no tenían esa mutación. Por ello, varios estudios están confirmando la eficacia de esta asociación.

El gran avance ha venido de la mano de los denominados inhibidores de tercera generación como Osimertinib y Rociletinib que han demostrado actividad contra estos carcinomas portadores de la mutación T790M. Especialmente Osimertinib ha realizado el desarrollo clínico que ha confirmado su eficacia en esta población. Inicialmente un ensayo fase I/II en pacientes con CPCNP con mutación EGFR previamente tratados con inhibidores específicos, demostró un 60% de respuesta en población con mutación T790M y cerca de un 30% en casos sin mutación T790M<sup>(21)</sup>.

Estos resultados han llevado a la aprobación por la FDA de Osimertinib en pacientes con tumores que han progresado a inhibidores de primera o segunda generación y donde se detecta la presencia de la mutación T790M como causa de la progresión. Por el contrario, Rociletinib abandonó su desarrollo clínico recientemente debido a resultados no confirmados. Actualmente hay otros inhibidores en desarrollo como Olmutinib o ASP8273 con ensayos clínicos en marcha (NCT02500927, NCT02485652, y NCT02588261).

De igual modo, nuevas mutaciones de resistencia se han descrito ya para inhibidores de EGFR de tercera generación. En este sentido, estudios preclínicos han demostrado que la mutación de EGFR C797S confiere resistencia a esta tercera generación de agentes<sup>(22)</sup>. Otros mecanismos de resistencia que pueden desarrollarse pueden involucrar a factores de la transición epitelio-mesénquima, activación del eje mediado por las MAPK Kinasas o del IGF1R.

Cuando en pacientes con tumores portadores de mutaciones de EGFR se produce la progresión a los inhibidores convencionales y no se identifica la presencia de la mutación T790M, pueden estar involucrados otros mecanismos de resistencia como la activación de vías de señalización mediadas por otros oncogenes como amplificaciones en MET, HER2 y CRKL, sobreexpresión de AXL o mutaciones en KRAS o BRAF<sup>(23)</sup>.

La amplificación de MET se ha descrito en un 3-7% de pacientes y hasta en un 21% en enfermos previamente tratados con los agentes anti-EGFR de primera o de segunda generación.<sup>(24)</sup>

Tras varios agentes fallidos, nuevos fármacos como INC280 ha demostrado eficacia cuando se combina con agentes de primera generación en casos de progresión a los mismos por lo que su eficacia se está tratando de confirmar en ensayos clínicos (NCT01610336).

También se han descrito casos de transformación en un carcinoma de células pequeñas y no hay que olvidar que en cerca de un 30% de casos no se han identificado las causas de la progresión<sup>(25)</sup>.

### Métodos de medición

El estudio de mutaciones de EGFR deberá ser realizado en laboratorios que tengan una técnica homologada y reproducible para este procedimiento.

Para todo tipo de estudios de tipo molecular (EGFR, ALK, otros) es necesario tener material tumoral suficiente. Por tanto, si consideramos la cantidad y calidad del tejido tumoral, la muestra tumoral más idónea sería la procedente de una pieza quirúrgica, seguidas por las biopsias (bronquial, transbronquial, pleural o con aguja gruesa) y finalmente el bloque celular obtenido por citología.<sup>(26)</sup> También existe la posibilidad de realizar el estudio en suero<sup>(27)</sup>, aunque su sensibilidad dependerá de la cantidad de células tumorales circulantes que vendrá determinada, en gran medida, por el grado de afectación metastásica.

Con el fin de obtener la máxima rentabilidad, dado que el material disponible suele ser escaso y que cada vez se precisa realizar más estudios moleculares, se recomienda emplear una técnica de alta sensibilidad (<5%). En este sentido, la PCR en tiempo real (Taq-Man PCR, Scorpions ARMS, Cobas) sería el procedimiento más adecuado y la secuenciación directa (Sanger, Pirosecuenciación) sólo debería realizarse si tenemos al menos un 50% de células tumorales.<sup>(28)</sup>

Por todo lo anteriormente expuesto, hay varias fases del proceso de determinación de mutaciones de EGFR y de otras alteraciones genéticas que son críticas. En primer lugar, el material sobre el que se purificará el ADN tumoral debe ser evaluado por un patólogo experto que delimite la zona sobre la que se realizará la microdissección por láser, si está disponible, o la macrodissección sobre el portaobjetos donde está depositado el corte de la pieza original. Si existe material suficiente, se debe realizar una tinción con hematoxilina-eosina en los cortes situados en los extremos del material para extracción, asegurando así que existe una concentración similar en los cortes delimitados por ellos. En una segunda fase, debe garantizarse que la purificación del ADN es de suficiente calidad a través de los métodos estándares, evitando la secuenciación de *smears* o de ADN muy fragmentados, lo cual podría reducir la sensibilidad de la técnica. Además, es necesaria la presencia de controles internos de calidad, así como grupos controles que garanticen la existencia de la reacción.

En relación con la metodología de PCR que se debe emplear, es importante que se realice en centros con amplia experiencia en secuenciación automática o con experiencia en prestar servicio de secuenciación a centros externos. Además, sería necesario que la extracción del ADN sea automatizada. Por último, tanto la PCR para hibridación de la secuencia problema, como la necesaria para la secuenciación colorimétrica, deberían realizarse en el mismo centro, con lo que se evitarían manipulaciones adicionales del material.

No se recomienda el empleo estandarizado de técnicas ultrasensibles, con sensibilidad analítica menor del 1%, para la determinación de mutaciones ya que su interpretación

puede ser complicada. Este punto es muy importante especialmente cuando la muestra tiene alta celularidad tumoral y hay discrepancias entre la positividad del método ultrasensible y la negatividad de los métodos convencionales.

Finalmente, en los informes de la determinación de la mutación de EGFR, y, en general, en todos los estudios moleculares, el informe debe recoger todos los aspectos previamente descritos: calidad de la muestra tumoral, método de detección realizado y sensibilidad del mismo, tipo de mutación encontrada y posible sensibilidad de la misma al tratamiento con ITK.

Se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales para la identificación de la mutación de EGFR por técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados preliminares confirman un buen rendimiento de este procedimiento y sería una técnica más sencilla y por tanto accesible a un mayor número de centros para su detección<sup>(29)</sup>. Sin embargo, actualmente no se puede considerar un procedimiento estándar pero podría ser un buen método de cribado inicial en aquellos centros donde no se realiza la determinación de mutaciones de EGFR.

En los últimos años se está explorando la determinación de las mutaciones de EGFR en sangre. Este procedimiento permitiría poder realizar el test de mutaciones de EGFR cuando no es posible obtener material tumoral suficiente. Aunque todavía no es un proceso estandarizado los primeros estudios muestran una sensibilidad y especificidad cercana a los resultados obtenidos con la detección de las mutaciones en el tejido tumoral. Por otra parte, la detección de mutaciones de EGFR puede ser una herramienta útil para

### RECOMENDACIÓN

*Dada la eficacia de los ITK en pacientes con CPCNP que presentan mutación EGFR, el análisis de mutaciones de EGFR se debería hacer en el mayor número posible de pacientes con CPCNP avanzado. Ya que el problema en cáncer de pulmón es la presencia de muestra tisular tumoral suficiente para la realización de la mutación, y aunque no hay un consenso totalmente establecido, se recomienda la realización del análisis de mutaciones de EGFR siempre en los pacientes en los que se presume una mayor probabilidad de encontrar dichas mutaciones, como son los enfermos que nunca han fumado o cuyos tumores tienen una histología de carcinoma no escamoso o el género femenino. En el resto de pacientes, la realización de la determinación de la mutación queda sujeta al criterio clínico.*

## 2. Determinación de reordenamientos de ALK

La alteración del gen de la Kinasa del linfoma anaplásico (“Anaplastic Lymphoma Kinase”, ALK) fue descrita por primera vez en 1989 al identificarse una translocación recíproca entre los cromosomas 2 y 5 (t[2;5] [p23;q35]) en un grupo de enfermos con este tipo de linfoma, de ahí su denominación<sup>(30)</sup>. Posteriormente se describió cómo esta translocación creaba

un gen de fusión al combinar el extremo 5' del gen de la nucleofosmina (NPM) con la región 3' de la Kinasa<sup>(31)</sup>.

El gen ALK se localiza en el cromosoma 2 y codifica para un receptor transmembrana de la familia de los receptores de insulina y con homología con los receptores TK leucocitarios<sup>(32)</sup>. El receptor de ALK está formado por un dominio extracelular con un péptido señal amino-terminal, un dominio intracelular con un segmento yuxtamembranoso que acoge el lugar de unión para el substrato-1 del receptor de insulina, y un dominio carboxi-terminal. Su activación producirá dimerización del receptor y transmisión de la señal a través de las vías intracitoplasmáticas<sup>(33)</sup>. Su función fisiológica no está claramente definida: en modelos animales ALK parece que está implicada en el desarrollo neurológico, sistema visual y musculatura visceral durante la etapa embrionaria. En tejidos humanos adultos, ALK se encuentra a bajos niveles en intestino delgado, testículos y sistema nervioso. Las alteraciones de ALK pueden estar implicadas en diferentes tipos de tumores como linfomas no-hodgkinianos, tumores miofibroblásticos inflamatorios<sup>(34)</sup>, rabdomiosarcomas<sup>(35)</sup>, neuroblastomas, carcinomas tiroideos anaplásicos, renales y pulmonares. En tejidos donde ALK está presente o se reexpresa, la activación oncogénica de ALK se produce por mutaciones puntuales en el dominio TK del receptor, como ocurre en neuroblastomas<sup>(36)</sup> o en carcinomas tiroideos anaplásicos<sup>(37)</sup>.

En CPCNP, la principal activación de ALK se produce por la formación de genes de fusión aunque también se han descrito mutaciones<sup>(38)</sup>.

Para que la proteína de fusión resulte estable y activa debe haber unas condiciones estructurales adecuadas del gen de fusión y de la región específica de rotura. Así, la fusión de ALK con otros genes permite que una región promotora con capacidad funcional en el tejido donde se ubica active la región codificante de ALK de la misma manera que la forma nativa de ALK lo hace cuando se une a su ligando.

En el caso del CPCNP, el gen que con más frecuencia realiza la fusión con ALK es EML4 ("Echinoderm Microtubule-Associated protein-like 4"), que codifica una proteína citoplasmática involucrada en la formación de microtúbulos. Se genera una inversión del brazo corto del cromosoma 2 [Inv (2)(p21p23)] que une los exones 1-13 de EML4 a los exones 20-29 de ALK. La inversión cromosómica no siempre ocurre en la misma localización, por lo que se pueden formar diversas variantes aunque todas las fusiones incluyen siempre el dominio intracelular con actividad TK de ALK codificada en el exón 20. Sin embargo, los truncamientos de EML4 pueden localizarse en sitios diferentes aunque el dominio aminoterminal de EML4 es necesario y suficiente para generar la actividad transformante oncogénica de *EML4-ALK*. En CPCNP se han identificado más de trece variantes de *EML4-ALK*, las más comunes las E13;A20, y E6a/b;A20, (33 y el 29% de los casos, respectivamente). Además existen otros tipos menos frecuentes de fusiones génicas de ALK con otros genes como *TFG-11* y *KIF5B*<sup>(39)</sup>.

Todos estos reordenamientos generan una activación constitutiva del receptor ALK. Aunque las vías de señalización intracelular mediadas por ALK no han sido todavía bien definidas

parece que activan ERK y STAT3 mientras que no muestran influencia sobre PI3K<sup>(40)</sup>. La naturaleza oncogénica de la proteína de fusión como vía de desarrollo del cáncer de pulmón fue confirmada en ratones transgénicos portadores de EML4-ALK cuando en el epitelio pulmonar se evidenció la formación de adenocarcinomas de pulmón.

El perfil clínico donde ocurren los tumores de pulmón con presencia de la fusión de ALK suele responder a un patrón consistente en pacientes jóvenes, con edad de presentación sobre los 50 años, con leve predominio del género femenino, no fumadores, del tipo histológico de adenocarcinoma y ausencia de mutaciones de EGFR y KRAS. Dentro de los adenocarcinomas con reordenamiento de ALK son más comunes los patrones de tipo sólido-cribiforme, papilar o micropapilar<sup>(41)</sup>, y es muy característica la presencia de células en anillo de sello. El patrón citológico también es peculiar, ya que las células muestran abundante mucina intracelular y los núcleos son pequeños y están desplazados.

No obstante, se han descrito casos de alteración de ALK en todos los tipos de CPCNP por lo que los rasgos clínicos o patológicos no deben ser los únicos indicadores para realizar el estudio que detecte la translocación de ALK<sup>(42)</sup>. Por otra parte, la presencia de mutaciones de EGFR, tampoco excluiría la posibilidad de presentar una translocación de ALK ya que se ha descrito hasta en un 6% de CPCNP con mutaciones de EGFR<sup>(43)</sup>. Al igual que los casos con mutación de EGFR, la importancia de la determinación de ALK radica en que supone un subgrupo de enfermos con cáncer de pulmón con un comportamiento biológico diferente. Además, su tratamiento con inhibidores específicos de ALK ofrece mayor eficacia que los tratamientos convencionales.

En 2006 fue iniciado un estudio en fase I con Crizotinib, un inhibidor dual de ALK y MET. Posteriormente, al identificar la posible eficacia en pacientes con CPCNP y presencia de ALK, el estudio fue orientado específicamente para este tipo de pacientes. En octubre de 2010 se publicaron los primeros resultados con la experiencia de Crizotinib en 82 pacientes identificados con presencia de reordenamientos de ALK después de analizar muestras de, aproximadamente, 1.500 pacientes<sup>(44)</sup>. Se alcanzó una tasa de respuesta del 57% y un control de la enfermedad en el 90%. En la publicación final de este estudio, fueron incluidos 149 pacientes que alcanzaron una tasa de respuesta del 60.8% (95% CI 52.3-68.9)<sup>(45)</sup>. Además, la respuesta se logró con independencia de la edad, género, estado general o línea de tratamiento. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 9.7 meses (95% CI 7.7-12.8) y a los 6 y 12 meses estaban vivos el 87.9% (95% CI 81.3-92.3) y el 74.8% (95% CI 66.4-81.5), respectivamente.

Simultáneamente, dos ensayos en fase III, han confirmado la mayor actividad de Crizotinib sobre el tratamiento quimioterápico de segunda línea (estudio PROFILE 1007)<sup>(46)</sup>, y en primera línea de tratamiento (estudio PROFILE 1014), frente a quimioterapia con cisplatino y pemetrexed<sup>(47)</sup>.

Ante estos buenos resultados, la FDA autorizó el tratamiento con Crizotinib (Xalkori®, Pfizer, New York, USA) en agosto de 2011 para pacientes con CPCNP y reordenamiento de ALK.

Los CPCNP con translocación de ALK terminan desarrollando progresión a Crizotinib en un periodo de tiempo estimado de unos 10 meses. Aproximadamente un tercio de tumores desarrollan mecanismos de resistencia a Crizotinib relacionados con ALK. Otros mecanismos implicados en la resistencia y diferentes a los mediados por ALK, han sido descritos como alteraciones de EGFR, HSP90, KRAS, KIT o HER2. De este modo, se han encontrado amplificaciones y ganancia del número de copias, pero sobre todo aparición de mutaciones secundarias de ALK localizadas en el dominio kinasa del receptor que activan la vía mediada por ALK<sup>(48)</sup>. Entre todas ellas, la mutación L1196M es la más común e interfiere con la unión de Crizotinib al receptor, determinando así la resistencia. De alguna manera, esta sería la mutación equivalente a la T790M en los casos mutados para EGFR. También se han descrito otras mutaciones como G1269A, C1156Y, L1152R, G1202R, S1206Y, 1151Tins, F1174C, and D1203N.

Los nuevos inhibidores como Ceritinib o Alectinib, pueden ser activos contra tumores que desarrollan mutaciones de ALK. Sin embargo, la mutación G1202R confiere resistencia a estos agentes. Por suerte, se están desarrollando nuevos inhibidores como Lorlatinib (PF-06463922) que muestra actividad contra esta mutación y Brigatinib (AP26113) que tiene actividad dual contra la mutación de EGFR T790M y la mutación de ALK L1196M. Además, todos estos inhibidores han demostrado alta actividad en pacientes con afectación cerebral.

La afectación del sistema nervioso central es un lugar frecuente de afectación metastásica en los pacientes con tumores con fusión de ALK. Se estima que al momento del diagnóstico hasta un 20% de pacientes puede tener afectación en sistema nervioso central y tras el tratamiento con Crizotinib hasta un 50% de pacientes metastatizará a este nivel. Aunque Crizotinib posiblemente retrasa la recaída en sistema nervioso comparación con la quimioterapia<sup>(49)</sup>, nuevos inhibidores como Alectinib, Ceritinib, Brigatinib o Lorlatinib han demostrado eficacia tanto para erradicar la enfermedad en sistema nervioso como para prevenir la recaída a ese nivel.

Dados los buenos resultados obtenidos por Ceritinib en casos resistentes a Crizotinib, en pacientes con metástasis cerebrales y en casos no tratados previamente con Crizotinib, han llevado a la autorización por la FDA en 2014 como tratamiento de segunda línea<sup>(50)</sup>. Dos estudios en fase III están comparando la eficacia de ceritinib frente a quimioterapia tanto en primera como en segunda línea (NCT01828099, NCT01828112). Alectinib también ha sido aprobado por la FDA como opción de segunda línea al haber demostrado eficacia tras progresión a Crizotinib (50% de respuesta y 79% de control de la enfermedad), hasta un 93,5% de respuestas en pacientes sin tratamiento previo y con alta eficacia en casos de enfermedad en sistema nervioso<sup>(51)</sup>. Dados<sup>(52)</sup> estos buenos resultados, los ensayos ALEX están comparando la eficacia y seguridad de Alectinib frente a Crizotinib en primera línea.

### Métodos de medición

La presencia de reordenamientos de ALK puede estar entre el 3 y el 10% de los CPCNP<sup>(53)</sup>. Esta amplia variación podría deberse a diferencias raciales, falta de diagnóstico

en la población con CPCNP o ausencia de un método diagnóstico establecido y extendido. En España, la incidencia de tumores de pulmón con presencia de la fusión de ALK se sitúa sobre el 3-4%, si bien podría ser superior. Por ello, es imprescindible establecer la determinación de los reordenamientos de ALK para identificar a todos los potenciales pacientes.

Las alteraciones moleculares de ALK se pueden identificar por hibridación *in situ* (ISH), por inmunohistoquímica (IHQ) y por RT-PCR. Actualmente, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es el procedimiento diagnóstico de referencia a nivel clínico<sup>(54)</sup> y el único aprobado por la FDA mediante la utilización de la sonda de FISH Vysis ALK Break Apart Probe Kit (Vysis LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe; Abbott Molecular, Abbott Park, IL). Para definir una muestra como positiva, tiene que existir más de un 15% de células tumorales con señales divididas, en una muestra de al menos 60 células.

La posterior recomendación de la Agencia Europea permite cualquier técnica, sobre todo el FISH con diferentes sondas comerciales, pero también permite la IHQ e, incluso, la RTPCR. De hecho, la IHQ que puede ser un importante método de cribado inicial<sup>(55)</sup>. La IHQ emplea anticuerpos dirigidos contra la porción más distal del dominio TK de ALK, que se encuentra conservada en todos los reordenamientos y que constituye la parte activa de la molécula. El anticuerpo más estandarizado es el clon D5F3 que suministra Ventana®. La mayor parte de casos positivos presentan una tinción citoplasmática granular intensa y homogénea a lo largo del tumor, mientras que se considera un resultado negativo cuando hay ausencia total de tinción o una muy débil positividad.

Actualmente se propone la aplicación de la IHQ como método de cribado, aunque siempre hay que recordar el riesgo de resultados falsos negativos inherente a esta metodología y el perfecto valor predictivo positivo de las nuevas IHQ ultrasensibles, que harían innecesaria la confirmación posterior con FISH<sup>(56,57)</sup>.

### RECOMENDACIÓN

*El estudio de la detección de los reordenamientos de ALK debe realizarse en los pacientes con CPCNP de la variante de adenocarcinoma o en casos de CPCNP que no han sido fumadores y siempre que se sospeche de su posible existencia en un paciente con CPCNP avanzado.*

*Dado que parece que las mutaciones de EGFR son mutuamente excluyentes con los reordenamientos de ALK, el estudio de ALK puede hacerse de forma automática inmediatamente después de haber descartado una mutación de EGFR aunque también puede hacerse de forma simultánea.*

*El estudio mediante FISH es la técnica habitual de detección de los reordenamientos de ALK aunque la expresión por inmunohistoquímica puede ser una alternativa válida, especialmente para un cribado inicial al ser más fácil de realizar.*

*Habitualmente se prefiere realizar el estudio en material de biopsia pero si la citología obtiene un bloque celular adecuado también es un método válido.*

## BIOMARCADORES RECOMENDABLES

### 1. Translocación de ROS1

*ROS1* es un oncogen que codifica para un receptor TK huérfano relacionado con ALK que puede sufrir translocación en el 1-2% de los pacientes con CPCNP. Los pacientes que presentan esta alteración suelen ser jóvenes y no fumadores, tener adenocarcinomas y no tienen mutaciones de EGFR, KRAS, BRAF, HER2 o reordenamientos de ALK<sup>(58)</sup>. En un estudio fase I con crizotinib en pacientes con CPCNP con reordenamientos de ROS1 se demostró una tasa de respuesta del 72% y una mediana de control de la enfermedad de 17,6 meses, lo que ha llevado a la FDA a su aprobación<sup>(59,60)</sup>.

Sin embargo, Los tumores con translocación de ROS1 pueden desarrollar mutaciones de resistencia, G2032R y L2155S, situadas en el dominio kinasa del receptor ROS1<sup>(61)</sup>. Lorlatinib, un inhibidor de ALK y ROS1, ha mostrado actividad en estudios preclínicos frente a estas mutaciones que confieren resistencia<sup>(62)</sup>. En un estudio fase I/II trial, 22 con presencia de translocaciones de ALK o ROS1 este agente demostró alta actividad por lo que se están desarrollando ensayos clínicos en fase II (NCT01970865)<sup>(63)</sup>. Aunque la identificación de la fusión de ROS1 inicialmente se realizó por FISH actualmente se puede detectar de forma fiable por inmunohistoquímica<sup>(64)</sup>.

#### **RECOMENDACIÓN**

*Dado que los agentes inhibidores de ALK como Crizotinib han demostrado actividad en estos pacientes, actualmente se recomienda realizar la búsqueda de translocaciones de ROS1 en aquellos enfermos en los que se ha descartado la presencia de mutaciones de EGFR o reordenamientos de ALK y tienen un perfil clínico sugestivo.*

## BIOMARCADORES CON EVIDENCIA INSUFICIENTE (investigacionales )

### 1. Mutaciones de K-Ras

La activación de la vía mediada por Ras, especialmente a través de KRas, ocurre en un 30% de adenocarcinomas y en un 5% de carcinomas epidermoides <sup>(65)</sup>. Además, la mutación que provoca la inactivación de NF1 RasGAP se describe en un 7% de CPCNP. Esta inactivación de NF1 RasGAP es mutuamente excluyente con la de EGFR y provoca una estimulación de todas las isoformas de RAS, aunque no se sabe si produce un efecto similar a los KRAS mutados o actúa más como mecanismo de resistencia a los anti-EGFR. Las mutaciones de KRAS en CPCNP ocurren en los codones 12 y 13, y están asociadas al hábito tabáquico y se han relacionado con un comportamiento tumoral más agresivo. A pesar de que hay datos que apuntan a que la presencia de mutaciones de KRAS puede tener un valor como factor pronóstico y factor predictivo negativo de respuesta a la quimioterapia y de evolución del tumor este hecho no ha podido ser completamente confirmado.

Por el contrario, la presencia de mutaciones de KRAS sí se relaciona significativamente con la ausencia de mutaciones de EGFR y con la resistencia a los ITK de EGFR.

Actualmente se están probando agentes que pueden bloquear niveles inferiores de la vía de señalización de RAS como los inhibidores de MEK 1 / 2 y ERK, tanto en mutados como en no mutados en KRAS, e inhibidores de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR<sup>(66)</sup>. Algunos centros realizan determinación de las mutaciones de KRAS como estrategia para considerar tumores con mayor agresividad o para descartar la determinación de otras determinaciones que son excluyente. Sin embargo, dada la escasez de muestra tumoral y la falta de tratamientos activos la mayoría de centros prefieren hacer la detección de mutaciones tratables como EGFR o ALK.

### RECOMENDACIÓN

*Hasta el momento, la búsqueda de inhibidores específicos eficaces de KRAS ha resultado infructuosa.*

*Por eso, aunque la detección de mutaciones de KRAS puede excluir razonablemente la existencia de mutaciones de EGFR o de ALK, su determinación no sería prioritaria, dada la escasez de la muestra en CPCNP y la ausencia de un tratamiento específico eficaz.<sup>(67)</sup>*

## 2. Mutaciones de BRAF

BRAF es una proteína kinasa serina-treonina localizada en la vía de señalización de RAS. En CPCNP, la incidencia de mutaciones de BRAF se sitúa entre el 1 y 3% pero solo en un 50% se corresponde con la mutación V600E y suelen ser mutuamente excluyentes con las de KRAS y EGFR<sup>(68)</sup>. Son también más frecuentes en adenocarcinomas con historia previa de tabaquismo<sup>(69)</sup>. Las mutaciones de BRAF producirán un aumento de la actividad Kinasa que conducirá a una activación constitutiva de MAPK2 y MAPK3 implicada en el desarrollo del CPCNP.

Se están desarrollando inhibidores específicos de BRAF como vemurafenib<sup>(70)</sup> o dabrafenib solos o asociados a inhibidores de MEK como trametenib.<sup>(71)</sup>

### RECOMENDACIÓN

*Aunque la determinación de mutaciones de BRAF no se considera establecida, en pacientes con perfil clínico compatible donde se hayan excluido otras mutaciones puede valorarse su realización si existe acceso a ensayos clínicos con inhibidores específicos.*

## 3. Translocaciones de RET

RET es un receptor TK que puede presentar translocación en un 1-2% de los CPCNP<sup>(72)</sup>. Algunos estudios describen que estas translocaciones recurrentes de fusión de RET con varios genes puede llegar a estar presente hasta en un 12% de CPCNP<sup>(73)</sup>. Habitualmente el perfil clínico de los pacientes portadores de esta translocación se ca-

racteriza por ser jóvenes y no fumadores, tener histología de adenocarcinoma y no presentar ninguna de las otras alteraciones genéticas frecuentes.

Cabozantinib ha mostrado actividad en un estudio fase II en pacientes con tumores con fusión de RET, con 7 de 16 pacientes que respondieron con una mediana de supervivencia libre de progresión de 7 meses y una supervivencia global de 10 meses <sup>(74)</sup>. Otros inhibidores como lenvatinib (NCT01877083), apatinib (NCT02540824), vandetinib (NCT01823068), and ponatinib (NCT01813734) tienen estudios en marcha.

### RECOMENDACIÓN

*Aunque la determinación de translocaciones de RET no se considera establecida, en pacientes con perfil clínico compatible donde se hayan excluido otras mutaciones puede valorarse su realización si existe acceso a ensayos clínicos con inhibidores específicos.*

## 4. Alteraciones de MET

MET es el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGFR) situado en el cromosoma 7q21-q31. En CPCNP, se han encontrado tres tipos de alteraciones oncogénicas de MET: sobreexpresión, en un rango del 25 al 75% de casos, amplificación, en un 3 al 10%, y mutaciones solo en un 1%. Estas alteraciones se han descrito tanto en adenocarcinomas como en carcinomas epidermoides y son independientes de la presencia de mutaciones de KRAS o de EGFR. También, la amplificación de MET se ha descrito en un 10 a un 20% de los pacientes cuyos tumores con mutación EGFR tienen resistencia adquirida a los ITK de EGFR.

Los primeros inhibidores de MET, tanto anticuerpos monoclonales como ITK, no mostraron resultados positivos en dos estudios fase III. Posiblemente parte de esta ausencia de beneficio pueda deberse a que no hay un método estandarizado de detección de las anomalías relacionadas con MET que permita una selección adecuada. En este sentido, tanto con los métodos de IHQ como de FISH se han descrito variaciones importantes y posiblemente el primer paso sea una definición adecuada de la mejor técnica a seguir. Sin embargo, se han visto respuestas con agentes con actividad inhibitoria de MET como crizotinib o cabozantinib tanto en casos de mutación como de amplificación de MET. Nuevos agentes como Glesatinib (MGCD265, Mirati) que tiene como diana MET y AXL ha demostrado eficacia en estudios fase I/II (NCT02544633) e INC280 muestra alta selectividad de inhibición de MET y se está explorando en diferentes situaciones solo o asociado a quimioterapia o erlotinib (NCT02468661).

Recientemente se han identificado las denominadas mutaciones “MET exon 14 skipping” que son alteraciones que implican a los sitios de “splicing” de ARN y en concreto al motivo DpYR, incluyendo Y1003, necesario para una correcta unión con la ubiquitina ligasa CBL<sup>(75)</sup>. Estas alteraciones pueden ser un nuevo mecanismo de activación oncogénica de MET que pueden estar presentes en un 2.7% de carcinomas, incluyendo varias histologías poco frecuentes como la adenoescamosa o la sarcomatoide donde puede estar

hasta en un 8% de casos pero también en los adenocarcinomas, casi en un 3% o en los escamosos, en un 2%. La edad media de estos pacientes es de 73 años, en un 60% son mujeres y en el 15% hay amplificación concurrente de MET. Inhibidores de MET como crizotinib ha demostrado actividad en tumores portadores de esta mutación<sup>(76)</sup>.

### RECOMENDACIÓN

*Los métodos para el análisis de las alteraciones de MET deben de ser estandarizados. Por tanto, actualmente no se recomienda realizar determinaciones buscando alteraciones de MET fuera de estudios de investigación. El posible papel de las mutaciones MET exon 14 skipping está en fase de investigación pero puede obtener resultados interesantes en el futuro.*

## 5. Mutación de HER-2

HER-2 es un receptor de la familia ERBB que puede encontrarse sobreexpresado en un 35% y amplificado en un 20% de casos de CPCNP, especialmente adenocarcinomas, aunque las mutaciones solo se presentan en un 2% de los casos<sup>49</sup>. Las terapias especialmente dirigidas contra HER-2 habitualmente empleadas en el tratamiento del cáncer de mama no han obtenido resultados evidentes en los casos de CPCNP. Por ello, se están probando nuevos agentes como Trastuzumab emtansine (NCT02289833) en estudios en fase II.

Las mutaciones de HER-2 suelen consistir en inserciones en el exón 20, especialmente afectando a la secuencia Tir-Val-Met-Ala en el codon 776. Esta mutación aparece sobre todo en mujeres, nunca fumadores, adenocarcinomas y población asiática. Además, no están presentes en tumores que contengan mutaciones de EGFR o de KRas. Estas inserciones provocan una activación constitutiva del receptor y las células tumorales que la contienen son sensibles a ITK duales contra EGFR y HER-2, pero no a inhibidores exclusivos de EGFR. El mayor estudio retrospectivo consiguió un 50% de respuestas con la combinación de trastuzumab y afatinib en casos con mutación HER-2. Por ello, estudios con afatinib están en marcha ya que esta agente podría tener eficacia contra tumores que tengan activo HER-2(NCT02369484).

Dacomitinib, ha demostrado un 13% de respuestas en un fase II para CPCNP mutados para HER-2<sup>(77)</sup>.

También<sup>(78)</sup>, se está evaluando la adición de inhibidores de mTOR debido a la dependencia de la mutación HER2 por la vía AKT/mTOR.

De hecho, Neratinib es un pan-HER inhibidor irreversible que en un estudio fase I en combinación con temsirolimus, un inhibidor de mTOR, mostró actividad en dos de los seis casos con mutaciones de HER<sup>(79)</sup>.

Con estos resultados, un estudio fase II está probando la eficacia de Neratinib solo o asociado en esta población (NCT01827267).

### RECOMENDACIÓN

*En pacientes con perfil clínico compatible y que se hayan descartado otras mutaciones habituales podría plantearse el estudio de HER-2. Posiblemente los estudios convencionales empleados en carcinomas de mama como IHQ o FISH no sean capaces de predecir la presencia de mutaciones que se presentan en el CPCNP. Por ello, debería realizarse el estudio de la mutación específica de HER-2. La realización de la determinación debería realizarse siempre que en caso de resultar positiva se pueda ofrecer al paciente un inhibidor específico.*

## 6. Translocaciones de NTRK

El gen NTRK codifica para la kinasa del receptor de la tropomiosina. En los últimos años se han descrito proteínas de fusión implicadas en CPCNP como MPRIP–NTrk1 y CD74–NTrk1 que provocan una actividad constitutiva de TrkA en hasta un 3.3% de pacientes con CPCNP. También se han visto fusiones con este gen en un pequeño grupo de enfermos con cáncer de colon y paulatinamente se han identificado nuevas fusiones como TRIM24–NTRK2 en tumores de pulmón <sup>(80)</sup>.

Entrectinib (RXDX-101) es un inhibidor múltiple de ALK, ROS1 y también de TRK que ha mostrado eficacia en diferentes tumores, por lo que varios ensayos con inhibidores específicos de TRK están probando su posible eficacia (NCT02576431, NCT01639508).

## 7. Otros métodos de determinación de las alteraciones de EGFR

Aunque inicialmente se propuso el FISH como posible método de predicción de respuesta a Erlotinib en el estudio BR.21<sup>(81)</sup>, la posterior descripción de las mutaciones de EGFR desbancó al FISH como sistema predictivo. La técnica de FISH se ha relacionado también con la potencial actividad de los ITK en casos de tumores con ausencia de mutaciones de EGFR. Sin embargo, estudios posteriores que han demostrado la eficacia de Erlotinib como tratamiento de segunda línea o como mantenimiento no han confirmado este papel, por lo que en la actualidad no se recomienda su realización para esta indicación.

Más tarde el FISH se ha empleado para predecir la respuesta a anticuerpos monoclonales contra EGFR, como Cetuximab<sup>(82)</sup>, aunque un subanálisis posterior estableció una mejor correlación con los niveles de expresión por IHQ<sup>(83)</sup>.

Los estudios de FISH tienen el inconveniente de que no están disponibles en muchos centros y de que precisan de sistemas de estandarización que marquen el número de copias del gen y el tipo de anomalías genéticas. La técnica de inmunohistoquímica es de más fácil realización y muy utilizada en patología, aunque el empleo de baremos o scores de expresión exige un entrenamiento mayor.

**RECOMENDACIÓN**

*Actualmente, no se recomienda la determinación de otras técnicas para la expresión de EGFR en sustitución de las mutaciones de EGFR a la hora de predecir la respuesta a ITK de EGFR.*

**8. Otras alteraciones en estudio**

Existen otras alteraciones cuya incidencia puede ser del 1% o incluso inferior que están en estudio como las mutaciones de MAPK2, vía PI3K y AKT. La mayoría de ellas están en fase de investigación y su interés radica en el desarrollo paralelo de inhibidores específicos.

En el caso del carcinoma escamoso, donde se han detectado menor incidencia de mutaciones activadoras, el interés se ha centrado en las mutaciones o la amplificación de PI3KCA, la amplificación de FGFR1 y las mutaciones de DDR2.

En los carcinomas neuroendocrinos, especialmente los carcinomas de células pequeñas no se han identificado biomarcadores de relevancia clínica. Recientemente, se ha descrito que las alteraciones en una proteína involucrada en la vía NOTCH, DLL-3, puede estar presente hasta en un 67% de carcinomas de células pequeñas. Los primeros estudios con un anticuerpo específico, Rovalpituzumab, han demostrado resultados interesantes que deben ser confirmados en los estudios en marcha<sup>(84)</sup>.

También, los nuevos avances en el campo de la Inmunoterapia pueden requerir la identificación de PD-L1 en el estudio. Los múltiples ensayos actualmente en marcha con anticuerpos contra PD-L1 o PD-1 darán una respuesta en este ámbito.

**9. Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento**

En los últimos años se ha estudiado el papel de diferentes marcadores farmacogenómicos como herramienta de predicción de respuesta a los quimioterápicos empleados en CPCNP<sup>(85)</sup>. De este modo, se han analizado factores relacionados con la resistencia a platinos (ERCC1<sup>(86)</sup>, BRCA 1), a taxanos (BRCA1)<sup>(87)</sup>, a pemetrexed (TS)<sup>(88)</sup> o a gemcitabina (RRM1)<sup>(89)</sup>. Hasta el momento, ninguno de ellos ha demostrado tener un valor predictivo por lo que no pueden ser recomendados en la práctica asistencial. No obstante, un gran desarrollo investigador en este campo sigue en marcha.

En la actualidad, tampoco hay ningún factor capaz de determinar la respuesta a los antiangiogénicos o el desarrollo de toxicidad asociada. En el momento actual, Bevacizumab tiene su indicación como tratamiento de primera línea en combinación con quimioterapia y Nintedanib y Ramucirumab han alcanzado recientemente la aprobación en combinación con Docetaxel.

Por todo ello, se debe continuar desarrollando una labor investigadora en este campo. Se recomienda incluir estudios de biomarcadores relacionados con la angiogénesis en los ensayos a realizar.

## 10. Biomarcadores predictivos de respuesta a la Inmunoterapia

Recientemente la Inmunoterapia a través de los agentes anti-PD1 y anti-PD-L1 ha demostrado un beneficio muy significativo en el tratamiento de segunda línea de los pacientes con GPCNP. En el caso de Nivolumab, dos ensayos en fase III confirmaron el beneficio de este anticuerpo frente a docetaxel en pacientes con histología epidermoide<sup>(90)</sup> y no epidermoide<sup>(91)</sup>. Pembrolizumab es otro anticuerpo que también demostró ese beneficio pero definiendo los pacientes en función de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1<sup>(92)</sup>. De este modo, se delimitaron varios grupos desde expresión nula, a expresión del 1 al 49% o mayor del 50%. En aquellos pacientes con expresión superior al 50% se objetivó una mayor tasa de respuesta y una mejor supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Posteriormente, un nuevo ensayo que realizó la selección de los pacientes en función de la expresión positiva de PD-L1 confirmó el beneficio de este biomarcador. Sin embargo, los ensayos con Nivolumab no demostraron de forma retrospectiva el papel de la expresión de PD-L1 a la hora de seleccionar los potenciales candidatos a beneficiarse de la inmunoterapia. De hecho hay pacientes con expresión leve o negativa que también alcanzaron respuesta. Por ello, aunque una expresión intensa de PD-L1 parece determinar una alta probabilidad de respuesta y eficacia a la inmunoterapia todavía hay que determinar muchos aspectos como el anticuerpo a emplear, ya que se han utilizado diferentes con los distintos fármacos, definir cuál es el punto de corte que defina la positividad, la biopsia a emplear, etc<sup>(93)</sup>. Nuevos inmunoterápicos como Atezolizumab han apostado por hacer un índice que combina la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales con la expresión en células infiltrantes<sup>(94)</sup>. Por ello, parece que la realización inmunohistoquímica de PD-L1 puede ser un primer biomarcador a realizar en un futuro próximo si se consolida su consistencia<sup>(95)</sup>. De hecho, si se confirmara la relación entre este marcador y la eficacia a la inmunoterapia podría ser utilizado para seleccionar los candidatos a este tratamiento, incluso en primera línea y como alternativa a la quimioterapia.

### RECOMENDACIÓN

*Aunque actualmente no está incorporada de forma rutinaria la realización de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 y no se ha podido demostrar su consistencia en todos los pacientes, los primeros estudios apuntan a un potencial valor cuando el tumor tiene una expresión claramente positiva. Por ello, en espera de una mejor definición de la técnica y del anticuerpo para realizar la inmunohistoquímica y definir su inmunorreactividad puede ser un biomarcador a incorporar en un futuro próximo como una opción de selección de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer de pulmón.*

## 11. Importancia del diagnóstico patológico en Cáncer de Pulmón

La diferenciación de los tipos histológicos del CP es muy importante, ya que establece la estrategia terapéutica a considerar y concretar el tipo de tratamiento.

En primer lugar, porque permite diferenciar los CPCNP de los de células pequeñas que tienen un abordaje terapéutico y evolución diferentes, donde la quimioterapia es el tratamiento de elección y la radioterapia torácica estará indicada en casos limitados.

Los principales tipos histológicos del CPNM son el adenocarcinoma, el carcinoma epidermoide o escamoso y el carcinoma de célula grande, según ha definido la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>(96)</sup>. La incidencia de estos tres tipos ha cambiado en los últimos años, de forma que se ha incrementado el adenocarcinoma al tiempo que se va reduciendo el carcinoma epidermoide<sup>(97)</sup>.

Utilidad clínica: valor predictivo y valor pronóstico de los subtipos histológico. La importancia de los subtipos histológicos en el CPCNP puede justificarse por diversas razones: cada tipo de carcinoma procede de células con diferente origen embriológico y surge de distintas localizaciones anatómicas (vía central o periférica), con lo que las funciones de las mismas serán diferentes y, por tanto, la respuesta al tratamiento o la evolución pueden discurrir en función de estos factores. En segundo lugar, algunas mutaciones son más frecuentes en ciertos tipos histológicos como, por ejemplo, las de KRAS o EGFR, que se asocian más frecuentemente con adenocarcinomas. Por ello, un tratamiento específico contra una diana podría depender, también, del tipo histológico donde esa diana es más relevante en el desarrollo de la neoplasia. De igual modo, los distintos quimioterápicos actúan sobre ciertas vías celulares cuya función puede variar según el tipo histológico del tumor.

### **El tipo histológico como factor predictivo de respuesta a pemetrexed**

Datos de dos estudios aleatorizados en fase III de quimioterapia, un análisis retrospectivo del estudio pivotal de pemetrexed frente a docetaxel en segunda línea<sup>(98)</sup> y un análisis prospectivo del ensayo que comparó cisplatino y gemcitabina frente a cisplatino y pemetrexed en primera línea de tratamiento<sup>(99)</sup> han atribuido un valor significativo al subtipo histológico en relación con la respuesta al tratamiento. De este modo, pemetrexed ha demostrado actividad en los tumores de histología no escamosa, tanto en primera línea, asociados a platinos, en mantenimiento y en segunda línea en monoterapia.

### **Relación del tipo histológico con el tratamiento con bevacizumab**

En el estudio aleatorizado en fase II que objetivó el beneficio de la adición de bevacizumab a la quimioterapia basada en carboplatino y paclitaxel<sup>(100)</sup>, se observó que la mayor respuesta se producía en el grupo de pacientes con tumores no epidermoides. Además, se produjeron varios casos de hemorragia pulmonar mortal relacionada con el bevacizumab en enfermos con carcinoma epidermoide. No obstante, no se sabe si este incremento de la incidencia de hemorragia está directamente relacionado con el subtipo histológico epidermoide o con un mayor riesgo de sangrado de los tumores centrales con infiltración vascular, que en su mayoría son del tipo epidermoide. Por todo ello, los dos ensayos en fase III realizados para confirmar la eficacia de bevacizumab en el CPNM sólo incluyeron tumores no epidermoides.

En relación con los nuevos antiangiogénicos indicados en segunda línea, Nintedanib solo ha demostrado su beneficio en la población no escamosa, principalmente adenocarci-

noma aunque su perfil de toxicidad no muestra hipertensión o hemorragias. Por el contrario, Ramucirumab ha mostrado eficacia en ambas histologías, escamosa y no escamosa, a pesar de tener un perfil de efectos secundarios similar al Bevacizumab en términos de hemorragia, hipertensión, proteinuria, etc.

### El tipo histológico como factor pronóstico

En una revisión de 408 publicaciones, realizadas entre 1982 y 2007, que exploraban el valor pronóstico o predictivo de la histología en el CPNM, sólo se identificaron unas 30 que aportaban una relación concluyente<sup>(101)</sup>. Once de ellas encontraron asociación con la evolución pronóstica y siete sugerían una predicción de la respuesta a la quimioterapia. Además, 14 publicaciones identificaron un valor pronóstico o predictivo cuando se empleaban inhibidores del EGFR.

La ausencia de resultados concluyentes se ha debido a la falta de una metodología homogénea, con un material histológico insuficiente y con una variación en la clasificación de subgrupos. A pesar de estas dificultades, se sugiere que la histología podría ofrecer una información pronóstica y predictiva relevante, por lo que los futuros estudios deberán ser diseñados teniendo en cuenta el análisis de los subtipos histológicos.

### Diferencias entre biopsia y citología para el diagnóstico patológico

La citología da una información limitada de la celularidad tumoral y no permite obtener datos sobre la arquitectura del tumor. Por ello, en la actualidad se recomienda la obtención del diagnóstico de neoplasia mediante biopsia por fibrobroncoscopia o con biopsia de aguja gruesa. Es evidente que el tamaño de la muestra que se consigue por vía endoscópica es muy reducido, pero suele ser suficiente para realizar un diagnóstico apropiado del tipo histológico. En un estudio comparativo entre biopsias bronquiales y biopsias obtenidas por toracotomía, hubo buena correlación entre ambos métodos<sup>(102)</sup>.

Las principales discrepancias en el diagnóstico histológico se dieron cuando existía necrosis extensa o ausencia de diferenciación, y es que se estima que puede haber una heterogeneidad tumoral importante en cerca de un 45% de los carcinomas estudiados. Una vez conseguido el material adecuado, se debe realizar un diagnóstico anatomopatológico del cáncer de pulmón que diferencie los tipos histológicos de forma precisa. Para ello, será necesario aplicar la técnica de inmunohistoquímica basada principalmente en la determinación de marcadores neuroendocrinos, TTF-1 y p63 o p40.

### RECOMENDACIÓN

*El diagnóstico de CPNM debe definir el tipo histológico concreto, haciendo la distinción entre epidermoide y no epidermoide, lo que permitirá decidir si el paciente es candidato a tratamiento con bevacizumab o pemetrexed. Además, el tipo histológico podría sugerir la realización de un estudio de mutaciones en EGFR y reordenamientos de ALK para el tratamiento con ITK específicos. De hecho, el adenocarcinoma es el que se asocia con mayor frecuencia a estas alteraciones genéticas. Por ello, actualmente no debería ser aceptable el diagnóstico aislado de carcinoma no microcítico de pulmón.*

## 12. Nuevas técnicas de detección de alteraciones genéticas

Ante la detección de alteraciones moleculares individuales, el siguiente paso trató de analizar la presencia de múltiples anomalías génicas mediante diferentes técnicas: el estudio de perfiles expresión génica<sup>(103)</sup>, los estudios de expresión en tejidos mediante inmunohistoquímica o los estudios de proteómica<sup>(104)</sup>. Sin embargo, estos procedimientos han tenido resultados dispares posiblemente porque las técnicas de realización no estaban optimizadas, no había una buena homogeneización de los grupos evaluados y los análisis bioinformáticos de datos tenían gran complejidad y dificultad de interpretación.

Por todo ello, ante la necesidad de tener que analizar múltiples alteraciones genéticas, en los últimos años se han incorporado los denominados métodos de nueva generación que permiten la secuenciación masiva de genes. Mediante este tipo de plataformas se podrían analizar en una sola prueba las principales alteraciones moleculares necesarias para orientar el diagnóstico y el tratamiento del CPCNP. Aunque estas técnicas de secuenciación masiva están todavía en fase de investigación, su desarrollo está siendo muy rápido y en estudios de grupos seleccionados se está demostrando una mayor rentabilidad que la determinación molecular individual aportando información muy valiosa que orienta tanto al pronóstico como a nuevas opciones de tratamiento<sup>(105)</sup>.

Por otra parte, ante la dificultad de obtener material tumoral, otra aproximación sería el estudio de la muestra sanguínea del paciente, lo que se ha denominado como “Biopsia Líquida”<sup>(106)</sup>. Para hacer esta aproximación se utiliza la caracterización molecular de células tumorales circulantes (CTC) y la búsqueda del ADN libre circulante (cDNA) en el suero mediante técnicas muy sofisticadas de alta sensibilidad. Aunque se trata de un campo de máximo interés, por el momento debe considerarse dentro del ámbito de la investigación. Sin embargo, los avances en este campo están siendo muy rápidos. Así por ejemplo, ya es posible la determinación de mutaciones de EGFR, con resultados que alcanzan alta especificidad (superior al 90%) pero con una sensibilidad todavía baja (alrededor del 70%) que con toda seguridad será mejorada con las nuevas técnicas. Esta estrategia de la “Biopsia Líquida” permite dos aproximaciones muy interesantes: en primer lugar, permitirá la posibilidad de realizar estudios moleculares en aquellos casos en los que no exista cantidad de tejido tumoral suficiente o el acceso al mismo no sea posible. Por otra parte, algunos estudios han demostrado cómo el seguimiento de estas mutaciones en la sangre puede servir de monitorización al tratamiento, al haber podido relacionar su desaparición con la respuesta al tratamiento dirigido o su reaparición con la recaída<sup>(107)</sup>. De confirmarse estos datos, esta monitorización molecular podría ser mucho más sensible y más precoz que la habitualmente realizada mediante el seguimiento clínico o radiológico.

### RECOMENDACIÓN

*Las nuevas estrategias de análisis molecular masivo mediante técnicas de alto rendimiento o los estudios de “biopsia líquida” se encuentran todavía en fase de investigación. No obstante, los importantes y rápidos avances tecnológicos que han presentado estas aproximaciones con una mejoría significativa de su sensibilidad y especificidad y la reducción de los costes de los mismos permiten considerar su enorme potencial en un futuro próximo.*

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of nonsmall-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-39.
- (2) Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-500.
- (3) Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13306-11.
- (4) Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-55.
- (5) Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 2005; 24: 2513-20.
- (6) Sequist L, Martins RG, Spigel D, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2442-9.
- (7) Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009 Sep 3; 361: 958-67.
- (8) Mok TS, Wu yL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009 Sep 3; 361: 947-57.
- (9) Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al; North-East Japan Study Group. Gefitinib or chemotherapy for nonsmall-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; 362: 2380-8.
- (10) Mitsudomi T, Morita S, Yatabe y, et al; West Japan Oncology Group Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with nonsmall-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010 ;11: 121-8.
- (11) 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: 735-42.
- (12) 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;13:239-46
- (13) 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;31:3327-34.
- (14) Wu YL, Zhou C, Hu CP, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:213-22.

- (15) 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. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:828-60.
- (16) Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* (2006) 66(16):7854–8.
- (17) Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res* (2011) 17(5):1169–80.
- (18) Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* (2012) 13(5):528–38.
- (19) Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov* (2014) 4(9):1036–45.
- (20) Seto T, Kato T, Nishio M, Goto K, Atagi S, Hosomi Y, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* (2014) 15(11):1236–44.
- (21) Jänne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor – resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* (2015) 372(18):1689–99.
- (22) Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, 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):3924–33.
- (23) Sierra JR, Cepero V, Giordano S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. *Mol Cancer* (2010) 9:75. doi:10.1186/1476-4598-9-75
- (24) Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(52):20932–7.
- (25) Morinaga R, Okamoto I, Furuta K, Kawano Y, Sekijima M, Dote K, et al. Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation. *Lung Cancer* (2007) 58(3):411–3.
- (26) Molina-Vila MA, Bertrán-Alamillo J, Reguart N. A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 1224-35.
- (27) Maheswaran S, Sequist L, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359.

- (28) 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;66:381-5.
- (29) Kato Y, Peled N, Wynes MW, et al. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for nonsmall cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol* 2010;5:1551-1558.
- (30) Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA, et al. The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki1positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989; 866-70.
- (31) Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263: 1281-84.
- (32) 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, 439-49.
- (33) Souttou B, Carvalho NB, Raulais D, Vigny M. Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001; 9526-31.
- (34) Bridge JA, Kanamori M, Ma Z, et al. Fusion of the ALK gene to the clathrin heavy chain gene, CLTC, in inflammatory myofibroblastic tumor. *Am J Pathol* 2001; 411- 15.
- (35) van Gaal JC, Flucke UE, Roffen MH, et al. Anaplastic lymphoma kinase aberrations in rhabdomyosarcoma: clinical and prognostic implications. *J Clin Oncol* 2012;30, 308-15.
- (36) George RE, Sanda T, Hanna M, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455: 975-78.
- (37) Murugan AK, Xing, M. Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Res* 2011;71: 4403-11.
- (38) 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: 561-6.
- (39) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 3143-9.
- (40) Takezawa K, Okamoto I, Nishio K, et al. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2140-8.
- (41) Nishino M, Klepeis VE, Yeap BY, et al. Histologic and cytomorphic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2012; 25: 1462-72.
- (42) Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012; 461: 245-57.
- (43) Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res* 2011; 71: 605160.
- (44) Kwak EL, Bang yJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-703.

- (45) Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012;13:1011-9.
- (46) Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 2385-94.
- (47) Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* (2014) 371(23):2167-77.
- (48) Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* (2012) 18(5):1472-82
- (49) Solomon BJ, Cappuzzo F, Felip E, Blackhall FH, Costa DB, Kim DW, et al. Intracranial Efficacy of Crizotinib Versus Chemotherapy in Patients With Advanced ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From PROFILE 1014. *J Clin Oncol*. 2016 Mar 28. pii: JCO635888. [Epub ahead of print]
- (50) Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;370:1189-97.
- (51) Ou SH, Ahn JS, De Petris L, Govindan R, Yang JC, Hughes B, et al. Alectinib in crizotinib-refractory ALK-rearranged non-small-cell lung cancer: a phase II global study. *J Clin Oncol* (2016) 34(7):661-8.
- (52) Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, Chiappori AA, West HL, Azada MC, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol* (2014) 15(10):1119-28.
- (53) Sasaki T, Jänne PA. New Strategies for Treatment of ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancers. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 7213-8.
- (54) Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5581-90.
- (55) Conklin CM, Craddock KJ, Have C, et al. Immunohistochemistry is a Reliable Screening Tool for Identification of ALK Rearrangement in Non-Small-Cell Lung Carcinoma and is Antibody Dependent. *J Thorac Oncol*. 2013; 8: 45-51.
- (56) Conde E, Angulo B, Izquierdo E, et al. The ALK translocation in advanced non-small-cell lung carcinomas: preapproval testing experience at a single cancer centre. *Histopathology* 2013; 62: 609-16.
- (57) 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: 823-859.
- (58) Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30:863-70.

- (59) Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* (2014) 371(21):1963–71.
- (60) Kazandjian D, Blumenthal GM, Luo L, He K, Fran I, Lemery S, Pazdur R. Benefit-Risk Summary of Crizotinib for the Treatment of Patients With ROS1 Alteration-Positive, Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 2016 Jun 21. pii: theoncologist.2016-0101. [Epub ahead of print]
- (61) Song A, Kim TM, Kim DW, Kim S, Keam B, Lee SH, et al. Molecular changes associated with acquired resistance to crizotinib in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* (2015) 21(10):2379–87.
- (62) Zou HY, Li Q, Engstrom LD, West M, Appleman V, Wong KA, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112(11):3493–8.
- (63) Bauer MT, Shaw TA, Solomon B, Besse B, James LP, Clancy JS, et al. Phase I/II study of PF-06463922, an ALK/ROS1 tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring specific molecular alterations. *J Clin Oncol* (2015) 33(Suppl):abstrTS2620.
- (64) Viola P, Maurya M, Croud J, Gazdova J, Suleman N, Lim E, Newsom-Davis T, Plowman N, Rice A, Montero MA, Gonzalez de Castro D, Popat S, Nicholson AG. A Validation Study for the Use of ROS1 Immunohistochemical Staining in Screening for ROS1 Translocations in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016 Jul;11(7):1029-39.
- (65) Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; 455: 1069-1075.
- (66) Oxnard GR, Binder A, Janne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:1097-104.
- (67) Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *J Clin Oncol*. 2013;31:1112-21.
- (68) Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2011;29:2046-51.
- (69) Cardarella S, Ogino A, Nishino M, Butaney M, Shen J, Lydon C, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* (2013) 19(16):4532–40.
- (70) Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* (2015) 373(8):726–36.
- (71) Planchard D, Besse B, Groen HJ, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, Barlesi F, Kim TM, Mazieres J, Novello S, Rigas JR, Upalawanna A, D'Amelio AM Jr, Zhang P, Mookerjee B, Johnson BE. 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):984-93.
- (72) Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 2012;18:382-4.
- (73) Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2012) 30(35):4352–9.

- (74) Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* (2013) 3(6):630–5.
- (75) Reungwetwattana T, Ou SH. MET exon 14 deletion (METex14): finally, a frequent-enough actionable oncogenic driver mutation in non-small cell lung cancer to lead MET inhibitors out of “40 years of wilderness” and into a clear path of regulatory approval. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(6):820-4
- (76) Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, Halmos B, Goldman J, Forde P, Leuenerger K, Peled N, Kalemkerian GP, Ross JS, Stephens PJ, Miller VA, Ali SM, Ou SI. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Thorac Oncol*. 2016 Jun 22 [Epub ahead of print]
- (77) Kris MG, Camidge DR, Giaccone G, Hida T, Li BT, O’Connell J, et al. Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol* (2015) 26(7):1421–7.
- (78) Mazières J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* (2013) 31(16):1997–2003.
- (79) Gandhi L, Bahleda R, Tolaney SM, Kwak EL, Cleary JM, Pandya SS, et al. Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* (2014) 32(2):68–75.
- 80) Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* (2013) 19(11):1469–72.
- (81) Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer: molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 133-44.
- (82) Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3351-7.
- (83) O’Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 795-805.
- (84) Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med*. 2015;7(302):302ra136
- (85) Hsu DS, Balakumaran BS, Acharya CR. Pharmacogenomic strategies provide a rational approach to the treatment of cisplatin-resistant patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4350-7.
- (86) Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-91.
- (87) Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2443-9.

- (88) Nakagawa T, Otake y, Yanagihara K, et al. Expression of thymidylate synthase is correlated with proliferative activity in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2004; 43: 145-9.
- (89) Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4731-7.
- (90) Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *Engl J Med*. 2015;373(2):123-35.
- (91) Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.
- (92) Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al; KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018-28.
- (93) Aguiar PN Jr, Santoro IL, Tadokoro H, de Lima Lopes G, Filardi BA, Oliveira P, Mountzios G, de Mello RA. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Immunotherapy*. 2016;8(4):479-88.
- (94) Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-567.
- (95) Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria JC, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch*. 2016;468(5):511-25
- (96) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 ;137:668-84.
- (97) Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013;31:992-1001.
- (98) Peterson P, Park K, Fossella F, et al. Is pemetrexed more effective in adenocarcinoma and large cell lung cancer than in squamous cell carcinoma? A retrospective analysis of a phase III trial of pemetrexed vs. docetaxel in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) [abstract]. *J Thorac Oncol* 2007; 2: S851.
- (99) Scagliotti GV, Parikh P, Von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3543-51.
- (100) Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2184-91.
- (101) Hirsch FR, Spreafico A, Novello S, et al. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 1468-81.

- (102) Cataluña JJ, Perpiñá M, Greses JV, et al. Cell type accuracy of bronchial biopsy specimens in primary lung cancer. *Chest* 1996; 109: 1199-203.
- (103) Simon G, Sharma A, Li X, et al. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2741-6.
- (104) Yanagisawa K, Tomida S, Shimada y, et al. A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 858-67.
- (105) Suh JH, Johnson A, Albacker L, Wang K, Chmielecki J, Frampton G, et al. Comprehensive Genomic Profiling Facilitates Implementation of the National Comprehensive Cancer Network Guidelines for Lung Cancer Biomarker Testing and Identifies Patients Who May Benefit From Enrollment in Mechanism-Driven Clinical Trials. *Oncologist*. 2016;21(6):684-91.
- (106) Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb;32:579-86.
- (107) Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016 Jun 27. pii: JCO667162. [Epub ahead of print].