



Anatomía patológica y genética del adenocarcinoma de pulmón

Carmen Oquendo Marmaneu
Director TFG: Dr. Joaquín Soria

ÍNDICE:

Resumen	3
Introducción	5
Clasificación histopatológica para la práctica clínica	6
Clínica	8
Diagnóstico	9
Clasificación TNM	14
Tratamiento	15
Tratamiento del carcinoma de pulmón no microcítico por estadios	16
Nuevos fármacos biológicos en la terapia del CPCNP	17
Pronóstico	17
En desarrollo: biopsia líquida	17
Genética en el cáncer	20
Genética del carcinoma de pulmón no microcítico	20
Determinación de mutaciones de EGFR	22
Determinación de reordenamientos de ALK	26
Reordenamientos de ROS1	32
Bibliografía	34

RESUMEN

La oncología personalizada surge como consecuencia del estudio, en los Departamentos de Anatomía Patológica, de la base molecular del tumor de cada uno de los pacientes diagnosticados con la finalidad de identificar, aquellas dianas terapéuticas que puedan ser objeto de tratamientos oncológicos personalizados.

El adenocarcinoma es el subtipo histológico más comúnmente diagnosticado dentro del carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), además del que presenta un porcentaje más alto de oncogenes alterados y potencialmente tratables. Kris y cols. identificaron dianas terapéuticas en un 64% de los pacientes estudiados en su serie, demostrando la necesidad de llevar a cabo estos estudios mediante los cuales podemos ser capaces de encontrar tratamientos dirigidos para la mayoría de los pacientes (Kris MG et al, 2014).

Varias guías publicadas, incluyendo la más reciente desarrollada por el Colegio Americano de patólogos (CAP), la Asociación internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación para la Patología Molecular (AMP), guía CAP/IASLC/AMP, recomiendan el estudio de mutaciones somáticas en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el estudio del reordenamiento de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) en pacientes diagnosticados de adenocarcinoma, bien en el momento del diagnóstico y previamente al comienzo del tratamiento en pacientes con enfermedad metastásica o en la recidiva/progresión de la enfermedad en aquellos que previamente hubieran sido diagnosticados en estadios más iniciales y que no hubieran sido testados para estas alteraciones.

Abstract:

Personalized oncology therapeutic targets those that can be personalized cancer treatment study arises in the Departments of Pathology, the molecular basis of tumor of each patient diagnosed with the aim of identifying,. Adenocarcinoma is the histological subtype most commonly diagnosed cancer in the lung carcinoma (NSCLC), in addition to having a higher percentage of altered oncogenes and potentially treatable. Kris et al. They identified therapeutic targets in 64% of the patients in their series, demonstrating the need to carry out these studies by which we may be able to find targeted treatments for most patients (Kris MG et al, 2014). Several published guidelines, including the latest developed by the College of American Pathologists (CAP), the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) and the Association for Molecular Pathology (AMP), guide CAP / IASLC / AMP, recommend study somatic mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the study of reordering kinase anaplastic lymphoma (ALK) in patients diagnosed with adenocarcinoma, either at the time of diagnosis and prior to start of treatment patients with metastatic disease or relapse / progression of disease in those who had previously been diagnosed at earlier stages and that they had not been tested for these disorders

Palabras clave:

Cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma, marcadores moleculares, EGFR, ALK, ROS1.

Keywords:

Lung cancer, Non-small cell lung cancer, adenocarcinoma, molecular markers, EGFR, ALK, ROS1.

INTRODUCCIÓN

“Sabemos que una de cada dos personas nacidas hoy tendrá un cáncer a lo largo de su vida, lo que supone un reto de enormes proporciones a múltiples niveles. Globalmente la incidencia del cáncer sigue aumentando consecuencia del incremento de la población y de su envejecimiento.” Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM 2015).

Tabla 1

Tumores con más alta Incidencia, Mortalidad y Prevalencia a 5 años en el mundo (Informe GLOBOCAN 2012).

	HOMBRE	MUJER	AMBOS SEXOS
INCIDENCIA	PULMÓN 16%	MAMA 25%	PULMÓN 13%
MORTALIDAD	PULMÓN 23%	MAMA 14%	PULMÓN 19%
PREVALENCIA A 5 AÑOS	PRÓSTATA 25%	MAMA 36%	MAMA 19%

Tabla 2

Tumores con más alta Incidencia, Mortalidad y Prevalencia a 5 años España (Informe GLOBOCAN 2012).

	HOMBRE	MUJER	AMBOS SEXOS
INCIDENCIA	PRÓSTATA 21%	MAMA 29%	COLORRECTAL 15%
MORTALIDAD	PULMÓN 27%	MAMA 15%	PULMÓN 20%
PREVALENCIA A 5 AÑOS	PRÓSTATA 31%	MAMA 40%	PRÓSTATA 17%

Tabla 3

Cinco localizaciones de cáncer más frecuentes en España en 2012 (según nº de casos, en orden decreciente).

	HOMBRE	MUJER	AMBOS SEXOS
1º	PRÓSTATA	MAMA	COLORRECTAL
2º	PULMÓN	COLORRECTAL	PRÓSTATA
3º	COLORRECTAL	CUERPO DE ÚTERO	PULMÓN
5º	VEJIGA	PULMÓN	MAMA
5º	ESTÓMAGO	OVARIO	VEJIGA

Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M., Dikshit R, Eser S., Mathers C, Rebelo M., Parkin DM, Forman D, Bray F, GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

El cáncer de pulmón sigue siendo el de mayor incidencia y mortalidad en el mundo.

En España, el cáncer con mayor incidencia es el colorrectal (15%), el que produce mayor mortalidad es el cáncer de pulmón (20,6%), y el de mayor prevalencia a los cinco años, el cáncer de próstata (17,9%).

A nivel mundial, el cáncer con mayor incidencia es el de pulmón (13%), el de mayor mortalidad, de nuevo el cáncer de pulmón (19,4%) pero es el cáncer de mama el que presenta la mayor prevalencia a los cinco años (19,2%). Puede considerarse que se trata de datos epidemiológicos similares a los observados en nuestro país.

Una vez presentada la distribución del cáncer en el mundo y en nuestro país, observamos que el tipo de cáncer que más afecta a la población y que mayor tasa de mortalidad produce es el cáncer de pulmón. Por ello es fundamental estudiar y conocer todo lo posible sobre ésta enfermedad, su etiología, sus formas de presentación en la población, cuándo sospechar de su presencia en un organismo y cómo diagnosticarla y, una vez confirmada, cómo tratarla.

La máxima incidencia de las neoplasias malignas de pulmón se da en torno a los 60 años. La mayoría de estos tumores son primarios y malignos, aunque el pulmón también es una de las principales localizaciones de aparición de metástasis a distancia.

El cáncer de pulmón no microcítico o de células no pequeñas representa aproximadamente el 85% de todos los cánceres de pulmón.

En España, el tipo histológico más frecuente era el epidermoide, pero últimamente está aumentando la frecuencia del adenocarcinoma.

La estirpe histológica más frecuente en no fumadores es el adenocarcinoma.

En EEUU la estirpe más frecuente es el adenocarcinoma.

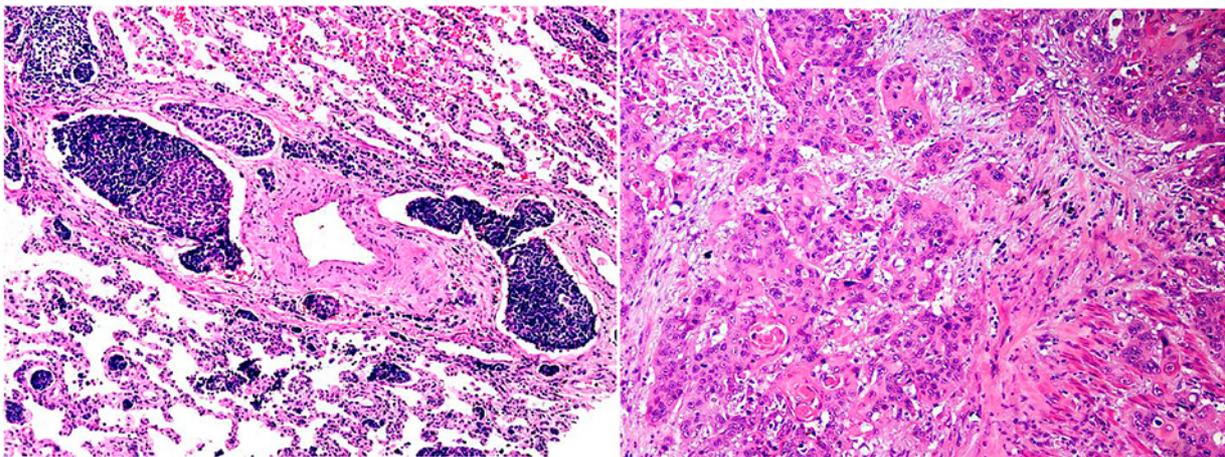
La incidencia y la mortalidad por cáncer de pulmón en mujeres se ha igualado a la de los varones, ha aumentado como consecuencia de su incorporación más tardía al hábito tabáquico.

CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA PARA LA PPRÁCTICA CLÍNICA

Los cánceres de pulmón se clasifican principalmente por su aspecto anatomopatológico, pero hoy en día también se incluye el estudio molecular de las mutaciones en EGFR y las translocaciones EML4- ALK por su capacidad predictiva de respuesta al tratamiento. Los dos principales tipos de cáncer de pulmón se distinguen por el tamaño de las células: Microcíticos (15-20 % de casos), llamado así porque las células son muy pequeñas, tiende a diseminarse con rapidez, por lo que rara vez se diagnostican cuando está localizado, y no microcíticos (80-85 % de casos), que a su vez se subdivide en adenocarcinoma (que comprende el 40-50 % de los cánceres de pulmón en general), carcinoma escamoso o epidermoide (25 %), y el de células grandes (10 %). La International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) acaban de hacer una nueva clasificación que diferencia entre adenocarcinomas invasores, adenocarcinoma in situ y adenocarcinoma mínimamente invasor por el aspecto radiológico, las diferencias moleculares, el pronóstico y las alternativas al tratamiento (Travis, W.D. et al, 2011).

Carcinoma de células no pequeñas

Carcinoma escamoso	
Adenocarcinoma	Mixto Acinar Papilar Bronquioloalveolar Sólido Fetal Mucinoso (coloide) Cistadenocarcinoma mucinoso Células en anillo de sello Células claras
Carcinoma de células grandes	Neuroendocrino Basaloide Semejante a linfoepitelioma Células claras Rabdoide
Adenoescamoso	
Sarcomatoide	Pleomórfico Fusocelilar Células gigantes Carcinosarcoma Blastoma pulmonar



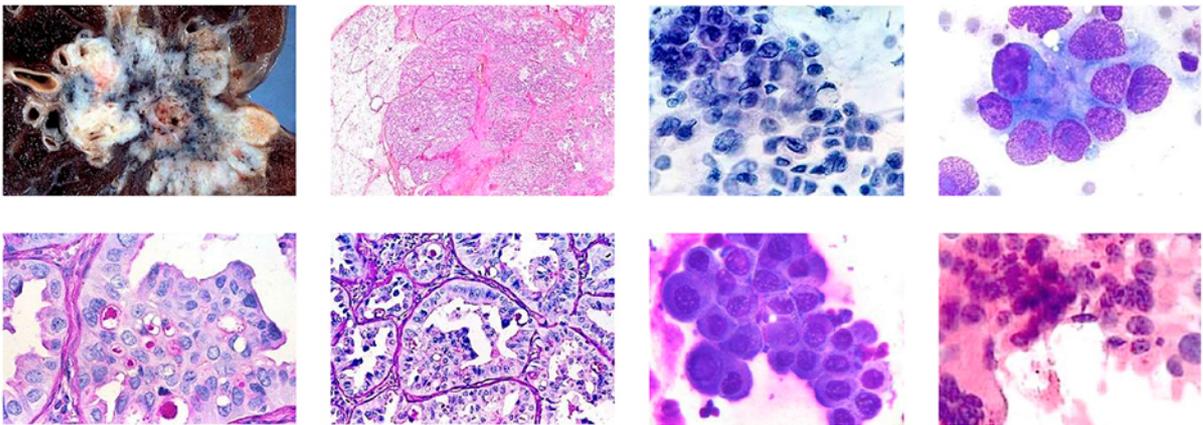
Imágenes de carcinoma microcítico y carcinoma epidermoide.

Dentro del carcinoma de pulmón no microcítico o de células no pequeñas (CPCNP), aparte de ser el adenocarcinoma el subtipo histológico más comúnmente diagnosticado, es también, el que presenta un porcentaje más alto de oncogenes alterados, y, en consecuencia, nos centraremos en él.

El Adenocarcinoma es el tumor que característicamente asienta sobre las cicatrices pulmonares crónicas, como son las cicatrices tuberculosas, y cuando así ocurre se le denomina "Scar cáncer".

Es el más frecuente entre los no fumadores. Suele presentarse como una masa periférica bien delimitada y no suele cavitarse. Es la causa más frecuente de nódulo pulmonar solitario maligno. Característicamente afecta a la pleura, siendo la causa más frecuente de derrame pleural maligno. Puede producir osteoartropatía hipertrófica, que consiste en la presencia de acropaquias junto con periostitis, y que cursa con dolor y tumefacción. Presenta metástasis extratorácicas en el 80% de los casos. Dentro de los CPCNP es el que tiene mayor tendencia a metastatizar vía hematógena.

Los adenocarcinomas se clasifican en acinar, papilar, invasivo mucoso, lepidico, miropapilar y sólido. La determinación de la clasificación es importantísima, pues nos permite valorar el pronóstico de nuestro paciente. El adenocarcinoma de predominio lepidico tiene mejor pronóstico (supervivencia del 95% a los cinco años) que el de predominio papilar y acinar, siendo el micropapilar el de peor pronóstico. En los subtipos de adenocarcinoma invasivo mucoso y lepidico, las células neoplásicas se disponen dentro de los alveolos y tienden a diseminarse por vía endobronquial, sin infiltración del parénquima adyacente. Pueden presentarse como un nódulo periférico o como un infiltrado parenquimatoso intersticial en la radiografía del tórax.



Imágenes de adenocarcinoma de pulmón: pieza macroscópica, histología y citología.

CLÍNICA

La forma de presentación es a menudo insidiosa, no produce síntomas hasta que la enfermedad está muy avanzada.

Los síntomas dependen de la localización del cáncer. Puede producir síntomas locales, que serán unos u otros en función de si la localización es central o periférica, manifestaciones por invasión de órganos vecinos, por afectación metastásica linfática o a distancia y síntomas paraneoplásicos.

En los tumores de localización central, más típica en el carcinoma epidermoide, la sintomatología local es consecuencia de una obstrucción bronquial, como es la tos productiva con o sin hemoptisis. Si la obstrucción de la luz bronquial es completa, puede ocasionar atelectasia y, si se infecta el parénquima pulmonar distal, se producen neumonías de repetición en el mismo lóbulo.

El carcinoma anaplásico de células grandes y el adenocarcinoma suelen presentarse como una masa periférica y suelen ser asintomáticos hasta fases avanzadas. La clínica local es consecuencia de la irritación pleural y cursa con dolor pleurítico, tos irritativa y disnea.

Cuando estos tumores invaden estructuras vecinas pueden presentarse cuadros de afectación regional como afonía por infiltración del nervio laríngeo recurrente, enfermedad pleural con o sin derrame, elevación de un hemidiafragma por infiltración del nervio frénico, síndrome de Horner por infiltración del sistema nervioso simpático cervicotorácico, síndrome de la vena cava superior, arritmias e insuficiencia cardíaca por infiltración del miocardio, taponamiento pericárdico por infiltración del pericardio... entre otros.

Cuando invaden los ganglios linfáticos regionales, aparecen adenopatías y, en ocasiones, linfagitis carcinomatosa, que cursa con disnea e infiltrados intersticiales.

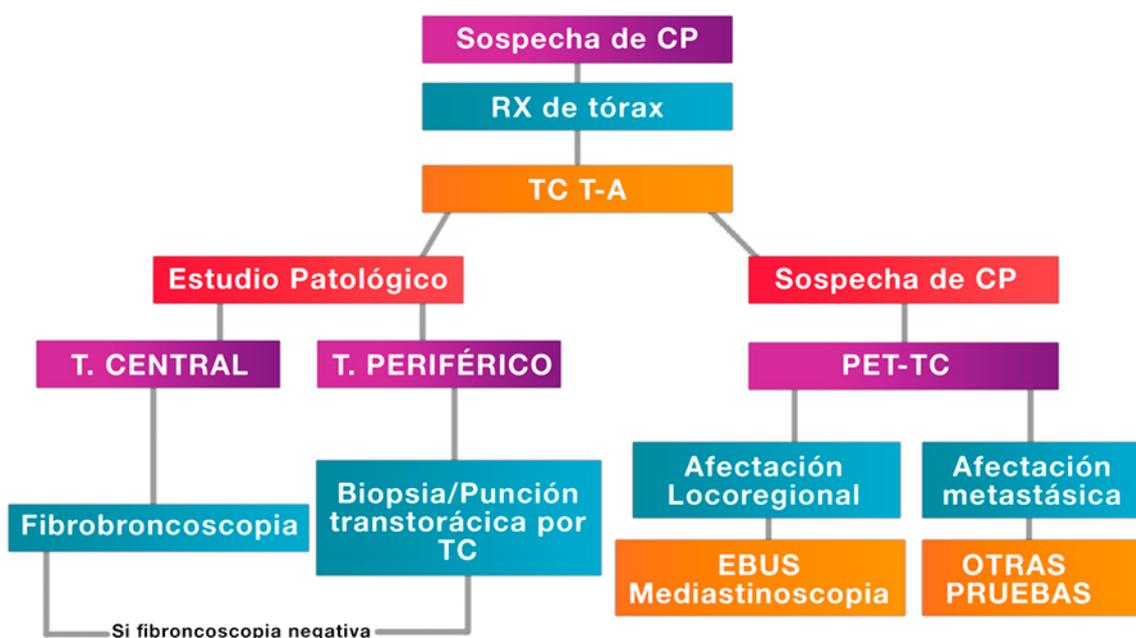
Las localizaciones más frecuentes de metástasis pulmonares son el hígado, el hueso, las glándulas suprarrenales y el cerebro.

DIAGNÓSTICO

En el momento del diagnóstico inicial, sólo en un 25% de los pacientes se encuentra la enfermedad localizada, en un 35%, la enfermedad se presenta en estadios localmente avanzados (estadio III ó IV). Aproximadamente el 80% de los pacientes con CPNM presentan enfermedad metastásica en alguna de sus fases evolutivas: el 30-40% en el momento del diagnóstico, el 50% como consecuencia de la recidiva de los estadios I-II y el 80% por progresión o recaída de los estadios III. En todos estos casos, la supervivencia es muy pobre.

Todo paciente con sospecha clínica de cáncer de pulmón debe ser remitido de forma preferente al servicio de Neumología correspondiente para su estudio, con el objetivo es confirmar el diagnóstico y realizar un estudio adecuado de operabilidad (capacidad del paciente para tolerar una cirugía de resección pulmonar sin excesivo riesgo para su vida ni de secuelas invalidantes) y resecabilidad (posibilidad evaluada en el estudio prequirúrgico de que el tejido tumoral pueda ser extirpado en su totalidad y con la obtención de un beneficio pronóstico demostrado o muy probable), clasificando adecuadamente al paciente y al tumor.

Cáncer de Pulmón: Algoritmo diagnóstico



Anamnesis y exploración física:

Se debe valorar la edad del paciente, los factores de riesgo a los que se ha visto expuesto a lo largo de su vida como el tabaquismo, la exposición laboral a asbesto, una historia de neoplasias previas, la existencia de enfermedades actuales asociadas, el estado clínico del paciente (índice de Karnofsky) y, por último, deben recogerse los síntomas y signos de enfermedad, especialmente aquellos que sugieran un estadio avanzado o enfermedad metastásica.

Radiografía de tórax:

Después de la historia clínica y la exploración física, otro aspecto fundamental en la evaluación del paciente con sospecha de cáncer de pulmón es la radiografía de tórax, que es la primera prueba complementaria a realizar y que puede mostrar, entre otros signos: la presencia de un nódulo pulmonar, el ensanchamiento mediastínico, atelectasia, patrón hiliar, derrame pleural... Ante cualquiera de estos hallazgos, el próximo paso a seguir será la toma de una muestra de tejido pulmonar tumoral para realizar una biopsia y poder confirmar la sospecha de cáncer de pulmón.

No debemos olvidar realizar una analítica que incluya hemograma, bioquímica general y coagulación y un ECG.

Estudio anatomopatológico:

Para la confirmación del diagnóstico de cáncer de pulmón es imprescindible el estudio anatomopatológico de la biopsia. En la mayoría de los casos, la muestra de tejido es obtenida a partir de la fibrobronscopia. Para una rentabilidad diagnóstica adecuada,

deben realizarse 3-4 biopsias y combinarlo con el estudio citológico del broncoaspirado.

En el caso de tumores centrales bastará con la realización de una biopsia bronquial, mientras que en los periféricos y de tamaño menor de 3 cm, la rentabilidad diagnóstica será menor, por lo que deberá realizarse una biopsia transbronquial o incluso una punción transtorácica o transparietal.

Una vez diagnosticado el tipo de cáncer de pulmón, es imprescindible determinar la extensión de la enfermedad, con el objetivo de descartar la afectación mediastínica o la presencia de metástasis a distancia que contraindiquen la cirugía con intención curativa.

TC de tórax y abdomen superior:

Es la técnica de elección para el estudio de extensión de la enfermedad. Ofrece una visión anatómica global de la enfermedad y permite la evaluación de la extensión tumoral intratorácica y la presencia de adenopatías mediastínicas. Como norma, se considera que la presencia de adenopatías mediastínicas mayores a 1 cm de diámetro en la TC obliga a confirmar su naturaleza neoplásica mediante histología, por exploración quirúrgica del mediastino (mediastinoscopia, mediastinotomía o toracoscopia) o mediante broncoscopia ecoguiada o EBUS, antes de plantear la exéresis tumoral.

EBUS:

Consiste en la realización de una broncoscopia y punción transbronquial o transtraqueal de las adenopatías guiada mediante ecografía. Se trata de una técnica en auge en los últimos años, con una sensibilidad del 87%, y con muchas menos complicaciones que la mediastinoscopia. Es útil para el estudio de las adenopatías paratraqueales bilaterales, traqueo-bronquiales, subcarinales e hiliares. En el caso de un resultado negativo en la punción mediante ecobroncoscopia se debe realizar una mediastinoscopia, ya que sigue siendo el gold estándar.

Mediastinoscopia:

Es la técnica de elección en la evaluación de las adenopatías paratraqueales derechas, traqueo-bronquiales proximales y subcarinales. Esta técnica es útil para ver el mediastino medio. Pero pueden surgir varias complicaciones derivadas de su uso, de las que las más frecuentes son la parálisis del nervio recurrente izquierdo y la infección de la herida quirúrgica y, las más graves, la mediastinitis y la hemorragia. Las adenopatías situadas en la ventana aortopulmonar y las cadenas preaórticas, son inaccesibles a la mediastinoscopia y requieren mediastinotomía anterior o toracoscopia.

Mediastinotomía:

Indicada en el carcinoma del lóbulo superior izquierdo y en los del bronquio principal izquierdo. Permite la visión del mediastino anterior.

Toracoscopia:

Está indicada cuando se observan en la TC torácica adenopatías paratraqueales derechas, aortopulmonares, paraesofágicas y en el ligamento pulmonar y en el estudio del derrame pleural.

La exploración quirúrgica está contraindicada cuando exista enfermedad neoplásica diseminada más allá del mediastino, y cuando el enfermo no pueda tolerar una futura cirugía de resección pulmonar (paciente inoperable).

RM:

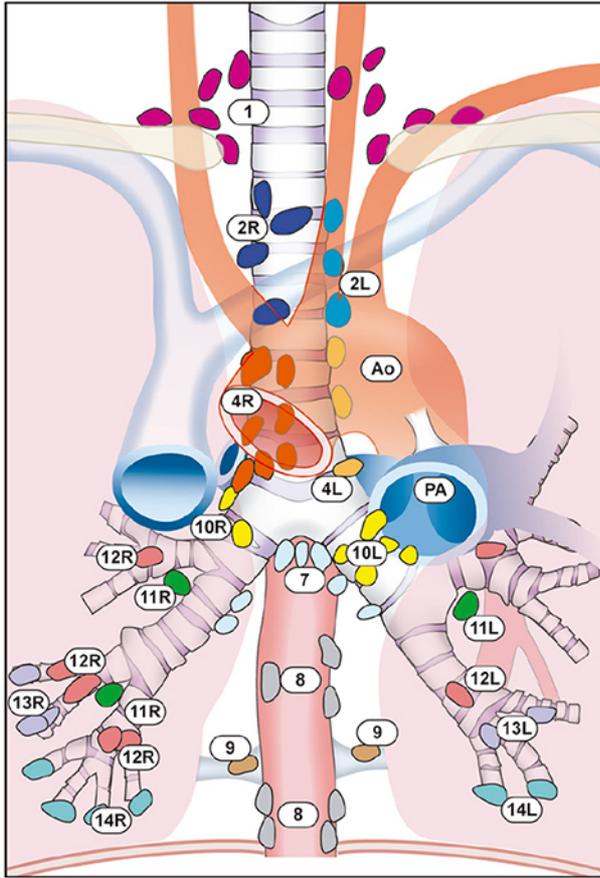
Es superior a la TC en las siguientes situaciones: adenopatías en la región subcarinal y/o ventana aortopulmonar, afección de la vena cava superior, arterias pulmonares y corazón y para la evaluación de los tumores apicales (tumor de Pancoast) ya que delimita mejor la invasión del plexo braquial, arteria subclavia y canal medular.

Gammagrafía ósea:

Indicada si hay dolores óseos u otros datos indicativos de metástasis óseas (hipercalcemia, elevación de la fosfatasa alcalina...).

TC craneal:

Indicada cuando existe sintomatología neurológica y en el cáncer microcítico de pulmón.



Supraclavicular zone

- 1 Low cervical, supraclavicular, and sternal notch nodes

Superior Mediastinal Nodes

Upper zone

- 2R Upper Paratracheal (right)
- 2L Upper Paratracheal (left)
- 3a Pre-vascular
- 3p Retrotracheal
- 4R Lower Paratracheal (right)
- 4L Lower Paratracheal (left)

Aortic Nodes

AP zone

- 5 Subaortic
- 6 Para-aortic (ascending aorta or phrenic)

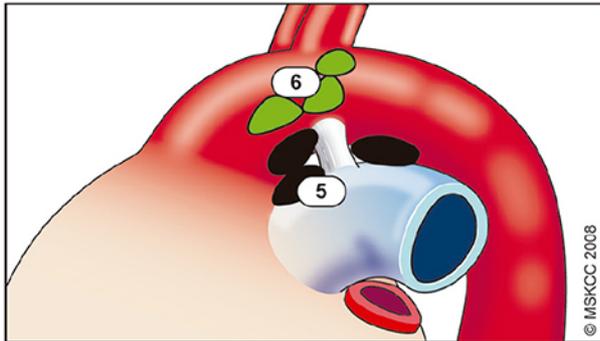
Inferior Mediastinal Nodes

Subcarinal zone

- 7 Subcarinal

Lower zone

- 8 Paraesophageal (below carina)
- 9 Pulmonary ligament



© MSKCC 2008

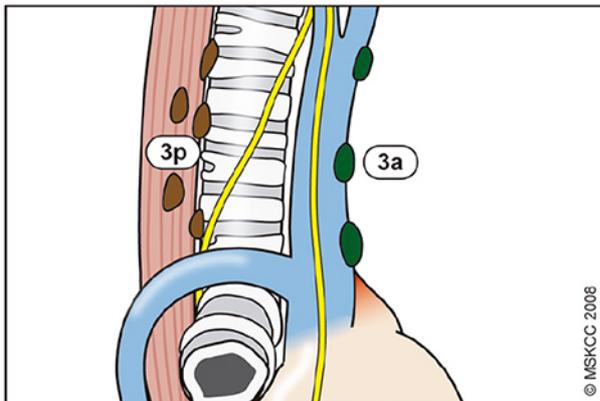
N₁ Nodes

Hilar/Interlobar zone

- 10 Hilar
- 11 Interlobar

Peripheral zone

- 12 Lobar
- 13 Segmental
- 14 Subsegmental



© MSKCC 2008

Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society

CLASIFICACIÓN TNM 7ª EDICIÓN, IASLC 2009 (International Association for the Study of Lung Cancer)

La última clasificación tumor, ganglio, metástasis (TNM), elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) permite una descripción estandarizada de los tumores pulmonares y encuadrar a los pacientes en estadios dentro de los cuales el pronóstico y la estrategia terapéutica sean similares.

T (Tumor):

T₀: No hay evidencias de tumor primario.

T_x: Células tumorales (en esputo o muestra del lavado broncoalveolar) sin que el tumor sea visible por imagen ni por fibroscopia.

T_{is}: Cáncer in situ.

T₁: Tumor con diámetro mayor de ≤ 3 cm rodeado de parénquima o pleura visceral, sin evidencia de invasión más allá del bronquio lobar. Se subdivide en: **T_{1a}** (≤ 2 cm) y **T_{1b}** (> 2 cm y ≤ 3 cm).

T₂: Tumor que cumple cualquiera de las siguientes características:

- Tumor > 3 cm y ≤ 7 cm, que se subdivide a su vez en: **T_{2a}** (>2 cm y ≤ 5 cm) y **T_{2b}** (>5 cm y ≤ 7 cm).
- Tumor de cualquier tamaño que produce cualquiera de las siguientes características:
 - Invasión de la pleura visceral, pero no de la pleura parietal.
 - Atelectasia y/o neumonitis postobstructiva lobar o bilobar.
 - Invasión del bronquio principal a más de 2 cm de la carina.

T₃: Tumor > 7 cm (sin límite superior) o:

- Tumor de cualquier tamaño con invasión de pleura parietal y por tanto de:
 - Pared torácica, típico de Pancoast, diafragma.
 - Pleura mediastínica.
 - Pericardio parietal.
 - Nervio frénico.
- El tumor invade el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina, pero no hay afectación carinal.
- Tumor asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva de todo un pulmón.
- Nódulos múltiples en un mismo lóbulo pulmonar.

T₄: Tumor de cualquier tamaño con afectación de mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales o carina. También se considera T4 la existencia de nódulo/s tumorales en distintos lóbulos ipsilaterales. Por último, también hablaremos de T4 cuando hay infiltración de nervio recurrente o aparece Síndrome de

la Vena Cava Superior, ambos por invasión directa tumoral, ya que también podrían darse por metástasis ganglionares.

N (Ganglios):

N_x: Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.

N₀: No hay afectación ganglionar. Para poder afirmar esto, deberán de haberse biopsiado 6 o más ganglios.

N₁: Hay afectación de ganglios peribronquiales o hiliares ipsilaterales.

N₂: Hay afectación de ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.

N₃: Afectación ganglionar de cualquier otro tipo:

- Afectación de ganglios hiliares o mediastínicos contralaterales.
- Afectación de ganglios escalenos o supraclaviculares ipsi o contralaterales.

M (Metástasis):

M_x: No es posible valorar la presencia de metástasis.

M₀: Sin metástasis.

M₁: Enfermedad metastásica, que se subclasifica en:

- **M_{1a}:** Metástasis intratorácica, definida como nódulos pulmonares contralaterales, derrame pleural (cambio importante con respecto al TNM de 1997), o implantes pleurales.
- **M_{1b}:** Metástasis a distancia, extratorácicas.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN

La mejor opción terapéutica en el cáncer de pulmón, especialmente en el CPCNP, donde es el tratamiento de elección, es la exéresis quirúrgica. Para poder llevar a cabo una cirugía curativa, debe confirmarse la reseccabilidad del tumor y la operabilidad del paciente.

Resecabilidad: es la posibilidad de conseguir una extirpación completa del tumor. Depende de las características del mismo, de su localización y extensión. Son indicadores de irresecabilidad:

-CPCNP estadio IV.

-CPCNP estadio IIIb.

-CPCNP estadio IIIa-T4 en algunos casos, con afectación de órganos nobles.

Operabilidad: define el riesgo de mortalidad perioperatoria del paciente, dependiendo de las características del paciente. Son criterios de inoperabilidad:

-Mal estado clínico (Karnofsky igual o menor al 40%).

-Enfermedades asociadas graves e incontrolables.

- Arritmia ventricular no controlable.
- IAM en los 3 meses previos.
- Prueba de esfuerzo con consumo máximo de O₂ menor a 15 ml/kg/min.
- Hipertensión pulmonar severa.
- PaCO₂ mayor a 45 mmHg irreversible.
- CV menor al 45% del valor teórico, irreversible.
- DLCO menor al 60% del teórico.
- FEV₁ postoperatorio predicho menor a 800 ml, o menor del 30%.

TRATAMIENTO DEL CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN (CNCP) POR ESTADIOS

Carcinoma in situ: se optará por la resección conservadora.

Estadios I-IIIa: son estadios, en general, candidatos a cirugía con intención curativa (segmentectomía, lobectomía, bilobectomía, neumectomía). Si el paciente es inoperable puede procederse a la ablación por radiofrecuencia, crioablación o radioterapia ablativa. En estos estadios, aunque la cirugía es lo principal, la quimioterapia neoadyuvante puede ser fundamental.

Estadios IIIb-IV: son estadios no resecables, un N3 siempre es una contraindicación absoluta para la cirugía. El tratamiento se basa en la quimioradioterapia.

	T _{1a}	T _{1b}	T _{2a}	T _{2b}	T ₃	T ₄
N ₀	Ia cir	Ia cir	Ib cir¿±QT?	IIa cir±QT	IIb cir±QT	IIIa QT+RT ¿±cir?
N ₁	IIa cir±QT	IIa cir±QT	IIa cir±QT	IIb cir±QT	IIIa QT+cir	IIIa QT+RT ¿±cir?
N ₂	IIIa QT±cir	IIIa QT±cir	IIIa QT±cir	IIIa QT±cir	IIIa QT±cir	IIIb QT±RT
N ₃	IIIb QT±RT	IIIb QT±RT	IIIb QT±RT	IIIb QT±RT	IIIb QT±RT	IIIb QT±RT

NUEVOS FÁRMACOS BIOLÓGICOS EN LA TERAPIA DEL CNCP

-ERLOTINIB, GEFITINIB: son anticuerpos monoclonales contra la tirosín kinasa del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Tienen efecto antiangiogénico. Se usan como tratamiento de rescate en el CPCNP localmente avanzado o metastásico con mutación de EGFR y sin mutación de K-ras. También se emplean como primera línea de tratamiento quimioterápico en algunos casos de adenocarcinoma.

-CETUXIMAB: también es un anticuerpo monoclonal anti- EGFR, con efecto antiangiogénico que se usa como tratamiento compasivo en el CPCNP epidermoide sin mutación EGFR.

-BEVACIZUMAB: de nuevo, un anticuerpo monoclonal, esta vez, anti-VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), con efecto antiangiogénico. Se utiliza en los CPCNP no epidermoides.

-CRIZOTINIB: es un inhibidor de la proteína ALK, que se utiliza en el CPCNP estadio IV con reordenamiento del gen ALK. Está ofreciendo resultados prometedores.

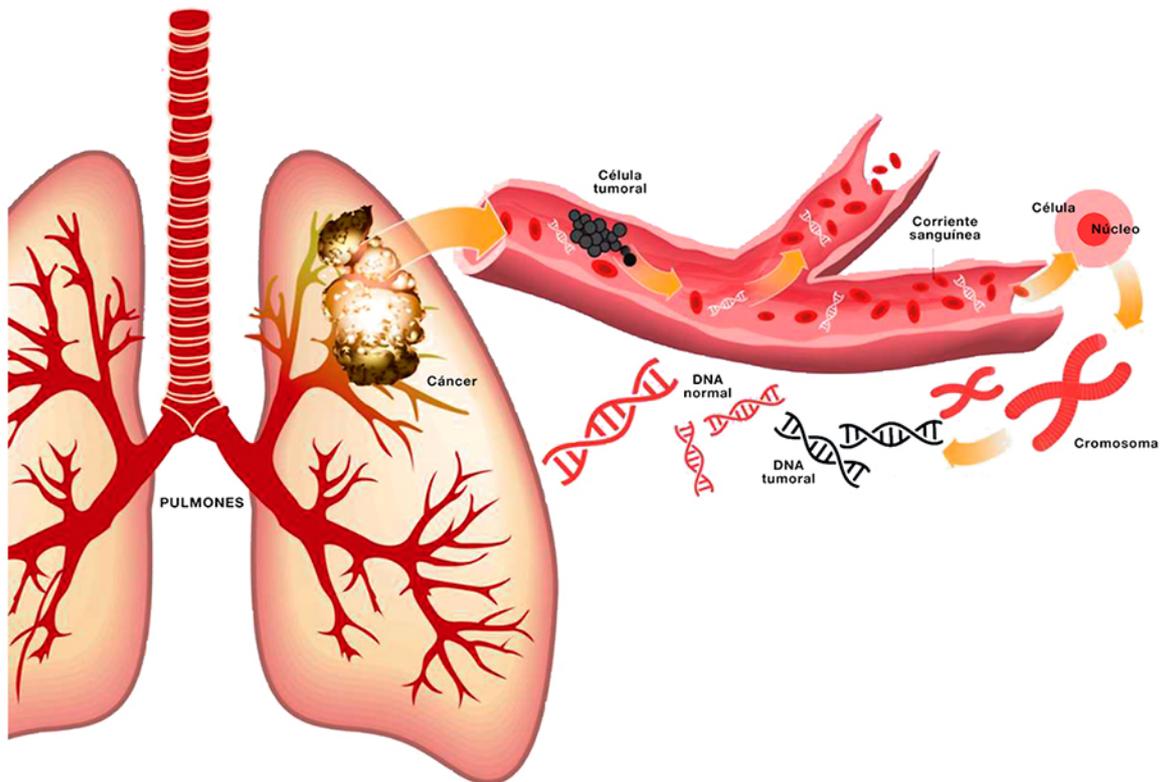
PRONÓSTICO

En los tumores CPCNP el tamaño del tumor primario influye en la supervivencia en el estadio I, pero el verdadero factor pronóstico radica en el número y la localización de los ganglios afectados.

La supervivencia a los 5 años oscila entre el 50% en el estadio I hasta un inquietante 1% en el estadio IV.

EN DESARROLLO: BIOPSIA LÍQUIDA

Investigadores del Instituto de Cáncer Dana-Farber y otras instituciones han llevado a cabo un nuevo estudio acerca de cómo a partir de un simple análisis de sangre pueden detectarse con rapidez y precisión mutaciones en genes clave, EGFR y K-ras, en los tumores de pulmón de células no pequeñas. Esto plantea el potencial de la biopsia líquida como una herramienta clínica rápida y eficaz para la identificación de pacientes que pueden beneficiarse de las drogas dirigidas a dichas mutaciones.



El reciente artículo, publicado el pasado mes de abril, recoge el primer estudio prospectivo realizado sobre la utilización de la genotipificación mediante PCR digital para la detección de las mutaciones mencionadas a partir de muestras de plasma (una muestra de sangre periférica contiene ADN libre flotante o suspendido de las células cancerosas que, tras su muerte, se derrama en el torrente sanguíneo). En el estudio se incluyeron dos tipos de muestras, sangre y biopsias convencionales de tejido, tomadas de 180 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico recientemente diagnosticados y 60 que habían desarrollado resistencia a un tratamiento previo: muestras de sangre y biopsias convencionales de tejido. El ADN extraído del plasma de la sangre fue analizado para identificar dos mutaciones relevantes en el gen EGFR (una implicada en el desarrollo del tumor y otra asociada a la resistencia al tratamiento), y una en el gen K-ras, destinada a descartar la presencia de otras mutaciones potencialmente tratables. Además, los datos obtenidos de la biopsia líquida se compararon con aquellos derivados del análisis genético de la biopsia.

Los resultados del trabajo muestran, por un lado, que las biopsias líquidas proporcionan los resultados en menor tiempo, una media de 2-3 días, comparado con el necesario para obtener la biopsia y su posterior análisis genético, que requiere una media de 27 días. Y, por otro lado, también revelan que el valor predictivo del ensayo es del 100% para la detección de estas mutaciones, en el caso de la mutación en EGFR primaria relacionada con el inicio del tumor y 79% en el caso de los pacientes con una mutación asociada a la resistencia al tratamiento. Además, la biopsia líquida

fue capaz de detectar ésta última mutación en casos en los que no se había detectado mediante la biopsia de tejido habitual. Y es que, “la biopsia únicamente analiza una parte del tumor, pudiendo pasar inadvertida una mutación presente en cualquier otra parte del tumor o del organismo, mientras que la biopsia líquida, por el contrario, podría reflejar mejor la distribución de mutaciones en el tumor como un todo”. Señala Geoffrey Oxnard, investigador en cáncer de pulmón en el *Dana-Farber and Brigham and Women’s Hospital* y director del trabajo.

Respecto a la sensibilidad diagnóstica de la prueba, se obtuvo un valor más modesto. En los casos en los que con la biopsia líquida no se detectaron las mutaciones, que sí eran evidentes al analizar las biopsias, estiman que podría deberse a dos posibles hechos: o bien las células del tumor no contienen la mutación o bien no se libera el ADN de dicho tumor al torrente sanguíneo. Los investigadores encontraron que esta discrepancia entre los resultados de las pruebas y la presencia de mutaciones fue menos frecuente en pacientes cuyo cáncer había hecho metástasis en múltiples localizaciones del organismo.

Con el objetivo de determinar la eficiencia del test en el estudio de la evolución del tumor a lo largo del tratamiento, el equipo analizó el ADN libre en plasma de 50 de los pacientes del estudio, desde el inicio del tratamiento. Concluyendo según refiere otro de los autores del artículo, Adrian Sacher, que aquellos en los que el análisis de la sangre mostró la desaparición de mutaciones tras dos semanas de tratamiento, tenían una mayor probabilidad de continuar respondiendo positivamente ante la terapia que los pacientes en los que no se observaba esta reducción.

Los resultados llevan a los investigadores a concluir que las biopsias líquidas analizadas mediante PCR digital pueden detectar mutaciones en EGFR con el rigor necesario para su utilización en la clínica. Además, debido a que los tumores están en constante evolución y pueden adquirir mutaciones adicionales, las biopsias líquidas repetidas pueden proporcionar la detección temprana de una nueva mutación, como ocurre con la mutación de resistencia EGFR, y que una vez descubierta permite el cambio de terapia con agentes nuevamente dirigidos ante esta novedad. La prueba es de gran utilidad tanto para los pacientes recién diagnosticados como para aquellos con recurrencia de la enfermedad.

“Nuestro estudio ha sido el primero en demostrar de forma prospectiva que una técnica de biopsia líquida puede ser una herramienta práctica para tomar decisiones de tratamiento en pacientes de cáncer,” manifiesta Geoffrey Oxnard. “El ensayo ha sido tan exitoso que estamos llevando a cabo la transición del ensayo a una prueba clínica para pacientes con cáncer.” (Sacher AG et al, 2016).

GENÉTICA EN EL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad genética, en la medida en que son cambios o mutaciones en los genes que controlan el funcionamiento de nuestras células, los que determinan la aparición del cáncer. Nuestro DNA va replicándose a lo largo de toda nuestra vida, nuestras células no son eternas y deben dividirse y nacer, desarrollarse y diferenciarse y morir, y es durante ese ejercicio, cuando puede aparecer el cambio, el error, el reordenamiento, la falta o el exceso de bases, en definitiva, la mutación. Aunque bien es cierto que suele ser necesaria la ocurrencia y acumulación de varias mutaciones a lo largo de la vida para que, como resultante, se desarrolle el cáncer. Prueba de ello es: que la incidencia de cáncer en la población general aumenta linealmente con respecto a la edad y que la acumulación de mutaciones sucesivas se puede correlacionar con los cambios patológicos progresivos que van desde la atipia, la hiperplasia, la displasia hasta el adenoma, carcinoma in situ y carcinoma.

Los genes conductores o reguladores de este proceso de crecimiento y división celular son los Oncogenes y los Genes supresores de tumores y sobre ellos actúan las mutaciones que devienen en los cánceres humanos, mutaciones dominantes en genes proliferativos (oncogenes) o mutaciones recesivas en genes antiproliferativos (genes supresores). Así mismo, se han encontrado mutaciones en otro grupo de genes, denominados genes de susceptibilidad, que no afectan a la proliferación celular directamente pero que favorecen una mayor tasa de mutación y la posibilidad de que se active algún protooncogén o se inactive algún gen supresor.

GENÉTICA DEL CARCINOMA DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

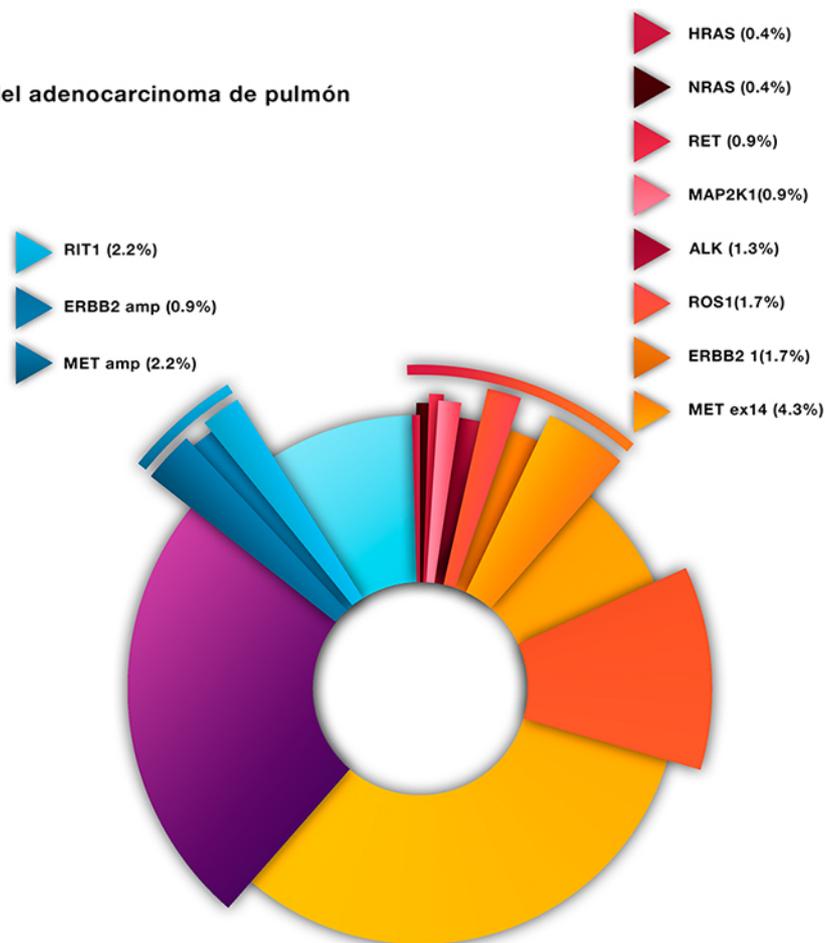
La identificación de las mutaciones en el cáncer de pulmón es fundamental para su clasificación molecular. Dentro del carcinoma de pulmón no microcítico (CPCNP), aparte de ser el adenocarcinoma el subtipo histológico más comúnmente diagnosticado, es también, el que presenta un porcentaje más alto de oncogenes alterados. Identificar estas mutaciones implica identificar dianas terapéuticas y, en definitiva, permite acercarnos, afinar y precisar en la terapia dirigida, para mejorar la supervivencia en subgrupos de pacientes con enfermedad potencialmente tratable.

Varias guías publicadas, desarrolladas por el Colegio Americano de patólogos (CAP), la Asociación internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) y la Asociación para la Patología Molecular (MP), guía CAP/IASLC/AMP, recomiendan el estudio de mutaciones somáticas en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el estudio de reordenamientos de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) en pacientes diagnosticados de adenocarcinoma, bien en el momento del diagnóstico y previamente al comienzo del tratamiento en pacientes con enfermedad metastásica o bien en la recidiva o progresión de la enfermedad en aquellos que previamente hubieran sido diagnosticados en estadios más iniciales y que no hubieran sido testados para estas alteraciones (Lindeman NI et al, 2013).

En el adenocarcinoma de pulmón, las alteraciones genéticas tratables en oncogenes ocurren predominantemente en EGFR, siendo principalmente del tipo mutación puntual y/o pequeñas inserciones/deleciones, con la consecuente estimulación de rutas oncogénicas como Ras/MAPK/ERK y PI3K/Akt/mTOR (Lynch TJ et al, 2004; Pao W et al, 2004; Paez JG et al, 2004). Los pacientes con estas mutaciones activadoras en EGFR son sensibles a inhibidores de la actividad tirosin quinasa (TKIs) como gefitinib, erlotinib y afatinib. Estos tratamientos han demostrado ser superiores a la quimioterapia convencional en términos de tasa de respuesta objetiva y progresión libre de enfermedad, menos tóxicos y mejor tolerados que el doblete estándar de quimioterapia basado en platino, cuando se indican en pacientes en estadios avanzados y no tratados que presentan mutaciones activadoras en EGFR (Mok T et al, 2009; Zhou C et al, 2011; Rosell R et al, 2012; Wu YL et al, 2014).

En los últimos años, el interés focalizado sobre las mutaciones activadoras, se ha extendido también hacia el estudio de otros reordenamientos potencialmente tratables, como son: traslocaciones que involucran a la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), receptor de la tirosin quinasa, sensibles a los inhibidores ALK, la amplificación del MET, factor de transición epitelio-mesenquimatoso, que se ha relacionado con la resistencia secundaria a los inhibidores de la tirosin quinasa del EGFR. Estos estudios incluyen además alteraciones en los genes ROS1, RET y NTRK.

Perfil molecular del adenocarcinoma de pulmón



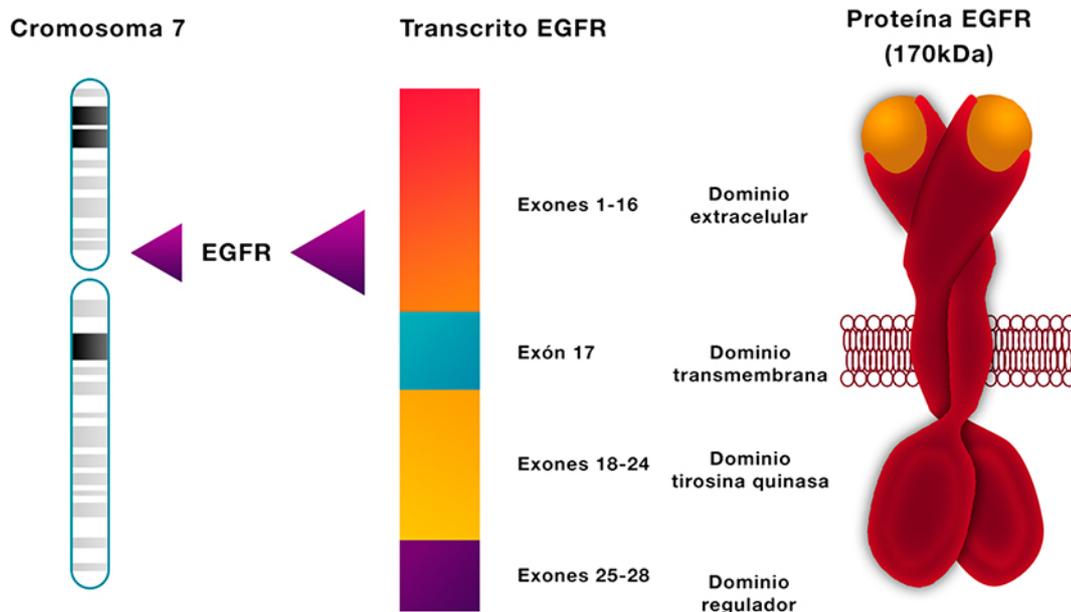
Cancer Genome Atlas Research Network. Nature 2014.

DETERMINACIÓN DE MUTACIONES DE EGFR:

Una proporción importante de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (entre un diez y un quince por ciento) tienen mutaciones en el gen EGFR, que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico. EGFR es uno de los cuatro miembros de la familia de receptores de membrana con actividad tirosin quinasa (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, rutas moleculares relacionadas con el crecimiento y supervivencia celular, dirigiendo la aparición y desarrollo del tumor.

Las mutaciones de EGFR que se han descrito con más frecuencia, ya desde 2004, cuando se describieron por primera vez, están situadas en los exones del 18 al 21, en la región codificante para el dominio intracitoplasmático TK del receptor:

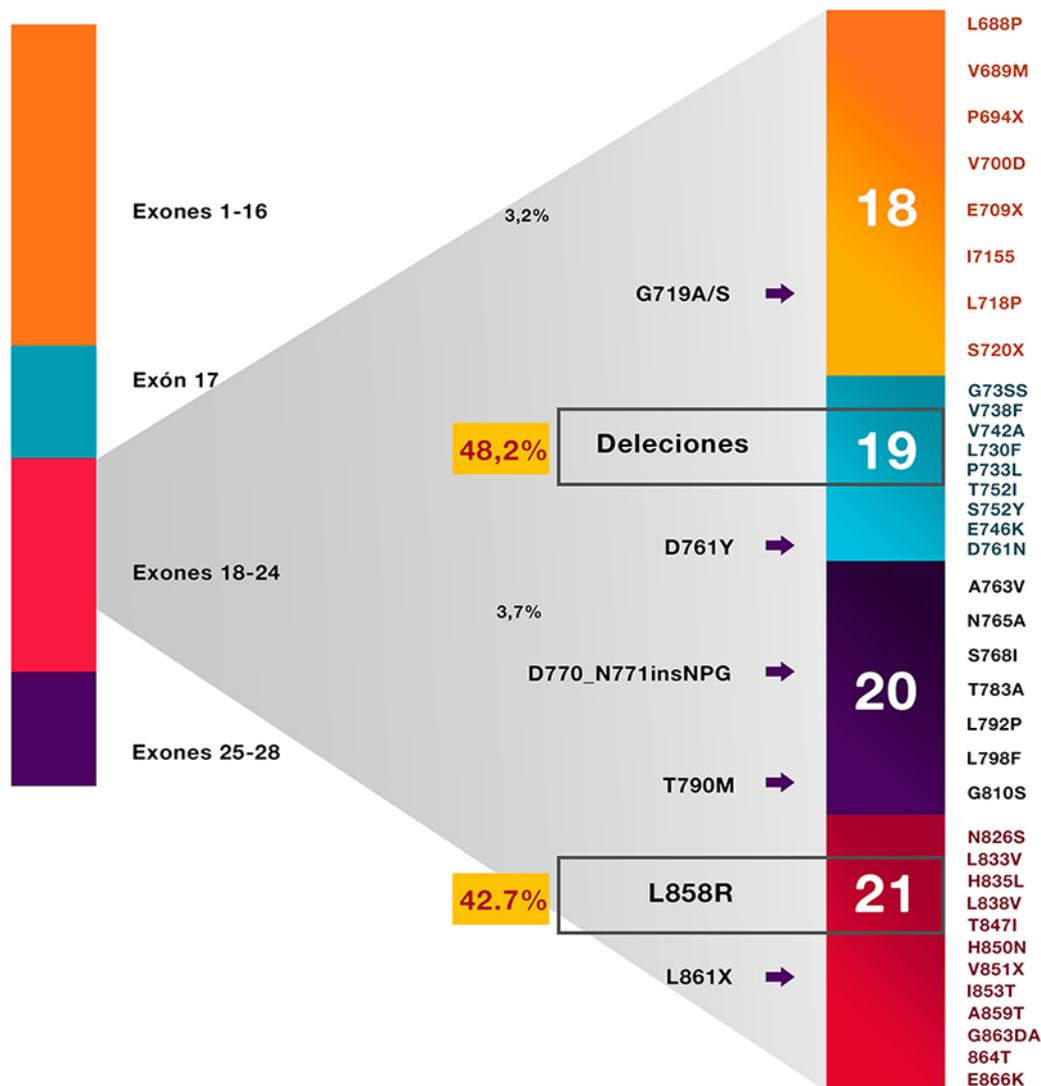
- en el exón 18 del EGFR: mutaciones E709 y G719.
- en el exón 19: deleciones de 9-, 12-, 15- y 24-bp (codones 746-753); o inserciones poco comunes de 15-bp y 18-bp (codones 746-753).
- en el exón 20: inserciones (codones 763-764, codones 767-774), S768I, T790M.
- en el exón 21: L858R, T854 y las mutaciones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

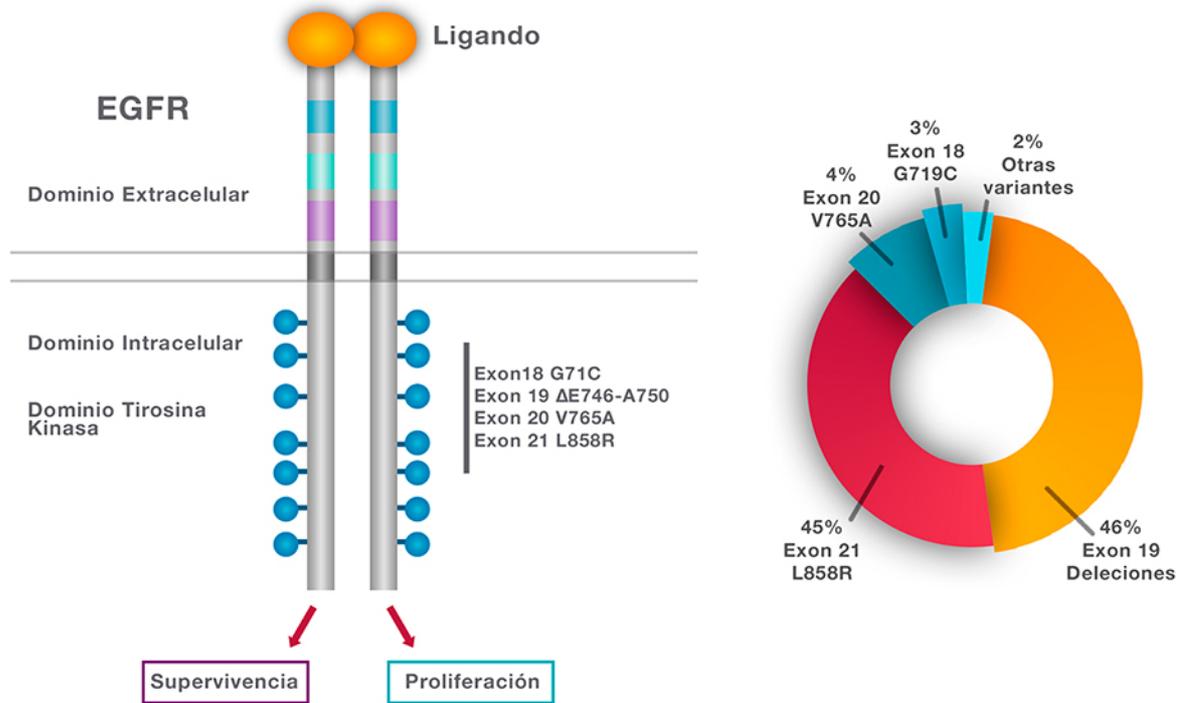


Como se ha señalado previamente, las mutaciones activadoras de EGFR se localizan entre los exones 18 al 21 en la región codificante para el dominio TK del receptor. El 90% de estas mutaciones son pequeñas deleciones en el exón 19 (donde se localizan los codones 747-750), o mutaciones puntuales en el 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%).

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.

Transcrito EGFR





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 (Lindeman NI, 2013).

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 estos estudios de tipo molecular (EGFR, ALK...) es necesario tener material tumoral suficiente. Por tanto, si consideramos la cantidad y calidad del tejido tumoral, la muestra 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 (Molina-Vila MA et al, 2008). También existe la posibilidad de realizar el estudio en suero (Maheswaran S et al, 2008), 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. En este sentido, la PCR en tiempo real (TaqMan 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 (Lopez-Rios F et al, 2013). 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 detección¹⁹. 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.

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.

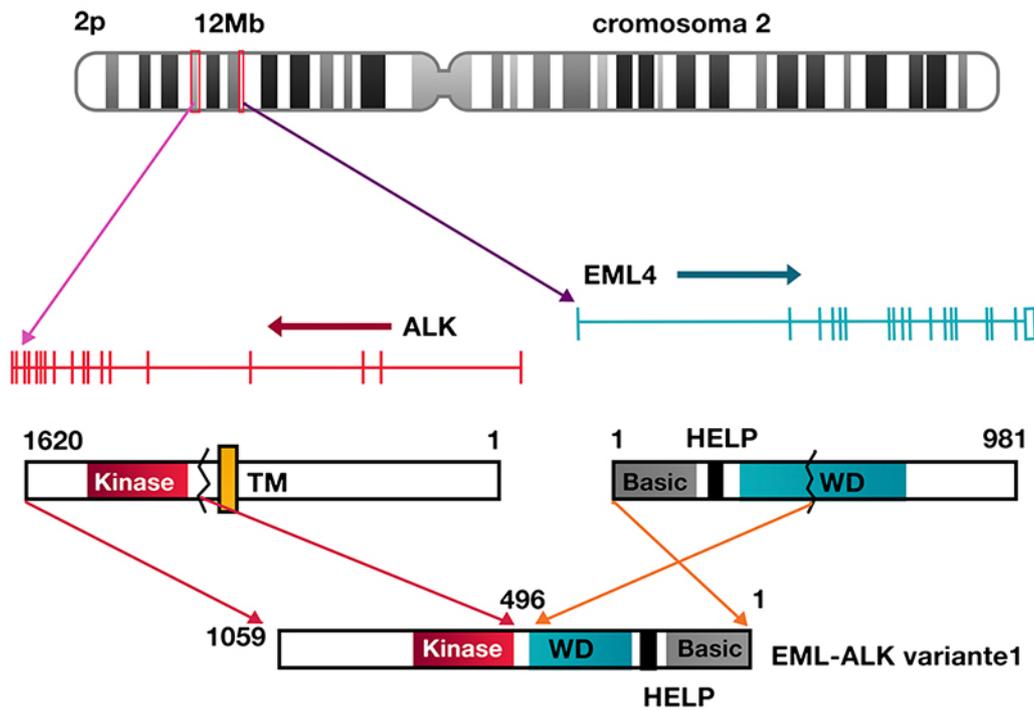
Varios estudios prospectivos y aleatorizados en fase III que han comparado la quimioterapia de primera línea frente a ITK en pacientes con CPCNP avanzado que presentan mutación EGFR, han demostrado el beneficio de los inhibidores al obtener una mayor tasa de respuesta (hasta un 70%) y de la supervivencia libre de progresión (9-15 meses). Estos estudios se han realizado con dos ITK reversibles, Gefinitib (Mok TS et al, 2009; Maemondo M et al, 2010; Mitsudomi T et al, 2010) y Erlotinib (Zhou C et al, 2011; Rosell R et al, 2012) y uno irreversible, Afatinib (Sequist LV et al, 2013; Wu YL et al, 2014). Por dicho motivo, estos tres inhibidores Gefinitib (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.

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 (Le Beau MM et al, 1989). Posteriormente se describió cómo esta translocación creaba un gen de fusión al combinar el extremo N-terminal del gen EML4 (2p21) (“Echinoderm Microtubule-Associated protein-like 4”, que codifica una proteína citoplasmática involucrada en la formación de microtúbulos) con el dominio tirosina quinasa (TK) en la porción C-terminal del gen ALK (2p23.2), creando un nuevo oncogen con actividad tirosin quinasa constitutiva (Soda M et al, 2007; Rikova K et al, 2007). Este reordenamiento incluye múltiples variantes de EML4-ALK, así como otros tipos menos frecuentes de fusiones génicas de ALK con otros genes como TFG-11 y KIF5B19 (Weinstein IB et al, 2008). El efecto es la activación de vías como Ras/MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT, resultando finalmente en un crecimiento incontrolado de las células tumorales y constituyendo otro ejemplo de “adicción oncogénica” en el CPCNP. 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 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 leucocitarios²². 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 (Souttou B et al, 2001). 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.

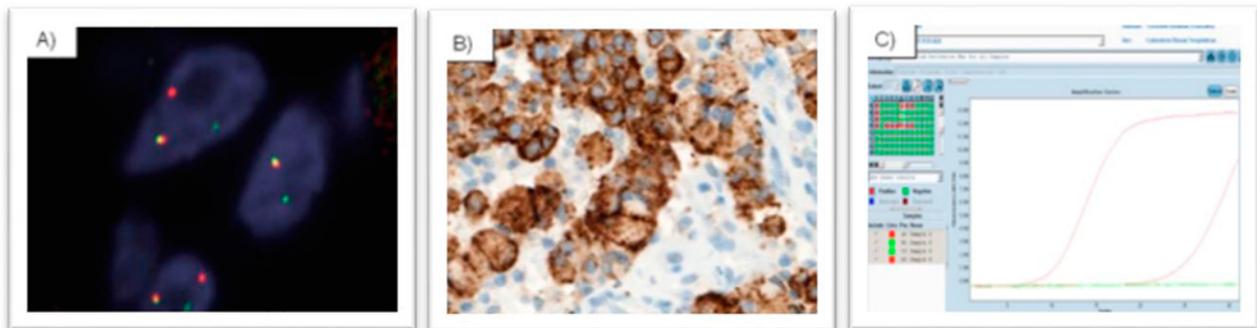


El perfil clínico donde ocurren los tumores de pulmón con presencia de la fusión de ALK suele responder a un patrón consistente en pacientes jóvenes, con edad de presentación sobre los 50 años, con leve predominio del género femenino, no fumadores, del tipo histológico de adenocarcinoma y ausencia de mutaciones de EGFR y KRAS. El reordenamiento de EML4-ALK es una alteración mutuamente excluyente con la presencia de mutaciones en EGFR y KRAS (Collisson EA et al, 2014). Dentro de los adenocarcinomas con reordenamiento de ALK son más comunes los patrones de tipo sólido-cribiforme, papilar o micropapilar (Nishino M et al, 2012) 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.

La presencia de reordenamientos de ALK puede estar entre el 3 y el 10% de los CPCNP (Sasaki T, 2011). 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.

Métodos de medición:

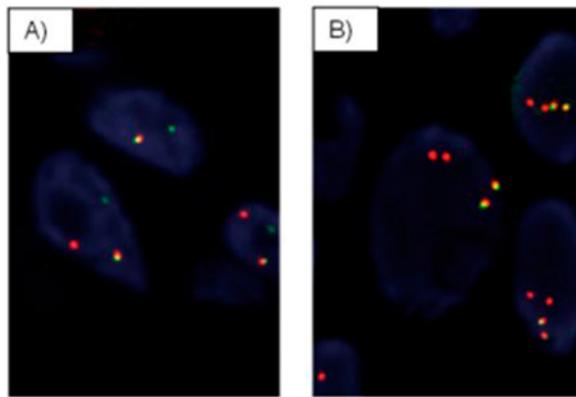
Las alteraciones moleculares de ALK se pueden identificar por hibridación in situ fluorescente (FISH), por inmunohistoquímica (IHQ) y por la retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Debido al hecho de que ALK puede mostrar reordenamientos con diferentes genes, un único estudio de FISH es capaz de detectar todas las posibles fusiones mientras que, por el contrario, es necesario utilizar múltiples PCRs para testar todas las posibilidades.



A: FISH; B: IHQ; C: RT-PCR.

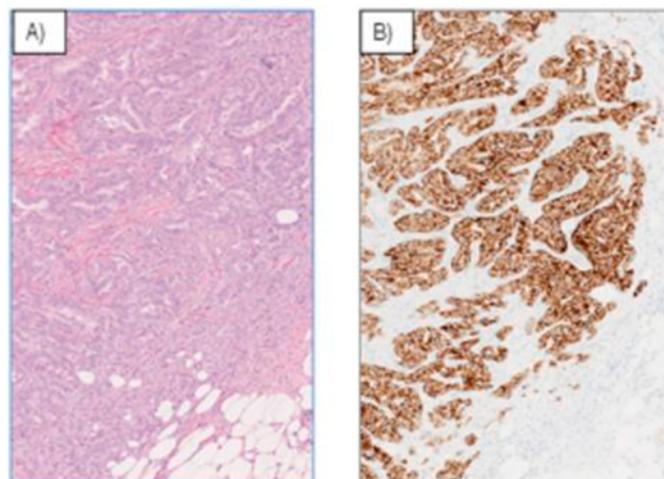
Como consecuencia, el FISH fue la metodología de elección para detectar esta alteración en los primeros ensayos clínicos con el inhibidor de ALK, crizotinib (Bang Y et al, 2010, Kwak E et al, 2010, Camidge DR et al, 2012) y el procedimiento diagnóstico de referencia a nivel clínico y el primero aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de EEUU, utilizando la sonda de FISH Vysis ALK Break Apart Probe Kit (Vysis LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe; Abbott Molecular, Abbott Park, IL).

El FISH generalmente utiliza sondas marcadas con fluorescencia roja y verde y con secuencias complementarias y adyacentes o incluso que incluyen una parte del gen ALK. En ausencia del reordenamiento, la superposición de las dos sondas produce una señal de fusión o señal amarilla. Por el contrario, ante la existencia de un reordenamiento de ALK, las dos sondas se separan resultando en la aparición de dos señales individuales, una roja (3') y otra verde (5') constituyendo el conocido como patrón típico de reordenamiento de ALK. La presencia de señales individuales y únicas de señal roja (3'), en ausencia de la señal verde (5'), también pueden ser observadas en algunos reordenamientos de este gen considerándose como casos positivos constituyendo el patrón atípico para el reordenamiento de ALK (Camidge DR et al, 2013).



Estudio del reordenamiento de ALK mediante FISH Panel A: ALK positivo (patrón típico). Panel B: ALK positivo (patrón atípico)

Estudios más recientes han demostrado que los tumores con reordenamientos en ALK muestran una expresión elevada de la proteína que puede ser detectada por estudios inmunohistoquímicos (IHQ) utilizando anticuerpos anti-ALK dirigidos hacia la porción más distal del dominio TK que se encuentra conservado en todos los reordenamientos.



Estudio del reordenamiento de ALK mediante IHQ Panel A: HE. Panel B: IHQ de ALK (clon D5F3 VENTANA)

La disponibilidad de diferentes metodologías para el estudio del reordenamiento de ALK ha generado la publicación de varios estudios comparativos (Li Y et al 2013; Conde E et al, 2014; Yatabe Y, 2015) en los que se concluye que, tanto el FISH como la IHQ son técnicas óptimas para la detección de estos reordenamientos siempre y cuando los protocolos de laboratorio se cumplan de manera estricta (Von Laffert M et al, 2014), dejando la RT-PCR como una metodología técnicamente limitada al no detectar todas las posibilidades e incluso no estar disponible en algunos departamentos de anatomía patológica. También es importante destacar que, aunque los métodos de extracción de RNA a partir de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE) han mejorado de

manera espectacular, en general, la calidad de éste no es óptima cuando es extraído a partir de este tipo de material.

Dentro de la variedad de anticuerpos disponibles para detectar el reordenamiento de ALK, 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 más estandarizado es el clon D5F3 que suministra Ventana®, que es capaz de clasificar los casos en positivos o negativos para el reordenamiento de ALK tras la valoración de la presencia o ausencia de tinción citoplasmática granular intensa independientemente del porcentaje de células tumorales que lo muestren. Considerándose casos positivos aquellos que presentan una tinción citoplasmática granular intensa y homogénea a lo largo del tumor, y resultados negativos cuando hay ausencia total de tinción o una muy débil positividad.

En octubre de 2012, Ventana obtuvo el marcado CE-IVD para su ensayo de IHQ de ALK en Europa y en 2013 para China, basándose esta última aprobación en los resultados obtenidos de un estudio retrospectivo que incluyó 1.100 sujetos chinos y en el cual se demostró el 99% de concordancia con el estudio de FISH.

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.

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 (Kwak EL et al, 2010). 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 52.368.9) (Camidge DR et al, 2010). 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. (Camidge DR et al, 2012).

Simultáneamente, dos ensayos en fase III, han confirmado la mayor actividad de Crizotinib sobre el tratamiento quimioterápico de segunda línea (estudio PROFILE 1007) (Shaw AT et al, 2013) y en primera línea de tratamiento (estudio PROFILE 1014), frente a quimioterapia con cisplatino y pemetrexed.

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.

Recientes publicaciones siguen demostrando el mayor beneficio del uso de crizotinib frente a la quimioterapia estándar en pacientes diagnosticados de CPCNP avanzado ALK positivos (Shaw AT et al, 2013), pero a pesar de la dramática respuesta inicial de estos pacientes y tras una media de 10 meses de tratamiento, aparecen resistencias adquiridas (Wilson FH et al, 2015) basadas en amplificación génica o mutaciones secundarias en el dominio tirosina quinasa de ALK (Doebele RC et al, 2012) y en otras ocasiones por activación de EGFR, KIT o receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) (Lovly CM et al, 2014).

Otros agentes como Ceritinib (Shaw AT et al, 2014) o Alectinib están en fases avanzadas de desarrollo y han demostrado actividad incluso en pacientes con progresión a Crizotinib.

Ceritinib ha recibido en el año 2014 su aprobación por la FDA en base a los resultados obtenidos de un ensayo clínico pivotal fase I (Shaw AT et al, 2014). Por otro lado, alectinib, terapia experimental de Roche incluida entre los inhibidores de segunda generación de ALK, que ya en junio de 2013 fue designada como Terapia Innovadora por la FDA, está disponible desde septiembre de 2014, en Japón.

Recientemente, en la 51 edición del congreso anual de la Asociación Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO) se han presentado los resultados obtenidos en los ensayos NP28673 (Ou SI et al, 2015) y NP28761 (Gandhi L et al, 2015) que demuestran que alectinib es capaz de superar la barrera hematoencefálica además de mostrar actividad en las metástasis cerebrales.

En la actualidad, se encuentra en curso el estudio fase III de ámbito mundial ALEX, que compara alectinib con crizotinib como tratamiento en primera línea para pacientes

diagnosticados de CPCNP ALK positivos identificados mediante el estudio de IHQ de VENTANA para ALK.

REORDENAMIENTO DE ROS1

Ros1 es un receptor tirosina kinasa que se sobreexpresa cuando el gen que lo codifica se encuentra activo constitutivamente, como consecuencia de un reordenamiento cromosómico. Fue identificada en 2007, en líneas celulares y en pacientes diagnosticados de CPCNP, por uno de los dos grupos que descubrió el Reordenamiento de ALK (Rikova K et al, 2007).

Los reordenamientos en ROS1 se han identificado en un 1% de los CPNM, preferentemente en mujeres, jóvenes, no fumadores o con hábito tabáquico ligero y con histología de adenocarcinoma con patrón sólido-cribiforme siendo también muy característica la presencia de células en anillo de sello (Pan Y et al, 2014).

De manera similar a como ocurre en los reordenamientos de ALK, estas fusiones se caracterizan por estar presentes en tumores que carecen de alteraciones genéticas en otros oncogenes muy importantes en el CPCNP como EGFR, KRAS y ALK (“tumores triple negativos”). También producen la activación de vías de señalización implicadas en el control de la proliferación celular, supervivencia y ciclo celular, como STAT3, PI3K/AKT/mTOR y RAS-MAPK/ERK. (Davies KD et al, 2013).

La metodología para la detección de los reordenamientos de ROS1 se ha basado en la experiencia adquirida con el test de ALK, por lo que las tres técnicas más utilizadas para estas identificaciones son FISH, IHQ y RT-PCR (Shaw AT, 2011). De nuevo, y de manera similar a como ocurre en ALK, la RT-PCR no se considera de elección debido a las limitaciones que podrían impedir detectar algunos casos positivos, tanto por el hecho de que el listado de reordenamientos de ROS1 es elevado y sigue creciendo, como por la baja calidad del RNA extraído mediante FFPE.

Al igual que en ALK, el FISH para ROS1 utiliza sondas marcadas con fluorescencia roja y verde y con secuencias complementarias y adyacentes o incluso que incluyen una parte del gen ROS1. También la interpretación de los resultados es similar al estudio de FISH de ALK, la ausencia de reordenamiento produce una señal de fusión o señal amarilla y la existencia de reordenamiento conlleva a la aparición de dos señales individuales, una roja (3') y otra verde (5'). Es importante destacar que al igual que en los patrones atípicos ALK positivos, también la presencia de señales individuales y únicas de la región roja (3'), en ausencia de la señal verde (5'), puede ser observada en algunos reordenamientos de este gen (Takeuchi K et al, 2012; Yoshida A et al, 2013).

La proteína ROS1 no se expresa en las células de pulmón normales, sin embargo, el reordenamiento del gen se asocia con una elevada expresión de la misma. Este hecho, unido a que la IHQ es un método rápido y disponible en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica podría convertirla en una prometedora herramienta para el screening de estos pacientes (Sholl LM et al, 2013; Boyle TA et al, 2015). En un estudio muy reciente llevado a cabo sobre 1478 CPNM totalmente resecaados se ha identificado expresión IHQ para ROS1 en 68 casos (4.6%), sugiriendo que esta metodología puede servir como método de cribado para la detección de reordenamientos de este gen (Warth A et al, 2014).

La proteína ROS1 muestra una gran homología en su secuencia de aminoácidos con la proteína ALK incluyendo su dominio TK, lo que la ha convertido en potencial diana para los inhibidores de ALK (Ou SI et al, 2012). El estudio fase I PROFILE1001 examinó la eficacia de crizotinib en pacientes CPCNP positivos para ROS1. Los resultados preliminares fueron presentados en el congreso de la American Society of Clinical Oncology 2012 (ASCO) mostrando una tasa de respuesta objetiva del 50%, incluyendo un paciente con respuesta completa y nueve pacientes con respuestas parciales (Shaw AT et al, 2014), resultados similares a los obtenidos en pacientes ALK positivos tratados con crizotinib. En la actualidad, existen 5 ensayos clínicos fase II o fase I/II que tratan de examinar el beneficio terapéutico de los TIKs en primera o segunda línea en pacientes positivos para ROS1 (Kohno T et al, 2015).

A pesar de la evidencia de que los pacientes ROS1 positivos pueden beneficiarse del tratamiento con crizotinib, la falta de recomendaciones formales respecto del método de cribado del reordenamiento en este gen, así como la falta de la aprobación oficial de su uso en estos pacientes, puede restringir el acceso a esta droga en determinadas situaciones. Debido a esta razón, todos los pacientes ROS1 positivos deben ser incluidos en ensayos clínicos con inhibidores ALK/ROS1.

Existen muchos otros biomarcadores moleculares es estudio, de los cuales no se ha obtenido a día de hoy evidencia suficiente: mutaciones de KRAS, mutaciones de BRAF, traslocaciones de RET, amplificación de MET, mutación de HER-2, entre otros.

Bien porque los métodos para el análisis de algunas de las alteraciones genéticas mencionadas, deben de ser estandarizados, o bien porque no existe acceso a ensayos clínicos con inhibidores específicos frente a dichas alteraciones, actualmente no se recomienda realizar determinaciones buscando estas anomalías específicas en los genes mencionados, fuera de estudios de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Bang Y, Kwak EL, Shaw AT, et al. Clinical activity of the oral ALK inhibitor PF-02341066 in ALK-positive patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) J Clin Oncol. 2010; 28(18s):(suppl; abstr 3).
- Boyle TA, Masago K, Ellison KE et al. ROS1 Immunohistochemistry Among Major Genotypes of Non-Small-Cell Lung Cancer. Clinical Lung Cancer, 2015; Vol. 16, No. 2, 106-11.
- 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.
- 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(10):1011-1019.
- Camidge DR, Skokan M, Kiatsimkul P et al. Native and Rearranged ALK Copy Number and Rearranged Cell Count in Non-Small Cell Lung Cancer. Implications for ALK Inhibitor Therapy. Cancer. 2013; Nov 15. 119(22): 3968-75.
- Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. Cancer Genome Atlas Research Network. Nature. 2014; Jul 31. 511(7511): 543-50.
- Conde E, Suárez-Gauthier A, Benito A et al. Accurate identification of ALK positive lung carcinoma patients: novel FDA-cleared automated fluorescence in situ hybridization scanning system and ultrasensitive immunohistochemistry. PLoS One. 2014; Sep 23. 9(9):e107200.
- Doebele, R.C., Pilling, A.B., Aisner, D.L et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 2012; 18: 1472–1482.
- Gandhi L, Shaw A, Gadgeel SM, et al. A phase II, open-label, multicenter study of the ALK inhibitor alectinib in an ALK+ non-small-cell lung cancer (NSCLC) U.S./Canadian population who had progressed on crizotinib (NP28761). J Clin Oncol 2015; 33 (suppl; abstr 8019).

- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28; 363(18):1693-703.
- Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4(2):156-164.
- Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA et al. The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989; 866–70.
- Li Y, Pan Y, Wang R et al. ALK-rearranged lung cancer in Chinese: a comprehensive assessment of clinicopathology, IHC, FISH and RT-PCR. *PLoS One*. 2013 Jul 26; 8(7): e69016.
- 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. *Journal of Thoracic Oncology* Jul 2013, 8 (7): 823–859. Special Article.
- 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.
- Lovly, CM, McDonald NT, Chen H. et al. Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion-positive lung cancer. *Nat. Med*. 2014; 20: 1027–1034.
- 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.
- 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.
- Maheswaran S, Sequist L, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359.
- 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, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010 ;11: 121-8.

- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947– 957.

- Mok T, Kim DW, Wu YL, et al. First-line crizotinib versus pemetrexed cisplatin or pemetrexed-carboplatin in patients with advanced ALK-positive non-squamous non-small cell lung cancer: Results of a phase III study (PROFILE 1014). *J Clin Oncol* 2014; 32:5s (suppl; abstr 8002).

- 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.

- Nishino M, Klepeis VE, Yeap BY et al. Histologic and cytomorphic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2012; 25: 1462-72.

- Ou SI, Tan J, Yen Y et al. ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; 12:447–56.

- Ou SI, Ahn JS, De Petris L., et al. Efficacy and safety of the ALK inhibitor alectinib in ALK+ non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients who have failed prior crizotinib: an open-label, single-arm, global phase 2 study (NP28673). *J Clin Oncol* 2015; 33 (suppl; abstr 8008).

- 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.

- Pan Y, Zhang Y, Li Y et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features. *Lung Cancer* 2014; 84:121-6.

- 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 U S A*. 2004; 101(36):13306-13311.

- Rikova K., Guo A, Zeng Q et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinase in lung cancer. *Cell* 2007; 131 (6): 1190–203.

- 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.

- 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.

- Shaw AT, Solomon B, Kenudson MM. Crizotinib and testing for ALK. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9:1335–1341.

- Shaw AT, Kim DW, Mehra R et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Mar 27; 370(13):1189-97.

- Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20; 371(21):1963-71.

- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20; 368(25):2385-94.

- Sholl LM, Sun H, Butaney M et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:1441-9.

- 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): 561–66.

- 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.

- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012 (Mar); 18: 378–81.

- Von Laffert M, Warth A, Penzel R et al. Multicenter immunohistochemical ALK-testing of non-small-cell lung cancer shows high concordance after harmonization of techniques and interpretation criteria. *J Thorac Oncol*. 2014 Nov; 9(11): 1685-92.

- Warth A, Muley T, Dienemann H et al. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology* 2014; 65(2): 187–94.

- Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res.* 2008; 68:3077-80, discussion 3080.
- Wilson FH, Johannessen CM, Piccioni F. A functional landscape of resistance to ALK inhibition in lung cancer. *Cancer Cell.* 2015 Mar 9; 27(3):397-408.
- 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(2):213–22.
- Yatabe Y. ALK FISH and IHC: you cannot have one without the other. *J Thorac Oncol.* 2015 Apr; 10(4): 548-50.
- Yoshida A, Kohno T, Tsuta K et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37: 554–562.
- 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):735–42.
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. (Internet). Madrid 2006. Actualizado 13 de Mar 2015. Disponible en: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/tumores-toracios/cancer-de-pulmon?start=5#content>
- SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. (Internet). Barcelona. Actualizado 9 Sep 2011. Disponible en: <http://www.archbronconeumol.org/es/normativa-separ-sobre-estadificacion-del/articulo/S0300289611002262/>
- MEDSCAPE (Internet). 1994. Actualizado 21 Abr 2016. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/279960-overview>
- PATHOLOGY INSIGHT (Internet). Actualizado 13 Ene 2016. Disponible en: <http://pathologyinsight.com/edicion/historiadelmes/1/8>

- NIH: Instituto Nacional del Cáncer. EE.UU. Actualizado 28 Jul 2016. Disponible en:
<http://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq>

- ONCOBYG: Grupo clínico de biomarcadores en oncología. 2016 Instituto ROCHE. Actualizado 2016. Disponible en:
http://www.oncobyg.com/CasosClinicos/cancer_de_pulmon/3/detalle

- DANA-FARBER CANCER INSTITUTE. Boston 2016. Actualizado Abr 2016. Disponible en:
<http://www.dana-farber.org/Newsroom/News-Releases/liquid-biopsy-blood-test-accurately-detects-key-genetic-mutation-in-most-common-form-of-ung-cancer-study-finds.aspx>

- GENÉTICA MÉDICA. Valencia. Actualizado Abr 2016. Disponible en:
<http://revistageneticamedica.com/2016/04/18/cancer-pulmon-no-microcitico/>

- Sergi Pascual Guardia, Juan Miguel Antón Santos, Francisco Javier Teigell Muñoz, Eduardo Manzone, Juan Jurado Serrano, Juan Mesa Quesada, Alberto López Serrano, Borja Ruiz Mateos, Eduardo Franco Díez, Sara Gallo Santacruz, Francisco Arnalich Montiel, Víctor Manuel González Cosano. Manual AMIR de Neumología y Cirugía Torácica. 8ª Edición, Madrid.