



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Silvia Margarita
García Acuña

Tesis doctoral

Expresión de PD-L1 en carcinoma
de célula no pequeña de pulmón y
su relación con otras dianas
terapéuticas moleculares

Santiago de Compostela, 2022



TESIS DE DOCTORADO

**EXPRESIÓN DE PD-L1 EN
CARCINOMA DE CÉLULA NO
PEQUEÑA DE PULMÓN Y SU
RELACIÓN CON OTRAS DIANAS
TERAPÉUTICAS MOLECULARES**

Silvia Margarita García Acuña

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE
LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2022





DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Silvia Margarita García Acuña**

Título de la tesis: **Expresión de PD-L1 en carcinoma de célula no pequeña de pulmón y su relación con otras dianas terapéuticas moleculares.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirмо que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela, 23 de mayo de 2022**

Firma electrónica





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Ihab Abdulkader Nallib**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Expresión de PD-L1 en carcinoma de célula no pequeña de pulmón y su relación con otras dianas terapéuticas moleculares.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Silvia Margarita García Acuña**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 23 de mayo de 2022**

Firma electrónica



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Máximo Francisco Fraga Rodríguez**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: **Expresión de PD-L1 en carcinoma de célula no pequeña de pulmón y su relación con otras dianas terapéuticas moleculares.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Silvia Margarita García Acuña**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 23 de mayo de 2022**

Firma electrónica





DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

La doctoranda Silvia Margarita García Acuña

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con su tesis doctoral titulada “Expresión de PD-L1 en carcinoma de célula no pequeña de pulmón y su relación con otras dianas terapéuticas moleculares.”.

En Santiago de Compostela, 23 de mayo de 2022

Firma electrónica

Para Pablo, la luz de mi vida.

Eres la razón de mi todo.

AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil expresar en pocas palabras mi sentimiento de gratitud hacia tantas personas que han contribuido de una u otra manera en este proceso, en la culminación de un sueño.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Ihab Abdulkader, por ser mi modelo a seguir, por todos los conocimientos y consejos que me ha transmitido a lo largo del tiempo y por exigirme siempre más para obtener la mejor versión de mí misma.

Al Dr. Máximo Fraga, por creer y apostar por mí desde el principio de todo, por tener siempre confianza en que podía conseguir llegar hasta aquí a pesar de las dificultades en el camino y por animarme a seguir adelante en momentos complicados del trayecto.

De igual manera, esta tesis no habría podido realizarse sin la colaboración del servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Mi especial agradecimiento al Dr. José Ramón Antúnez, por darme la libertad para organizar mi tiempo y por la disposición y apoyo en todo momento. Así mismo, mi reconocimiento especial al Biobanco por toda la asesoría brindada.

De igual manera, estoy eternamente en deuda con la sección de Patología Molecular e Inmunohistoquímica: Raquel, Elena, Mery, Ángel, Yoli, Dori y Maga. Muchas gracias por la paciencia cuando preguntaba mil veces las mismas cosas, por alentarme a que yo misma hiciera todo y así corroborar lo importante y vital que es su trabajo para nuestro quehacer diario.

Durante el transcurso de este proyecto, tuve la incondicional ayuda de un amigo que ha estado a mi lado desde aquel Febrero del año 2000 en el que tuve la suerte de coincidir con él. Muchas gracias Andrés, los números siempre han sido un universo paralelo que tú dominas y sin tu paciencia desde bioestadística, pasando por epidemiología hasta el estudio de esta tesis, siempre tuve la fortuna de contar contigo a pesar de esos 7.667 kilómetros de distancia.

Agradezco también a todos mis amigos en Galicia, Bogotá, Bucaramanga y en cualquier rincón del mundo en el que se encuentren ahora, porque siempre sentí su apoyo en todo momento.

A mi papá, por preguntarme cada semana por la evolución de este proyecto y por enseñarme la alegría, la constancia y la responsabilidad del trabajo digno; a mi mamá, por su fortaleza espiritual, por animarme con sus palabras, por estar siempre conmigo y permitirme volar hasta aquí. A mis hermanas y sus familias por el amor desde la distancia. A Patricia por ser una segunda madre y a su maravillosa familia por permitirme ser parte de ella.

Finalmente, dedico este trabajo a las dos personas más importantes de mi vida. Javier, no pude encontrar mejor compañero de vida; tu apoyo constante y sereno así como tu tranquilidad me han equilibrado y complementado siempre de tal manera que mis éxitos también son tuyos.

Pablo, eres la luz de mi vida, mi mayor tesoro. Perdóname por las horas que te robé; espero que algún día leas esto, te sientas orgulloso de mi y haya logrado ser el mejor ejemplo para ti, académico, personal y profesional. Te amo.

RESUMEN

Introducción: El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial, con una estimación de 1.7 millones de muertes cada año y usualmente diagnosticado cuando los pacientes tienen la enfermedad localmente avanzada o metastásica. Este cáncer avanzado tiene una pobre supervivencia más allá de 5 años y no puede optar a manejo quirúrgico. El subtipo histológico más frecuente es el carcinoma de célula no pequeña de pulmón (CPCNP), el cual tiene potenciales dianas terapéuticas moleculares tales como las denominadas mutaciones “conductoras”. Recientemente, con el advenimiento de la inmunoterapia, también es posible valorar la expresión de PD-L1 y de esta manera, ampliar el arsenal terapéutico.

Objetivos: Describir las características clínicas y moleculares de casos de CPCNP en población gallega así como evaluar la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y explorar posibles asociaciones. Adicionalmente describir la supervivencia de este grupo de pacientes basándose en la expresión de PD-L1.

Materiales y métodos: En este estudio observacional se recogieron 103 casos de pacientes de población gallega con CPCNP y se estudiaron sus características clínico-patológicas y moleculares en seis dianas terapéuticas diferentes (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *BRAF* y *NRAS*). Se obtuvieron datos por medio de la historia clínica de manera retrospectiva y se completaron los estudios moleculares a través de RT-PCR y FISH. La expresión tumoral de PD-L1 fue valorada por medio de inmunohistoquímica. Se exploraron

asociaciones entre las variables clínicas y moleculares con PD-L1 y se hizo un análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier en relación a la expresión de PD-L1.

Resultados: El perfil clínico de los pacientes con CPNCP corresponde principalmente a hombres fumadores, con una mediana de edad de 62 años y con diagnóstico histológico de adenocarcinoma. A nivel molecular las frecuencias obtenidas de las mutaciones conductoras analizadas en orden decreciente fueron: *KRAS* (28.75%), *EGFR* (10.67%), *ALK* (2.9%), *BRAF* (2.5%), *ROS1* (1%) y *NRAS* (0%). El estudio de expresión de PD-L1 mostró ausencia de expresión en el 60.2% de los casos, mientras que el 39.8% presentaron algún grado de positividad; de estos casos positivos, el 25.24% presentaban una expresión entre 1%-49% y el 14.56% una expresión $\geq 50\%$. No se encontraron asociaciones entre esta expresión y las características clínicas, pero a nivel molecular se observó una tendencia a que la fusión de *ALK* esté asociada a la expresión de PD-L1, de la misma manera que el *EGFR* de tipo wild-type, este último particularmente en la categoría de expresión $\geq 50\%$. También se observó en los pacientes con mutaciones en *KRAS* una significativa expresión de PD-L1 (43% de los casos). Finalmente, el análisis de supervivencia mostró medianas inferiores en aquellos pacientes con alta expresión de PD-L1.

Conclusiones: El perfil clínico y molecular de los pacientes con CPCNP en Galicia es semejante a lo descrito en la literatura. El alto porcentaje de casos con expresión de PD-L1 inferior al 1% es atribuible probablemente al predominio de biopsias endoscópicas como material de trabajo. La tendencia a que PD-L1 se exprese de mayor manera en casos de *EGFR* wild type, especialmente en la categoría $\geq 50\%$ ó en pacientes con fusión de *ALK* es importante de cara al tratamiento puesto que los estudios han mostrado que en pacientes con dicha expresión y que albergan mutaciones en *EGFR* ó

fusiones de *ALK* hay refractariedad a la inmunoterapia. El estudio conjunto de *KRAS* y de PD-L1 es útil dados los datos de otros trabajos que muestran una supervivencia libre de progresión mayor al estar presentes ambas variables. Finalmente, la expresión de PD-L1 \geq 50% se correlacionó con menor mediana de supervivencia global aunque su rol como factor predictor aún es controvertido.

RESUMO

Introdución: O cancro de pulmón é a principal causa de morte relacionada co cancro en todo o mundo, cun estimado de 1,7 millóns de mortes cada ano, e adoita diagnosticarse cando os pacientes teñen a enfermidade localmente avanzada ou metastásica. Este cancro avanzado ten unha escasa supervivencia máis aló dos 5 anos, e non pode optar polo manexo cirúrxico. O subtipo histolóxico máis frecuente é o carcinoma de pulmón de células non pequenas (CPCNP), que posúe dianas terapéuticas moleculares potenciais como as denominadas mutacións "condutoras". Recentemente, coa chegada da inmunoterapia, tamén é posible avaliar a expresión de PD-L1 e así ampliar o arsenal terapéutico.

Obxectivos: Describir as características clínicas e moleculares dos casos de CPCNP na poboación galega, así como avaliar a expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en células tumorais e explorar posibles asociacións. Ademais, describir a supervivencia deste grupo de pacientes baseándose na expresión de PD-L1.

Materiais e métodos: Neste estudo observacional recolléronse 103 casos de pacientes da poboación galega con CPCNP, estudáronse as súas características clínico-patolóxicas e moleculares en seis dianas terapéuticas diferentes (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS*). Obtivéronse datos mediante a historia clínica retrospectiva e se completaron os estudos moleculares mediante RT-PCR e FISH. A expresión tumoral de PD-L1 foi avaliada por medio da inmunohistoquímica. Exploráronse as asociacións entre variables clínicas e moleculares con PD-L1 e realizouse unha análise de

supervivencia mediante o método de Kaplan-Meier en relación coa expresión de PD-L1.

Resultados: O perfil clínico dos pacientes con CPCNP corresponde principalmente a homes fumadores, cunha idade media de 62 anos e diagnóstico histolóxico de adenocarcinoma. A nivel molecular, as frecuencias obtidas das mutacións condutoras analizadas en orde decrecente foron: *KRAS* (28.75%), *EGFR* (10.67%), *ALK* (2.9%), *BRAF* (2.5%), *ROS1* (1%) e *NRAS* (0%). O estudo da expresión de PD-L1 mostrou ausencia de expresión no 60.2% dos casos, mentres que o 39.8% presentaban algún grao de positividade; destes casos positivos, o 25.24% tiña unha expresión entre o 1%-49% e o 14.56% unha expresión $\geq 50\%$. O resto dos casos correspondentes ao 60.19% tiñan unha expresión inferior ao 1%. Non se atoparon asociacións entre esta expresión e as características clínicas, pero a nivel molecular observouse unha tendencia a que a fusión de *ALK* se asociase coa expresión de PD-L1, do mesmo xeito que o *EGFR* “wild-type”, este último especialmente na categoría de expresión $\geq 50\%$. Tamén se observou unha expresión significativa de PD-L1 (43% dos casos) en pacientes con mutacións en *KRAS*. Finalmente, a análise de supervivencia mostrou medianas máis baixas naqueles pacientes con alta expresión de PD-L1.

Conclusiones: O perfil clínico e molecular dos pacientes con CPCNP en Galicia é coherente co descrito na literatura. A alta porcentaxe de casos con expresión de PD-L1 inferior ao 1% probablemente débese ao predominio das biopsias endoscópicas como material de traballo. A tendencia de PD-L1 a expresarse máis en casos de *EGFR* “wild-type” especialmente na categoría de expresión $\geq 50\%$ ou con fusión de *ALK* é importante para o tratamento, xa que algúns estudos demostraron que en pacientes con expresión de PD-L1 e que albergan mutacións de *EGFR* ou fusión de *ALK* son refractarios á inmunoterapia. O estudo conxunto de *KRAS* e PD-L1 é útil tendo en

conta os datos doutros estudos que mostran unha maior supervivencia sen progresión cando ambas variables están presentes. Finalmente, a expresión de PD-L1 $\geq 50\%$ correlacionouse cunha mediana de supervivencia global máis baixa, aínda que o seu papel como factor predictivo aínda é controvertido.

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide, with 1.7 million estimated deaths per year, and it is usually diagnosed when patients have locally advanced or metastatic disease. This advanced cancer is not amenable to surgical management and has a poor 5 years survival rate. The most frequent histological subtype is non-small cell lung carcinoma (NSCLC), which has potential molecular therapeutic targets such as the so-called driver mutations. Recently, with the advent of immunotherapy, it is also possible to assess the expression of PD-L1 and thus expand the therapeutic arsenal.

Objectives: To describe the clinical and molecular characteristics of NSCLC cases in the Galician population as well as to evaluate the immunohistochemical expression of PD-L1 in tumor cells and to explore possible associations. Additionally describe the survival of this group of patients based on the expression of PD-L1.

Materials and methods: In this observational study, 103 cases of patients from the Galician population with NSCLC were collected and their clinical-pathological and molecular characteristics were studied in six different therapeutic targets (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *BRAF* and *NRAS*), clinical data were obtained from the clinical history and the molecular studies were completed through RT-PCR and FISH. Tumor expression of PD-L1 was assessed by immunohistochemistry. Associations between clinical and molecular variables with PD-L1 were explored and a Kaplan-Meier survival analysis was performed in relation to PD-L1 expression.

Results: The clinical profile of patients with NSCLC corresponds mainly to male smokers, with a median age of 62 years and a histological diagnosis of adenocarcinoma. At the molecular level, the frequencies obtained from the driver mutations analyzed in decreasing order were: *KRAS* (28.75%), *EGFR* (10.67%), *ALK* (2.9%), *BRAF* (2.5%), *ROS1* (1%) and *NRAS* (0%). The PD-L1 expression study showed that 60.2% of the cases were negative and 39.8% presented some type of positivity; of these positive cases, 25.24% had an expression between 1%-49% and 14.56% an expression $\geq 50\%$. No associations were found between this expression and clinical features, but at the molecular level a tendency was observed for *ALK* fusion to be associated with PD-L1 expression, in the same way as wild-type *EGFR*, the latter particularly in the category of expression $\geq 50\%$. Significant expression of PD-L1 (43% of cases) was also observed in patients with *KRAS* mutations. Finally, the survival analysis showed lower medians in those patients with high expression of PD-L1.

Conclusions: The clinical and molecular profile of patients with NSCLC in Galicia is consistent with previous literature findings. The high percentage of cases with no PD-L1 expression is probably attributable to the predominance of endoscopic biopsies as working material. The tendency for PD-L1 to be more expressed in *EGFR* wild type cases, especially in the $\geq 50\%$ category or in patients with *ALK* fusion is important for treatment since studies have shown that patients with PD-L1 expression and harboring *EGFR* mutations or *ALK* fusions are refractory to immunotherapy. The joint study of *KRAS* and PD-L1 is useful given the data from other studies that show greater progression-free survival when both variables are present. Finally, PD-L1 expression $\geq 50\%$ is correlated with lower median overall survival, although its role as a predictive factor is still controversial.

Índice:

RESUMEN	15
RESUMO.....	19
ABSTRACT	23
INTRODUCCIÓN	39
1. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS	42
1.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>EGFR</i>) ...	46
1.2 Quinasa del Linfoma Anaplásico (<i>ALK</i>).....	51
1.3 <i>ROS</i> proto-oncogén 1 del receptor de tirosina quinasa (<i>ROS1</i>).....	56
1.4 <i>KRAS</i> proto-oncogén GTPasa	58
1.5 <i>B-RAF</i> proto-oncogen, serina/treonina quinasa (<i>BRAF</i>)....	61
1.6 <i>NRAS</i> proto-oncogen GTPasa	63
1.7 Otras alteraciones	64
1.7.1 <i>MET</i> proto-oncogén GTPasa	64
1.7.2 <i>RET</i> proto-oncogén GTPasa	65
1.7.3 <i>ERB-B2</i> receptor tirosina quinasa 2.....	66
1.7.4 Receptor de tirosina quinasa neurotrófico	67
2. EL CÁNCER Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	68

2.1	Generalidades	68
2.2	Evasión de la respuesta inmune por el cáncer de pulmón.....	73
2.3	Puntos de control inmunológicos	75
2.3.1	Receptor de antígenos de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4).....	76
2.3.2	Vía del receptor de muerte celular programada (PD-1/PD-L1).....	79
2.3.2.1	<i>PD-1</i>	79
2.3.2.2	PD-L1	81
2.3.2.3	PD-L2	88
2.4	Inmunoterapia y carga mutacional tumoral.....	88
HIPÓTESIS & OBJETIVOS.....		93
MATERIALES & MÉTODOS.....		97
1.	MATERIALES	97
1.1	Diseño, contexto y pacientes	97
1.2	Variables.....	98
1.3	Prevención de sesgos.....	98
1.4	Tamaño de la muestra.....	99
1.5	Consentimiento informado	99
2.	MÉTODOS	100
2.1	Inmunohistoquímica PD-L1	100
2.1.1	Valoración de la Inmunohistoquímica de PD-L1	102
2.2	Análisis de reordenamientos en <i>ROS1</i> mediante hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	105

2.2.1	6q22 <i>ROS1</i> Break Apart FISH probe RUO kit (Abbott Molecular).....	106
2.3	Análisis del estado mutacional de los genes <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> y <i>BRAF</i>	110
2.3.1	Extracción de ADN	110
2.3.2	Cuantificación de ADN	110
2.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para detección de mutaciones en <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> y <i>BRAF</i>	111
2.4	Análisis estadístico.....	116
RESULTADOS		121
1.	PACIENTES	121
2.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	123
3.	EXPRESIÓN DE PD-L1	129
4.	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	131
5.	CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y VARIABLES CLÍNICAS	139
6.	CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE PD-L1 Y LAS MUTACIONES CONDUCTORAS ANALIZADAS	142
7.	EXPRESIÓN DE PD-L1 Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	145
DISCUSIÓN		149
1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	150
2.	EXPRESIÓN DE PD-L1	152
3.	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	154

3.1	<i>EGFR</i>	154
3.2	<i>ALK</i>	157
3.3	<i>ROS1</i>	158
3.4	<i>KRAS</i>	158
3.5	<i>BRAF</i>	160
3.6	<i>NRAS</i>	161
4.	CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y VARIABLES CLÍNICAS.....	162
5.	CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y LAS MUTACIONES “CONDUCTORAS” ANALIZADAS	162
5.1	<i>EGFR</i> y PD-L1	163
5.2	<i>ALK</i> y PD-L1	165
5.3	<i>ROS-1</i> y PD-L1.....	166
5.4	<i>KRAS</i> y PD-L1.....	166
5.5	<i>BRAF</i> Y PD-L1.....	167
5.6	<i>NRAS</i> y PD-L1.....	168
6.	EXPRESIÓN DE PD-L1 Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	168
	CONCLUSIONES.....	173
	REFERENCIAS.....	177
	LISTA DE FIGURAS	211
	LISTA DE TABLAS	215
	ANEXO 1. Estadio clínico AJCC séptima edición	219

ANEXO 2. ESCALA ECOG.....	221
ANEXO 3 Dictamen del comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo	223
ANEXO 4. Permiso de reproducción de figuras.....	227

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AJCC:	“American Joint Committee on Cancer”
ALK:	“Anaplastic lymphoma kinase” - quinasa del linfoma anaplásico
ATP:	“adenosine triphosphate” - adenosín trifosfato
BAG:	Biopsia con aguja gruesa
BDGF:	“brain-derived neurotrophic factor” - factor neurotrófico derivado del cerebro
BRAF:	“ <i>B-Raf</i> proto-oncogene, serine/threonine kinase” - <i>B-Raf</i> proto-oncogén serina treonina quinasa
c-KIT:	“ <i>KIT</i> proto-oncogene, receptor tyrosine kinase” - receptor tirosina quinasa del proto-oncogén <i>KIT</i>
CAP:	“College of American Pathologists”- Colegio Americano de Patólogos
CK2:	“casein kinase 2” - caseína quinasa 2
CMH:	complejo mayor de histocompatibilidad
CPNCP:	Carcinoma de célula no pequeña de pulmón
CTLA-4:	“Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4” - Receptor de antígenos de linfocitos T citotóxicos 4
CTLs:	“Cytotoxic T lymphocytes” - Linfocitos T citotóxicos

- DAPI:** “4',6-diamidino-2-phenylindole” - 4,6 diamino-2-fenilindol
- ECOG:** “Eastern Cooperative Oncology Group”
- EGRF:** “Epidermal growth factor receptor” - receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EML4:** “echinoderm microtubule associated protein-like 4”
- ERRB:** “erb-b receptor tyrosine kinase ” - familia de receptores de tirosina quinasa
- ERRB2:** “erb-b2 receptor tyrosine kinase 2” - receptor de tirosina quinasa 2 erb-b2
- FFPE:** “formalin-fixed, paraffin embedded” – fijado en formol y embebido en parafina
- FGFR:** “fibroblast growth factor receptor” - factor del receptor de crecimiento de fibroblastos
- FISH:** “Fluorescence in situ hybridation” - hibridación fluorescente in situ
- FNT- α :** factor de necrosis tumoral- α
- HE:** Hematoxilina eosina
- HGF:** “hepatocyte growth factor” - factor de crecimiento de los hepatocitos
- HGFR:** “hepatocyte growth factor receptor” – receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos

ICB:	“immune checkpoint blockade” – bloqueadores de los puntos de control inmunitarios
ICI:	“immune checkpoint inhibitor” – inhibidor de los puntos de control inmunitarios
IL:	Interleuquina
IFNγ:	Interferón- γ
IHQ:	inmunohistoquímica
JAK:	“Janus kinases” – quinasas Jano
<i>KIF5B</i>:	kinesin family member 5B - miembro 5B de la familia de la quinesina proto-oncogén <i>KIT</i>
<i>KRAS</i>:	“ <i>KRAS</i> proto-oncogene, GTPase” - <i>KRAS</i> proto-oncogén GTPasa
LCMC:	“The Lung Cancer Mutation Consortium”
MAPK:	“Mitogen-Activated Protein Kinases” - proteína quinasas activadas por mitógenos
<i>MET</i>:	“ <i>MET</i> proto-oncogene, receptor tyrosine kinase” - proto-oncogén <i>MET</i> del receptor de tirosina quinasa
NE:	neuroendocrino
NGS:	“Next-generation sequencing” - Secuenciación de nueva generación
NGR:	“Nerve growth factor” – factor de crecimiento nervioso
NK:	“natural killer”

- NOS:** “Not otherwise specified” - no especificado
- NPM:** “nucleophosmin” – nucleofosmina
- NRAS:** “*NRAS* proto-oncogene, GTPase” - *NRAS* proto-oncogén GTPasa
- NTF-3:** “neurotrophin 3” – neurotrofina 3
- NTRK:** “Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1” - receptor de tirosina quinasa neurotrófico
- OS:** “Overall survival” – supervivencia global
- PCR:** “polymerase chain reaction” - reacción en cadena de la polimerasa
- PD-1:** “Programmed cell death protein 1” – proteína de la muerte celular programada 1
- PD-L1:** “Programmed Death-ligand 1” - Ligando de la vía de muerte celular programada 1
- PD-L2:** “Programmed Death-ligand 2” - Ligando de la vía de muerte celular programada 2
- PFS:** “Progression-free survival” – supervivencia libre de progresión
- PI3K:** “phosphatidylinositol 3-kinases” - fosfatidil inositol 3 quinasa
- PTEN:** “Phosphatase and tensin homolog “ - fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
- RET:** “*RET* proto-oncogene” – proto-oncogén *RET*

RT-PCR:	“real time polymerase chain reaction” - reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
ROS1:	“ <i>ROS</i> proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase” - receptor tirosina quinasa <i>ROS</i> proto-oncogén 1
SEAP:	Sociedad Española de Anatomía Patológica
SEOM:	Sociedad Española de Oncología Médica
SHP1:	“Src homology region 2 domain-containing phosphatase- 1”
SHP2:	“Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2”
STAT:	“signal transducer and activator of transcription – transductor de señales y activador de la transcripción”
TCR:	“T cell receptor” - receptor del linfocito T
TMB:	“Tumor mutational burden” – carga mutacional tumoral
TME:	“tumor microenvironment” – microambiente tumoral
TPS:	“Tumor proportion score”
TRK:	“Tropomyosin receptor kinase” - receptores de tropomiosina de tirosina quinasa
WT:	“Wild type”

I

Introducción

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial, con una estimación de 1.7 millones de muertes en el año 2020 (Globocan 2020). En España, los cánceres que produjeron más defunciones ese mismo año fueron los de pulmón (22.930 casos) seguido del cáncer colorrectal, páncreas, mama, próstata, hígado/vías biliares y estómago, todos ellos con más de 5.000 fallecimientos (SEOM 2020).

El principal factor de riesgo que aumenta la probabilidad de contraer cáncer de pulmón es el tabaco. Otros factores incluyen respirar aire contaminado, la exposición a radón, asbesto, diésel o a radiaciones ionizantes así como la presencia de antecedentes familiares (Dubey 2016, Ramada 2010). Adicionalmente, hay evidencia que sugiere una correlación con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, de manera independiente al uso del tabaco, la cual es mediada probablemente por susceptibilidad genética (Reck 2017).

Determinar el subtipo histológico del cáncer de pulmón empezó a tomar relevancia en los últimos años dados los notables avances en la genética de los tumores, con profundas implicaciones en el diagnóstico histopatológico y molecular así como en su tratamiento (WHO 2015, Travis 2013 y 2015). Así, una vez evaluado el tejido tumoral y teniendo en cuenta las características morfológicas e inmunohistoquímicas el cáncer puede ser diagnosticado y clasificado adecuadamente (Tabla 1 Travis 2015). El grupo histológico más frecuente es el denominado Carcinoma Pulmonar de Célula no Pequeña (CPCNP), que constituye aproximadamente el 85% de los

casos y que incluye al adenocarcinoma y al carcinoma epidermoide (Herbst 2018, Carbone 2015). Desgraciadamente, la mayoría de estos pacientes se diagnostican cuando la enfermedad está localmente avanzada o metastásica y muchos no sobreviven más allá de 5 años (Carbone 2015). De ahí la importancia de un diagnóstico adecuado que permita un tratamiento individualizado a partir de las alteraciones moleculares de cada subtipo histológico.

Estas terapias dirigidas han redefinido el manejo del CPCNP, con tratamientos cuyas dianas son reordenamientos en el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) o del gen *ROS1* proto-oncogén 1 del receptor de tirosina quinasa (*ROS1*) así como mutaciones de los genes del receptor del factor del crecimiento epidérmico (*EGFR*), de *KRAS* proto-oncogén GTPasa (*KRAS*) o de *BRAF* proto-oncogén, serina/treonina quinasa (*BRAF*). El problema radica en que muchos de los pacientes no presentan estas alteraciones y no pueden acceder a estas opciones terapéuticas (Low 2019). Es aquí y gracias al estudio de la inmunología tumoral cuando aparece una de las grandes incorporaciones al arsenal terapéutico del cáncer de pulmón: la inmunoterapia. Ésta, a través del desarrollo de moduladores inmunes ha alterado dramáticamente el manejo de los casos en estadios avanzados, como parte del manejo en primera línea y mejorando la supervivencia de los pacientes, especialmente en aquellos en los que hace unos años, no tenían ninguna opción de tratamiento (Low 2019). La expresión de PD-L1, la carga mutacional tumoral y la infiltración por linfocitos T CD8+ se han asociado con un aumento en los beneficios de la inmunoterapia. Sin embargo, la efectividad de este tratamiento en pacientes con alteraciones moleculares conductoras y expresión concomitante de PD-L1 sigue siendo controvertido dado que hay pocos datos disponibles al respecto. La mayoría de estudios disponibles son de pacientes con mutaciones en *EGFR* o reordenamientos de *ALK*, mientras que los datos para otras alteraciones moleculares menos frecuentes son en su mayoría deficientes (Berghoff 2019).

Tabla 1. Clasificación de los tumores de pulmón. Original tomado de la referencia Travis 2015. Permitido por Journal of Thoracic Oncology.

TABLE 1. 2015 WHO Classification of Lung Tumors ^{a,b,c}		TABLE 1. (Continued)	
Histologic Type and Subtypes	ICDO Code	Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Epithelial tumors		Papillomas	
Adenocarcinoma	8140/3	Squamous cell papilloma	8052/0
Lepidic adenocarcinoma ^f	8250/3 ^d	Exophytic	8052/0
Acinar adenocarcinoma	8551/3 ^d	Inverted	8053/0
Papillary adenocarcinoma	8260/3	Glandular papilloma	8260/0
Micropapillary adenocarcinoma ^f	8265/3	Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Solid adenocarcinoma	8230/3	Adenomas	
Invasive mucinous adenocarcinoma ^f	8253/3 ^d	Sclerosing pneumocytoma ^f	8832/0
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 ^d	Alveolar adenoma	8251/0
Colloid adenocarcinoma	8480/3	Papillary adenoma	8260/0
Fetal adenocarcinoma	8333/3	Mucinous cystadenoma	8470/0
Enteric adenocarcinoma ^f	8144/3	Mucous gland adenoma	8480/0
Minimally invasive adenocarcinoma ^f		Mesenchymal tumors	
Nonmucinous	8256/3 ^d	Pulmonary hamartoma	8992/0 ^d
Mucinous	8257/3 ^d	Chondroma	9220/0
Preinvasive lesions		PEComatous tumors ^f	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 ^d	Lymphangioliomyomatosis	9174/1
Adenocarcinoma in situ ^f		PEComa, benign ^f	8714/0
Nonmucinous	8250/2 ^d	Clear cell tumor	8005/0
Mucinous	8253/2 ^d	PEComa, malignant ^f	8714/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Keratizing squamous cell carcinoma ^f	8071/3	Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma ^f	8072/3	Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Basaloid squamous cell carcinoma ^f	8083/3	Epithelioid hemangi endothelioma	9133/3
Preinvasive lesion		Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Synovial sarcoma	9040/3
Neuroendocrine tumors		Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Small cell carcinoma	8041/3	Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation ^f	8842/3 ^d
Combined small cell carcinoma	8045/3	Myoepithelial tumors ^f	
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelioma	8982/0
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelial carcinoma	8982/3
Carcinoid tumors		Lymphohistiocytic tumors	
Typical carcinoid tumor	8240/3	Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3	Diffuse large cell lymphoma	9680/3
Preinvasive lesion		Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 ^d	Intravascular large B cell lymphoma ^f	9712/3
Large cell carcinoma	8012/3	Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Erdheim-Chester disease	9750/1
Sarcomatoid carcinomas		Tumors of ectopic origin	
Pleomorphic carcinoma	8022/3	Germ cell tumors	
Spindle cell carcinoma	8032/3	Teratoma, mature	9080/0
Giant cell carcinoma	8031/3	Teratoma, immature	9080/1
Carcinosarcoma	8980/3	Intrapulmonary thymoma	8580/3
Pulmonary blastoma	8972/3	Melanoma	8270/3
Other and Unclassified carcinomas		Meningioma, NOS	9530/0
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3	Metastatic tumors	
NUT carcinoma ^f	8023/3 ^d		
Salivary gland-type tumors			
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3		
Adenoid cystic carcinoma	8200/3		
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3		
Pleomorphic adenoma	8940/0		

(Continued)

^aThe morphology codes are from the ICDO.² Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.
^bThe classification is modified from the previous WHO classification³ taking into account changes in our understanding of these lesions.
^cThis table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.¹
^dThese new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.
^eNew terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.³
^fLCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma, WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

1. **BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

El cáncer de pulmón es una enfermedad heterogénea y la comprensión de su génesis y biología es crucial para el desarrollo de tratamientos efectivos. Durante los últimos 20 años se ha evolucionado desde el uso empírico de terapias citotóxicas a terapias con dianas moleculares específicas mejor toleradas. Estas dianas se han desarrollado gracias al estudio del proceso de carcinogénesis, y permiten un aumento en la supervivencia y en la calidad de vida, especialmente en los casos de adenocarcinoma (Collison 2014 y Hammerman 2012).

Como se mencionó previamente, el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón es el tabaco. El daño tisular a partir del tabaco inicialmente se manifiesta en cambios genéticos, epigenéticos (mutaciones, pérdida de heterocigosidad y metilación del promotor) y posteriormente de manera global en el transcriptoma, específicamente en las vías inflamatorias y de apoptosis (Herbst 2008). Si estos cambios persisten en el tiempo, conducen eventualmente a la activación permanente e irregular de vías de proliferación y apoptosis que se traduce morfológicamente en lesiones premalignas, como la displasia. Alteraciones adicionales resultan en cáncer invasivo, angiogénesis y metástasis (Mao 1997). Dentro de estas anomalías, aparecen las denominadas “mutaciones conductoras”, las cuales son esenciales para la supervivencia de las células tumorales. La dependencia de éstas a dichas mutaciones se denomina “adicción oncogénica” y su inactivación resulta en muerte celular y por ende se detiene el crecimiento del tumor (WHO 2015, Weinstein 2006). Dichas “mutaciones conductoras” juegan un rol fundamental en la carcinogénesis, y su presencia o ausencia debe determinarse de manera rutinaria dada la existencia de tratamientos específicos para cada una de ellas en caso de estar presentes.

Las mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y los reordenamientos en el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) fueron las primeras alteraciones moleculares descritas (en 2004 y 2007 respectivamente) que mostraron ser sensibles a terapias específicas, concretamente a inhibidores de tirosina quinasa (Politi 2015). Ensayos clínicos han visto que el tratamiento de cánceres avanzados con estos medicamentos presenta una respuesta superior a la quimioterapia convencional en pacientes con las mutaciones y de manera opuesta, aquellos pacientes sin las alteraciones, responden mejor a la quimioterapia (Mok 2009, Shaw 2013).

Las principales alteraciones oncogénicas y su frecuencia en porcentaje según el tipo histológico se recogen en la figura 1. (Herbst 2018).

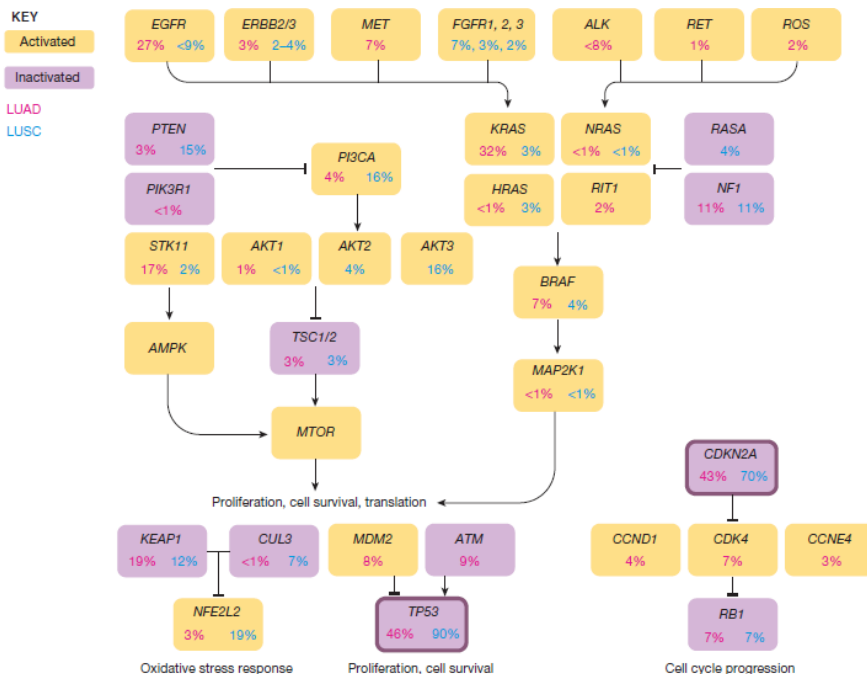


Figura 1. Alteraciones moleculares en cáncer de pulmón. Original tomado de la referencia Herbst 2018. Permitido por Springer Nature.

La última guía del Colegio Americano de Patólogos (CAP) y la Asociación de Patología Molecular establece para la realización de pruebas moleculares, la división de las principales alteraciones en tres categorías (Lindeman 2018). Un primer grupo, el cual debe realizarse a todos los pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadio avanzado incluye la detección de alteraciones en los genes de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*), del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y del receptor tirosina quinasa *ROS* proto-oncogén 1 (*ROS1*). El segundo grupo se debe realizar como parte de un panel ampliado al anterior o cuando éstos resultan negativos. En esta categoría están el *KRAS* proto-oncogén GTPasa (*KRAS*), el *B-Raf* proto-oncogén serina treonina quinasa (*BRAF*), el proto-oncogén *MET* del receptor de tirosina quinasa (*MET*), el proto-oncogén *RET* (*RET*) y el receptor de tirosina quinasa 2 erb-b2 (*ERBB2* O *HER2*). El último grupo corresponde a genes en investigación como el *NRAS* proto-oncogén GTPasa (*NRAS*) el receptor de tirosina quinasa neurotrófico (*NTRK*) o el factor del receptor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR*), entre otros (Tabla 2) (Lindeman 2018).

Tabla 2. Marcadores emergentes en CPCNP. Original a partir de la referencia Lindeman 2018. Permitido por Elsevier.

Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (<i>MEK1/MAP2K1</i>)
Fibroblast growth factor receptor 1–4 (<i>FGFR 1–4</i>)
Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1–3 (<i>NTRK1-3</i>)
Neuregulin 1 (<i>NRG1</i>)
Ras-like without CAAX 1 (<i>RIT1</i>)
Neurofibromin 1 (<i>NF1</i>)
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (<i>PIK3CA</i>)
AKT serine/threonine kinase 1 (<i>AKT1</i>)
NRAS proto-oncogene, GTPase (<i>NRAS</i>)
Mechanistic target of rapamycin (<i>MTOR</i>)
Tuberous sclerosis 1 (<i>TSC1</i>)
Tuberous sclerosis 2 (<i>TSC2</i>)
KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase (<i>KIT</i>)
Platelet-derived growth factor receptor alpha (<i>PDGFRA</i>)
Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (<i>DDR2</i>)

Por su parte, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), establecieron un consenso en el año 2019 en el cual además de hacer las pruebas antes mencionadas en pacientes en estadios avanzados, incluye dentro de su algoritmo la detección de mutaciones en *BRAF* y la expresión del ligando del receptor de la vía de muerte celular programada (PD-L1) (Figura 2) (Garrido 2019).

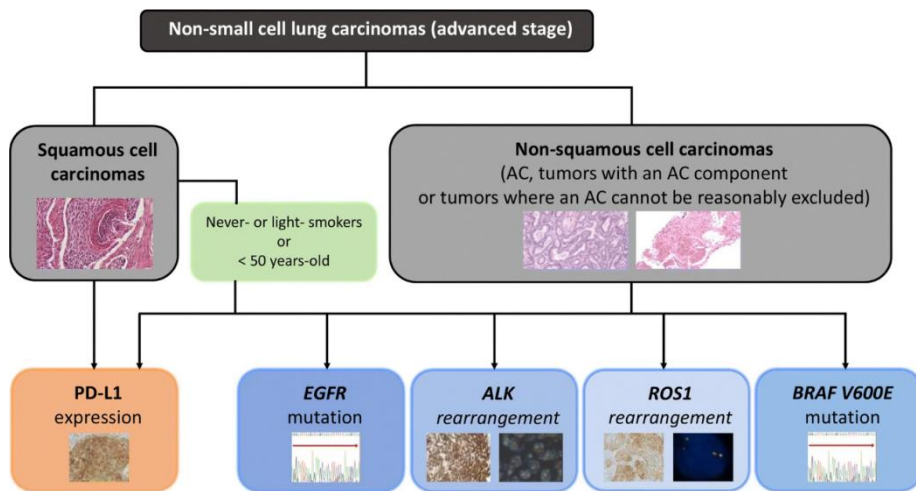


Figura 2. Algoritmo diagnóstico para realización de pruebas de biomarcadores en pacientes en estadios avanzados de CPCNP. Original tomado de la referencia Garrido 2019. Licencia Creative Commons.

1.1 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (*EGFR*)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor - *EGFR*) es un gen que pertenece a la familia de receptores de la tirosina quinasa (ErbB). Se encuentra localizado en el cromosoma 7p11.2, se extiende cerca de 200kb, contiene 28 exones y codifica una proteína de 464 aminoácidos (Cheng 2012). Ésta se compone de una región extracelular N-terminal que se une al ligando, un segmento lipofílico transmembrana, y una región intracelular C-terminal con el dominio tirosina quinasa (Figura 3 Cheng 2012).

Una vez el ligando se une al dominio extracelular, hay una homo/heterodimerización y posterior autofosforilación de las tirosinas c-terminales. Esto lleva a una activación intracelular de la cascada de las vías PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa), JAK/STAT (Jano quinasa/ transductor de señales y activador de la transcripción) y

MAPk (vía de las proteína quinasas activadas por mitógenos) y por tanto, a la inducción de varias respuestas celulares cruciales como proliferación, angiogénesis, metástasis y disminución de los procesos de apoptosis (Cheng 2012, Cagel 2018, Cunha Santos 2011). Por tanto, la desregulación en la señalización en estos receptores, ya sea por sobreexpresión o por la adquisición de mutaciones somáticas puede conducir a la tumorigénesis en una variedad de cánceres humanos (Shah 2020).

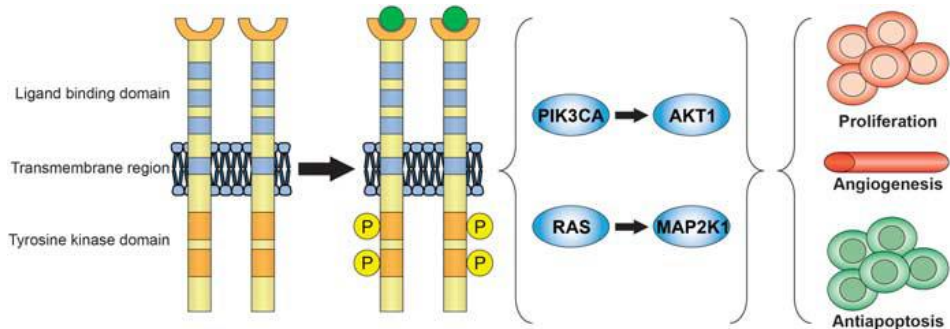


Figura 3. Estructura molecular del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Original tomado de la referencia Cheng 2012. Permitido por Modern Pathology.

Específicamente en el CPCNP, las mutaciones activadoras en el gen de *EGFR* se han reportado en un 10-15% de pacientes occidentales con adenocarcinoma y hasta en un 50% en pacientes asiáticos (Shah 2020). En España, la mutación está presente en el 8%-11% de los CPCNP en estadios avanzados y específicamente en adenocarcinoma en un 16.6% (Garrido 2019, Rossell 2016). Otras características clínicas que se correlacionan con la presencia de esta mutación son el género femenino, no fumador y las variantes histológicas de adenocarcinoma de tipo lepidico y papilar (Cunha Santos 2011, WHO 2015).

El clúster de mutaciones ocurre en el dominio tirosina quinasa en los exones 18, 19, 20 y 21 (Penzel 2011). Éstas pueden clasificarse en tres categorías principales: deleciones en el exón 19, inserciones en el

exón 20 y mutaciones con cambio de aminoácidos en los exones 18-21 (Cheng 2012). Una revisión de Yamamoto y colaboradores en 2009 sobre 2880 pacientes con carcinoma de pulmón, detectó 569 mutaciones en *EGFR*, estando 48% localizadas en el exón 19, 42% en el exón 21, 3.7% en el exón 20 y 3.2% en el exón 18 (Yamamoto 2009). Dentro de las mutaciones del exón 19 se encuentran la delE746-A750, delL747-T751insS y delL747-P753insS. En el exón 21 la mutación más característica es la L858R pero también se encuentran la L861Q y L861R. En el exón 18 están G719C, G719S y G719A. Por su parte, las mutaciones en el exón 20 se asocian a resistencia a tratamientos, siendo la más importante la T790M (Cheng 2012).

La importancia terapéutica de estas alteraciones moleculares se demostró a mediados de la década pasada, cuando se encontró que los adenocarcinomas que albergaban estas mutaciones respondían a tratamientos con moléculas inhibitoras de la tirosina quinasa bloqueando la señalización de EGFR (Shah 2020). Los primeros inhibidores desarrollados fueron erlotinib y gefitinib, denominados de primera generación porque son reversibles y su único blanco es el EGFR; interrumpen su señalización al competir con el ATP en el dominio catalítico intracelular del receptor, inhibiendo la autofosforilación del dominio y atenuando la activación de la cascada intracelular (Sharma 2007).

Gefitinib y erlotinib han sido aprobados para el tratamiento de CPCNP en primera línea, pero desgraciadamente, con el tiempo la mayoría de pacientes desarrollan resistencia a estos agentes (Shah 2020). La causa más frecuente, identificada hasta en un 50% de los casos, es una segunda mutación en *EGFR* en el exón 20, con la sustitución de una treonina por una metionina en el codón 790 (T790M) (Kobayashi 2005, Arcila 2011). Esta mutación afecta la eficacia inicial del inhibidor ya sea al generar un efecto estérico o al aumentar la afinidad del dominio tirosina quinasa por el ATP. Otros

mecanismos de resistencia descritos incluyen la amplificación de *HER2* (ésta ha sido identificada en el 12-13% de los tumores resistentes a tratamiento con inhibidores de primera generación), amplificación del proto-oncogén *MET* y mutaciones en *BRAF* y en la vía PI3K que generan vías de señalización compensadoras (Heydt 2018, Shah 2020). A nivel histopatológico se ha descrito como mecanismo de resistencia el cambio de fenotipo a carcinoma de célula pequeña (Herbst 2018, Camidge 2014).

Es por esto que se empezaron a desarrollar otra serie de medicamentos que pudieran superar los mecanismos de resistencia, al inhibir de manera simultánea e irreversible múltiples receptores de la familia ErbB. Estos fármacos incluyen a afatinib y dacomitinib y son los denominados inhibidores de segunda generación, los cuales han mostrado un aumento en la supervivencia libre de progresión en comparación a los de primera generación (Herbst 2018, Paz-Ares 2017). Afatinib inhibe de manera irreversible a EGFR, Her2 y Her4 al bloquear la transfosforilación de los residuos de tirosina a nivel c-terminal, sitio donde se da el primer paso de la activación de los receptores ErbB. Tiene un perfil inhibitorio más amplio y está aceptado como tratamiento de primera línea para adenocarcinomas y como segunda línea en carcinomas epidermoides (Shah 2020). Al igual que los inhibidores de primera generación, el mecanismo de resistencia más frecuente es la mutación T790M detectada en el 50-70% de los casos (Tanaka 2017) seguida por la amplificación de *MET*; también se ha detectado sobreexpresión del *FGFR* (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos) y aparición de mutaciones terciarias en *EGFR* tal como la V843I (Van der Wekken 2016). El otro medicamento incluido en este grupo es el dacomitinib, que actúa de manera similar a afatinib y ha sido aprobado recientemente como primera línea de tratamiento para el carcinoma de célula no pequeña de pulmón *EGFR* positivo. Datos in vitro han indicado resistencia por medio de la mutación T790M pero hasta ahora hay pocos datos al respecto (Shah 2020).

Los últimos medicamentos en desarrollarse han sido los inhibidores de tercera generación representados por osimertinib, el cual es efectivo en pacientes con la mutación T790M y en aquellos casos con progresión después del uso de inhibidores de primera generación. Este medicamento se une de manera covalente a una cisteína en el codón 797 y logra sobrepasar la afinidad mejorada del ATP secundaria a la mutación. Los mecanismos de resistencia descritos a este fármaco incluyen la amplificación de *MET*, mutaciones terciarias en *EGFR*, específicamente C797S y otras como amplificación de *HER2* y mutaciones en *RAS* (Shah 2020, Herbst 2018, Niederst 2015) (figura 4 Cheng 2012).

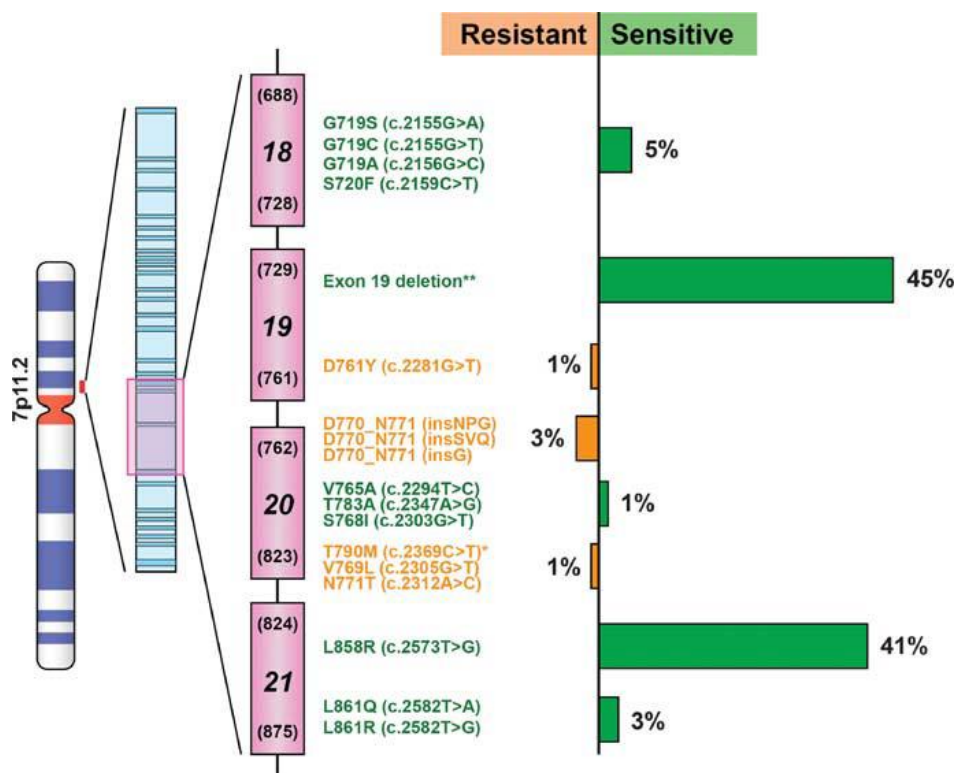


Figura 4. Estructura génica del *EGFR*, frecuencia de mutaciones y resistencias. Original tomado de la referencia Cheng 2012. Permitido por Modern Pathology.

El último consenso de la SEAP-SEOM así como las guías del Colegio Americano de Patólogos (CAP) sobre la determinación de biomarcadores en cáncer de pulmón recomiendan determinar la presencia de mutaciones en *EGFR* de manera universal, en todos los pacientes con adenocarcinoma en estadios avanzados, en pacientes con carcinomas epidermoides menores de 50 años y en aquellos casos de no fumadores o que tengan un acúmulo inferior a 15 paquetes/año (Garrido 2019). Esta determinación se puede hacer usando una variedad de métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), secuenciación de Sanger, pirosecuenciación y secuenciación de nueva generación (NGS) entre otros. La inmunohistoquímica (IHQ) no se recomienda para analizar este biomarcador (Cagle 2018, Lindeman 2018).

1.2 QUINASA DEL LINFOMA ANAPLÁSICO (*ALK*)

El gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 2 y codifica un receptor de tirosina quinasa transmembrana que pertenece a la superfamilia de receptores de insulina (Golding 2018). La proteína está constituida por un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio quinasa intracelular. Su función en humanos no está del todo clara pero se ha sugerido un rol en el desarrollo del sistema nervioso fetal (Golding 2018). Hay tres tipos de mutaciones en *ALK*: amplificaciones, mutaciones puntuales y reordenamientos, siendo estos últimos los más frecuentes (Du 2018). El primero en ser descubierto fue el gen de fusión nucleofosmina (*NPM*)-*ALK* en el contexto del linfoma anaplásico de células grandes (Morris 1994). Posteriormente, en el año 2007, Soda y colaboradores descubrieron la fusión “echinoderm microtubule associated protein-like 4” (*EML4*)-*ALK* en un subgrupo de pacientes con CPCNP. Esta fusión se forma como resultado de una inversión dentro del brazo corto del

cromosoma 2 que une el intrón 13 de *EML4* con el intrón 19 de *ALK* [*inv(2)(p21;p23)*]. Dicha fusión oncogénica codifica una proteína tirosina quinasa constitutivamente activa que genera inhibición de la apoptosis y la promoción de la proliferación celular a través de la activación de las vías PI3K/AKT, MAPk y STAT3 (Figura 5 Cheng 2012).

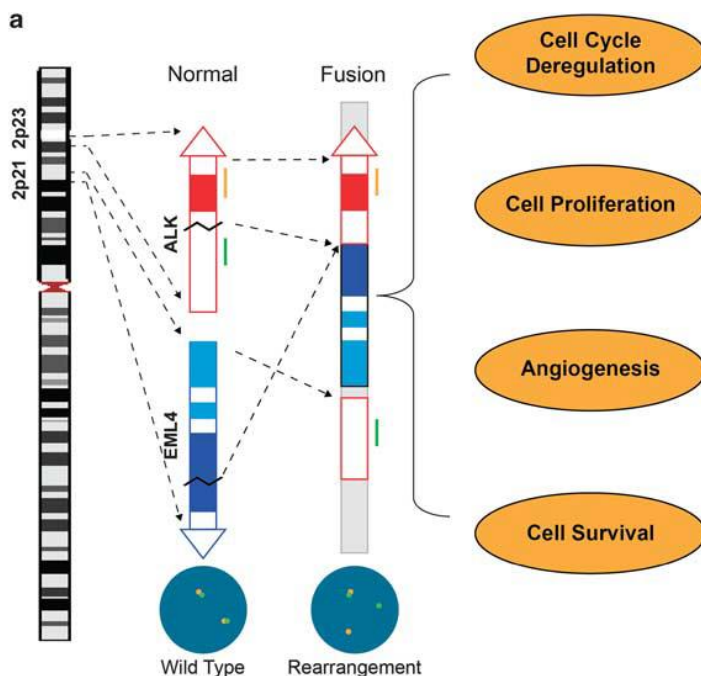


Figura 5. Reordenamiento de *ALK*. Original tomado de la referencia Cheng 2012. Permitido por Modern Pathology.

Dado los diferentes puntos de rotura de *EML4*, se han descrito hasta siete variantes de esta mutación (V1-V7), siendo la V1 la más frecuente (Soda 2007, Lawrence 2000, Cheng 2012). Otros reordenamientos descritos además de *EML4* incluyen *KIF5B* (miembro 5B de la familia de la quinesina), *LKCl* y *TFG*. (2012, Chiarle 2008, OMS 2015) (Figura 6. Wu 2017).

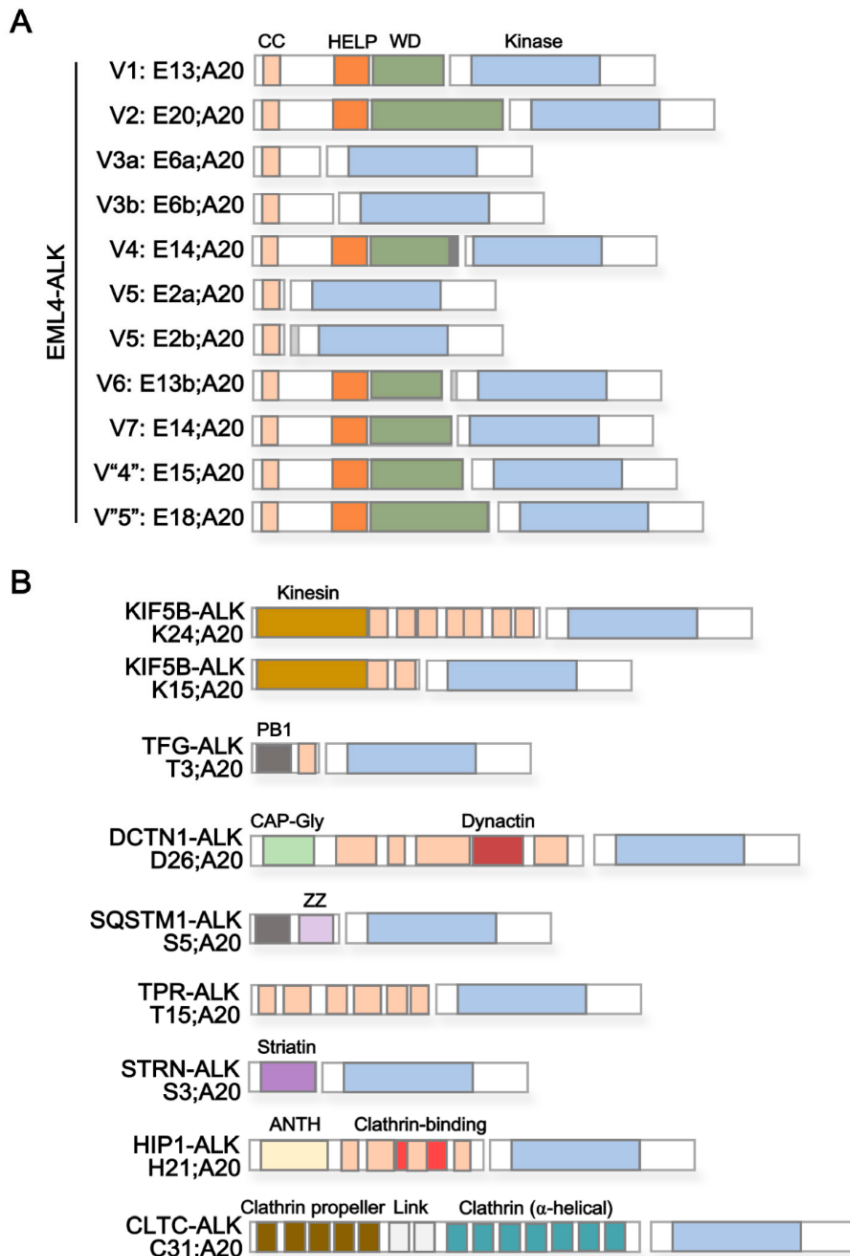


Figura 6. Variantes de la fusión *EML4-ALK* y otros genes de fusión descritos. Original tomado de la referencia Wu 2017. Licencia Creative Commons.

A nivel clínico-epidemiológico, el reordenamiento de *ALK* está presente en el 2-5% de los pacientes con CPCNP en estadios avanzados (Garrido 2018) y se observa más frecuentemente en pacientes jóvenes no fumadores; histopatológicamente se ha asociado principalmente a adenocarcinomas con patrones acinares (incluyendo morfología cribiforme) y a tumores con células en anillo de sello (Del Monte 2019).

En 2011, tan sólo 4 años después del descubrimiento de Soda et al, la FDA aprobó el uso de crizotinib para el tratamiento de pacientes con CPCNP *ALK* positivos en estadio avanzado. Crizotinib es un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de *ALK*, *MET* y *ROS1* y ha demostrado ser superior a la quimioterapia respecto a la tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión en todas las líneas de tratamiento (Solomon 2014). A pesar de estos resultados, después de cierto periodo de tiempo (media de 10.9 meses), hay progresión de la enfermedad, debido al desarrollo de hasta en un tercio de los casos de mutaciones de resistencia en el dominio tirosina quinasa de *ALK*, tales como L1196M (análoga a la mutación T790M de *EGFR*), G1269A, C1156Y, L1152R, G1202R, S1206Y, 1151Tins, F1174C y D1203N entre otras (Del Monte 2019) (Figura 7. Golding 2018). Estas alteraciones aumentan la afinidad del ATP, induciendo un cambio conformacional que interfiere con las vías de señalización. Otros mecanismos de resistencia descritos incluyen la amplificación de *ALK* o *EGFR* o mutaciones en *c-KIT* (receptor tirosina quinasa del proto-oncogén *KIT*) (Del Monte 2019).

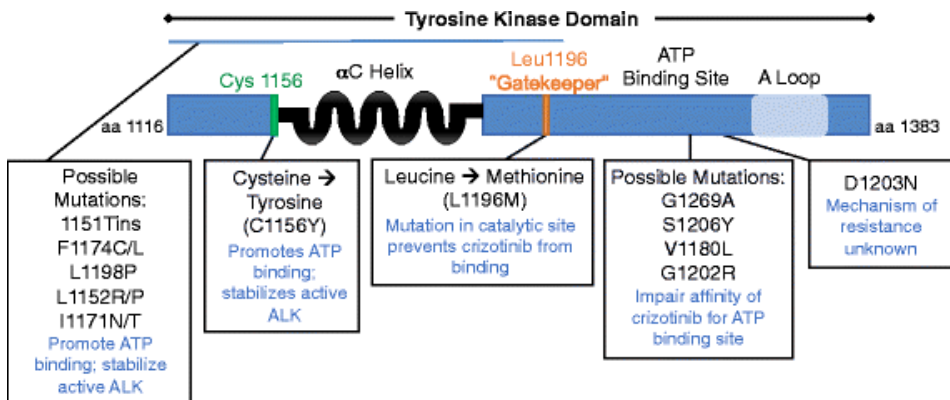


Figura 7. Mecanismos de resistencia a crizotinib. Original tomado de la referencia Golding 2018. Licencia open access.

Debido a esto, se han desarrollado inhibidores de ALK de segunda generación como ceritinib y alectinib que probaron ser efectivos contra muchas de las formas de resistencia a crizotinib, excepto a la sustitución G1202R (McCusker 2019). Afortunadamente, existe un inhibidor ALK de tercera generación (lorlatinib), el cual ha demostrado gran potencia y actividad a pesar de los mecanismos de resistencia y eficacia en pacientes previamente tratados con hasta tres líneas de inhibidores de ALK (Gainor 2016, Shaw 2017, McCusker 2019).

Al igual que con *EGFR*, el último consenso de la SEAP-SEOM así como las guías del CAP sobre la determinación de biomarcadores en cáncer de pulmón recomiendan que la búsqueda de reordenamientos en *ALK* se debe realizar de manera universal en todos aquellos pacientes con estadios avanzados de adenocarcinoma u otro tipo de carcinoma en el que no se haya demostrado características de carcinoma epidermoide. Respecto a este último grupo la recomendación es realizar el test en pacientes menores de 50 años y/o casos de no fumadores o que fumen menos de 15 paquetes/año (Garrido 2019). Los métodos ideales para la detección de estos reordenamientos son la IHQ, hibridación fluorescente in situ (FISH), PCR y NGS (Garrido 2019).

1.3 *ROS* PROTO-ONCOGÉN 1 DEL RECEPTOR DE TIROSINA QUINASA (*ROS1*)

El gen *ROS1*, también conocido como *MFC3* o *c-ros-1* se encuentra localizado en el cromosoma 6q22.1 y codifica un receptor tirosina quinasa estructuralmente similar a ALK; consta de un dominio de unión al ligando extracelular N-terminal, una región transmembrana hidrofóbica y un dominio intracelular tirosina quinasa (Lin 2017). A pesar de que no es conocido su ligando externo y su rol biológico en humanos no está definido, se piensa que funciona igual que ALK, es decir, por fosforilación de tirosina intracelular que activa las vías de señalización PI3K, STAT 3 y RAS/MAPk con los efectos celulares descritos previamente (Cagle 2017, Chin 2012).

Los reordenamientos en *ROS1* fueron descritos por primera vez en 1987 en una línea celular de glioblastoma, en donde se identificó la fusión con el gen *FIG* (localizado a nivel del cromosoma 6q22 adyacente a *ROS1*) dando como resultado una quinasa constitutivamente activa (Shibuya 1986). Desde su descripción inicial en glioblastomas, los reordenamientos de *ROS1* se han detectado en un amplio rango de tumores malignos como en angiosarcomas, melanomas spitzoides o carcinomas de diferentes tipos incluyendo los de vía biliar, gástrico, ovárico, colorrectal y CPCNP (Patil 2019). En este último se han detectado hasta 14 genes de fusión complementarios: *CD74*, *SLC34A2*, gen sindecan 4 (*SDC4*), gen ezrin (*EZR*), *FIG*, *LRIG3*, *KDELR2*, *CCDC6*, *MSN*, *TMEM106B*, *TPD52L1*, *CLTC* Y *LIMA1*. De todos ellos, el reordenamiento *CD74-ROS1* es el más frecuente (40-45%) (Lin 2017, Guo 2019) (figura 8. Lin 2017).

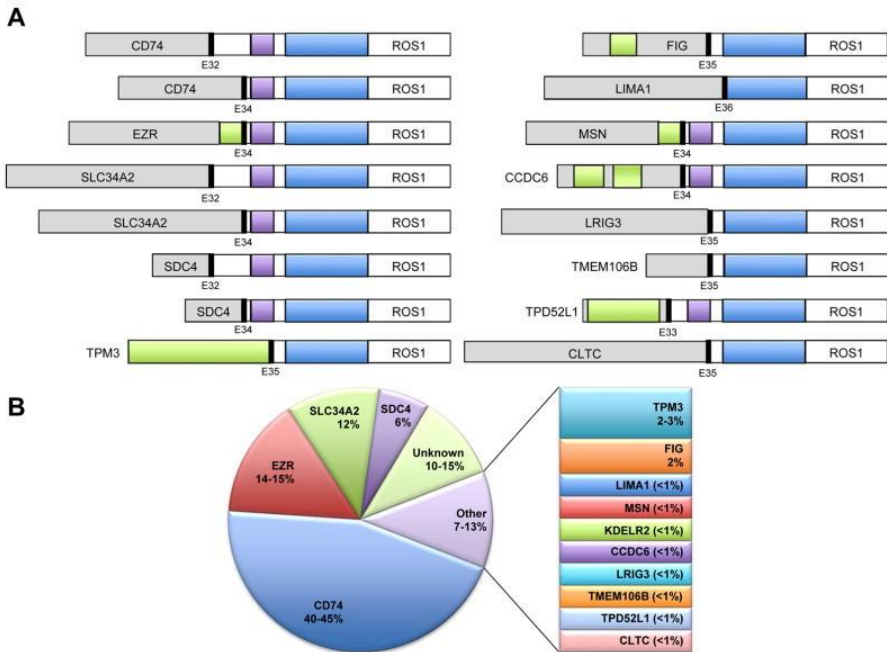


Figura 8. Reordenamientos de *ROS1* y su frecuencia en CPCNP. Original tomado de la referencia Lin 2017. Permitido por Journal of Thoracic Oncology.

Dichos reordenamientos se presentan en el CPCNP en el 1-2% de los casos y, de manera similar a *ALK*, son significativamente más frecuentes en adenocarcinomas (especialmente en aquellos con áreas sólidas y células en anillo de sello) de pacientes jóvenes, no fumadores (Bergheton 2012, Lin 2017). No obstante, también se han informado en casos con histologías escamosas y de célula grande; usualmente no coexisten con reordenamientos de *ALK* pero sí puede darse de manera concomitante, aunque muy raramente, con mutaciones en *EGFR* o *KRAS* (Patil 2019).

Dado que el receptor de tirosina quinasa de *ROS1* comparte un 49% de su secuencia de aminoácidos y un 77% del sitio de unión con el ATP con las secuencias de *ALK*, se tomó esta base estructural para

pensar que los inhibidores de este último podrían tener actividad sobre los primeros y con los mismos inconvenientes, esto es, la aparición de resistencias, especialmente la mutación G2032R, que es análoga a la G1202R de *ALK* (Lin 2017). Crizotinib y entrectinib están aprobados actualmente por la FDA como primera línea de tratamiento en pacientes con adenocarcinomas en estadios avanzados con el reordenamiento. Lorlatinib está recomendado en pacientes con CPCNP metastásico, cuya enfermedad ha generado resistencia a los medicamentos antes mencionados (Ettinger 2021).

Se recomienda que la detección de reordenamientos de *ROS1* se realice en pacientes con adenocarcinomas en estadios avanzados (IIIB-IV), independientemente de sus características clínicas. Respecto a carcinomas epidermoides, se debe realizar en el contexto de pacientes no fumadores. Dicho análisis se puede hacer por medio de inmunohistoquímica (cribado), FISH (método confirmatorio y considerado el “gold standard”) o por técnicas moleculares como RT-PCR y NGS (Garrido 2019).

1.4 *KRAS* PROTO-ONCOGÉN GTPASA

El *KRAS* proto-oncogén GTPasa, también conocido como oncogén homólogo al Kirsten rat sarcoma (*KRAS*), se encuentra localizado en el cromosoma 12 y codifica una proteína que pertenece a la familia de las GTPasas. Estructuralmente se compone de un dominio catalítico o G, el cual une nucleótidos de guanina para activar las señales de transducción e incluye cuatro regiones principales: un bucle de unión al fosfato, el switch I, el switch II y un bucle de unión a la base. Esta zona es altamente homóloga (90%) con otras proteínas RAS. En contraste, la región C-terminal es una región hipervariable que determina entonces la función de cada proteína (Burns 2020). De manera similar a las otras proteínas RAS, *KRAS* es un switch binario

que varía entre un estado de unión a GTP (activo) o a GDP (inactivo) con el fin de regular las vías de señalización; para ello se genera un cambio conformacional entre el switch I y II que permite unir el GTP y así interactuar con vías tales como RAF/MEK/ERK y PI3K/AKTmTOR (Figura 9) (Burns 2020, Friedlander 2020).

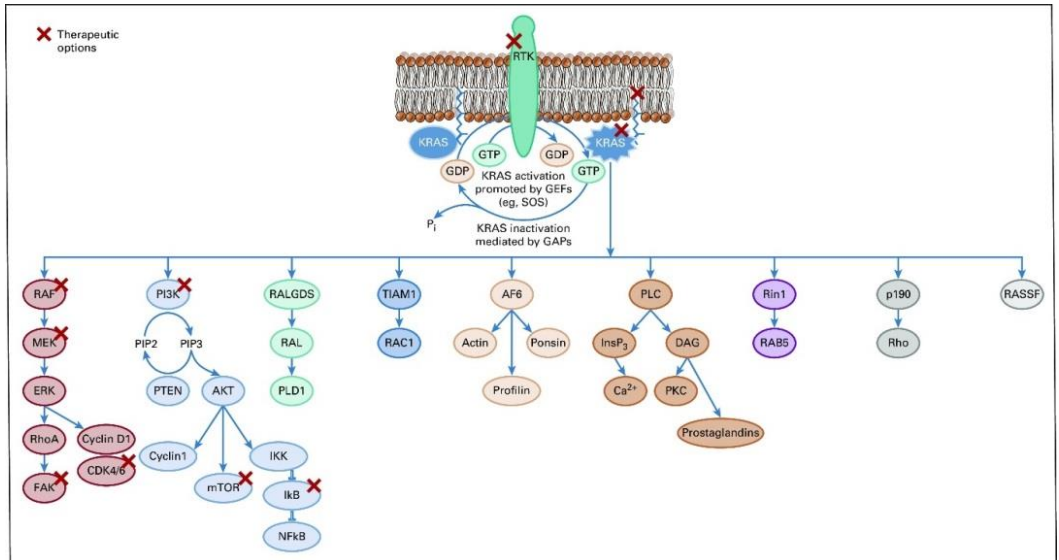


Figura 9. Fosforilación de KRAS y sus vías de señalización. Original tomado de la referencia Burns 2020. Permitido por Journal of Clinical Oncology.

Las mutaciones en *KRAS* se presentan en un 20-40% de adenocarcinomas, prevalencia que es mayor en occidentales en contraste con la población asiática (26% vs 11%) y en fumadores vs. no fumadores (30% vs 10%) (Adderley 2019). Son mutaciones heterogéneas en donde hay sustituciones que comprometen los codones 12, 13 y 61 (Lee 2012). La sustitución más frecuente, encontrada en el 41% de los casos es *KRAS* G12C y se ha identificado sobre todo en grandes fumadores. Es una mutación puntual con una sustitución de glicina a cisteína en el codón 12. Dicho residuo de cisteína se localiza cerca al switch I y II y su efecto genera cambios en

ciertos factores de intercambios de nucleótidos (GEF) (Burns 2020). En contraste, la sustitución G12D se ha encontrado en pacientes no fumadores o con poco hábito tabáquico (Friedlander 2020). Estas formas oncogénicas mantienen a RAS constitutivamente activo sin necesidad de estímulos externos lo cual resulta en una proliferación excesiva y aumento en la supervivencia celular (Cagle 2018).

Las terapias dirigidas contra *KRAS* mutado hasta ahora no habían sido clínicamente efectivas a pesar de haberse intentado múltiples aproximaciones tales como la inhibición directa del sitio de unión, inhibidores cascada abajo en MEK o BRAF o inhibición directa no covalente de RAS. Sin embargo, dada la localización especial del residuo de cisteína de la mutación G12C antes mencionada, se ha logrado desarrollar una molécula que se une de manera covalente a la región del switch, afectando la unión de los GEFs a la proteína de unión del GDP, impidiendo su transformación a GTP activo y por tanto, impidiendo la activación de *KRAS*. Este inhibidor es el sotorasib, y ha sido recientemente aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos como monoterapia en pacientes con CPCNP con mutación *KRAS G12C* y que hayan progresado tras al menos, una línea de terapia sistémica previa; además, en ratones inmunocompetentes se ha visto una respuesta pro-inflamatoria en el microambiente tumoral que podría tener beneficio al usarse en conjunto con terapias inhibitoras de los puntos de control inmunitarios (Canon 2019).

Las investigaciones continúan en busca de más moléculas, dada la frecuencia de las mutaciones en *KRAS* y las posibilidades que representa al ser mutuamente excluyente de las otras “mutaciones conductoras”, siendo esto importante en el algoritmo diagnóstico, dado que su positividad disminuye marcadamente la probabilidad de que otra de ellas se presente (Lindeman 2018).

Las últimas recomendaciones indican su estudio (por medio de RT-PCR o pirosecuenciación) como parte de un panel diagnóstico inicial o cuando las pruebas de rutina han resultado negativas (Lindeman 2018).

1.5 *B-RAF* PROTO-ONCOGEN, SERINA/TREONINA QUINASA (*BRAF*)

El gen B-Raf proto-oncogen, serina/treonina quinasa también conocido como V-raf murine sarcoma homolog b (*BRAF*) se encuentra localizado en el cromosoma 7q34 y codifica una quinasa de seronina/treonina que es clave en la vía de señalización de crecimiento y proliferación RAS/RAF/MAPK (vía también conocida como Raf-MEK-ERK) (Guo 2019).

En condiciones normales, los factores de crecimiento se unen a los receptores de tirosina quinasa de la superficie promoviendo su dimerización y autofosforilación; esto lleva a la fosforilación de otras proteínas de adaptación en la vía, que finalmente causan activación de Ras-GTPasa y ésta a su vez del oncogén *RAF*, el cual activa MEK con la posterior fosforilación de la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK), quien al ser traslocada al núcleo, se une y fosforila factores de transcripción alterando así la expresión génica (Khunger 2018) (Figura 10 Baik 2017). Cuando *BRAF* se encuentra mutado, hay una activación constitutiva de la cascada promoviendo una señalización incontrolable y crecimiento tumoral (Khunger 2018).

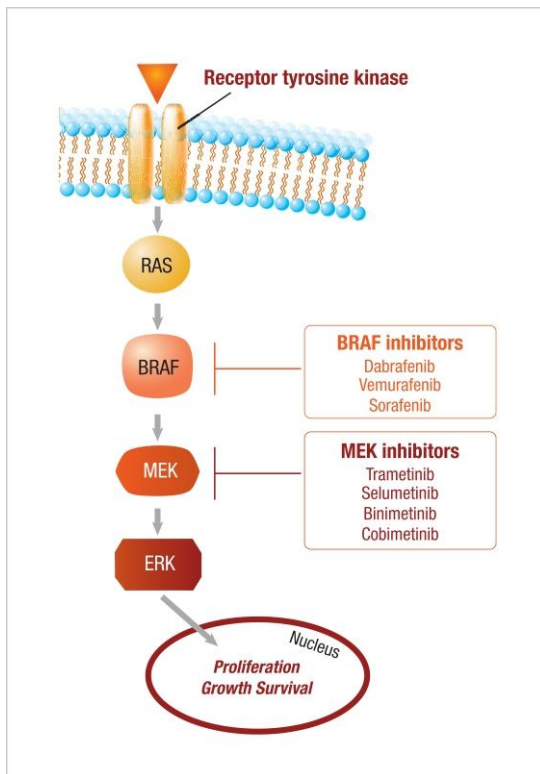


Figura 10. BRAF en la vía de señalización intracelular. Modificado del original Baik 2017. Permitido por The Oncologist.

Dicha mutación se presenta en el 2-4% de los pacientes con CPCNP siendo la más frecuente la sustitución de un glutamato por una valina en el codón 600 (V600E) del exón 15 (Baik 2017). Otras mutaciones documentadas incluyen K601E, L597Q y G469A/V y son de manera habitual mutuamente excluyentes con otras “mutaciones conductoras”; de ahí que sea interesante su uso en pacientes con opciones terapéuticas limitadas. (Baik 2017). Basados en el éxito de los tratamientos de inhibidores de BRAF (vemurafenib, dabrafenib) en melanoma, se ha estudiado su uso en combinación con un inhibidor de MEK (trametinib) en CPCNP, observándose resistencia al fármaco al haber una reactivación de ERK a través de la vía MAPK por medio de

señales alternativas u otros mecanismos no conocidos (Guo 2019, Noeparast 2017).

Las características clínicas de pacientes con esta mutación no están tan bien definidas como en el caso de *EGFR* y *ALK*, pero se ha relacionado con histología de adenocarcinoma y pacientes fumadores en hasta un 70% de los casos (Baik 2017).

Las guías diagnósticas más recientes recomiendan incluir *BRAF* como parte del estudio de todos los pacientes con CPCNP sin componente escamoso, y puede ser detectado por medio de cualquier PCR así como con NGS, siempre y cuando la metodología usada incluya los exones 11 y 15 (Garrido 2019).

1.6 *NRAS* PROTO-ONCOGEN GTPASA

NRAS es una GTPasa relacionada con *KRAS*, originalmente identificada en las líneas celulares del neuroblastoma como un tercer miembro de la familia RAS después de *KRAS* y *HRAS* quienes regulan el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. A pesar de que los 3 miembros de la familia comparten algunas secuencias, sus productos proteicos generan distintos tipos de señalización y tienen roles diferentes en la tumorigénesis (Hancock 2003, Pylayeva-Gupta 2011). Las mutaciones de *NRAS* en cáncer de pulmón son muy raras: 0.7% en el estudio de Ohashi et al, teniendo en cuenta el sesgo de que el 80% de los casos correspondían a adenocarcinoma. En este estudio también se asociaron estas mutaciones a pacientes afroamericanos y fumadores. El 50% de ellas corresponde a transversiones A:T > T:A y son mutuamente excluyentes de las alteraciones de *ALK*, *KRAS* y *EGFR* (Ohashi 2013). Un caso de reciente descripción, en el cual un paciente presentaba un CPCNP con mutación de *BRAF* y desarrolló resistencia adquirida a los inhibidores de RAF y MEK, coincidió con

la aparición de una mutación de ganancia de función en *NRAS* Q61K (Abravanel 2018). Estos hallazgos están en consonancia con lo descrito por el grupo de Ninomiya, y por tanto deberían tenerse en cuenta a futuro como posible causa de resistencia a tratamientos dirigidos (Ninomiya 2018). Las recomendaciones actuales por ahora no lo incluyen en los paneles diagnósticos (Lindeman 2018).

1.7 OTRAS ALTERACIONES

1.7.1 *MET* proto-oncogén GTPasa

El gen *MET* se encuentra localizado en el cromosoma 7 en la posición 31.2 y codifica un receptor de tirosina quinasa (HGFR) el cual se activa con un ligando natural específico: el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF); dicho receptor pertenece a una familia de receptores tirosina-quinasa que juega un rol fundamental en el crecimiento y proliferación celular, invasión y transición epitelio-mesénquima al activar las vías de señalización PI3K, STAT y MAPK (Trusolino 2010, Sierra 2011). El exón 14 de *MET* codifica la región yuxtamembrana del receptor que contiene el residuo Y1003 que sirve como sitio de unión para la E3 ubiquitin ligasa CBL. Las mutaciones a este nivel conllevan a la pérdida de la degradación mediada por ubiquitina y promueve la oncogénesis (Kong-Beltrán 2006, Vuong 2018). La activación aberrante de la señalización de *MET* puede ocurrir como resultado de amplificaciones (4.6%), sobreexpresión proteica (23%) y mutaciones génicas (4%). La presencia de estas alteraciones son predictivas de beneficio con inhibidores de tirosina quinasa *MET* específicos (crizotinib, tepotinib o capmatinib) (Paik 2015, Garrido 2019). El perfil clínico patológico asociado a estas mutaciones corresponde a pacientes adultos mayores con histología sarcomatoide. Es importante recordar que uno de los mecanismos de

resistencia de inhibidores de tirosina quinasa específicos para EGFR es precisamente la amplificación de *MET* (Garrido 2019).

Dada la variedad de alteraciones presentes en *MET*, el método de elección para detectarlas es la NGS. La secuenciación por Sanger puede detectar mutaciones en el exón 14 pero si hay baja frecuencia alélica pueden pasarse por alto. El FISH se utiliza para detectar amplificaciones y la RT-PCR de tipo cuantitativo (qRT-PCR) es sensible y específica si se busca únicamente este gen (Garrido 2019).

1.7.2 *RET* proto-oncogén GTPasa

El proto-oncogen *RET* se encuentra localizado en el cromosoma 10 en la posición 11.21 y codifica un receptor tirosina quinasa compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. La unión con su ligando causa homodimerización de *RET*, autofosforilación de sus residuos intracelulares de tirosina y posteriormente activación de las vías PI3K, RAS/MAPK y STAT (Mulligan 2014). Las alteraciones en *RET* incluyen reordenamientos con *KIF5B*, *CCDC6* y *NCO4* y de manera similar a *ALK*, los puntos de rotura en los exones 11 y 12 generan una homodimerización activa del receptor independiente del ligando y por ende una activación permanente de las vías de señalización (Takeuchi 2012). Las variantes estructurales que causan las fusiones de *RET* son bastante raras, encontrándose en 0.6-0.9% de todos los CPCNP y hasta en un 2% específicamente en los adenocarcinomas (Wang 2012). En estos últimos es posible sospechar la presencia de reordenamientos de *RET* cuando se encuentran calcificaciones en forma de cuerpos de psammoma (Garrido 2019). Respecto a sus posibilidades terapéuticas, se han descrito dos inhibidores selectivos, praelitinib (BLU-667) y selpercatinib (LOXO 292) aprobados por la Agencia Europea de Medicamentos para pacientes con CPCNP

avanzado con alteraciones en *RET* y que hayan recibido previamente inmunoterapia y/o quimioterapia basada en platinos. La técnica ideal de detección es la NGS pero una alternativa válida es el FISH (Garrido 2019)

1.7.3 *ERB-B2* receptor tirosina quinasa 2

El gen del *ERB-B2* (también conocido como *Her2neu*) se encuentra localizado en el cromosoma 17q12, consta de 32 exones y codifica a un miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento similar a EGFR, pero a diferencia de este último sin presencia de un ligando endógeno (Guo 2019). Su activación ocurre a través de su heterodimerización con otros miembros de la familia *ERBB*, promoviendo distintas vías de señalización incluyendo PI3K, MAPK y JAK/STAT (Guo 2019). En los casos de CPCNP, la amplificación de *HER2* (a diferencia de los cánceres de mama) no es considerada una mutación conductora oncogénica sino un mecanismo secundario de resistencia a los inhibidores de EGFR (Tomizawa 2011, Takezawa 2012, Suzuki 2015); por otro lado, las mutaciones tipo inserción sí parecen tener un potencial oncogénico, especialmente la mutación YVMA 776-779 presente en el exón 20 y que se encuentra en el 3% de los adenocarcinomas; también se asocia al sexo femenino, etnia asiática y no fumadores (Gao 2019, Stephens 2004, Arcila 2012).

Las terapias contra *HER2* han tenido mucho éxito en el cáncer de mama, pero en el CPCNP han mostrado poca y controvertida actividad y hasta el momento no hay medicamentos aprobados para este fin; sin embargo, afatinib ha mostrado un cierto beneficio clínico específicamente en carcinomas epidermoides (Goss 2018).

Al igual que con otras dianas terapéuticas antes mencionadas, las pruebas moleculares para *HER2* no deben incluirse dentro de la

rutina como prueba en solitario, sino como parte de un panel inicial o cuando las pruebas para *EGFR*, *ALK* y *ROS1* sean negativas (Lindeman 2018).

1.7.4 Receptor de tirosina quinasa neurotrófico

Los genes de la neurotrofina quinasa (*NTRK1*, *NTRK2* Y *NTRK3*) codifican una familia de receptores de tropomiosina de tirosina quinasa (TRKA, TRKB y TRKC) los cuales se encuentran activados de manera normal durante el desarrollo neuronal (Farago 2018). Estructuralmente, están constituidos por un dominio extracelular de unión al ligando tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDGF) o neurotrofina 3 (NTF-3), así como de un segmento transmembrana y un dominio intracelular tirosina quinasa que al sufrir cambios conformacionales activan diferentes vías de señalización como la vía MAPK, ERK y PI3K (Ricciuti 2017).

La alteración molecular más frecuente es el reordenamiento, con una frecuencia de presentación inferior al 1%, aunque otros estudios han mostrado prevalencias mayores especialmente con *NTRK1* de hasta el 3% (Garrido 2019, Ricciuti 2017). Se han desarrollado varios inhibidores entre otros larotrectinib (inhibidor panTRK), entrectinib y selitrectinib (LOXO -195) (inhibidor selectivo de segunda generación) (Guo 2019).

Es importante tener en cuenta que estas alteraciones son mutuamente excluyentes entre sí y con otras mutaciones conductoras y para su detección se puede realizar un cribado con inmunohistoquímica con posterior confirmación mediante FISH o NGS (Garrido 2019).

2. EL CÁNCER Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

2.1 GENERALIDADES

El sistema inmune juega un rol importante en el control y erradicación del cáncer. Sin embargo, múltiples mecanismos de supresión inmune pueden impedir una efectividad adecuada del sistema ante los tumores. Por ello se están desarrollando terapias dirigidas contra varios reguladores inmunológicos negativos (Karachaliou 2015). Para entender estos nuevos tratamientos, es necesario primero hacer un análisis de la respuesta inmune ante el cáncer.

Tanto la inmunidad innata como adaptativa juegan un rol crucial en la respuesta inmune antitumoral. La inmunidad innata (Figura 11 Aldarouish 2016) está compuesta de macrófagos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas y células “*natural killer*” (NK), mientras que la inmunidad adaptativa (figura 12 Aldarouish 2016) está compuesta por células B, linfocitos citotóxicos CD8+ (CTLs) y linfocitos T “*helpers*” CD4+. Es importante mencionar que las células NK y las células T $\gamma \delta$ participan en los procesos de interfase entre la inmunidad innata y adaptativa (Zitvogen 2008, Liu 2012).

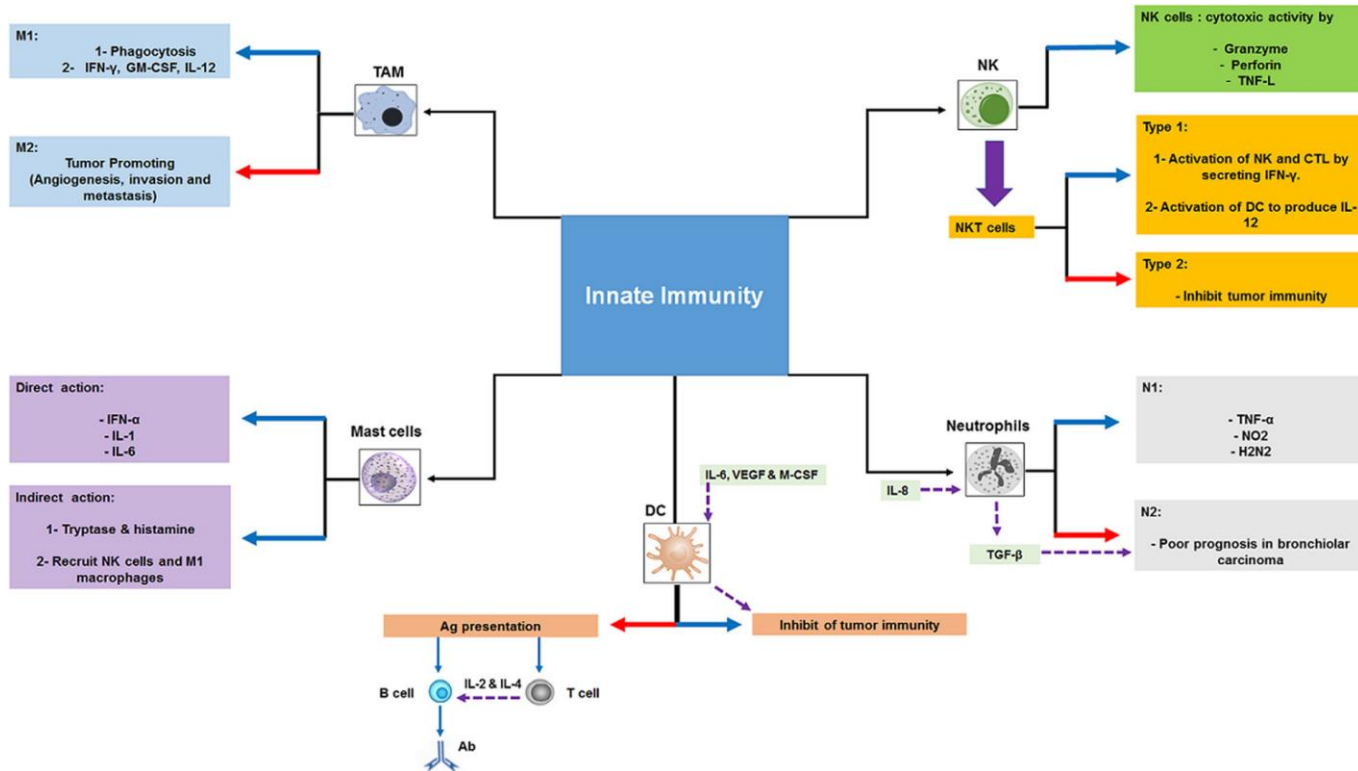


Figura 11. Inmunidad innata. Componentes y efectos. Original tomado de la referencia Aldarouish 2016. Licencia Creative Commons.

Inicialmente, el infiltrado inmune es escaso, hasta que aparecen las células NK; éstas atacan directamente al tumor al inducir apoptosis y secretar perforina, granzima y factor de necrosis tumoral- α (FNT- α). De manera indirecta, atacan al expresar CD16 y destruir las células malignas a través de anticuerpos dependientes de la citotoxicidad celular (Sutlu 2009).

De manera concomitante, los macrófagos de tipo M1 reconocen moléculas que expresan las células malignas en su superficie (fosfatidilserina lipídica, lipoproteínas de baja densidad oxidadas, calreticulina) y las fagocitan (Gardai 2006). Los macrófagos de tipo M2 son en parte responsables de las metástasis tumorales al promover la transferencia de las células malignas al torrente sanguíneo e inhibir a células T anti-tumorales (Kryczec 2006).

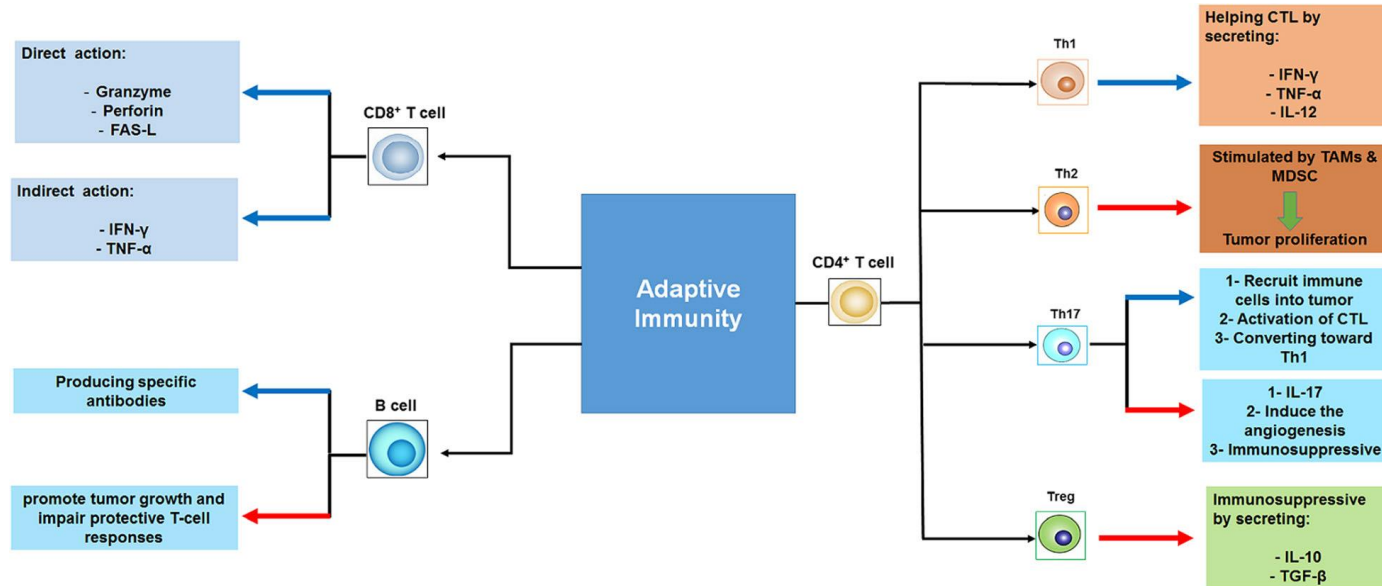


Figura 12. Inmunidad adaptativa. Componentes y efectos. Original tomado de la referencia Aldarouish 2016. Licencia Creative Commons.

Finalmente los linfocitos T atacan las células tumorales que expresan antígenos tumor-específicos mediante su presentación directa en los ganglios linfáticos o por medio de una presentación cruzada en forma de péptidos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Figura 13 Kunimasa 2020). Dichos antígenos tumorales pueden estar derivados de virus oncogénicos, antígenos de diferenciación, moléculas epigenéticamente reguladas o neoantígenos derivados de mutaciones asociadas con el proceso de carcinogénesis (Sharma 2015, Schumacher 2015). Esta presentación cruzada se da ante linfocitos T CD8 vírgenes que se activan en coordinación con receptores coestimulatorios (CD28 y 4-1BB/CD137), se especializan y se transforman en CTLs. Estos proliferan y se dirigen hacia el tumor, donde atacan y destruyen células tumorales usando varios mecanismos como la secreción de granzimas, perforinas y ligandos de la familia del FNT tales como Fas-ligando (Shresta 1998, Cullen 2010).

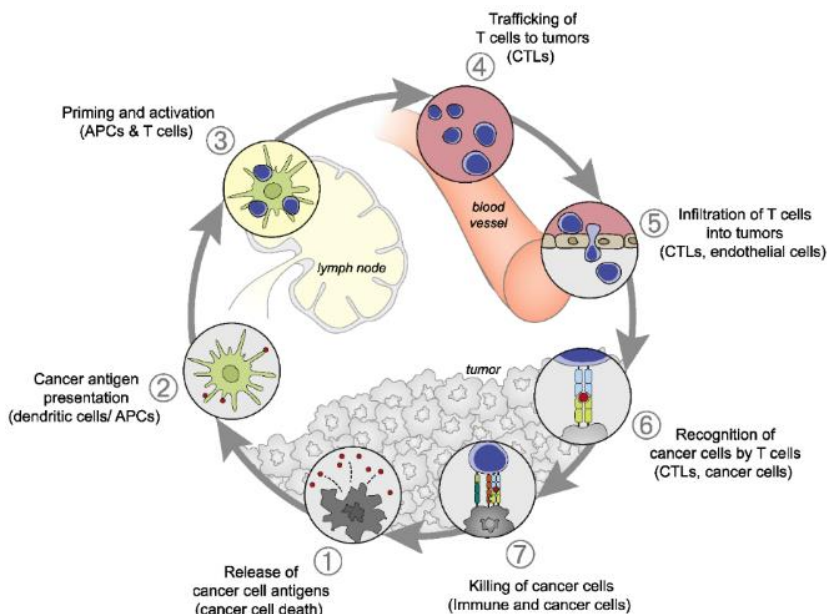


Figura 13. Ciclo de inmunidad frente al cáncer. Original tomado de la referencia Kunimasa 2020. Licencia Open Access.

Por otra parte, los linfocitos T CD4+ vírgenes entran en contacto con los antígenos tumorales y con una adecuada señalización coestimuladora, se activan, polarizan y diferencian en distintos subtipos que incluyen el Th1, Th2, Tregs, Th17, Th9, Th22 y T *helpers* foliculares. Dentro de estas subpoblaciones, los Th1 juegan un claro rol antitumoral al coordinar la inmunidad mediada por células contra el tumor, al producir grandes cantidades de Interferón- γ (IFN γ) el cual ejerce funciones de antiproliferación, proapoptosis e inhibición de angiogénesis; además aumenta y mejora la expansión e infiltración de los linfocitos CD8+ (CTLs) al sitio del tumor (Ikeda 2002, Bos 2010, Kim 2014). Los Th1 también reclutan y activan células inflamatorias como macrófagos, granulocitos, eosinófilos y células NK; de hecho, pueden destruir células tumorales que expresan CMH-II directamente a través de la secreción de perforina y granzima o a través de la vía FAS-ligando (Haabeth 2014).

2.2 EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR EL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón evade la respuesta inmune a través de varios mecanismos, que empiezan con el proceso de inmuoedición. Éste, consiste en “editar” el sistema inmune adyacente al tumor y consta de tres fases: la fase de eliminación (los tumores inmunogénicos son erradicados), la fase de equilibrio (las células tumorales no eliminadas coexisten con las inmunes) y la fase de escape (el tumor escapa del control inmune); son éstos últimos, los casos que son detectados clínicamente. (Matsushita 2012, Kunimasa 2020 figura 14). Entrando un poco en detalle en la fase de equilibrio, hay que tener en cuenta que en esta etapa el sistema inmune adaptativo previene la invasión y el sobrecrecimiento tumoral al modular o “esculpir” el sistema inmune; el problema radica en que a consecuencia de la sobreexposición inmune a células tumorales

genéticamente inestables, éstas pueden adquirir la habilidad de evitar su reconocimiento y por ende, su destrucción, entrando de lleno a la fase de escape que, como se comentó previamente, se traduce en tumores detectables clínicamente (Beatty 2015, Kunimasa 2020).

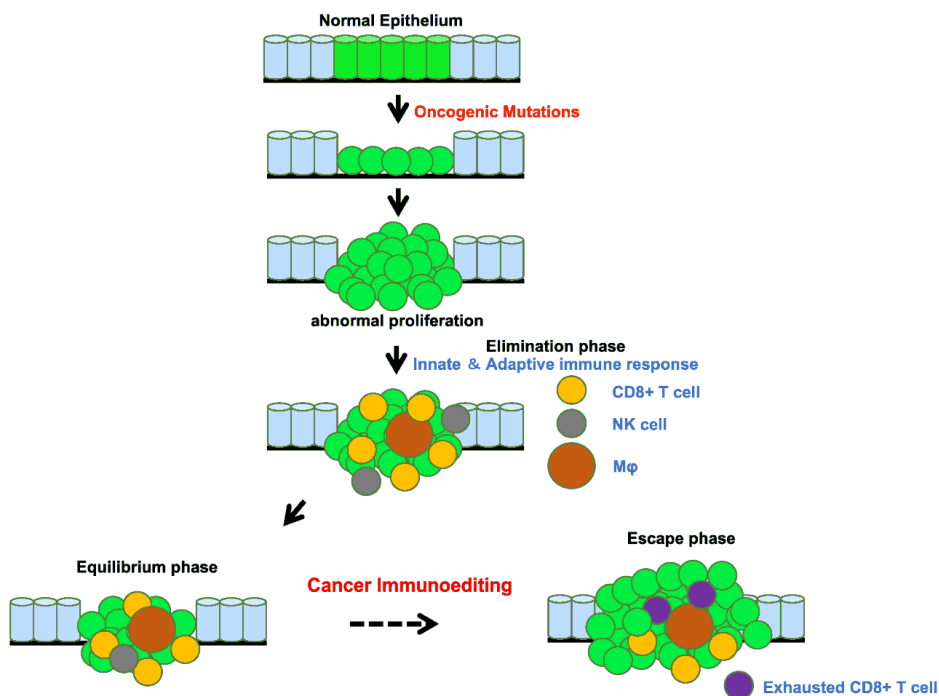


Figura 14. Fases de la inmunoedición. Original tomado de la referencia Kunimasa 2020. Licencia Open Access.

Para ello, las células tumorales alteran el procesamiento de rutina de los antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos. Esto lo consiguen mediante la secreción de proteínas como STAT-3, IDO, TGF- β e IL-10 (Aldarouich 2016), que son capaces de disminuir la expresión de las moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad I, haciendo ineficaz la actividad de las células T (Ramnath 2006), y promoviendo el aumento de células

inmunosupresoras, específicamente LTreg (linfocitos T reguladores) y células supresoras derivadas del sistema mieloide. Éstas se acumulan en el microambiente tumoral, promueven el crecimiento de las células malignas y disminuyen la respuesta inmune antitumoral (Lesokhin 2012). Finalmente, uno de los mecanismos más importantes de evasión tumoral corresponde a las alteraciones de las moléculas involucradas en los puntos de control inmunológicos, en lo cual se profundizará a continuación.

2.3 PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICOS

Nuestro sistema inmunológico dispone de complejos mecanismos de control (puntos de control inmunológicos) cuyo fin es mantener el control de las reacciones inmunitarias, al evitar respuestas exacerbadas o inapropiadas y permitir la tolerancia a antígenos propios. Estos puntos de control son moléculas del sistema inmune que pueden tener una función inhibidora o activadora.

La expresión de las proteínas de los puntos de control pueden verse desreguladas por los tumores como parte de los mecanismos de resistencia inmune. Las células T han sido el foco de mayor atención y esfuerzo en la búsqueda de dianas terapéuticas dada su capacidad para el reconocimiento selectivo de péptidos derivados de proteínas en todos los compartimentos celulares, la eliminación directa de células que expresan antígenos vía CTLs y su habilidad para orquestrar diversas respuestas inmunes (vía linfocitos T helpers), lo cual integra los mecanismos inmunes innato y adaptativo (Pardoll 2012). Como se comentó previamente, la inmunidad mediada por células T incluye múltiples pasos secuenciales que involucran la selección clonal de células antígeno-específicas, su activación y proliferación en tejidos linfoides secundarios, su tráfico a sitios donde está el antígeno y la inflamación, la ejecución de funciones efectoras directas y la llamada

a través de citoquinas y ligandos de membrana de múltiples células efectoras inmunes. Cada uno de estos pasos está regulado por señales inhibitorias y estimulatorias, de tal manera que los agonistas de los receptores co-estimulatorios y los antagonistas de las señales inhibitorias, cuya acción final es la amplificación de la respuesta T antígeno específica, son los modelos actuales de investigación y tratamiento inmunoterapéutico. Así se entiende entonces que, a diferencia de los modelos de anticuerpos estudiados previamente (EGFR, ALK, etc.), los anticuerpos que bloquean los puntos de control inmunitarios, no van dirigidos a las células tumorales directamente, sino a los receptores de los linfocitos o sus ligandos, con el fin de mejorar la actividad antitumoral endógena (Zou 2008, Pardoll 2012).

Algunos de los puntos más estudiados en el CPCNP y que poseen una función inhibitoria son entre otros el receptor de antígenos de linfocitos T citotóxicos 4 (CTL-4) y la vía del receptor de muerte celular programada y sus ligandos (PD-1/PD-L1 y PD-L2). En el año 2018 el premio Nobel de Medicina fue otorgado a James Allison y Tasuku Honjo «por su descubrimiento de la terapia contra el cáncer por la inhibición de la regulación inmune negativa». Allison y su grupo estuvieron al frente del trabajo que descubrió el CTLA-4, mientras que Honjo identificó a la Proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1).

2.3.1 Receptor de antígenos de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4)

CTLA-4 fue el primer receptor de los puntos de control en ser clínicamente abordado. Se expresa exclusivamente en las células T, donde regula la amplitud de la activación de las mismas en estadios tempranos. La principal función del CTLA-4 es contrarrestar la

actividad del receptor coestimulador CD28 (Rudd 2009). Éste no afecta la activación de las células T a menos que el receptor (TCR) se vincule con un antígeno afín. Una vez el reconocimiento antigénico ocurre, la señalización de CD28 amplifica fuertemente al TCR para que se activen las células T gracias a su interacción con los ligandos CD80 y CD86 (también conocidos como B7.1 y B7.2). En paralelo, hay señales inhibitorias mediadas por el CTLA-4, que amortigua la reacción al tener mucha más afinidad con los ligandos antes mencionados y de esta manera inhibe la activación de la célula T, disminuye la producción de IL-2 y previene la progresión del ciclo celular (figura 15 Pardoll 2012).

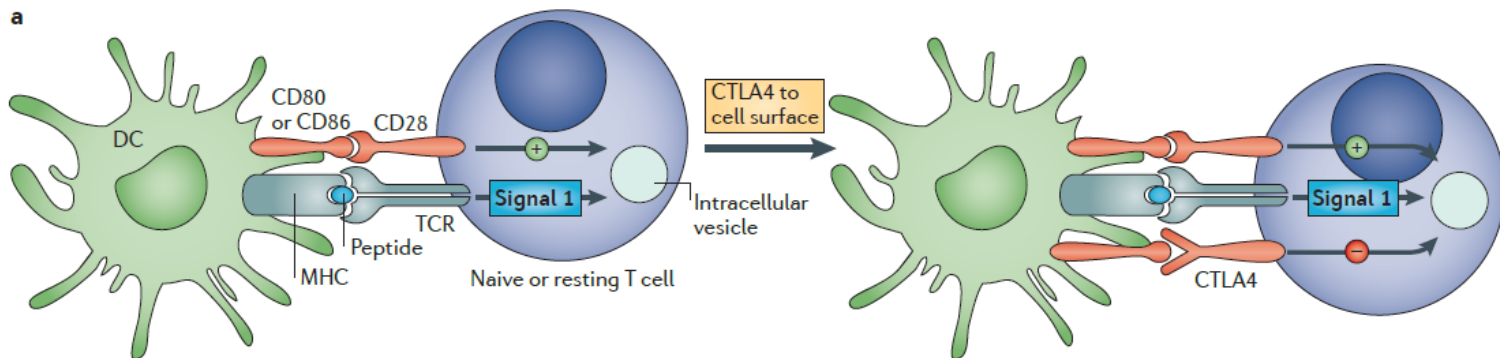


Figura 15. Punto de control inmune-CTLA-4. Original tomado de la referencia Pardoll 2012. Permitido por Nature Reviews Cancer.

El primer medicamento aprobado por la FDA con bloqueo de los puntos de control inmune fue el *ipilimumab*, una inmunoglobulina G1 humana que bloquea el CTLA-4 y que se ha usado en el tratamiento del melanoma metastásico. Posteriormente se desarrolló *trelemimumab*, una IgG4 también anti CTLA-4 que se encuentra en fase de estudio en combinación con anti PD-L1 para el manejo del cáncer de pulmón de célula no pequeña. (Aldarouish 2016).

2.3.2 Vía del receptor de muerte celular programada (PD-1/PD-L1)

La vía molecular del receptor de muerte celular programada (PD-1 ó CD279) y sus ligandos, PD-L1 (B7-H1 ó CD274) y PD-L2 (B7-DC ó CD273) juega un rol vital en el mantenimiento de la tolerancia inmune periférica (esto es, los mecanismos que mantienen la quiescencia de los linfocitos T autoreactivos, maduros, que han escapado de los medios de control centrales de tolerancia durante su desarrollo en el timo). Los tumores y patógenos que causan infecciones crónicas pueden utilizar esta vía para escapar del sistema inmune (Boussiotis 2016). Una vez se vieron los efectos del bloqueo de CTLA-4 sobre tumores malignos, se empezó a explorar la vía del PD-1/PD-L1, con resultados alentadores en múltiples ensayos clínicos para varios tipos de cáncer (Topalian 2012).

2.3.2.1 PD-1

El receptor PD-1 es una proteína constituida por 288 aminoácidos que se induce tras la activación de las células T, pero que también se encuentra presente en células T doble negativas (CD4-CD8-) en el timo, en células NK, linfocitos B, monocitos y células de Langerhans inmaduras (Okazaki 2007). La molécula del PD-1 está compuesta por un dominio extracelular IgV, un dominio

transmembrana y un dominio intracelular de aproximadamente 95 aminoácidos que contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) y un motivo de cambio del inmunorreceptor basado en tirosina (ITSM, por sus siglas en inglés) (Vargas-Rojas 2008); éstos últimos son los que tienen la capacidad de unirse a la fosfatasa inhibitoria SHP-2 (Li 2016) (figura 16 Boussiotis 2016). Altos niveles de PD-1 han sido detectados en los linfocitos intratumorales (TILs) (Ahmadzadeh 2009).

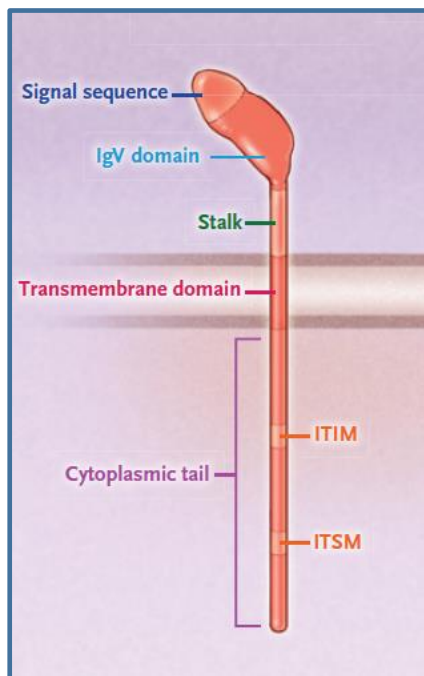


Figura 16. Estructura del receptor PD1. Original tomado con autorización de la referencia Boussiotis 2016. Copyright Massachusetts Medical Society.

2.3.2.2 PD-L1

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1), también conocido como B7-H1 ó CD274 es el ligando principal del PD-1. Se encuentra codificado por el gen *PDCDL1* localizado en el cromosoma 9 en humanos en la posición p24.1 (Kythreotou 2017). Fue descrito por Dong et al en 1999 y reconocido como el tercer miembro de la familia de proteínas B7 compartiendo su secuencia en un 37% con el PD-L2 y hasta un 20% con B7.1 y B7.2 (Dong 1999). La longitud total del PD-L1 se codifica dentro de siete exones, correspondiendo entonces a una proteína de 40 kDa constituida por 290 aminoácidos y formada por dominios extracelulares similares a IgV e IgC, un dominio transmembrana hidrofóbico y una pequeña cola citoplasmática hecha de 30 aminoácidos (figura 17 Fabrizio 2018)

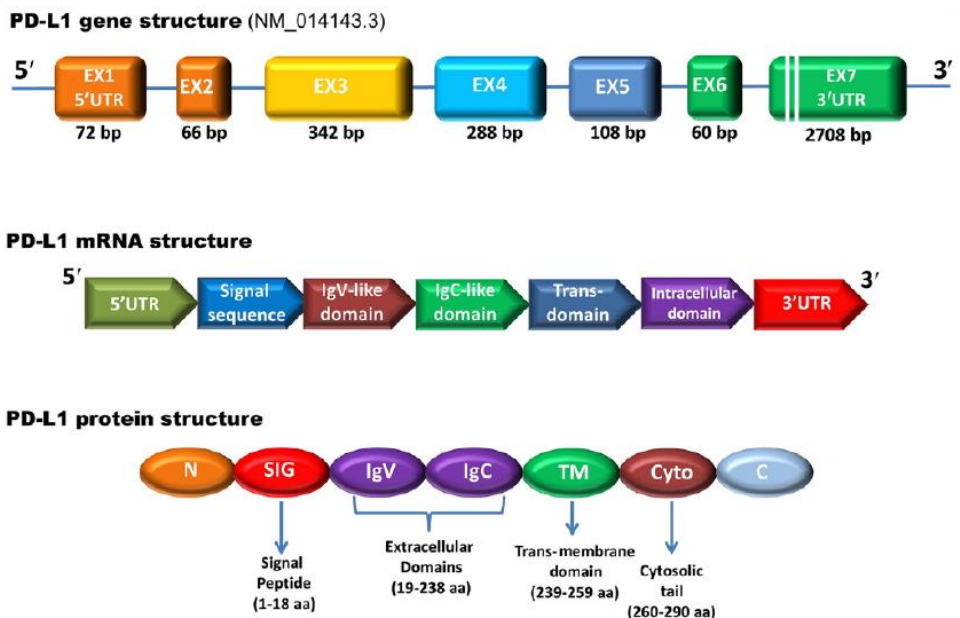


Figura 17. Estructura del gen de PD-L1, su mRNA y la proteína. Original tomado de la referencia Fabrizio 2018. Permitido por SAGE publishing. Licencia creative commons.

La expresión de PD-L1 puede ser constitutiva o inducible. A nivel constitutivo, bajos niveles pueden ser encontrados en linfocitos no activos, células presentadoras de antígenos, córnea, sincitiotrofoblasto y células de los islotes de Langerhans donde contribuye a la homeostasis tisular y a respuestas proinflamatorias (Restifo 2012). En el contexto de inflamación y/o infección, PD-L1 es inducida como una señal supresora en células endoteliales, epiteliales y especialmente en las células T para regular su función, prevenir la autoinmunidad y el daño tisular colateral (Kythreotou 2017).

Una vez el PD-L1 se une a PD1, éste es fosforilado por la proteína tirosina quinasa Lck, con activación de las fosfatasa 1 y 2 (SHP-1 y SHP-2) que defosforilan a moléculas como ZAP70 inactivando de esta forma el TCR (Yokosuka 2012, Xia 2019). Esta respuesta inhibitoria es fortalecida además por la inactivación directa de la vía Ras-MEK-ERK e indirecta de la vía PI3k-AKT. Ésta última se da a través de la defosforilación de la quinasa de caseína 2 (CK-2) (otro blanco de SPH-2) que genera una actividad descontrolada de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), el antagonista fisiológico de PI3K-AKT (Kythreotou 2017, Patsoukis 2013).

En el proceso de carcinogénesis, el PD-L1 puede estar sobreexpresado como resultado de algunos eventos oncogénicos; por ejemplo en tumores con mutaciones en *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina) la sobreexpresión de PD-L1 se explica por la activación desenfrenada de la vía PI3K-AKT (Suzuki 2003). También se ha observado que los reordenamientos de *ALK* inducen la expresión de PD-L1 vía STAT-3 (Kythreotou 2017, Nielsen 1997). Esta sobreexpresión finalmente transmite señales antiapoptóticas a las células cancerígenas permitiendo su supervivencia (Boussiotis 2016) (Figura 18 Kythreotou 2017) (Figura 19 Boussiotis 2016). Sin embargo, el mecanismo más frecuente de sobreexpresión se da por reacciones en el microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés). En primer lugar cuando hay presencia de interferón γ y otras citoquinas liberadas

por células T activadas locales, se desarrolla resistencia a esas mismas células T por activación en la célula tumoral de vías de proliferación y supervivencia. En segundo lugar, la exposición por largo tiempo a antígenos tumorales en las células T infiltradas en el TME las termina agotando, y estas células T presentan mucho PD-1 pero baja función antitumoral promoviendo así la sobreexpresión de PD-L1. De ahí, que la principal función de los anticuerpos que bloquean la vía PD-1/PD-L1 es rescatar la función de las células T agotadas e incrementar la inmunidad antitumoral (Xia 2019).

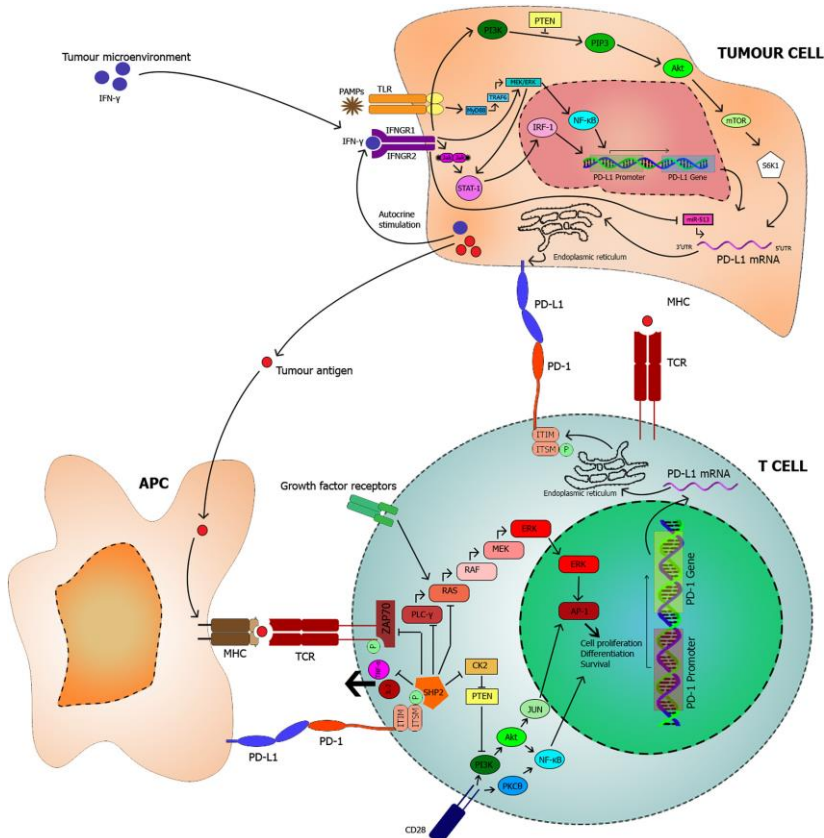


Figura 18. Vías de señalización implicadas en el eje PD-1/PD-L1 y su relación con las células tumorales. Original tomado de la referencia Kythreotou 2017. Permitido por BMJ Publishing Group Ltd.

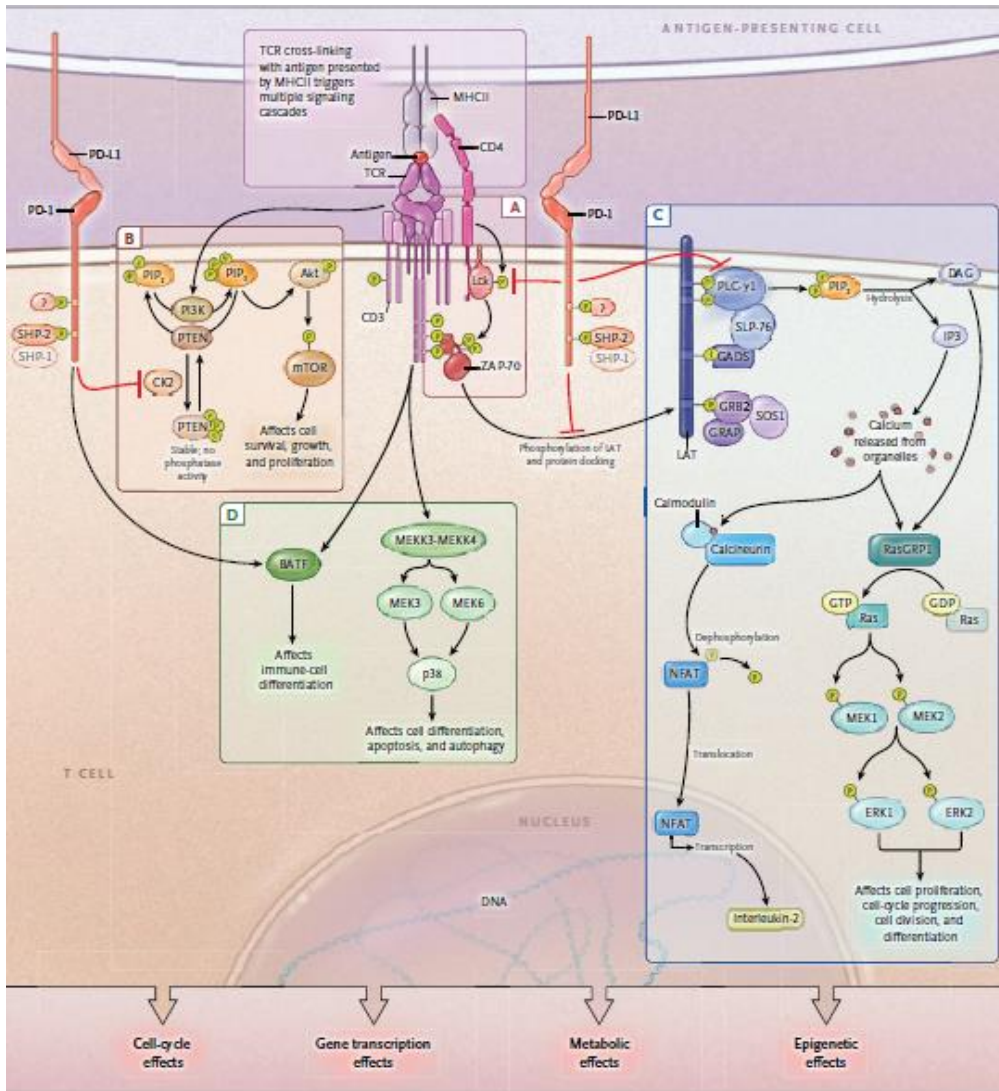


Figura 19. Vías de señalización implicadas en la activación de PD-1. Original tomado con autorización de la referencia Boussetis 2016. Copyright Massachusetts Medical Society.

Como se ha mencionado previamente, en 1996, el grupo de Jim Allison encontró que un anti-CTLA4 podría aumentar la respuesta anti-tumoral de las células T, demostrando así por primera vez la viabilidad terapéutica en el bloqueo de los puntos de control inmune (Leach 1996). Diez años después se aprobaba *ipilimumab*. A partir de ahí empezaron a realizarse estudios clínicos con medicamentos que bloqueaban el eje PD-1/PD-L1 y de esta manera restauraban la inmunidad antitumoral mediada por células T (Herbst 2018, Topalian 2012). Los anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción de PD-L1 y PD-1 aprobados hasta el momento son nivolumab y pembrolizumab, que se unen a PD-1, y atezolizumab, durvalumab y avelumab, que se unen a PD-L1; son conocidos en conjunto como bloqueadores de los puntos de control inmunitarios ó ICIs por sus siglas en inglés (Herbst 2018).

La expresión de PD-L1 en células tumorales y en algunos casos en las células inmunes, es detectada por inmunohistoquímica, usándose esta técnica como biomarcador para predecir la respuesta a los ICIs. Como se ve en la tabla 3, hay variedad de anticuerpos con diferentes metodologías desarrolladas en paralelo para los diversos medicamentos aprobados. Los cuatro clones más ampliamente usados son Agilent 28-8 y 22C3 y Ventana SP142 y SP143. Éstos muestran positividad cuando las células tumorales son reactivas en la membrana de manera parcial o total con cualquier intensidad (Garrido 2019). Específicamente, con el clon SP142 las células inmunes dentro del área tumoral también deben ser evaluadas. En biopsias pequeñas es aceptable valorar entre 50-100 células para validar el resultado. También es posible hacerlo con citología aunque hasta el momento no hay estudios que comparen la correlación entre el resultado con la respuesta al tratamiento (Garrido 2019). Actualmente se están realizando estudios comparativos que permitan armonizar las

diferentes pruebas y así promover técnicas confiables y reproducibles (Hirsch 2017).

Tabla 3. Medicamentos bloqueadores de los puntos de control inmunitarios. Original tomado de la referencia Kythreotou 2017. Permitido por BMJ Publishing Group Ltd.

Table 1 The principal PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors currently approved and in clinical development						
	Nivolumab (BMS-936558)	Pembrolizumab (MK-3475)	Atezolizumab (MPDL3280A)	Durvalumab (MEDI4732)	Avelumab (MSB0010718C)	Pidilizumab (CT-011)
Target	PD-1	PD-1	PD-L1	PD-L1	PD-L1	PD-1
Monoclonal antibody class	Fully human IgG4	Humanised IgG4k	Humanised IgG1	Engineered IgG1k	Fully human IgG1	Humanised IgG1k
Stage of clinical development	FDA approved Phase III	FDA approved Phase III	FDA approved Phase III	FDA approved Phase III	FDA approved Phase III	Phase II
Approved indication	Melanoma (2014), NSCLC (2015), RCC (2015), urothelial carcinoma (2017), MMR-d colorectal cancer (2017)	Melanoma (2014), NSCLC (2016), HNSCC (2016), Hodgkin's lymphoma (2017), MMR-d tumours (2017)	Urothelial carcinoma (2016), NSCLC (2016)	Urothelial carcinoma (2017)	Merkel cell carcinoma (2017)	
Companion PD-L1 assay	Dako 28-8 (rabbit)	Dako 22c3 (mouse)	Ventana SP142 (rabbit)	Ventana SP263 (rabbit)		NA
Target cells	TC	TC IC	TC IC	TC IC		

Según el estadio clínico del CPCNP la aplicación de los diferentes ICIs varía:

- Enfermedad localizada: estudios recientes han mostrado resultados prometedores de los anticuerpos anti PD-L1 como tratamiento neoadyuvante, aunque en las guías actuales de manejo esto aún no se contempla (Ruiz-Bañobre 2019).
- Estadío III no resecable: en pacientes sin progresión después de quimio/radioterapia, el tratamiento de consolidación con Durvalumab por 1 año ha mostrado un aumento en la progresión libre de enfermedad (PFS por sus siglas en inglés) y en la supervivencia global (OS por sus siglas en inglés) (Majen 2019).
- Estadío IV sin mutaciones conductoras:
 - o Primera línea: si la expresión es mayor o igual a 50% se recomienda el uso de pembrolizumab en ausencia de

contraindicaciones. Para pacientes con menos expresión, tanto en carcinomas escamosos como en no escamosos, resultados recientes de estudios en Fase III han mostrado beneficios en términos de eficacia y OS al añadir pembrolizumab o atezolizumab a la quimioterapia estándar de primera línea (Majem 2019).

- Segunda línea: En pacientes con carcinomas escamosos y no escamosos metastásicos sin contraindicaciones y que no hayan recibido inmunoterapia previa, se puede administrar como agente único pembrolizumab, nivolumab o atezolizumab. Esta recomendación se basa en datos de estudios en Fase III que mostraron aumentos significativos en la supervivencia y en la tolerabilidad de estos agentes en comparación con docetaxel (Majem 2019).

Dado que la inmunoterapia ha surgido como el nuevo tratamiento gold-standard para pacientes en estadio IV la mayoría de estos ensayos excluyeron a pacientes con alteraciones oncogénicas dado que dichas mutaciones conductoras pueden alterar la carga mutacional tumoral (TMB), la infiltración tumoral por linfocitos y la expresión de PD-L1 y por tanto los datos de respuesta a ICIs en estos pacientes, son limitados (Dantoing 2021, Remon 2018).

Los estudios en estos casos por lo general son contradictorios, escasos y la mayoría dirigidos a pacientes con mutaciones en *EGFR* o reordenamientos en *ALK*.

Adicionalmente, a pesar de toda la estrategia terapéutica antes mencionada, aún queda por definir claramente el rol de la expresión de PD-L1 y su relación con la supervivencia. Los datos sobre su significado pronóstico son conflictivos, con estudios como el de Cooper y Velcheti que lo señalan como factor pronóstico favorable, en

Velcheti 2014, Zhou 2017). Por otro lado, no parece haber correlación con algunas variables clínico-patológicas como edad, tipo histológico, estadio tumoral o estatus de fumador (Wang 2015), pero sí parece haber un aumento en la expresión de PD-L1 en pacientes hombres y fumadores, así como en tumores de gran tamaño, pobremente diferenciados y con ganglios metastásicos (Zhang 2017, Li 2019, Lee 2019, Wu 2019).

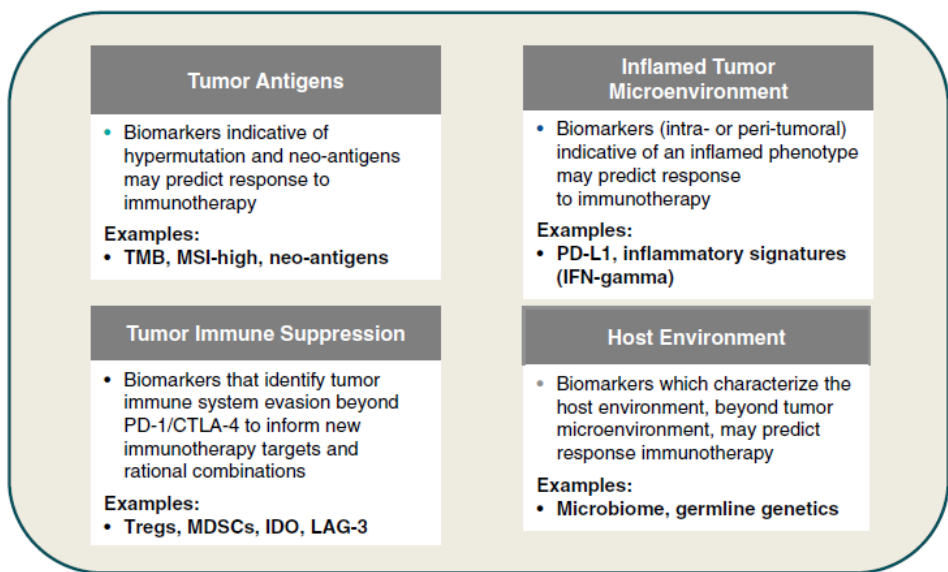
2.3.2.3 PD-L2

Al igual que PD-L1, el ligando de muerte programada 2 (PD-L2), también conocido como B7-DC ó CD273, comparte el 37% de su secuencia con el mismo y actúa como ligando de PD-1. A pesar de que su expresión se ha observado en algunos tumores, su rol en el proceso de mediación de la resistencia inmune y por tanto su importancia predictiva en la respuesta al bloqueo de la vía de PD-1 es desconocida. Un subgrupo de linfomas de Hodgkin, linfomas de células del manto y cánceres gástricos han mostrado amplificación cromosómica en la zona 9q24.1 con expresión sustancial de PD-L2 (Topalian 2016). Además, el análisis de un número limitado de tumores sólidos ha demostrado dicha expresión en aproximadamente un 20% de los casos; sin embargo, esto no ha mejorado el poder predictivo respecto a la posible sensibilidad a la terapia anti PD-1 (Taube 2014).

2.4 INMUNOTERAPIA Y CARGA MUTACIONAL TUMORAL

Existe un amplio grupo de biomarcadores en estudio, los cuales podrían predecir una mejor respuesta a los tratamientos con inmunoterapia (Figura 20. Ascierto 2018). Esto incluye entre otros, a la carga mutacional tumoral (TMB). Ésta, TMB por sus siglas en inglés, es un biomarcador que se define como el número de

mutaciones somáticas presentes en un tumor, una vez eliminados los polimorfismos y las mutaciones germinales en el exoma estudiado o el número total de mutaciones sinónimas y no sinónimas por megabase presentes con una frecuencia alélica $\geq 5\%$ al secuenciar el genoma tumoral por NGS (Berland 2019, Remon 2018). La TMB se ha definido como un biomarcador predictor independiente de respuesta a los ICIs debido a que las células tumorales son genéticamente inestables, albergan altos niveles de mutaciones somáticas cuyo desenlace es la expresión de neoantígenos, los cuales no están sujetos a la tolerancia inmune y por tanto, activan el sistema inmune siendo elegibles para su destrucción.(Gubin 2015, Remon 2018)



CTLA4=cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; I-O=immuno-oncology; IDO=indoleamine-2,3 dioxygenase; IFN=interferon; LAG-3=lymphocyte activation gene-3; MDSCs=myeloid-derived suppressor cells; MSI-High=microsatellite instability high; PD-1=programmed death receptor-1; PD-L1=programmed death ligand 1; TMB=tumor mutational burden; Treg=regulatory T cell

Figura 20. Biomarcadores tumorales e inmunes en evaluación para predecir respuesta a inmunoterapia. Original tomado de la referencia Ascierto 2018. Licencia Open Access.

Algunos estudios han mostrado una asociación entre la TMB y pacientes con CPCNP, específicamente una TMB mayor en varones fumadores así como en las metástasis (Alexandrov 2013 Remon 2018). También se ha visto una asociación con ciertas mutaciones como *KRAS* con una TMB mayor (TMB 10.3 mut/Mb) en comparación con la carga presente en tumores que albergan *EGFR*, *ALK*, *ROS1* ó *MET* (3.1 a 6.2 mut/Mb). Esta baja carga tumoral podría entonces correlacionarse con la poca eficacia de los inhibidores de los puntos de control inmunitarios en estos casos de CPCNP (Heeke 2018, Berland 2019).

A pesar de que este biomarcador no está aún implementado de manera rutinaria en la práctica clínica, puede llegar a ser útil en la selección de pacientes para inmunoterapia. Por ahora se requieren más estudios que permitan obtener una estandarización adecuada del cálculo de la TMB y su informe (Remon 2018, Garrido 2019).

Es así, que al hacer un análisis exhaustivo del tumor y su huésped, y teniendo en cuenta todos aquellos biomarcadores disponibles, se podría eventualmente, hacer una selección de pacientes aún más individualizada, generando así nuevas estrategias terapéuticas de manejo, que permitan obtener una mejor y mayor respuesta a la inmunoterapia.

II

Hipótesis & Objetivos

HIPÓTESIS & OBJETIVOS

El cáncer de pulmón se diagnostica usualmente cuando el paciente se encuentra con la enfermedad localmente avanzada o metastásica. El subtipo histológico predominante es el carcinoma de célula no pequeña, el cual tiene terapias dirigidas basadas en la presencia de mutaciones “conductoras”. Con el advenimiento de la inmunoterapia se abrió una nueva vía de manejo para aquellos tumores con expresión de PD-L1.

La relación entre estas mutaciones “conductoras” y la expresión de PD-L1 es un tema crítico en investigación dado que la mayoría de estudios de pacientes con CPCNP e inmunoterapia se han realizado en pacientes sin este tipo de alteraciones, y los pocos que hay se han enfocado por lo general en *ALK* y *EGFR* siendo además los resultados contradictorios. Por este motivo se recopilaron casos para describir las características clínicas y moleculares y establecer una posible relación entre ellas.

Se plantea la hipótesis de que algunos datos clínicos y/o moleculares puedan generar diferencias en la expresión de PD-L1, lo que determinaría cambios en la elección del tratamiento.

Por todo ello, en el presente trabajo de tesis doctoral se han planteado los siguientes objetivos:

- Describir las características clínicas y moleculares de los casos de CPCNP en población gallega.

- Evaluar la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales.
- Explorar asociaciones entre la expresión de PD-L1 y las características clínicas y moleculares de los casos.
- Describir la supervivencia de los pacientes con base en la expresión de PD-L1 dado que los datos respecto a su rol como factor predictivo son poco consistentes e incluso contradictorios.

III

Materiales & Métodos

MATERIALES & MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 DISEÑO, CONTEXTO Y PACIENTES

Este estudio observacional descriptivo incluye 103 casos de pacientes diagnosticados con carcinoma de célula no pequeña de pulmón (83 adenocarcinomas, 14 carcinomas epidermoides, 5 neuroendocrinos y 1 carcinoma no especificado NOS) entre los años 2010 a 2016 en los estadios I (2), II (2), III (9) y IV (90).

Se utilizaron biopsias obtenidas a través del Biobanco y del servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, de las cuales 44 fueron biopsias bronquiales, 19 biopsias con aguja gruesa y 40 piezas quirúrgicas correspondientes al tumor primario o a su metástasis. Se evaluó la Hematoxilina-Eosina (HE) de cada caso para comprobar la presencia y cantidad de tejido tumoral necesario para las pruebas; se revisó y reclasificó de ser necesario el diagnóstico histopatológico de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO 2015). Como criterios de inclusión los casos seleccionados debían corresponder a pacientes fallecidos cuyo material de biopsia debía tener al menos 100 células tumorales viables para valoración y no contar con proceso previo de decalcificación para garantizar una extracción adecuada de ADN viable. Aquellos casos que no cumplieran con cualquiera de las anteriores características fueron excluidos del trabajo.

1.2 VARIABLES

De manera retrospectiva se obtuvieron datos clínicos como edad al diagnóstico histopatológico (calculada de acuerdo a la fecha en que se tomó la muestra y se realizó el diagnóstico), fecha de fallecimiento y sexo (determinada por la revisión de la Historia Clínica en IANUS), historia de tabaquismo (se tomó en cuenta cualquier tipo de antecedente tabáquico y se subdividieron los exfumadores en aquellos con más o menos 15 años de abandono del hábito), estadio clínico (I a IV según clasificación de la séptima edición del libro del American Joint Committee on Cancer- AJCC- anexo 1) y escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group – anexo 2). El tipo de muestra obtenida así como el diagnóstico histopatológico y el resultado del estado mutacional de *EGFR*, *ALK* y *ROS1*, éste último en caso de estar disponible, fueron tomados a partir de la información almacenada en el sistema EOS del servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

De manera prospectiva se realizó prueba de PD-L1 a todos los casos y de *ROS1*, *KRAS*, *BRAF* y *NRAS* a aquellos en los que hubo material suficiente para completar el panel de pruebas moleculares. Las pruebas se realizaron de manera homogénea en todos los casos independientemente del valor de PD-L1 y de cualquier otro resultado de las pruebas moleculares.

1.3 PREVENCIÓN DE SESGOS

Para prevenir sesgos de selección se definieron criterios de inclusión y exclusión que no estuviesen relacionados con la expresión de PD-L1.

Para prevenir sesgos de medición todas las pruebas se realizaron uniformemente en todos los casos. Adicionalmente, los expertos que interpretaron los resultados de la expresión de PD-L1 desconocían el estado mutacional de los casos evaluados.

Para reducir el fenómeno de confusión, se realizó análisis multivariable para el desenlace de supervivencia, ajustando por las variables edad al diagnóstico y tipo histológico. Las variables de confusión fueron elegidas por su relación teórica tanto con la expresión de PD-L1 como con la mortalidad.

1.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

La naturaleza descriptiva de este estudio no requiere cálculo de tamaño de muestra. Se incluyeron todos los pacientes que cumplieron los criterios de selección durante el periodo de estudio. Las asociaciones calculadas en este estudio son netamente exploratorias.

1.5 CONSENTIMIENTO INFORMADO

No fue necesario el uso del consentimiento informado, dado que todos los pacientes se encontraban fallecidos en el momento del estudio, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo (código de registro: 2018/399) (Anexo 3).

2. MÉTODOS

2.1 INMUNOHISTOQUÍMICA PD-L1

Se realizaron cortes de cada caso a 3-5 μm . Posteriormente el tejido se montó en cristales cargados y para preservar su antigenicidad, una vez montados, los cristales permanecieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Se hizo desparafinación, rehidratación y recuperación antigénica por medio del sistema de pre-tratamiento PT Link: inmersión de los cristales con tejido en solución de recuperación a pH bajo (EnVision FLEX) e incubación por 20 minutos a 97°C; posteriormente y cuando la temperatura disminuye a 65°C se retiran y se realiza lavado con un tampón. Una vez realizado esto, los cristales con tejido pasan al Autostainer Link48 (Agilent) que se encarga del resto del procesamiento por medio del siguiente protocolo de inmunotinción:

1. Reactivo de bloqueo de peroxidasa (Agilent) (5 minutos).
2. Anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal de ratón anti-PD-L1 (clon 22C3 Agilent) (30 minutos).
3. Mouse LINKER (Agilent) para amplificación de señal (30 minutos).
4. Reactivo de visualización: dextrano conjugado con moléculas de peroxidasa y anticuerpos secundarios de cabra contra inmunoglobulinas de ratón y conejo en una solución tamponada con proteína estabilizante y un agente antimicrobiano (30 minutos).
5. Solución tamponada con peróxido de hidrógeno y un agente antimicrobiano (5 minutos).

6. Solución de trabajo de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina en solvente orgánico (5 minutos).
7. Solución de mejora con sulfato cúprico en agua (5 minutos).
8. Contraintinción con hematoxilina EnVision FLEX (Agilent) (5 minutos).

Entre los distintos puntos se realizaron lavados con solución tamponada y al finalizar el proceso se hicieron dos lavados adicionales con agua destilada. Finalmente se realizó montaje en un medio no acuoso.

Cada vez que se realizaron pruebas con casos se incluyeron controles de calidad tanto negativos como positivos siendo estos:

- Líneas celulares suministradas por la casa comercial (Agilent)
- Amígdala (control positivo propio del laboratorio) (Figura 21)
- Un segundo cristal de tumor de cada caso en el que se sustituyó el anticuerpo primario por tampón de dilución (control negativo propio del laboratorio).

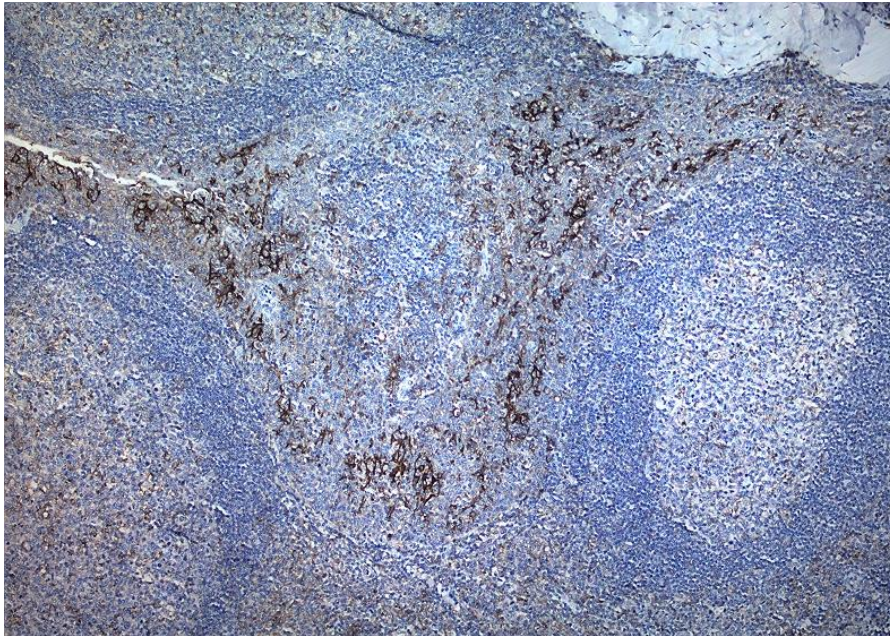


Figura 21. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1 (20X). Control positivo en amígdala.

2.1.1 Valoración de la Inmunohistoquímica de PD-L1

Se revisaron los controles positivo y negativo para hacer la validación de la prueba y confirmar que los reactivos funcionaron de manera adecuada. Posteriormente, se examinó la HE de cada caso y se verificó la presencia de al menos 100 células tumorales viables. Respecto al control positivo, la intensidad general se evaluó con la siguiente escala (tabla 4):

Tabla 4. Valoración de la intensidad de la inmunohistoquímica de PD-L1.

0	Negativo
1+	Débil
2+	Moderada
3+	Fuerte

Se consideró el control positivo como satisfactorio cuando al menos 70% de las células presentaban tinción de membrana en promedio 2+ de intensidad. En el caso de observarse fondo, éste debía ser de menos de 1+ (Figura 22)

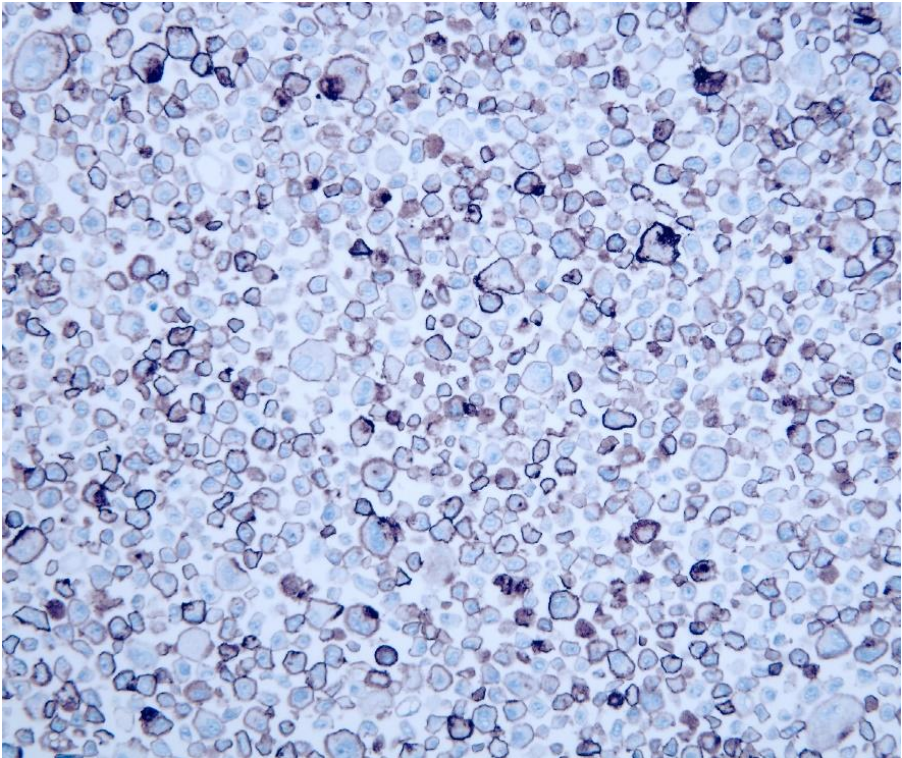


Figura 22. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1-(20x). Control positivo en línea celular.

La valoración del control negativo se consideró satisfactoria cuando la mayoría de las células fueron negativas para la tinción. Se dieron como negativos también, aquellos controles con presencia de 10 células o menos con tinción de membrana. Al igual que en el control positivo, el fondo en estos casos debía ser inferior a 1+ (Figura 23).

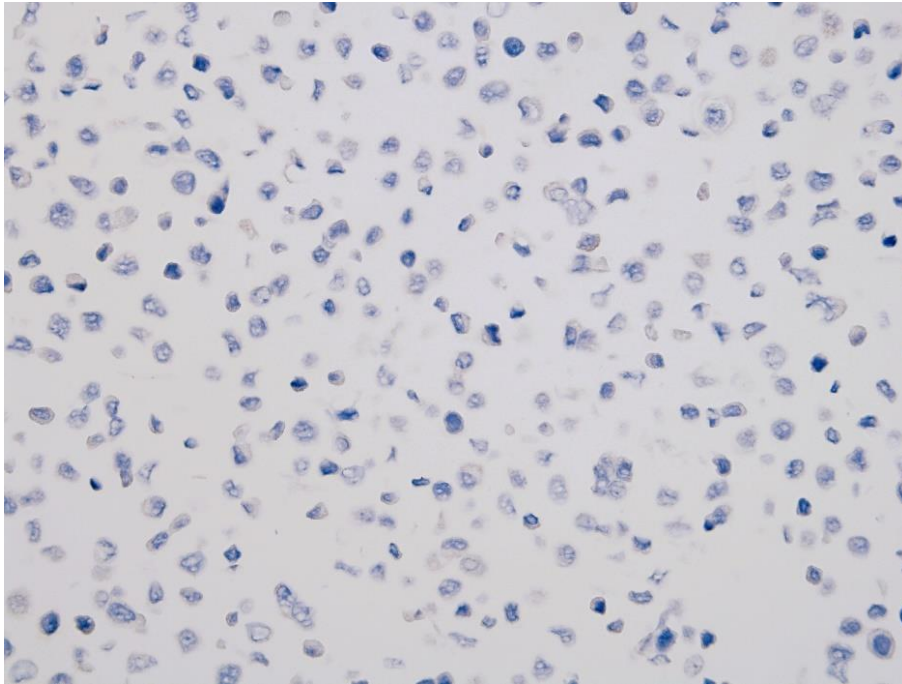


Figura 23. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1-(20x). Control negativo en línea celular.

La interpretación del PD-L1 en los casos se determinó por medio del “Tumor Proportion Score” (TPS), definiéndose éste como el porcentaje de células tumorales viables que muestran una tinción de membrana parcial o completa ($\geq 1+$) en relación a todas las células tumorales viables presentes en la muestra (Agilent technologies).

$$TPS = \frac{\# \text{ células tumorales positivas para PD-L1}}{\text{Total de células tumorales positivas y negativas para PD-L1}}$$

A bajo aumento (4x), se examinaron todas las áreas con presencia de células tumorales, buscando cualquier zona con intensidad 1+ y tinción de membrana. Posteriormente, a alto aumento (10x, 20x, 40x), se evaluaron éstas y se estimó el porcentaje de células tumorales tanto positivas como negativas. Se prestó especial atención a diferenciar las células tumorales positivas de las células inmunes y macrófagos reactivos a la tinción, así como a las zonas de necrosis y a las células normales.

Una vez realizado el TPS, se procedió a clasificar el resultado dentro de las siguientes categorías (tabla 5):

Tabla 5. Valoración de la expresión de la inmunohistoquímica de PD-L1 (Agilent technologies).

Expresión de PD-L1	Patrón de tinción	Resultado
No expresión	Tinción de membrana parcial ó completa ($\geq 1+$) en $<1\%$ de células tumorales viables	TPS $<1\%$
Baja expresión	Tinción de membrana parcial ó completa ($\geq 1+$) en $\geq 1-49\%$ de células tumorales viables	TPS 1-49%
Alta expresión	Tinción de membrana parcial ó completa ($\geq 1+$) en $\geq 50\%$ de células tumorales viables	TPS $\geq 50\%$

2.2 ANÁLISIS DE REORDENAMIENTOS EN *ROSI* MEDIANTE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

La hibridación fluorescente in situ es una técnica que permite la visualización de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) así como sus alteraciones en un cromosoma, mediante la alineación de una sonda de ADN marcada con un fluoróforo que se une a secuencias diana complementarias. La hibridación de esta sonda con el ADN celular es visible por su detección directa en un microscopio de fluorescencia.

Para su realización partimos de cortes de 4 μm de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE) que se colocan en cristales cargados. Tras la desparafinación del tejido se realiza desnaturalización del ADN para que se permita la hibridación con la sonda complementaria. La sonda no unida se elimina mediante una serie de lavados. Posteriormente, a los núcleos se les hace una contratinción con DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol), la cual es específica para DNA y tiñe azul. La técnica es valorada en un microscopio de fluorescencia con los filtros apropiados según las sondas utilizadas.

2.2.1 6q22 *ROS1* Break Apart FISH probe RUO kit (Abbott Molecular)

Para la detección de reordenamientos en muestras FFPE del gen *ROS1* se empleó el kit *ROS1* Break Apart FISH Probe RUO kit (Abbott Molecular). Este test consta de dos sondas separadas, localizadas en la posición 3' y 5' de la región de ruptura del gen *ROS1*:

- Sonda 6q22 *ROS1* (Tel) SpectrumOrange [5']: Hibrida la región 6q22 en el cromosoma 6, en la región telomérica del gen *ROS1*. Tiene un tamaño aproximado de 317 Kb y se visualiza de color naranja.
- Sonda 6q22 *ROS1* (Cen) SpectrumGreen [3']: Hibrida la región 6q22 en el cromosoma 6, en la región centromérica del gen *ROS1*. Tiene un tamaño aproximado de 557 Kb y se visualiza de color verde.

La técnica fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que se resumen a continuación:

1. Desparafinado y deshidratación de las secciones histológicas.
2. Pretratamientos, para permeabilizar el tejido y facilitar el acceso de la sonda a la secuencia diana:
 - Inclusión de los cristales en la solución de pretratamiento (Vysis) previamente atemperada a $80^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 ± 3 minutos.
 - Pretratamiento con solución de proteasa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 ± 4 minutos.
3. Procedimiento de hibridación usando el instrumento Hybridizer (Agilent):
 - Deshidratación del tejido en alcoholes de gradación creciente durante un minuto (70%, 85% y 100%).
 - Ajuste de la temperatura y tiempo de desnaturalización a 73°C por 3 minutos.
 - Ajuste de la temperatura y tiempo de hibridación a 37°C por 12-24 horas.
 - Aplicar 10 μL de la mezcla de la sonda a cada cristal, cubrirlos, sellarlos y colocarlos en el Hybridizer previamente ajustado y empezar el programa de hibridación.
4. Procedimiento de lavado con Buffer I y II.
5. Contratación con DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) contraste de los núcleos.

6. Valoración de las preparaciones hibridadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 equipado con un filtro para DAPI (núcleos) y un filtro doble para SpectrumGreen y SpectrumOrange así como con una cámara digital DP70 (Olympus).

Para la interpretación de la prueba se verificó en primer lugar la HE para localizar el área tumoral; posteriormente a un aumento de 10x se localizó en el cristal del FISH dicha zona para hacer la evaluación a un aumento de 100x de 50 células tumorales con el filtro apropiado. Aquellos casos con celularidad tumoral insuficiente, artefactados o con ausencia de hibridación, no fueron valorados.

El test se evaluó de la siguiente manera (Figura 24):

- Positivo (con el reordenamiento):
 - Al menos un set de señales naranja y verde que están separados por la distancia del diámetro de 2 o más señales.
 - Se identifica una sola señal verde sin su correspondiente señal naranja en un núcleo con señales fusionadas/separadas.
- Negativo (sin el reordenamiento):
 - Las señales naranja y verde se encuentran adyacentes o fusionadas (en esta última situación se puede observar amarillo).
 - Se observa una sola señal naranja sin su correspondiente señal verde.

	 Normal Verde Naranja
Positivo	
Positivo	
Negativo	
Negativo	

Figura 24. Interpretación de la prueba de FISH para *ROS1*.

La condición final de *ROS1* se determina de la siguiente manera después del conteo de 50 células:

- Muestra negativa cuando menos de 5 células son positivas ($< 5/50$ o $< 10\%$).
- Muestra positiva si más de 25 células son positivas ($> 25/50$ o $> 50\%$)
- Muestra equívoca si hay entre 5-25 células positivas.

En este último caso el cristal es valorado por un segundo evaluador el cual selecciona 50 núcleos adicionales, los cuales se suman a los primeros 50 para valorar la muestra sobre 100 células. En esta situación se considera que:

- Muestra negativa: si el porcentaje promedio de células positivas es inferior al 15% ($< 15/100$).
- Muestra positiva: si el porcentaje promedio de células positivas es mayor o igual al 15% ($\geq 15/100$).

2.3 ANÁLISIS DEL ESTADO MUTACIONAL DE LOS GENES *KRAS*, *NRAS* Y *BRAF*

2.3.1 Extracción de ADN

Se revisó el archivo de ADN congelado, extraído previamente para la realización de las pruebas de *EGFR* y se usó el excedente de material en caso de existir. Cuando éste era insuficiente o no había, se procedió al aislamiento del mismo, a partir de muestras FFPE con suficiente material, usando el kit Cobas® DNA sample preparation kit (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se trata de un kit manual basado en la unión del ADN a fibras de vidrio de una columna. Para ello, partimos de cortes de 5µm de las muestras FFPE que desparafinamos usando xilol y etanol 100%. A continuación se lleva a cabo la lisis del tejido incubando la muestra con un tampón de lisis (TLB, tampón de lisis de tejido) y proteinasa, lo que permite la liberación de los ácidos nucleicos y protege el ADN de la acción de las DNAsas (enzimas degradadoras de ADN). La muestra se incuba durante 1 hora a 56°C y a continuación otra hora a 90°C.

Posteriormente se añade el tampón PBB (tampón de unión a parafina) e isopropanol y se transfiere a una columna con fibras de vidrio. Seguidamente y mediante centrifugación, el ADN se une a la superficie del filtro de fibras eliminando al tiempo diferentes sustancias como sales, proteínas y otras impurezas celulares. Los ácidos nucleicos adheridos al filtro se lavan y eluyen en una solución acuosa.

2.3.2 Cuantificación de ADN

Una vez extraído el ADN, se cuantificó usando un espectrofotómetro de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Nanodrop 1000 de Thermofischer). Para calibrarlo se usó tampón de

elución y se realizaron dos mediciones por cada muestra. Aquellas muestras con cuantificación inferior a 9 ng/ μ l no se usaron para las pruebas.

2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para detección de mutaciones en *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*.

Para la detección de mutaciones en *KRAS* se usó el kit *KRAS* Mutation Test v2 (LSR) (Roche) y para *BRAF/NRAS* el kit *BRAF/NRAS* Mutation Test (LSR) (Roche). La prueba se basa en la realización de una PCR en tiempo real, alelo-específica para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS* y en los exones 11 y 15 de *BRAF* (tablas 6 y 7).

Dicha prueba se basa en la amplificación y detección por PCR de ADN diana, usando parejas de cebadores complementarias y oligonucleótidos marcados con tinciones fluorescentes. La detección de dichas mutaciones se realiza a través del sistema cobas z 480 (Roche). Se incluyeron controles positivos y negativos (incluidos en el kit) en cada serie analizada de casos para confirmar la validez de la carrera.

Tabla 6. Mutaciones de *KRAS* detectadas por el kit *KRAS Mutation Test v2* (LSR) (Roche).

Exon	KRAS Mutation Group	KRAS Mutation	Nucleotide Nomenclature	Protein Nomenclature	COSMIC ID
Exon 2	G12X	G12A	c.35G>C	p.Gly12Ala	522
		G12C	c.34G>T	p.Gly12Cys	516
		G12D	c.35G>A	p.Gly12Asp	521
		G12R	c.34G>C	p.Gly12Arg	518
		G12S	c.34G>A	p.Gly12Ser	517
		G12V	c.35G>T	p.Gly12Val	520
	G13X	G13A	c.38G>C	p.Gly13Ala	533
		G13C	c.37G>T	p.Gly13Cys	527
		G13D	c.38G>A	p.Gly13Asp	532
		G13R	c.37G>C	p.Gly13Arg	529
		G13S	c.37G>A	p.Gly13Ser	528
		G13V	c.38G>T	p.Gly13Val	534
Exon 3	A59X	A59E	c.176C>A	p.Ala59Glu	547
		A59G	c.176C>G	p.Ala59Gly	28518
		A59S	c.175G>T	p.Ala59Ser	1235389
		A59T	c.175G>A	p.Ala59Thr	546
	Q61X	Q61E	c.181C>G	p.Gln61Glu	550
		Q61Hc	c.183A>C	p.Gln61His	554
		Q61Ht	c.183A>T	p.Gln61His	555
		Q61K	c.181C>A	p.Gln61Lys	549
		Q61L	c.182A>T	p.Gln61Leu	553
		Q61P	c.182A>C	p.Gln61Pro	551
Q61R	c.182A>G	p.Gln61Arg	552		
Exon 4	K117X	K117Nc	c.351A>C	p.Lys117Asn	19940
		K117Nt	c.351A>T	p.Lys117Asn	28519
	A146X	A146P	c.436G>C	p.Ala146Pro	19905
		A146T	c.436G>A	p.Ala146Thr	19404
A146V	c.437C>T	p.Ala146Val	19900		

Tabla 7. Mutaciones de *BRAF*/*NRAS* detectadas por el kit *BRAF*/*NRAS* Mutation Test v2 (LSR) (Roche).

BRAF				
Exon	Mutation Reported	Mutation	Nucleic Acid Sequence	COSMIC ID
11	BRAF Exon 11	G466A	c.1397G>C	452
11	BRAF Exon 11	G466V	c.1397G>T	451
11	BRAF Exon 11	G469A	c.1406G>C	460
11	BRAF Exon 11	G469R	c.1405G>A	457
11	BRAF Exon 11	G469V	c.1406G>T	459
15	BRAF V600E/E2/D	V600E	c.1799T>A	476
15	BRAF V600E/E2/D	V600E2	c.1799_1800TG>AA	475
15	BRAF V600E/E2/D	V600D	c.1799_1800TG>AT	477
15	BRAF V600K	V600K	c.1798_1799GT>AA	473
15	BRAF V600R	V600R	c.1798_1799GT>AG	474
15	BRAF K601E	K601E	c.1801A>G	478
NRAS				
Exon	Mutation Reported	Mutation	Nucleic Acid Sequence	COSMIC ID
2	G12X	G12A	c.35G>C	565
2	G12X	G12C	c.34G>T	562
2	G12X	G12D	c.35G>A	564
2	G12X	G12R	c.34G>C	561
2	G12X	G12S	c.34G>A	563
2	G12X	G12V	c.35G>T	566
2	G13X	G13A	c.38G>C	575
2	G13X	G13C	c.37G>T	570
2	G13X	G13D	c.38G>A	573
2	G13X	G13R	c.37G>C	569
2	G13X	G13S	c.37G>A	571
2	G13X	G13V	c.38G>T	574
2	A18T	A18T	c.52G>A	577
3	Q61X	Q61Ht	c.183A>T	585
3	Q61X	Q61Hc	c.183A>C	586
3	Q61X	Q61K	c.181C>A	580
3	Q61X	Q61L	c.182A>T	583
3	Q61X	Q61P	c.182A>C	582
3	Q61X	Q61R	c.182A>G	584
3	Other NRAS Ex3/4	A59D	c.176C>A	253327
3	Other NRAS Ex3/4	A59T	c.175G>A	578
3	Other NRAS Ex3/4	K117Nc	c.351G>C	N/A
3	Other NRAS Ex3/4	K117Nt	c.351G>T	N/A
3	Other NRAS Ex3/4	A146T	c.436G>A	27174
3	Other NRAS Ex3/4	A146V	c.437C>T	4170228

La técnica fue realizada según recomendaciones del fabricante las cuales se resumen a continuación:

1. Realización de un mapa de la placa a analizar e introducirla en el sistema informático para posicionar adecuadamente cada muestra.
2. Cálculo del volumen de diluyente de DNA por muestra y dilución del mismo.
3. Cálculo del volumen a usar de las mezclas maestras (MMX) 1, 2 y 3 por serie y por kit.
4. Cálculo del volumen de cloruro de magnesio a usar por serie.
5. Realización de las mezclas maestras de trabajo (MMX + cloruro de magnesio) 1, 2 y 3 para cada kit según los cálculos previstos.
6. Cargar la mezcla de trabajo en cada columna correspondiente (25 μ l en cada pocillo).
7. Pipetear los controles positivos en la posición A-01 a A-06 y los negativos en B-01 a B-06 (25 μ l en cada pocillo).
8. Agregar el ADN diluido (25 μ l en cada pocillo). Cada caso posicionado en su pocillo y fila correspondiente.
9. Cubrir la placa con film sellante.
10. Centrifugación de la placa.
11. Posicionar la placa en el equipo Cobas z 480 (Roche) con el programa KRAS v2 FFPET e iniciarlo.

Una vez terminada la prueba, el software del equipo (cobas®4800 User Defined Workflow) automáticamente guarda y carga los datos al sistema los cuales se analizan por medio del portal “Oncology Research Kit data” al acceder al programa y pulsar analizar. El análisis de los resultados se interpreta de la siguiente manera (tablas 8 y 9):

Tabla 8. Interpretación de resultados del kit KRAS Mutation Test v2 (LSR) (Roche).

Resultado de la prueba	Resultado de la mutación	Interpretación
Mutación detectada	G12X (G12A, G12D, G12R, G12S, G12V) G12C G13X (G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V) A59X (A59E, A59G, A59S, A59T) Q61X (Q61E, Q61Hc, Q61Ht, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R) K117X (K117Nc, K117Nt) A146X (A146P, A146T, A146V)	Mutación detectada en un área específica de la zona diana.
No mutación detectada (NMD)	N/A	Mutación no detectada en las regiones diana.
Inválida	N/A	
Fallida	N/A	Fallo de la prueba por problemas de hardware o software.

Tabla 9. Interpretación de resultados del kit BRAF/NRAS Mutation Test (LSR) (Roche).

Resultado de la prueba	Resultado de la mutación	Interpretación
Mutación detectada	BRAF V600E/E2/D BRAF V600K BRAF V600R BRAF K601E BRAF Exon 11 (G466A, G466V, G469A, G469R, G469V) NRAS G12X (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V) NRAS G13X (G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V) NRAS A18T NRAS Q61X (Q61Ht, Q61Hc, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R) NRAS otras mutaciones exón 3 y 4 (A59D, A59T, K117Nc, K117Nt, A146T, A146V)	Mutación detectada en un área específica de la zona diana.
No mutación detectada (NMD)	N/A	Mutación no detectada en las regiones diana.
Inválida	N/A	
Fallida	N/A	Fallo de la prueba por problemas de hardware o software.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la descripción general de los casos se usaron frecuencias simples, porcentajes para las variables dicotómicas, y promedios, desviaciones estándar y rango para las variables continuas. Los datos ausentes en una variable en particular fueron excluidos de la descripción de la misma. Se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- En la variable estado tabáquico, los sujetos exfumadores con menos de 15 años de abandono del hábito se clasificaron en una categoría aparte
- La variable ECOG fue dicotomizada en mayor de 2 y menor o igual a 2
- La variable PD-L1 fue categorizada en tres niveles: menor a 1, mayor o igual a 1 y menor que 50, y mayor o igual a 50.
- Para el análisis de supervivencia la variable tipo histológico fue categorizada en presencia o ausencia de adenocarcinoma.

Se realizó un análisis para explorar la asociación entre la expresión de PD-L1 y los demás marcadores. Para ello se usó la versión categórica de la variable PD-L1 y se cruzó con los resultados de *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* expresados como variables dicotómicas (negativo/positivo), excluyendo los casos no valorables o con lecturas inválidas. Al tratarse de una exploración, no se realizaron pruebas de hipótesis. Los valores ausentes fueron excluidos del cálculo de las asociaciones. No se realizaron análisis de sensibilidad.

Finalmente, la relación entre la expresión de PD-L1 y la mortalidad por cualquier causa se exploró mediante análisis de supervivencia. Se estimó el tiempo desde el diagnóstico hasta el fallecimiento, excluyendo aquellos casos con fecha de muerte desconocida. Las funciones de supervivencia en cada categoría de expresión de PD-L1 se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon usando regresión de Cox, ajustando por edad al diagnóstico y adenocarcinoma.

Los análisis se realizaron con el software Stata 14.1 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.)

IV

Resultados

RESULTADOS

1. PACIENTES

De los 442 casos potencialmente elegibles, 103 casos fueron seleccionados para el estudio. Las variables clínicas fueron analizadas en la totalidad de ellos así como el estudio inmunohistoquímico de PD-L1 y el molecular de *EGFR* y *ALK*. El estudio de *ROS1* se realizó en 102 casos y el de *KRAS*, *BRAF* y *NRAS* en 82. Tras la realización de las pruebas, cuatro casos de *ROS1* fueron no valorables, dos de *KRAS* resultaron inválidos así como 3 de *BRAF* y *NRAS* aún cuando se repitió en todos ellos el test (Figura 25).

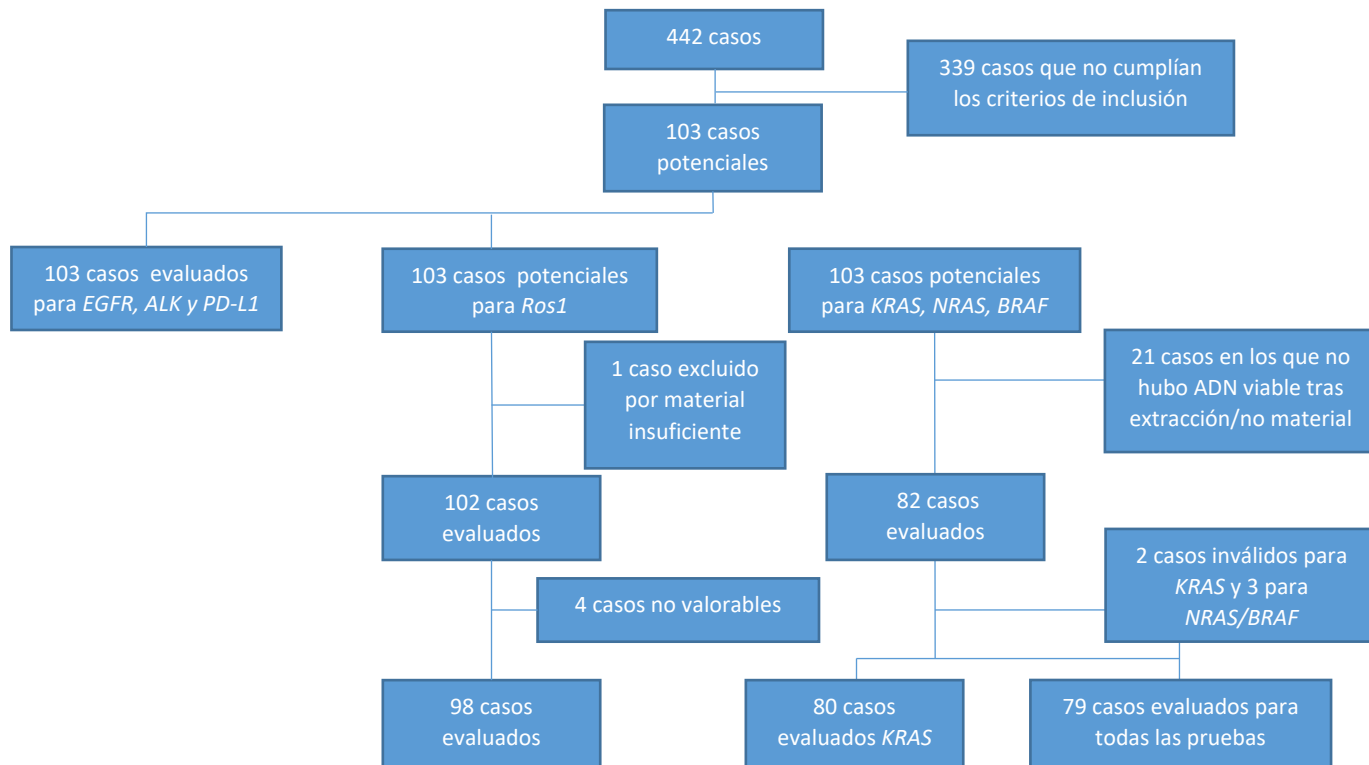


Figura 25. Flujo de casos potenciales y casos definitivos valorados.

2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se estudiaron 103 casos de CPCNP. Las características clínico-patológicas se resumen en la tabla 10. Los pacientes correspondían a 84 hombres y 19 mujeres cuya media de edad fue de 62 años (rango 37-87 años) tanto a nivel general como en subgrupos por género (figura 26). De ellos, 90 (87.3%) tenían historia de consumo de tabaco mientras que 12 (11.7%) no y en uno de los casos (0.97%) no fue posible conocer el antecedente (figura 27). La mayor parte de los tumores correspondían a un estadio IV (90 casos-87.3%) y el resto se distribuyeron de la siguiente manera: estadio III (9-8.7%), estadio II (2-1.9%) y estadio I (2-1.9%) (figura 28). Respecto a la escala de estado funcional en el momento del diagnóstico (escala ECOG-Eastern Cooperative Oncology Group) se encontraron 84 pacientes con una valoración igual o inferior a 2 (81.6%), 18 (17.4%) por encima de 2 y en uno de los casos no fue posible conocer el dato (0.97%).

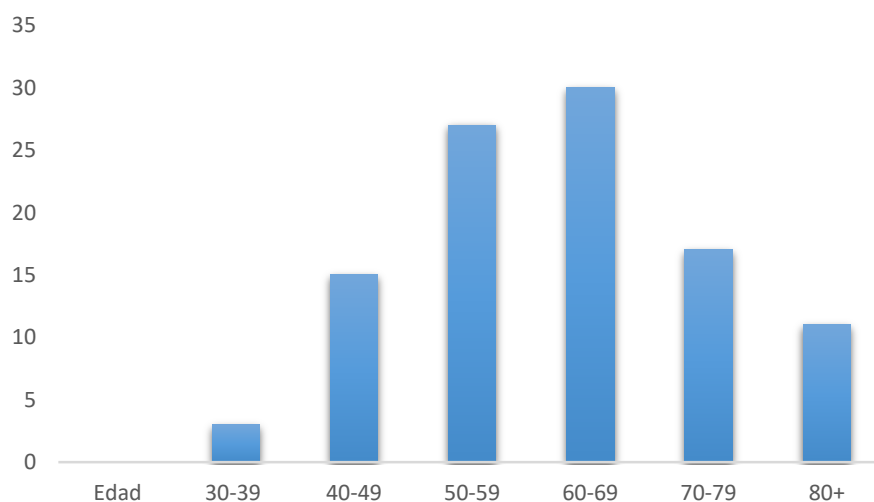


Figura 26. Distribución de edad según grupos etáreos.

Tabla 10. Características clínicas y patológicas de los pacientes (NE= neuroendocrino, NOS = no especificado, ECOG: escala ECOG-Eastern Cooperative Oncology Group).

Variable	Total de pacientes (n = 103)
Edad	
- < 62 años	48 (46.6%)
- ≥ 62 años	55 (53.4%)
Sexo:	
- Hombre	84 (81.55%)
- Mujer	19 (18.45%)
Historia de consumo de tabaco:	
- Fumador activo	49 (47.57%)
- No fumador	12 (11.65%)
- Ex fumador de más de 15 años	18 (17.48%)
- Ex fumador de menos de 15 años	23 (22.33%)
- Sin dato	1 (0.97%)
Tipo histológico:	
- Adenocarcinoma	83 (80.6%)
- Carcinoma epidermoide	14 (13.6%)
- Carcinoma NE	5 (4.9%)
- Carcinoma NOS	1 (0.9%)
Localización de la muestra obtenida:	
- Tumor primario	62 (60.2%)
- Metástasis	41 (39.8%)
Estadío tumoral:	
- I	2 (1.94%)
- II	2 (1.94%)
- III	9 (8.74%)
- IV	90 (87.38%)
Escala ECOG:	
- 0	5 (4.85%)
- 1	52 (50.48%)
- 2	27 (26.2%)
- 3	17 (16.5%)
- 4	1 (0.97%)
- Sin dato	1 (0.97%)

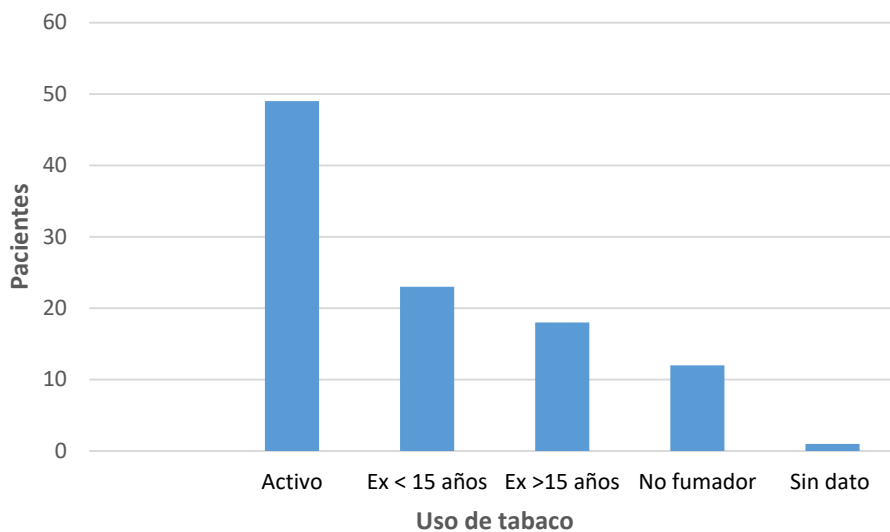


Figura 27. Distribución según consumo de tabaco

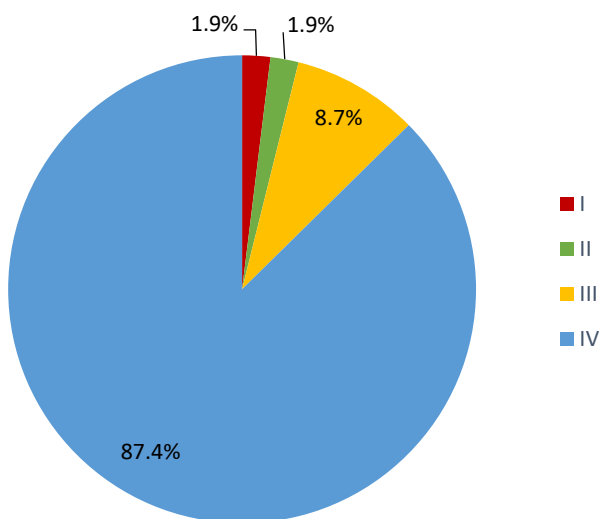


Figura 28. Distribución según estadio clínico

En cuanto a la clasificación histológica, 83 tumores correspondían a adenocarcinomas (80.6%) y 14 a carcinomas epidermoides (13.6%); el resto se distribuían entre carcinomas neuroendocrinos (5 – 4.9%) y un caso de carcinoma NOS (0.9%) (figuras 29 a 33). Las muestras se obtuvieron principalmente del tumor primario (60.2%) y los demás de la metástasis (39.8%).

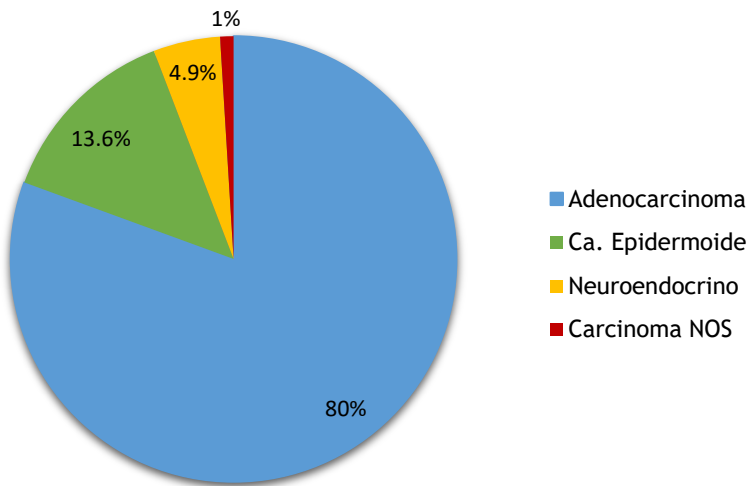


Figura 29. Distribución según tipo histológico

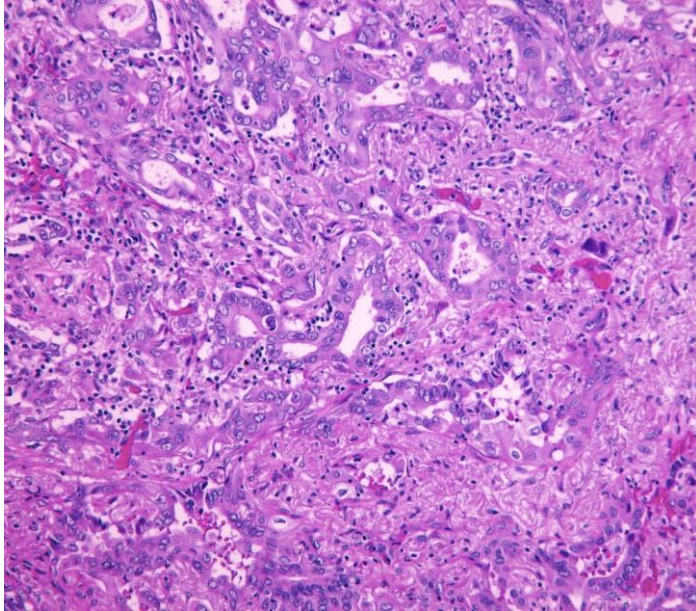


Figura 30. Adenocarcinoma: estructuras glandulares atípicas sobre estroma fibroso e inflamación (HE 20x)

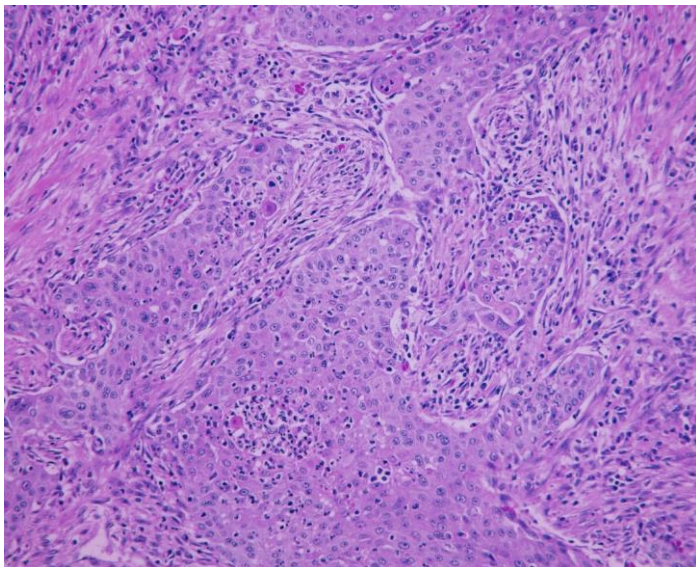


Figura 31. Carcinoma epidermoide: nidos sólidos de células tumorales malignas con disqueratocitos sobre un fondo fibroso con inflamación (HE 20x).

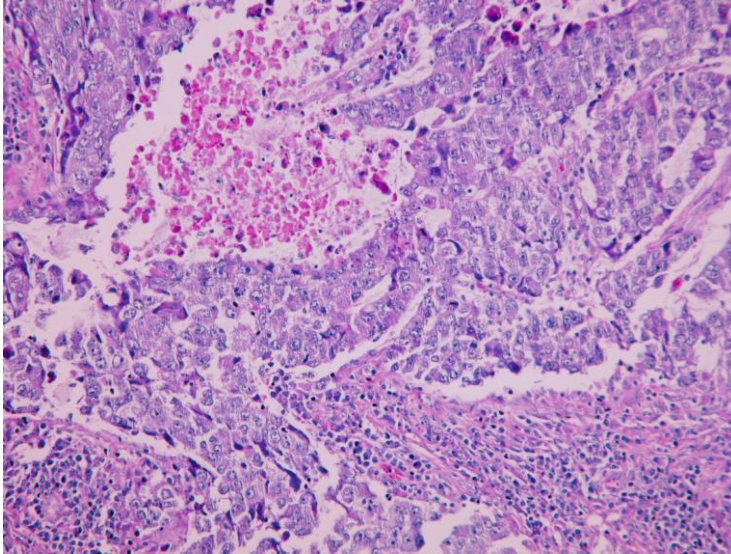


Figura 32. Carcinoma neuroendocrino: grupos tumorales de células con citoplasma amplio y nucleolo prominente con focos de necrosis (HE 20x).

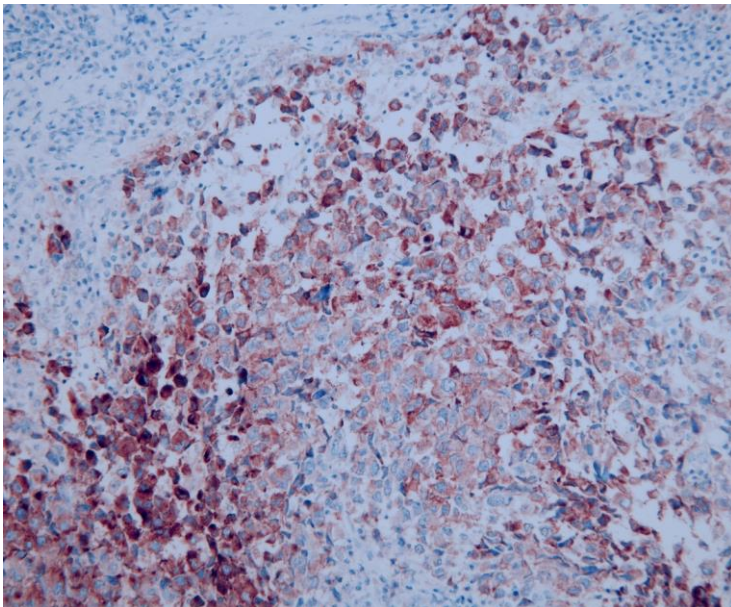


Figura 33. Positividad inmunohistoquímica para sinaptofisina en carcinoma neuroendocrino (20x).

3. EXPRESIÓN DE PD-L1

Se realizó estudio inmunohistoquímico para PD-L1 en los 103 casos. De éstos, el 39.8% presentaron algún tipo de positividad. El 25.24% (26 casos) tenía un TPS entre 1%-49% y el 14.56% (15 casos) un TPS $\geq 50\%$. Los casos con expresión menor al 1% correspondieron al 60.19% (62 casos) (figura 34 a 37).

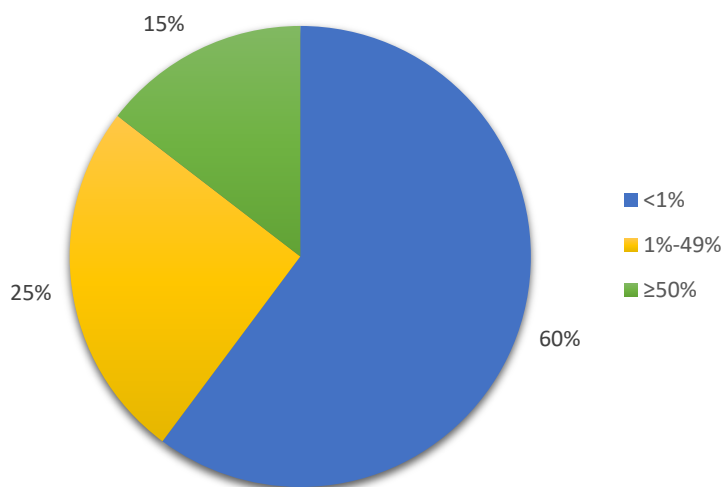


Figura 34. Categorías de expresión inmunohistoquímica de PD-L1.

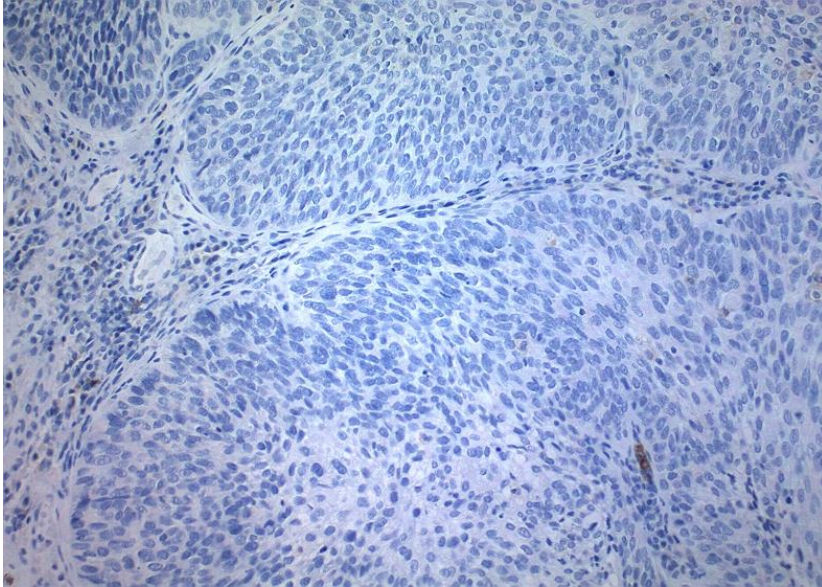


Figura 35. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1 (20X). Carcinoma de pulmón de célula no pequeña con TPS <1%

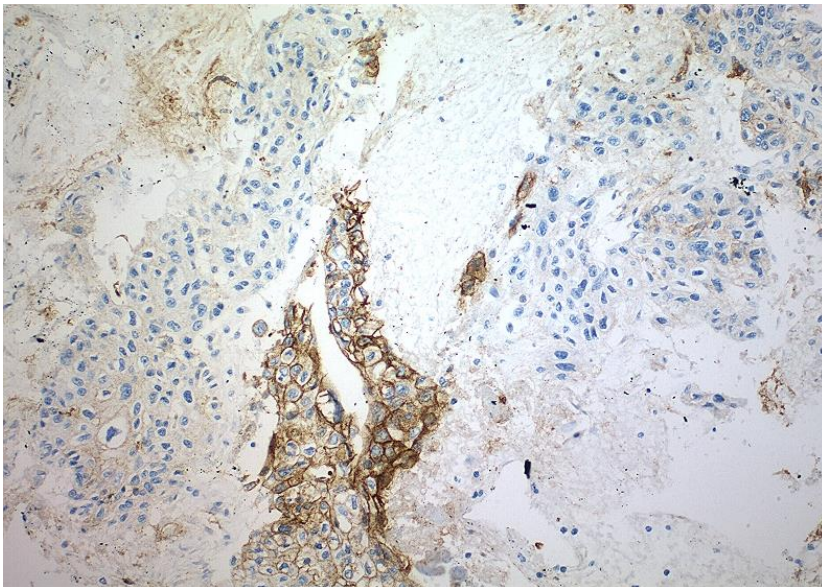


Figura 36. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1 (20X). Carcinoma de pulmón de célula no pequeña con TPS 1-49%

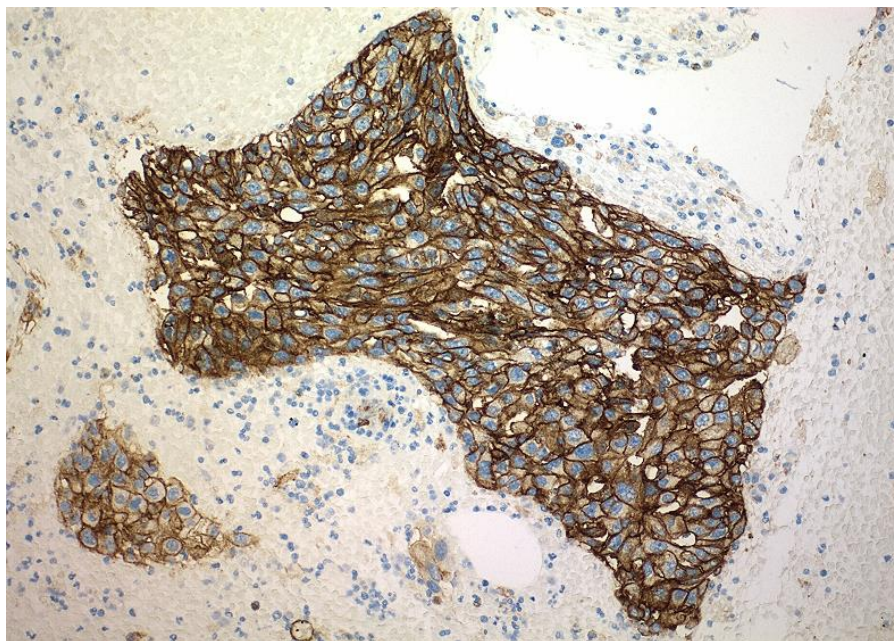


Figura 37. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1(20X). Carcinoma de pulmón de célula no pequeña con TPS $\geq 50\%$

4. Características moleculares

Se realizó estudio molecular completo en 79 de los 103 casos (76.7%); en los restantes, no fue posible completar la totalidad de las pruebas debido a falta de material o problemas técnicos.

De los 79 casos con análisis completo, 39 de ellos (47%), presentaron al menos una alteración molecular. Específicamente *EGFR*, *ALK* y *ROS1* fueron analizados en 98 de los pacientes incluidos y se encontró alguna mutación o reordenamiento en el 15.3%.

Puntualmente para *EGFR* se observaron mutaciones en el 10.67% de los casos (11), todos ellos casos de adenocarcinoma, siendo la frecuencia en este subgrupo de un 13.25%. La más usual correspondió a una mutación puntual en el exón 21 (L858R), presente en 5 casos, todos ellos con histología de adenocarcinoma y en estadio IV. La siguiente en frecuencia fue una mutación tipo delección en el exón 19 en cuatro pacientes no fumadores, también con histología de adenocarcinoma y en estadio IV. Los dos casos restantes consistían en una doble mutación en el exón 20 (T790M) y el exón 21 (L858R) y de igual manera que los anteriores casos, eran pacientes con adenocarcinomas en estadio IV (figura 38, Tabla 11). Se observó una tendencia a detectarse la mutación en mujeres (7 de los 11 casos - 63%) y en pacientes no fumadores (8 de 11 casos - 72%)

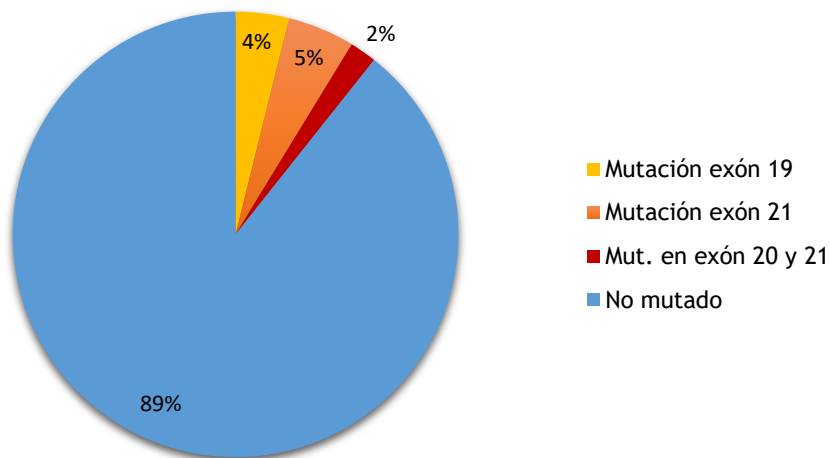


Figura 38. Estado mutacional de *EGFR* en todos los casos.

Tabla 11. Características clínicas y patológicas de los pacientes y su correlación con el estado de *EGFR*. (NE = neuroendocrino, NOS = no especificado).

Variable	<i>EGFR</i> MUTADO EN EXON 19 (n = 4)	<i>EGFR</i> MUTADO EN EXON 21 (n = 5)	<i>EGFR</i> MUTADO EN EXON 20 Y 21 (n = 2)	<i>EGFR</i> NO MUTADO (n = 92)
Edad				
- < 62 años	1 (25%)	1 (20%)	1 (50%)	45 (48.9%)
- ≥ 62 años	3 (75%)	4 (80%)	1 (50%)	47 (51.1%)
Sexo:				
- Hombre	2 (50%)	2 (40%)	0	80 (86.96%)
- Mujer	2 (50%)	3 (60%)	2 (100%)	12 (13.04%)
Historia de consumo de tabaco:				
- Fumador activo	0	1 (20%)	1 (50%)	70 (76.1%)
- No fumador	4 (100%)	3 (60%)	1 (50%)	4 (4.34%)
- Ex fumador de más de 15 años	0	1 (20%)	0	16 (17.4%)
- Ex fumador de menos de 15 años	0	0	0	1 (1.08%)
- Sin dato				1 (1.08%)
Tipo histológico:				
- Adenocarcinoma	4 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	72 (78.27%)
- Carcinoma epidermoide	0	0	0	14 (15.21%)
- Carcinoma NE	0	0	0	5 (5.43%)
- Carcinoma NOS	0	0	0	1 (1.08%)
Estadío tumoral:				
- I	0	0	0	2 (2.1%)
- II	0	0	0	2 (2.1%)
- III	0	0	0	9 (9.8%)
- IV	4 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	79 (85.9%)

Del total de los 103 casos, se observaron reordenamientos de *ALK* en 3 de ellos (2.91%) que representan el 3.6% de todos los adenocarcinomas. Estos pacientes eran todos hombres y con historia de consumo de tabaco (figura 39, Tabla 12). El estudio de *ROS1* se realizó de manera adecuada en 100 casos, siendo 98 de ellos valorables y observándose el reordenamiento en solo uno de ellos, correspondiente a una paciente de sexo femenino de 55 años con carcinoma epidermoide y no fumadora (figura 40). Los cinco casos restantes no pudieron realizarse pues en cuatro de ellos no fue valorable la técnica y en el último no hubo material. (Tabla 12)

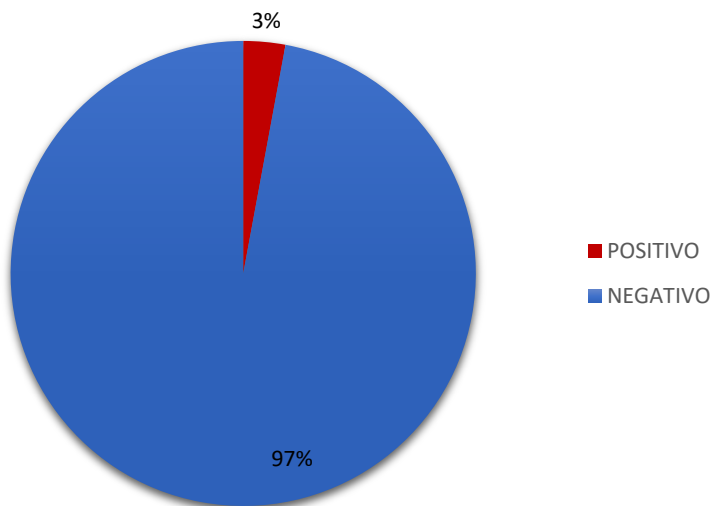


Figura 39. Reordenamientos de *ALK*

Tabla 12 .Características clínicas y patológicas de los pacientes en relación a *ALK* y *ROS1*. (NE = neuroendocrino, NOS = no especificado).

Variable	<i>ALK POSITIVO</i> (n = 3)	<i>ROS1 POSITIVO</i> (n = 1)
Edad		
- < 62 años	1 (33.3%)	1 (100%)
- ≥ 62 años	2 (66.6%)	0
Sexo:		
- Hombre	3 (100%)	0
- Mujer	0	1 (100%)
Historia de consumo de tabaco:		
- Fumador activo	2 (66.6%)	0
- No fumador	0	1 (100%)
- Ex fumador de más de 15 años	1 (33.3%)	0
- Ex fumador de menos de 15 años	0	0
- Sin dato	0	0
Tipo histológico:		
- Adenocarcinoma	3 (100%)	0
- Carcinoma epidermoide	0	1 (100%)
- Carcinoma NE	0	0
- Carcinoma NOS	0	0
Estadío tumoral:		
- I	0	0
- II	1 (33.3%)	0
- III	0	0
- IV	2 (66.6%)	1 (100%)

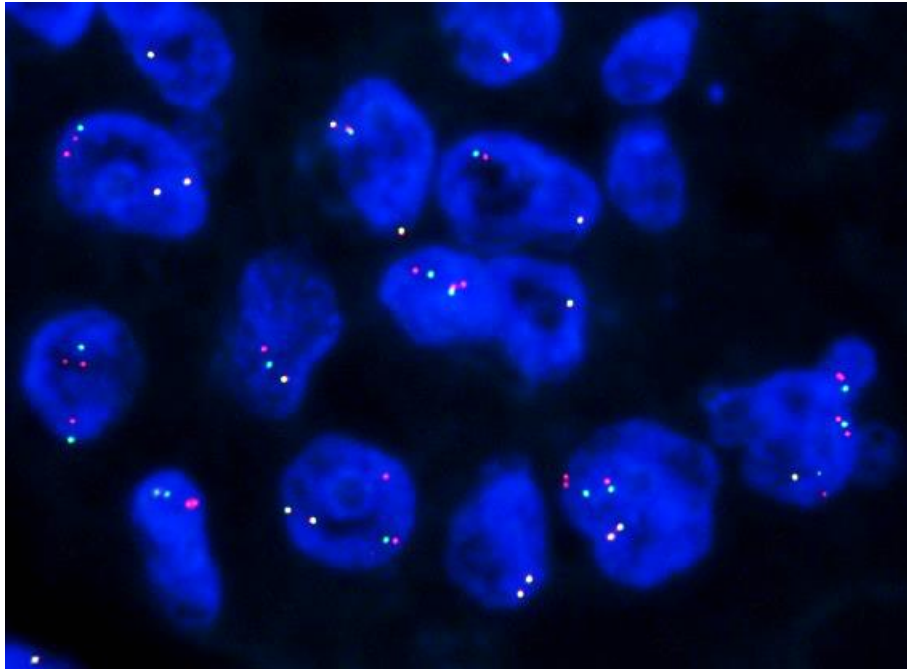


Figura 40. FISH con reordenamiento de *ROS1*.

Como se ha mencionado previamente, el estudio de mutaciones en *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* pudo ser realizado en 82 pacientes. Los resultados se detallan en la tabla 13. Específicamente para *KRAS* la prueba fue valorable en 80 casos (2 fueron inválidos), encontrándose mutaciones en el 28.75% de éstos (33.3% exclusivamente en adenocarcinomas); la alteración más frecuente correspondió a la mutación que afecta el codón 12 (G12X) con 19 casos, seguidas de las mutaciones en el codón 13 (G13X) y el codón 61 (Q61X), cada una con dos casos (Figura 41). De manera general se observó una frecuencia mayor de la mutación en pacientes con historia de consumo de tabaco y con histología de adenocarcinoma. Al hacer el análisis por subgrupos llamó la atención la presencia de la mutación en un 53.85% de las mujeres estudiadas vs. el 23.8% de los hombres.

Tabla 13. Características clínicas y patológicas de los pacientes y su correlación con el estado de *KRAS*. (NE= neuroendocrino, NOS= no especificado).

Variable	Total de pacientes (n= 80)	Total mutados <i>KRAS</i> (n= 23)	<i>KRAS</i> mutación G12X (n= 19)	<i>KRAS</i> mutación G13X (n= 2)	<i>KRAS</i> mutación Q61X (n= 2)
Edad					
- < 62 años	40 (50%)	14 (60.9%)	10 (52.63%)	2 (100%)	2 (100%)
- ≥ 62 años	40 (50%)	9 (39.1%)	9 (47.37%)	0	0
Sexo:					
- Hombre	67 (83.75%)	16 (69.6%)	14 (73.7%)	1 (50%)	1 (50%)
- Mujer	13 (16.25%)	7 (30.4%)	5 (26.3)	1 (50%)	1 (50%)
Historia de consumo de tabaco:					
- Fumador activo	58 (72.5%)	18 (78.3%)	14 (73.7%)	2 (100%)	2 (100%)
- No fumador	6 (7.5%)	1 (4.35%)	1 (5.2%)	0	0
- Ex fumador de más de 15 años	14 (17.5%)	3 (13%)	3 (15.8%)	0	0
- Ex fumador de menos de 15 años	1 (1.25%)	0	0	0	0
- Sin dato	1 (1.25%)	1 (4.35%)	1 (5.2%)	0	0
Tipo histológico:					
- Adenocarcinoma	63 (78.75%)	21 (91.3%)	17 (89.5%)	2 (100%)	2 (100%)
- Carcinoma epidermoide	11 (13.75)	1 (4.35%)	1 (5.2%)	0	0
- Carcinoma NE	5 (6.25%)	1 (4.35%)	1 (5.2%)	0	0
- Carcinoma NOS	1 (1.25%)	0	0	0	0
Estadío tumoral:					
- I	2 (2.5%)	1 (4.35%)	1 (5.2%)	0	0
- II	2 (2.5%)	0	0	0	0
- III	8 (10%)	2 (8.7%)	2 (10.52%)	0	0
- IV	68 (85%)	20 (86.95%)	16 (84.2%)	2 (100%)	2 (100%)

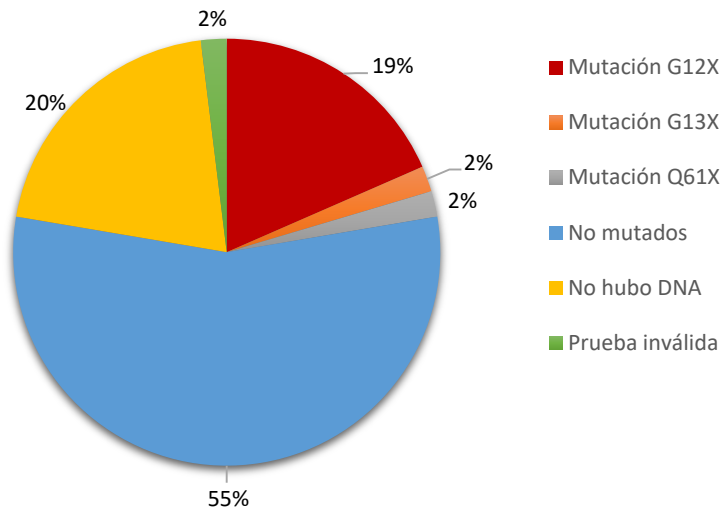


Figura 41. Estado mutacional de *KRAS*.

El estudio de *BRAF* se realizó en 82 casos, de los cuales tras repetición de la prueba, 3 resultaron inválidos. Es así, que de los 79 casos que finalmente pudieron analizarse, se identificaron 2 casos con mutaciones en el codón 600, específicamente V600K y V600R (2.5%) (Figura 42). Se trataba de dos pacientes masculinos con adenocarcinoma, historia de consumo de tabaco y en estadio IV, uno de los cuales presentaba una mutación concomitante en el codón 12 de *KRAS* (G12X).

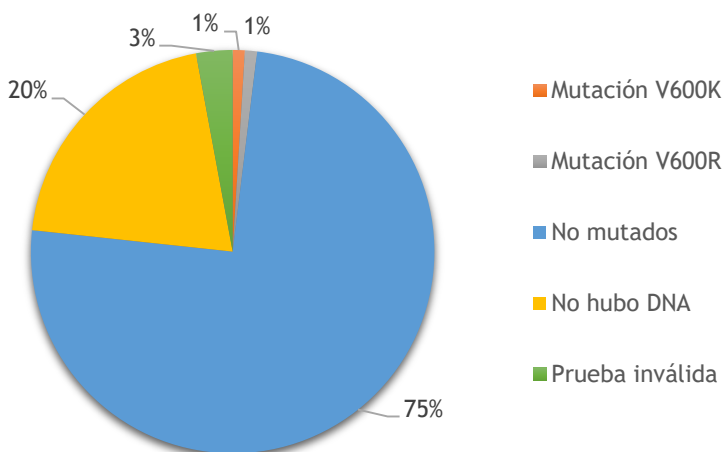


Figura 42. Estado mutacional de *BRAF*.

Por su parte, en *NRAS* no fue detectada ninguna mutación.

5. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y VARIABLES CLÍNICAS

No se encontró ninguna tendencia significativa entre las variables clínicas y la expresión de PD-L1. Los resultados se observan en detalle en la tabla 14.

Tabla 14. Características clínicas y patológicas de los pacientes y su correlación con la expresión de PD-L1. (NE= neuroendocrino, NOS= no especificado).

Variable	Total de pacientes (n = 103)	Expresión de PD-L1 <1% (n =62) (60.24%)	Expresión de PD-L1 1%-49% (n =26) (25.2%)	Expresión de PD-L1 ≥50% (n=15) (14.56%)
Edad				
- < 62 años	48 (46.6%)	27 (56.3%)	13 (27%)	8 (16.7%)
- ≥ 62 años	55 (53.4%)	35 (63.6%)	13 (23.6%)	7 (12.8%)
Sexo:				
- Hombre	84 (81.55%)	52 (61.9%)	19 (22.62%)	13 (15.48%)
- Mujer	19 (18.45%)	10 (52.63%)	7 (36.84%)	2 (10.53%)
Historia de consumo de tabaco:				
- Fumador activo	49 (47.57%)	31 (63.2%)	9 (18.4%)	9 (18.4%)
- No fumador	12 (11.65%)	7 (58.3%)	5 (41.7%)	0
- Ex fumador de más de 15 años	18 (17.48%)	10 (55.6%)	4 (22.2%)	4 (22.2%)
- Ex fumador de menos de 15 años	23 (22.33%)	14 (60.9%)	7 (30.4%)	2 (8.7%)
- Sin dato	1 (0.97%)	0	1	0
Tipo histológico:				
- Adenocarcinoma	83 (80.6%)	47 (56.6%)	22 (26.5%)	14 (16.9%)
- Carcinoma epidermoide	14 (13.6%)	9 (64.29%)	4 (28.57%)	1 (7.14%)
- Carcinoma NE	5 (4.9%)	5 (100%)		
- Carcinoma NOS	1 (0.9%)	1 (100%)		

De manera descriptiva, para el grupo con valores de TPS 1%-49%, 19 de 26 pacientes (73%) eran hombres, 20 (77%) tenían historia de consumo de tabaco y 22 (84.6%) tenían un diagnóstico de adenocarcinoma (figura 43).

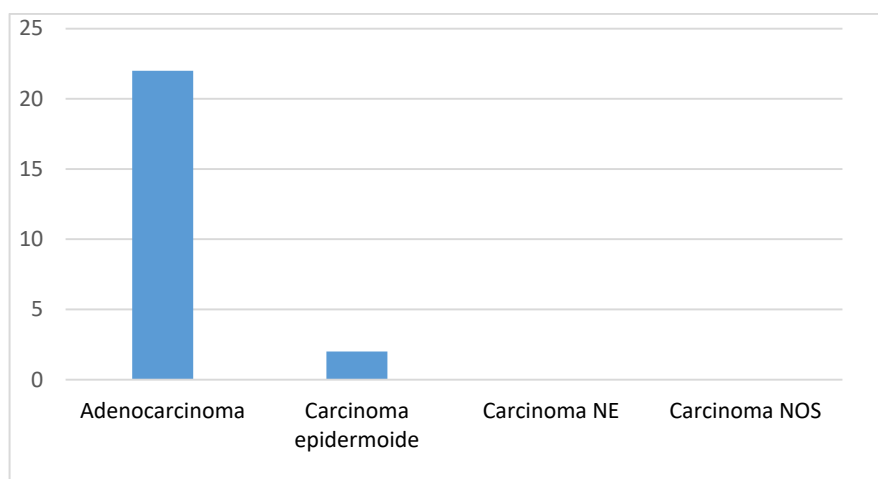


Figura 43. Distribución por tipo histológico de la categoría de expresión de PD-L1 1-49%. (NE= neuroendocrino, NOS= no especificado).

Para el grupo con valores de TPS $\geq 50\%$, 14 de 15 pacientes (93%) eran hombres, todos tenían historia de consumo de tabaco y 14 (93%) tenían un diagnóstico de adenocarcinoma (figura 44).

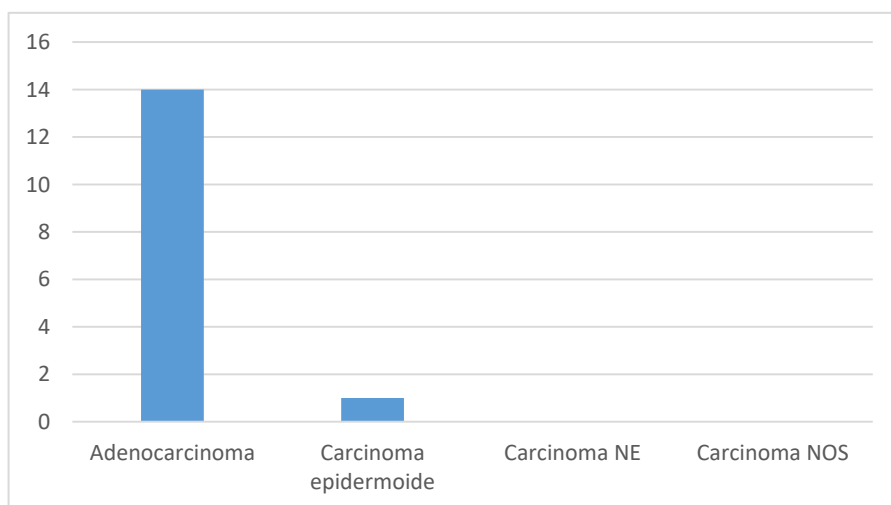


Figura 44. Distribución por tipo histológico de la categoría de expresión de PD-L1 $\geq 50\%$ (NE= neuroendocrino, NOS= no especificado).

Aunque a primera vista pensaríamos que la expresión de PD-L1 es más frecuente en hombres, al analizar de manera proporcional con todos los casos estudiados (incluyendo los negativos), encontramos que el porcentaje de mujeres con expresión es del 47.27% vs. un 38.1% en hombres. De la misma manera, el análisis de expresión entre historia de consumo de tabaco vs. pacientes que nunca han fumado, no muestra diferencias muy significativas, con una expresión de PD-L1 en el 39% en el primer grupo vs. 41% en el segundo. Finalmente, respecto a tipo histológico observamos una positividad para PD-L1 en un 43.4% de todos los adenocarcinomas vs. 25% en carcinomas epidermoides. En los casos de carcinomas neuroendocrinos y carcinoma NOS, no se detectó expresión.

6. CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE PD-L1 Y LAS MUTACIONES CONDUCTORAS ANALIZADAS

De todos los casos estudiados para todas las pruebas moleculares (81 casos) se encontró expresión de PD-L1 en asociación a algún tipo de mutación en un 20.9%, correspondiente a 17 casos. De manera descriptiva, en el grupo con TPS 1%-49% se evidenciaron 4 casos con mutaciones en *EGFR* (3 en el exón 19 y 1 en el exón 20), 2 casos con reordenamientos de *ALK* y el único caso con reordenamiento de *ROS1*. Respecto a *KRAS* se observaron 7 casos mutados. En el grupo de TPS $\geq 50\%$ solo se detectaron 3 mutaciones en *KRAS*, siendo el resto de alteraciones negativas. En ninguno de los grupos con expresión de PD-L1 hubo casos con mutaciones de *BRAF* ó *NRAS*. En las figuras 45 y 46 y en las tablas 15 y 16 se recogen los resultados del análisis.

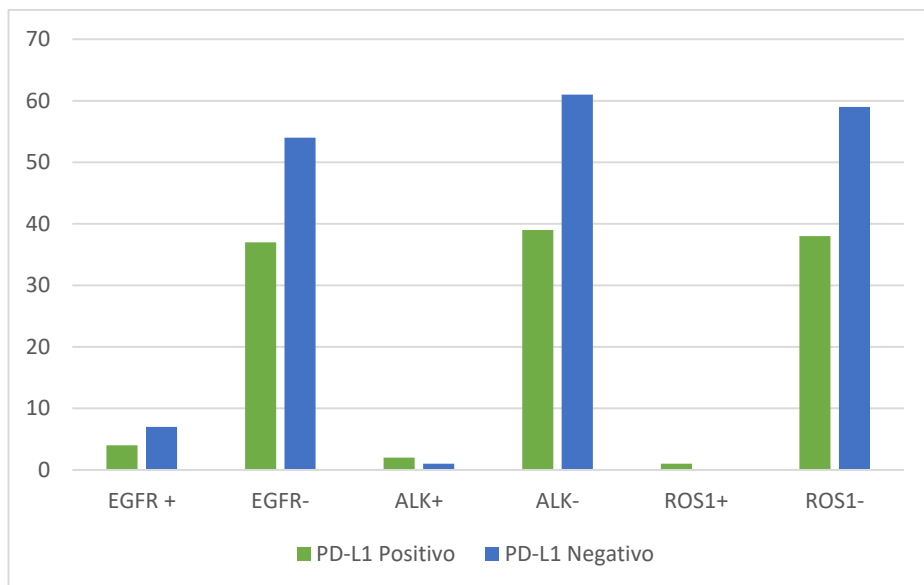


Figura 45. Correlación entre expresión de PD-L1 y *EGFR*, *ALK* y *ROS1*.

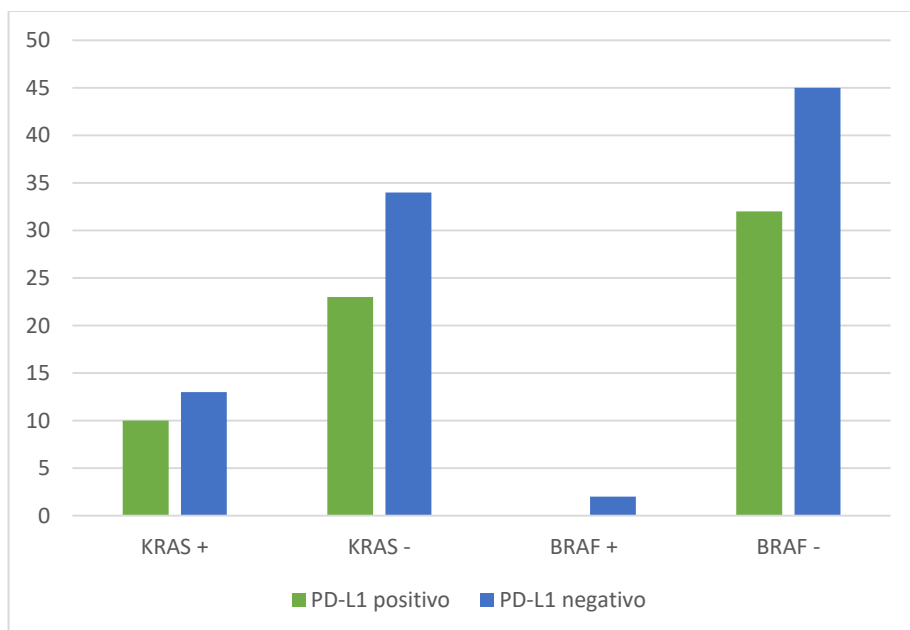


Figura 46. Correlación entre expresión de PD-L1 y *KRAS* y *BRAF*.

Tabla 15. Correlación entre expresión de PD-L1 y mutaciones en *EGFR*, *ALK* y *ROS1*.

Variable	Total de pacientes (n = 103)	Expresión de PD-L1 <1% (n =62)	Expresión de PD-L1 1%-49% (n =26)	Expresión de PD-L1 ≥50% (n=15)
EGFR				
- Mutado en exón 19	4 (3.88%)	1 (25%)	3 (75%)	0
- Mutado en exón 21	5 (4.85%)	4 (80%)	1 (20%)	0
- Mutado en exón 20 y 21	2 (1.94%)	2 (100%)	0	0
- No mutado	92 (89.32%)	55 (59.7%)	22 (23.9%)	15 (16.3%)
ALK				
- Positivo	3 (2.91%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0
- Negativo	100 (97.09%)	61 (61%)	24 (24%)	15 (15%)
ROS1				
- Positivo	1 (0.97%)	0	1 (100%)	0
- Negativo	97 (94.17%)	59 (60.8%)	24 (24.7%)	14 (14.4%)
- No valorable	5 (4.85%)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)

Tabla 16. Correlación entre expresión de PD-L1 y mutaciones en *BRAF* y *KRAS*.

Variable	Total de pacientes (n = 82)	Expresión de PD-L1 <1% (n = 49)	Expresión de PD-L1 1%-49% (n = 22)	Expresión de PD-L1 ≥50% (n = 11)
BRAF				
- Mutación en V600K	1 (1.22%)	1 (100%)	0	0
- Mutación en V600R	1 (1.22%)	1 (100%)	0	0
- No válido	3 (3.65%)	2 (66.6%)	1 (33.3%)	0
- No mutado	77 (93.9%)	45 (58.44%)	21 (27.27%)	11 (14.28%)
KRAS				
- Mutación G12X	19 (23.17%)	12 (63.15%)	6 (31.57%)	1 (5.26%)
- Mutación G13X	2 (2.44%)	1 (50%)	0	1 (50%)
- Mutación Q61X	2 (2.44%)	0	1 (50%)	1 (50%)
- No válido	2 (2.44%)	2 (100%)	0	0
- No mutado	57 (69.5%)	34 (59.64%)	15 (26.31%)	8 (14.03%)

7. EXPRESIÓN DE PD-L1 Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Se realizó un análisis de supervivencia por el método de Kaplan Meier comparando las diferentes categorías de expresión de PD-L1. Como se puede observar en la figura 47, la supervivencia en el grupo con TPS <1% es significativamente mayor, observándose una mediana de supervivencia de 207 días, frente a los 63 días el grupo con TPS \geq 50%. Por otra parte, la categoría intermedia (TPS 1-49%) presenta una mediana de supervivencia de 129 días.

En la regresión de Cox, el Hazard Ratio ajustado de la comparación TPS 1-49% vs TPS <1% fue de 1.2 (intervalo de confianza del 95% 0.77 a 2.03, $p=0.365$), y el de la comparación TPS \geq 50% versus TPS <1% fue de 2.27 (IC95% 1.23 a 4.18, $p=0.009$).

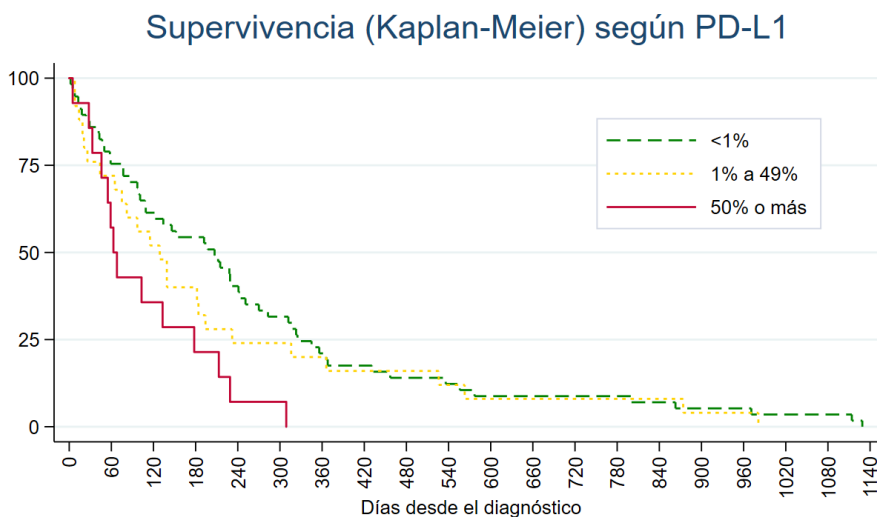


Figura 47. Curva de supervivencia según categorías de expresión de PD-L1.

V

Discusión

DISCUSIÓN

Las estrategias actuales en el CPCNP se basan en ofrecer un tratamiento personalizado para todos los pacientes. El diagnóstico molecular para detectar las alteraciones genéticas conductoras se ha convertido en el estándar de atención y se ha establecido como método viable para seleccionar a los pacientes que van a beneficiarse de una terapia dirigida. Además, la inmunoterapia se ha convertido en una nueva opción terapéutica para aquellos pacientes que no tienen alteraciones dirigibles.

Los resultados de este estudio mostraron las siguientes frecuencias en las mutaciones estudiadas: *EGFR*: 10.67%, *ALK*: 2.9%, *KRAS*: 28.75%, *BRAF*: 2.5% y *NRAS*: 0%. Adicionalmente, no se encontraron tendencias importantes entre las variables clínico-patológicas y moleculares con la expresión de PD-L1, sin embargo, se observó que PD-L1 tiende a expresarse en los casos con fusión en *ALK* y en los *EGFR* wild-type, estos últimos especialmente en la categoría de mayor expresión; el análisis de supervivencia mostró medianas inferiores en aquellos pacientes con alta expresión de PD-L1.

A continuación se detallan y discuten estos resultados en donde además de describir las características clínicas y moleculares de los tumores, se ha evaluado la relación entre estos biomarcadores (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*) y la expresión de PD-L1 y se comparan con la literatura más reciente.

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Las características clínico-patológicas de nuestra serie son muy similares a lo descrito por la literatura. La mayoría de los pacientes eran hombres con una media de edad de 62 años, fumadores y con adenocarcinomas. La tabla 17 resume los datos comparativos entre nuestros casos y algunos estudios representativos. La diferencia significativa en el número de pacientes en estadio IV puede explicarse por un sesgo de selección, dado que al inicio de nuestro estudio se planteó trabajar únicamente con pacientes en estadios avanzados para posteriormente ampliarlo con pacientes en otros estadios y poder llegar a un mínimo de 100 casos.

Tabla 17. Comparación entre diferentes estudios respecto a variables clínicas (ND: no dato)

Variable	Li et al (2017) n = 6458	Jiang et al (2017) n = 297	Lee et al (2019) n = 1000	Liu et al (2020) n = 1017	Esteban et al (2020) n = 53	Presente serie (2020) n = 103
Edad (años)	59.22	65	64	62	66.47	62
Sexo:						
- Hombre	4291 (66.5%)	211 (71.1%)	574 (57.4%)	554 (54.47%)	45 (84.9%)	84 (81.55%)
- Mujer	2167 (33.5%)	86 (28.9%)	426 (42.6%)	463 (45.53%)	8 (15.09%)	19 (18.45%)
Historia tabaquismo:						
- Si	ND	169 (56.9%)	454 (45.4%)	462 (45.4%)	44 (83.01%)	90 (87.4%)
- No	ND	128 (43.1%)	546 (54.6%)	555 (54.6%)	8 (15.09%)	12 (11.6%)
- Sin dato	ND				1 (1.88%)	1 (0.97%)
Tipo histológico:						
- Adenocarcinoma	3523 (54.4%)	156 (52.5%)	773 (77.3%)	863 (84.9%)	26 (49.05%)	83 (80.6%)
- Carcinoma epidermoide	1637 (25.35%)	129 (43.4%)	188 (18.8%)	121 (11.9%)	26 (49.05%)	14 (13.6%)
- Otros	1298 (20.25%)	12 (4.1%)	39 (3.9%)	29 (2.8%)	1 (1.88%)	6 (5.8%)
Estadío tumoral:						
- I	10.5%	ND	634 (63.4%)	ND	12 (22.63%)	2 (1.94%)
- II	ND	ND	176 (17.6%)	ND	21 (39.62%)	2 (1.94%)
- III	ND	ND	144 (14.4%)	ND	20 (37.73%)	9 (8.74%)
- IV	53.3%	ND	30 (3%)	ND	0	90 (87.38%)

2. EXPRESIÓN DE PD-L1

La expresión de PD-L1 de CPCNP en nuestro estudio fue del 39.8%. Estos datos son similares al estudio de Lee et al (2019) en donde detectaron una tasa de positividad del 43.3% y al meta-análisis realizado por Li et al (2019) en donde se observó expresión en el 37.7% (4293 casos de 11383 pacientes estudiados), aunque las definiciones de positividad entre los diversos estudios eran variables.

En la tabla 18 se comparan nuestros datos con los principales estudios incluyendo datos de una cohorte con población española exclusivamente (Esteban 2020). Todos estos estudios se realizaron con el mismo clon y metodología que se usaron para evaluar nuestra serie, por tanto resultan comparables de manera adecuada.

Tabla 18. Comparación entre diferentes estudios del nivel de expresión de PD-L1 en casos de CPCNP

<i>Estudio</i>	<i>Clon</i>	<i>n (casos totales)</i>	<i>TPS <1%</i>	<i>TPS 1%-49%</i>	<i>TPS ≥50%</i>
Keynote 001 (2015)	22C3	824	39.2%	37.6%	23.2%
Rangachari et al (2017)	22C3	71	42.25%	28.16%	29.57%
Express (2018)	22C3	2435	48.4%	29.4%	22.2%
Lee et al (2019)	22C3	1000	56.7%	23.3%	20%
Liu et al (2020)	22C3	600	41.33%	42.5%	16.1%
Esteban et al (2020)	22C3	53	47.2%	26.4%	26.4%
Presente estudio (2020)	22C3	103	60.19%	25.24%	14.36%

Llama la atención la diferencia en nuestro estudio en las categorías de expresión de $<1\%$ y $\geq 50\%$. Esto podría explicarse por las diferentes variables que pueden afectar a la determinación de PD-L1, entre otras, características preanalíticas como hipoxia, tiempo de

fijación (el cual se recomienda sea entre 6 y 24 horas) y tipo de muestra (Ilie 2016). En relación a este último parámetro, nuestra serie contó con un 42.72% de biopsias transbronquiales y un 18.45% de biopsias con aguja gruesa (BAG), lo que implica menos tejido para valorar. El estudio de Coghlin et al (2010) cuantificó la cantidad de fragmentos obtenidos por vía transbronquial encontrando una media de 4 y en general 3 de los cuales tenían tumor. La media de superficie de tejido con tumor fue de tan solo 33.4% (Coghlin 2010). Estos datos son muy importantes puesto que se ha demostrado que la expresión de PD-L1 en biopsias se correlaciona pobremente con lo que se observa en las piezas quirúrgicas, siendo esta discordancia tan alta de hasta un 46% en el estudio de Ilie et al (2015). En este trabajo encontraron que en todos los casos discordantes, la biopsia subestimó la expresión de PD-L1 respecto a la pieza quirúrgica y esto probablemente se deba a la heterogeneidad intratumoral, puesto que se ha visto expresiones diferentes de PD-L1 en diferentes regiones del mismo espécimen tumoral e incluso en varios cortes del mismo tumor (Ilie 2015-2016).

Otro punto importante a tener en cuenta, es la antigüedad del material estudiado. Las indicaciones vigentes preanalíticas recomiendan el uso de muestras con menos de 5 años desde su procesamiento; nuestra serie tenía 15 de 103 casos (14.5%) entre 6 y 8 años de antigüedad, de los cuales 12 fueron negativos.

Comparando específicamente nuestros datos con los del estudio de Esteban et al, se puede inferir que las diferencias en los niveles de expresión se deben al tipo de muestra estudiada. Mientras en nuestro estudio se valoraron principalmente biopsias transbronquiales y BAGs, el estudio de Esteban se realizó exclusivamente en piezas quirúrgicas con la subsecuente connotación de heterogeneidad tumoral antes mencionada.

3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

En nuestra serie, de los 79 casos estudiados para las 6 alteraciones moleculares (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *BRAF* y *NRAS*), 39 de ellos (49.3%) presentaron al menos una alteración. El estudio por NGS de Liu et al, sobre 1017 pacientes mostró alguna mutación en el 74.63% de los casos, pero ellos estudiaron 9 genes más. Al analizar por subgrupos, Liu et al encontraron hasta un 52.7% de pacientes con al menos una alteración entre *EGFR*, *ALK* y *ROS1* mientras que en nuestro estudio se detectaron hasta en un 14.5%. Estas diferencias probablemente se deben a variaciones en la prevalencia de las mutaciones de *EGFR* en la población asiática. El estudio de co-mutaciones en nuestro trabajo mostró una frecuencia del 3.7% correspondiente a 3 casos, de los cuales 2 presentaban dos mutaciones en *EGFR* en diferentes exones, mientras que el tercer caso mostraba una mutación en *KRAS* en el codón 12 (G12X) y otra mutación en *BRAF* V600K. Los diversos estudios analizando coexistencia de más de una mutación muestran frecuencias del 0.8% al 15% dependiendo de las mutaciones analizadas y la población a estudio (Zhuang 2018, El Osta 2019, Guibert 2017).

3.1 *EGFR*

Nuestro estudio mostró una prevalencia de las mutaciones en *EGFR* de 10.67% para todos los casos y del 13.25% para los adenocarcinomas. Estos datos coinciden con la prevalencia de la serie de Douillard sobre población caucásica con una frecuencia de la mutación del 13.7% (Douillard 2017).

Al analizar por adenocarcinomas exclusivamente, el meta-análisis de Midha et al con 39 estudios europeos, mostró una variabilidad en la prevalencia entre el 6%-41%; en población española, el estudio de Rossell (2009) muestra una incidencia del 16.6% y la única serie en

población gallega descrita por Vázquez et al con 184 pacientes, detectaron mutaciones en 25 casos, todos de adenocarcinoma correspondientes a un 13.6%. Aunque nuestro estudio muestra datos inferiores respecto al de Rossell, hay que resaltar que este último trabajo probablemente está sobreestimando la frecuencia ya que incluía una población con más mujeres no fumadoras en donde se sabe que es más habitual esta alteración. Nuestro resultado es más comparable con el estudio REASON, también sobre población española, que mostró una tasa de mutación en adenocarcinomas del 15.4% con un intervalo de confianza del 12.5%-18.7% (Esteban 2015). Por otra parte, nuestros datos a nivel general no son comparables con la población asiática, ya que como se referenció previamente, pueden encontrarse tasas de hasta el 50% (Shah 2020).

En cuanto a la distribución de las mutaciones en *EGFR*, las mutaciones más frecuentes que hemos encontrado fueron, la L858R en el exón 21 (5 de 11 casos) y deleciones del exón 19 (4 de 11 casos), tal como se describe en algunos estudios. La tabla 19 muestra los datos comparativos.

Tabla 19. Comparación entre diferentes estudios respecto al tipo de mutación de *EGFR* encontrado.

Tipo de mutación en <i>EGFR</i>	Rossell et al (2009) n = 217	Yamamoto et al (2009) n = 569	Vázquez et al (2016) n = 25	Lee et al (2019) n = 424	García-Acuña et al (2020) n=11
Deleciones en exón 19	135 (62.2%)	48.2%	11 (44%)	182 (42.9%)	4 (36.4%)
Mutaciones en exón 21					
- L858R	82 (37.8%)	42.7%	11 (44%)	202 (47.6%)	5 (45.5%)
- L861Q	0	0	1 (4%)	0	0
Mutaciones en exón 20	0	3.7%	2 (8%)	17 (4%)	0
Mutaciones en exón 18	0	3.2%	0	0	0
Otras mutaciones	0	0	0	23 (5.4%)	0
Mutaciones en exón 20 y 21	0	0	0	0	2 (18%)

En nuestra serie llama la atención la presencia de 2 casos con mutaciones simultáneas correspondientes al 1.9% del total de los CPCNP analizados. Se trataba de 2 mujeres con adenocarcinoma en estadio IV y con presencia de novo de la mutación L858R en el exón 21 y la T790M en el exón 20. La presencia de mutaciones simultáneas y concomitantes son muy poco frecuentes, identificándose en el 0.4% – 3% de todos los casos de CPCNP y entre el 1%-8% de los casos con mutaciones de *EGFR* (Saxena 2014, Tang 2020). Trasladando estos datos a nivel clínico, diversos estudios han sugerido que la presencia de la T790M de novo genera una respuesta pobre a los tratamientos con inhibidores de tirosina quinasa estándar (Rossell 2011, Costa 2014). Por ello, dichos trabajos sugieren la posibilidad de usar osimertinib antes de tiempo; sin embargo, no hay trabajos que validen aún este enfoque. Existe en fase 2 un estudio (AZENT) cuyo objetivo principal es evaluar la eficacia de osimertinib como tratamiento en primera línea en pacientes con mutaciones en *EGFR* en concomitancia con la T790M, cuyos resultados resaltarán o no la importancia de esta mutación de novo (Tang 2020).

Respecto a las características clínicas, detectamos una tendencia entre la presencia de mutaciones de *EGFR* en mujeres y en no fumadores, de manera similar a prácticamente todos los estudios incluyendo los de población española (Rossell 2009, Esteban 2015, Zhang 2016). Adicionalmente, se vió que las mutaciones de *EGFR* se presentaban con mayor frecuencia en adenocarcinomas (11 de 11 casos), pacientes mayores de 62 años (8 de 11 casos) y en estadio IV (11 de 11 casos). Los estudios antes mencionados (Rossell 2009, Esteban 2015, Zhang 2016) hacen referencia a una asociación con adenocarcinoma pero no respecto a edad o estadio patológico. Este último en nuestro trabajo pudo verse influenciado como se mencionó previamente, por el tipo de selección inicial de los casos. En cuanto a la edad, a pesar de que la mayoría de estudios no hacen referencia a

ésta como factor independiente, el estudio de Ueno et al sí mostró una asociación significativa y hacen referencia a la similitud de sus resultados con los del estudio de Choi et al, en el cual se evaluaron 98 casos de mujeres y en donde una vez ajustado el análisis estadístico con respecto al tipo histológico y al hábito tabáquico, la edad persistía como factor predictor (Ueno 2012, Choi 2010). Llama la atención el sesgo de selección en dicho estudio, puesto que la población a estudio correspondía únicamente a mujeres en donde ya es sabido que hay un aumento en la presencia de mutaciones en *EGFR*.

3.2 *ALK*

La prevalencia del reordenamiento de *ALK* en nuestro estudio (2.91%) es similar a la reportada por la literatura, así como en otros estudios de población gallega, esto es, 2-5% (Sánchez-Ares 2016). No ha sido posible establecer qué tipo de variantes ocurren en los reordenamientos dado que el estudio fue realizado por FISH.

En cuanto a los datos clínico-patológicos, se ha observado en nuestro estudio que los 3 casos positivos correspondían a pacientes varones, con historia de consumo de tabaco y con adenocarcinoma. La media de edad de los casos positivos fue de 60 años. Estos datos se asemejan a estudios que han asociado este reordenamiento a pacientes jóvenes con una media de 59 años (Takeuchi 2012, Chia 2014). Por otro lado, el meta-análisis de Chapman et al (2016) que incluyó 167 trabajos y 63000 pacientes con CPCNP, mostró una asociación significativa con adenocarcinoma como subtipo tumoral al igual que en nuestro trabajo, pero en contraposición a nuestros datos se asoció a pacientes no fumadores (Chapman 2016). Podríamos especular que esto se debe a un sesgo de muestreo ya que en nuestra cohorte, el 82% de los pacientes tenían historia de tabaquismo, haciendo más probable la presencia de alteraciones en este grupo de pacientes.

3.3 *ROS1*

Según la literatura, reordenamientos de *ROS1* se presentan en el 1% de los casos de CPCNP y al igual que *ALK* se encuentra asociado a pacientes jóvenes, no fumadores y adenocarcinomas (Bergheton 2012, Lin 2017). Nuestro único caso (1% del total de CPCNP analizados), correspondía a una paciente de 55 años y no fumadora. Sin embargo, llama la atención que el subtipo histológico es el de un carcinoma epidermoide. Este tipo de casos son extremadamente raros, pero es muy importante su detección dado que pueden recibir crizotinib como estrategia terapéutica (Ju 2018). La serie de Davis et al sobre 428 pacientes encontró 5 casos positivos para *ROS1* (1.1%), 2 (0.4%) de ellos correspondientes a carcinomas epidermoides (0.4%) (Davis 2012). De igual forma, el estudio de Shaw con 50 casos de CPCNP *ROS1* positivos, mostró un único caso (2%) con histología de epidermoide (Shaw 2014). Por otro lado, el estudio de Zhao et al en 214 casos de carcinoma epidermoide no encontró ninguno con el reordenamiento *ROS1* (Zhao 2016). A pesar de que estos casos son muy escasos, las recomendaciones actuales para la detección de *ROS1*, incluyen casos de carcinoma epidermoide únicamente en el contexto de pacientes no fumadores, dada la asociación previamente descrita y la posibilidad de terapia dirigida (Garrido 2019, López-Rios 2020).

3.4 *KRAS*

De manera general, nuestro estudio encontró un 28.7% de mutaciones en *KRAS*. Esta frecuencia está dentro de los intervalos descritos en la literatura y que abarcan entre el 20% y 40% (Adderley 2019). En nuestra serie se observó también una mayor frecuencia de la mutación en pacientes con historia de consumo de tabaco (95%), lo cual es comparable con diversos estudios como el de 670 pacientes de Dogan et al en donde el 93% de pacientes fumadores tenían mutado

KRAS (Dogan 2012) y al estudio LCMC (The Lung Cancer Mutation Consortium) donde de 450 pacientes con *KRAS* mutado, el 92% de ellos tenían antecedentes de tabaquismo (El Osta 2019). Respecto al subtipo histológico, en nuestro trabajo la mutación se presentó con mayor frecuencia en adenocarcinomas tal como se describe en la literatura (Friedlander 2020).

Al estudiar por subgrupos encontramos una mayor proporción de mujeres afectadas (53.85% vs. 23.8%). Estos datos son similares a los estudios de Dogan et al y al LCMC en donde respectivamente la frecuencia de mujeres con *KRAS* mutado fue del 62.9% y 64.4% respectivamente (Dogan 2012, El Osta 2019).

Respecto al tipo de mutación encontrada, observamos en mayor proporción alteraciones en el codón 12 (G12X) (19 de 23 casos; 82.6%) seguido por los codones 13 y 61, cada uno con 2 casos positivos (8.7% para cada codón). Estos datos se correlacionan con lo descrito en diversos estudios para la población de occidente. Por ejemplo, en el estudio LCMC en 450 pacientes con *KRAS* mutado, se identificaron mutaciones en el codón 12 en el 86.4% de los casos, en el codón 13 en un 7.11% y en el codón 61 hasta un 6.4% (El Osta 2019). De manera similar, el trabajo de Dogan evidenció un predominio de las mutaciones del codón 12 (>80%) y 13 (Dogan 2012). No ha sido posible hacer el análisis de las diferentes variantes en cada codón, dadas las limitaciones de la técnica.

Finalmente, como ya se comentó, se detectó una co-mutación correspondiente a una alteración de *KRAS* en el codón 12 (G12X) y en *BRAF V600K*. Las co-mutaciones de *KRAS* en CPCNP se han asociado de manera preferente con alteraciones en *p53*, *STK11* y *KEAP1/NFE2L2* y no presentan una asociación con sexo o edad (Arbour 2018). El estudio francés desarrollado por el “French Cooperative Thoracic Intergroup” que usó una base de datos de 17826 pacientes, encontró co-mutaciones en 165 (0.9%) casos, 108 (65.4%)

de los cuales correspondían a mutaciones en *KRAS* con mutaciones adicionales en *PIK3CA* (32%), *EGFR* (15%), *ALK* (13%) y *BRAF* (9%) (Guibert 2017). De manera similar, en el trabajo de Scheffler et al (2018) se valoraron 4507 pacientes por NGS usando dos paneles de 14 genes y FISH. Como resultado, encontraron que de 1078 pacientes con mutaciones en *KRAS*, el 53.5% tenía al menos una mutación adicional, siendo la más frecuente *p53* (39.4%). Otras mutaciones detectadas en asociación fueron *STK11* (19.8%), *KEAP1* (12.9%) y *ATM* (11.9%). Así mismo, se identificaron hasta un 15.4% de casos con amplificaciones de *MET* y 13.8% en *HER2*, estas últimas presentes de manera exclusiva con la mutación de *KRAS* G12C. Se encontraron 1.2% de casos con *EGFR* y 1.3% con *BRAF*. Éstas últimas correspondían a V600E, G596V, G464V y G469V (Scheffler 2018). Llama la atención que, en contra de lo publicado previamente, se encontrase la mutación V600E en conjunto con *KRAS*, cuando lo usual es encontrar esta asociación con mutaciones no-V600E como en nuestro caso. Diversos estudios han analizado la presencia de co-mutaciones previamente referenciadas como “mutuamente excluyentes” con frecuencias entre 1.3% y 15.4% y con implicaciones respecto a la respuesta a los tratamientos dirigidos (Zuang 2018, Yang 2014, Won 2015). Estos datos hacen pensar en que a medida que se desarrollen nuevas tecnologías con mayor capacidad para la detección de múltiples alteraciones genéticas de manera simultánea, se van a encontrar más co-mutaciones y es posible que sea necesario replantearse el dogma de las mutaciones mutuamente excluyentes.

3.5 *BRAF*

En nuestra serie encontramos 2 casos (2.5%) mutados para *BRAF* siendo estas mutaciones V600K y V600R. Estos datos se corresponden a la literatura en donde la frecuencia varía entre el 0.9%-4% (Viall 2018). Llama la atención que los dos casos de nuestra serie

corresponden a mutaciones no-V600E, cuando casi todos los estudios informan de una frecuencia del 50% para V600E (Ngueyen-Ngoc 2015) e incluso de hasta el 83% de los casos en la cohorte europea EURAF (Gautschi 2015). Respecto al perfil clínico, nuestros pacientes correspondían a hombres, fumadores y con adenocarcinoma. No obstante, a diferencia de otras mutaciones oncogénicas como *EGFR* o *ALK*, en donde hay características clínicas asociadas, en *BRAF* no están claras, pero se han detectado mayoritariamente en casos de adenocarcinoma y específicamente en pacientes con mutaciones no-V600E se ha relacionado a historia de consumo de tabaco hasta en el 82% de los casos como ocurrió en nuestro paciente (Auliac 2018). En cuanto al sexo, algunos estudios han mostrado una asociación de V600E en mujeres, sin embargo otros trabajos no lograron establecer dicha asociación (Lindeman 2018). Cabe recordar que uno de nuestros casos presentaba una co-mutación con *KRAS*. Myall et al en 18 pacientes evaluados con NGS, detectó que la co-mutación de *BRAF* más frecuente era *p53* (Myall 2019) aunque como ya se mencionó, puede también coexistir con mutaciones en *KRAS* (Lindeman 2018).

En resumen, nuestros hallazgos confirman los datos previamente descritos en la literatura. Dado el potencial terapéutico de la detección de *BRAF*, se espera que en las próximas guías de trabajo del Colegio Americano de Patólogos el estudio mutacional de *BRAF* sea parte del panel primario de estudio molecular. Por su parte, las guías Españolas ya lo incluyen como parte del panel diagnóstico inicial (Garrido 2019).

3.6 *NRAS*

En el estudio de *NRAS* de nuestra serie no encontramos ningún caso con mutaciones. Esto probablemente se debe al tamaño de la muestra que resulta insuficiente para detectar una mutación con tan baja prevalencia, que representó el 0.7% en la serie de Ohashi con 4562 pacientes evaluados (Ohashi 2013).

4. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y VARIABLES CLÍNICAS

A pesar de que nuestro estudio no mostró tendencias de ningún tipo entre la expresión de PD-L1 y las características clínico-patológicas, otros trabajos han demostrado un aumento en la expresión de PD-L1 en pacientes hombres y fumadores (Lee 2019, Wu 2019). Adicionalmente, los meta-análisis de Li et al (2019) y de Zhang et al (2017) encontraron un aumento en la expresión de PD-L1 en tumores de gran tamaño, tumores pobremente diferenciados y en tumores con ganglios linfáticos metastásicos. Estas últimas dos variables también tuvieron asociación significativa en la cohorte española de Esteban et al (2020). Ninguno de estos estudios mostró relación con la edad.

5. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y LAS MUTACIONES “CONDUCTORAS” ANALIZADAS

En nuestro estudio se encontraron 17 casos (20%) con mutaciones y con cualquier tipo de expresión de PD-L1. El estudio de Song en 385 muestras identificó 163 casos con expresión de PD-L1 y alguna mutación (42%) (Song 2016). Cabe aclarar que este estudio se hizo sobre resecciones quirúrgicas con la connotación antes mencionada de heterogeneidad tumoral y en población asiática con aumento en la frecuencia de mutaciones en *EGFR*. Por lo general, los estudios que analizan la relación entre dicha expresión y las mutaciones conductoras hacen análisis de manera individualizada como se expone a continuación.

5.1 *EGFR* Y PD-L1

Diversos estudios han mostrado resultados contradictorios respecto a la expresión de PD-L1 y la presencia de mutaciones en *EGFR*, sin embargo, los análisis más recientes deducen que la presencia de la mutación disminuye la expresión de PD-L1 especialmente en umbrales altos. Esto podría explicarse por la aparente disminución de linfocitos T CD8+ y baja carga tumoral en estos tumores (Dong 2017, Dantoing 2021).

En nuestra serie se encontró que 4 de las 11 muestras con mutación de *EGFR*, tenían expresión de PD-L1 (36%) así como 37 de las 92 muestras wild type (WT) (40.2%). Llama la atención que de estos 37 casos, 15 correspondían a la categoría de mayor expresión.

Estos datos fueron similares al estudio de Lee et al (2019), un trabajo con 1000 pacientes con CPCNP, en los que detectaron 424 casos con mutaciones de *EGFR*. Al hacer un punto de corte de expresión de PD-L1 de 1% se observó que la expresión era significativamente mayor en los pacientes WT en comparación a los mutados (46% vs 29.2%).

Centrándonos específicamente en la categoría de expresión $\geq 50\%$, el estudio de Lee antes mencionado, mostró una positividad del 21.9% en los pacientes WT y tan solo un 8% en los mutados. Estos datos se correlacionan con los del estudio de Rangachari et al (2017) y con los de nuestra serie, en donde no se encontraron casos con mutaciones en *EGFR* que tuvieran niveles altos de expresión de PD-L1. Por el contrario, ambas series mostraron que de manera exclusiva esta categoría de expresión se restringía a casos WT. Por otro lado en el estudio de Garon et al (2015) no se encontró ningún tipo de asociación.

En nuestra serie llamó la atención que de los 4 pacientes con mutaciones en el exón 19, 3 de ellos (75%) presentaron expresión de PD-L1 mientras que de los 5 pacientes con mutaciones en el exón 21 en tan solo 1 hubo positividad (20%). Estos datos a mayor escala, fueron estudiados también por Lee et al en un análisis de 424 casos de adenocarcinomas, todos mutados en *EGFR*, en donde se encontró que de 182 casos con mutaciones en el exón 19, 63 (34.6%) eran positivos para PD-L1 mientras que de 202 casos con alteraciones en el exón 21, 49 (24%) tenían expresión; sin embargo no se encontró significancia estadística a estos datos ($p= 0.229$) (Lee 2019).

Respecto al beneficio de la inmunoterapia en estos pacientes, los escasos datos encontrados no son prometedores. Un estudio en fase 2 que evaluaba Pembrolizumab en pacientes *EGFR* positivos, fue discontinuado por falta de eficacia después que los primeros 11 pacientes fueron tratados (Lisberg 2018). El metaanálisis de Lee et al no mostró tampoco beneficios de la inmunoterapia sobre la quimioterapia en estos pacientes (Lee 2017); sin embargo, el grupo de Yamada et al presentó datos de mayor respuesta en mutaciones poco comunes de *EGFR* (Yamada 2019). Por su parte, la cohorte Immunotarget mostró que la tasa de respuesta objetiva al tratamiento fue de solo 12% (Mazieres 2019).

Aunque no era objetivo de nuestro trabajo, vale la pena resaltar, que diferentes estudios han indicado que los pacientes con mutaciones en *EGFR* sin expresión de PD-L1 tienen mayor supervivencia (Liu 2018). Esto podría explicarse si se tiene en cuenta que los pacientes con cáncer de pulmón y mutaciones oncogénicas como se mencionó previamente, presentan una menor carga mutacional tumoral (TMB) lo cual es un factor adicional que resulta en una menor activación de la vía PD-1/PDL1 (Li 2018).

5.2 ALK Y PD-L1

Estudios experimentales en líneas celulares han demostrado que la fusión *EML-ALK* con activación de función, aumenta la expresión de PD-L1 (Ota 2015, Hong 2016, Remon 2018). En nuestro estudio, 2 de los 3 pacientes con este reordenamiento presentaron una expresión de PD-L1 entre el 1-49% (5% y 22%). Estos datos son similares al estudio de Liu et al, que observó en los casos con fusión *EML-ALK* una mayor frecuencia de expresión de PD-L1 en dicha categoría (Liu 2020). Diversos trabajos han mostrado esta misma tendencia, con positivities que varían del 30% al 78% pero es raro que excedan el 50% (Bylicki 2017). La cohorte ImmunoTarget a pesar de que observó aumento en la expresión de PD-L1 en tumores *ALK* positivos vió que la mayoría de casos eran refractarios al tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitarios (Mazieres 2019). Este mismo hallazgo se observó en la serie de casos descrita por Jahanzeb et al (2021). Tampoco se ha demostrado beneficio al combinar los ICIs con diferentes inhibidores de tirosina quinasa, sin embargo continúan algunos estudios para intentar encontrar combinaciones que sean efectivas y seguras (Remon 2018).

Por otra parte, el meta-análisis desarrollado por Zhang et al (2017) no evidenció asociaciones significativas.

Otros estudios llaman la atención sobre la expresión variable en el tiempo de PD-L1 antes y después de tratamientos con inhibidores de *ALK* (Bylicki 2017). Gainor et al realizaron un trabajo, observando que en pacientes sin expresión de PD-L1 o con expresión muy baja, hasta un 23% podían volverse positivos o aumentar la expresión. De manera inversa, de 11 pacientes con expresión mayor al 5%, después de tratamientos con inhibidores de tirosina quinasa, 4 se negativizaron (Gainor 2016, Bylicki 2017).

Dado que nuestro estudio fue de tipo retrospectivo y puntual en el tiempo, no fue posible valorar este tipo de cambios.

5.3 *ROS-1* Y PD-L1

Hay muy poca información al respecto de esta asociación, sin embargo, llama la atención que a pesar de tener una alta homología estructural con *ALK*, se han reportado muy raramente casos con expresión alta de PD-L1 (Rangachari 2017).

El único caso con el reordenamiento de *ROS-1* en nuestra serie, presentó una expresión de PD-L1 del 2%. El estudio de Rangachari et al con 71 pacientes, mostró 2 casos de reordenamiento de *ROS-1* que también presentaban un nivel de expresión de PD-L1 inferior al 50%. El estudio con líneas celulares desarrollado por Liu et al (2020), corroboró esta asociación al ver un aumento significativo de la expresión de PD-L1 en células epiteliales bronquiales con fusión de *ROS-1* y su clara disminución en modelos vivos con ratones tratados con crizotinib. Estos datos sugieren el bloqueo de PD-L1/PD-1 como alternativa terapéutica para pacientes que hayan desarrollado resistencia a inhibidores de tirosina quinasa y que tengan dicho reordenamiento (Liu 2020).

5.4 *KRAS* Y PD-L1

Nuestro estudio de PD-L1 en los casos con mutaciones de *KRAS* evidenció una positividad de cualquier intensidad en el 43% (10 de 23 casos). Estos datos son muy similares a los del meta-análisis de Li et al (2017) que analizó 16 estudios con 528 pacientes con mutaciones en *KRAS* identificando 215 casos con expresión de PD-L1 (44.6%) y una asociación estadísticamente significativa ($p=0.03$); dichos

hallazgos son acordes con los datos del estudio de Chen et al (2017) en donde se indicó que los pacientes con mutaciones en *KRAS* inducen la expresión de PD-L1 a través de la vía ERK y por apoptosis de linfocitos T CD3+.

Por su parte en la cohorte del estudio ImmunoTarget, se vió que los pacientes *KRAS* positivos presentaban mejores tiempos de supervivencia libre de progresión estando esto asociado con los niveles de PD-L1 (Mazieres 2019). Hallazgos similares han sido descritos por Kim et al y por Torralvo et al. Habría que tener en cuenta sin embargo, que la presencia de mutaciones concomitantes en *p53* y *STK11* podrían influenciar el microambiente tumoral y por ello, afectar la respuesta inmune anti-tumoral (Rothschild 20193, Ferrer 2018). Otros estudios asocian este efecto de *KRAS* a una mayor carga tumoral que potencialmente aumentaría la sensibilidad a los inhibidores de los puntos de control inmune (Friedlander 2020, Liu 2020).

Dado el beneficio de la inmunoterapia, la cuestión ahora es establecer una secuencia para el tratamiento dada la aprobación de los nuevos inhibidores de *KRAS G12C*. Hay que tener en cuenta también para efectos de eficacia, si existe o no asociada la mutación *STK11/LKB1* puesto que como se mencionó previamente, su presencia afecta el microambiente tumoral y estos pacientes han mostrado menores tiempos de supervivencia libres de progresión e incluso peor supervivencia global lo cual sugiere su rol como generadora de resistencia a los ICIs (Remon 2018).

5.5 *BRAF* Y PD-L1

El estudio de *BRAF* en los pacientes de nuestra serie evidenció solo 2 casos mutados los cuales fueron negativos para PD-L1. Un

estudio reciente de Dudnik et al analizó 39 pacientes *BRAF* positivos, de los cuales el 18% presentaron positividad intermedia (1%-49%) y 33% alta (>50%) para PD-L1, encontrando una asociación significativa en este último grupo (Dudnik 2018). Por su parte, la cohorte ImmunoTarget, analizó 10 casos *BRAF* positivo, de los cuales 7 presentaron expresión de PD-L1 y mostraban una mejoría en la supervivencia en comparación con la presencia de otras mutaciones como *EGFR*. Estos datos en consonancia con las experiencias previas en melanoma han permitido sugerir como estrategia terapéutica a la inmunoterapia después de haber realizado terapia dirigida y una línea de quimioterapia (Mazieres 2019). Dada la aprobación de inhibidores anti-*BRAF* y anti-*MEK* queda por definir el beneficio de añadir ICIs al tratamiento dada la toxicidad reportada en los primeros (Dantoing 2021).

5.6 *NRAS* Y PD-L1

Nuestro estudio no detectó mutaciones en *NRAS*. En el estudio de Song et al con 385 pacientes se observó tan solo un paciente (0.25%) con mutación de *NRAS* que fue negativo para PD-L1 (Song 2016). Estudios en melanomas en donde se han demostrado mayores tasas de positividad para *NRAS*, han sugerido una posible respuesta a inmunoterapia basándose en la posible expresión constitutiva de PD-L1 “in vivo” asociada a una mayor carga mutacional tumoral, de manera similar a lo referenciado previamente con *KRAS* (Johnson 2015, Wang 2020).

6. EXPRESIÓN DE PD-L1 Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Los datos respecto al rol predictivo de PD-L1 y la supervivencia tienden a ser poco consistentes, con estudios que lo asocian a un mejor

desenlace como el de Velcheti et al, versus otros investigadores como Mu y Chen que afirman lo contrario. Por su parte, Yang, en su estudio de 2014 no encontró correlación alguna con la supervivencia global pero sí con la supervivencia libre de recaída (Mu 2010, Chen 2012, Velcheti 2014, Yang 2014). Estos datos contradictorios podrían explicarse por el uso de diferentes clones ó incluso de puntos de corte en el momento de evaluar los casos además de la propia heterogeneidad y expresión dinámica de este marcador (Zhou 2017).

Los meta-análisis más completos, realizados por Zhang (2017) y Li (2019) con más de 40 trabajos analizados y 11000 pacientes, determinaron una correlación entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia. Se observó que la sobreexpresión de PD-L1 mostraba menor supervivencia, con un 45% de aumento del riesgo para la mortalidad. Estos datos son similares a los encontrados en nuestro estudio en donde observamos que los pacientes con un TPS>50% presentaban una mediana de supervivencia significativamente menor en comparación con los pacientes sin expresión de PD-L1. Dado que se han observado asociaciones entre la expresión de PD-L1 y peor grado histológico, gran tamaño tumoral y ganglios metastásicos, es posible deducir que la expresión de PD-L1 podría promover invasión y metástasis, llevando a un peor pronóstico en estos pacientes (Zhang 2017).

Otra posible explicación radica en la naturaleza intrínseca de la función de PD-L1. Konishi y colaboradores encontraron que la expresión de PD-L1 conlleva a una respuesta inmune antitumoral negativa, al permitir a las células tumorales evadir la respuesta inmune del huésped vía apoptosis de las células T, inhibición de la proliferación de linfocitos y de la secreción de sus citoquinas. Además, se ha visto disminución de la presencia de linfocitos intratumorales en regiones PD-L1 positivas en comparación a las

negativas lo que implicaría entonces un efecto negativo de la respuesta inmune antitumoral en los pacientes (Konishi 2004, Wang 2015).

Esta tesis ha demostrado datos de frecuencia tanto en las mutaciones conductoras como en la expresión de PD-L1 en la población gallega acordes a la literatura, pero no se identificaron tendencias significativas entre ellas. Si se demostró una correlación entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia. Las limitaciones en este estudio incluyen el tamaño de la muestra y la obtención de la información en modo retrospectivo que no permitió valorar datos significativos como el posible efecto de la inmunoterapia en estos pacientes a nivel de supervivencia o su posible relación en casos concomitantes con otras mutaciones conductoras.

VI.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El perfil clínico de pacientes con CPCNP en Galicia corresponde principalmente a hombres con una mediana de edad de 62 años, fumadores y con adenocarcinomas, coincidente con lo descrito en la literatura.
2. En los casos con análisis molecular completo, se detectó una mutación conductora en casi la mitad de los casos (47%). Las frecuencias obtenidas de dichas mutaciones analizadas en orden decreciente fueron: *KRAS* (28.75%), *EGFR* (10.67%), *ALK* (2.9%), *BRAF* (2.5%), *ROS1* (1%) y *NRAS* (0%); estos datos se ajustan a lo descrito tanto en la literatura general como en la española.
3. En cuanto al estudio de PD-L1, en nuestra serie se observó un mayor porcentaje de casos con expresión inferior al 1% en relación a lo descrito, atribuible probablemente al predominio de biopsias endoscópicas sobre piezas quirúrgicas y/o antigüedad de las muestras.
4. No se encontraron tendencias significativas en la correlación entre las características clínico-patológicas y la expresión de PD-L1.
5. Se evidenció una leve tendencia a presentar expresión de PD-L1 en casos con fusión de *ALK* ó de *EGFR* wild-type, estos últimos particularmente en la categoría $\geq 50\%$. Estos datos son importantes de cara al tratamiento puesto que los escasos estudios a la fecha han mostrado que pacientes con mutaciones en *EGFR* o

fusión en *ALK* y expresión de PD-L1 son refractarios a manejo con ICIs y por tanto no hay beneficio en el uso de los mismos.

6. En nuestro estudio, se observó una alta frecuencia de mutaciones en *KRAS* (28.75%) con una significativa expresión de PD-L1 en este grupo (43%); por tanto es importante la realización de ambas determinaciones dado que diversos trabajos han mostrado una supervivencia libre de progresión mayor al estar presentes las dos variables.
7. La expresión de PD-L1 \geq 50% se correlacionó con menor mediana de supervivencia global de manera similar a los meta-análisis más completos, aunque la definición de su rol como factor predictor es aún controvertido dada su heterogeneidad, expresión dinámica y la propia complejidad molecular del CPCNP.

VII

Referencias

REFERENCIAS

- Abravanel DL, Nishino M, Sholl LM, Ambrogio C, Awad MM. An Acquired NRAS Q61K Mutation in BRAF V600E-Mutant Lung Adenocarcinoma Resistant to Dabrafenib Plus Trametinib. *J Thorac Oncol*. 2018 Aug 1;13(8):e131–3.
- Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. Vol. 41, *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2019. p. 711–6.
- Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009 Aug 20;114(8):1537–44.
- Aldarouish M, Wang C. Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35(1):1–13.
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A V., et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 14;500(7463):415–21.
- Arbour KC, Jordan E, Kim HR, Dienstag J, Yu HA, Sanchez-Vega F, et al. Effects of co-occurring genomic alterations on outcomes in patients with KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan 15;24(2):334–40.

- Arbour KC, Jordan E, Kim HR, Dienstag J, Yu HA, Sanchez-Vega F, et al. Effects of co-occurring genomic alterations on outcomes in patients with KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(2):334–40.
- 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 Mar 1;17(5):1169–80.
- Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012 Sep 15;18(18):4910–8.
- Ascierto PA, Brugarolas J, Buonaguro L, Butterfield LH, Carbone D, Daniele B, et al. Perspectives in immunotherapy: Meeting report from the Immunotherapy Bridge (29-30 November, 2017, Naples, Italy). *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):1–14.
- Auliac JB, Bayle S, Vergnenegre A, Le Caer H, Falchero L, Gervais R, Doubre H, Vinas F, Marin B, Chouaid C. Patients with non-small-cell lung cancer harbouring a BRAF mutation: a multicentre study exploring clinical characteristics, management, and outcomes in a real-life setting: EXPLORE GFPC 02-14. *Curr Oncol.* 2018 Oct;25(5):e398-e402
- Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014 Oct 1;25(10):1935–40.
- Baik CS, Myall NJ, Wakelee HA. Targeting BRAF -Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Profiling to

- Rationally Designed Therapy . *Oncologist*. 2017 Jul;22(7):786–96.
- Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 15;21(4):687-92
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):863–70.
- Berghoff AS, Bellosillo B, Caux C, et al. Immune checkpoint inhibitor treatment in patients with oncogene- addicted non-small cell lung cancer (NSCLC): summary of a multidisciplinary round-table discussion. *ESMO Open*. 2019;4(3):e000498.
- Berland L, Heeke S, Humbert O, Macocco A, Long-Mira E, Lassalle S, et al. Current views on tumor mutational burden in patients with nonsmall cell lung cancer treated by immune checkpoint inhibitors. *J Thorac Dis*. 2019;11(Suppl 1):S71–80.
- Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8368–77.
- Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1767–78.
- Bylicki O, Paleiron N, Margery J, Guisier F, Vergnenegre A, Robinet G, et al. Targeting the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint in EGFR-Mutated or ALK-Translocated Non-Small-Cell Lung Cancer. *Target Oncol*. 2017;12(5):563–9.
- Burns TF, Borghaei H, Ramalingam SS, Mok TS, Peters S. Targeting KRAS-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: One

Mutation at a Time, With a Focus on KRAS G12C Mutations. *J Clin Oncol*. 2020;38(35):4208-4218.

Cagle PT, Allen TC, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Borczuk AC, et al. *Molecular Pathology of Lung Cancer*. Springer International Publishing; 2018. 216 p.

Camidge DR, Pao W, Sequist L V. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Aug 1;11(8):473–81.

Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575(7781):217–23.

Carbone DP, Gandara DR, Antonia SJ, Zielinski C, Paz-Ares L. Non-small-cell lung cancer: Role of the immune system and potential for immunotherapy. *J Thorac Oncol*. 2015;10(7):974–84.

Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*. 2016 Mar 1;27(3):409–16.

Chen N, Fang W, Lin Z, Peng P, Wang J, Zhan J, et al. KRAS mutation-induced upregulation of PD-L1 mediates immune escape in human lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;3:1175–87.

Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori*. 2012 Nov;98(6):751-5

Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, et al. *Molecular pathology of lung cancer: Key to personalized medicine*. *Mod Pathol*. 2012;25(3):347–69.

- Chia PL, Dobrovic A, Dobrovic A, John T. Prevalence and natural history of ALK positive non-small-cell lung cancer and the clinical impact of targeted therapy with ALK inhibitors. *Clin Epidemiol.* 2014;6:423–32.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(1):11–23.
- Chin LP, Soo RA, Soong R, Ou S-HI. Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012 Nov;7(11):1625–30.
- Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S, Stewart KN, Devereux GS, Nicolson MC, Kerr KM. Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010 Apr;5(4):448-52
- Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014 Jul 9;511(7511):543–50.
- Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Selinger CI, Kohonen-Corish M, Yip P, Yu B, O'Toole SA, McCaughan BC, Yearley JH, Horvath LG, Kao S, Boyer M, Scolyer RA. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer.* 2015 Aug;89(2):181-8.
- Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Giménez-Capitán A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-Mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin Cancer Res.* 2014 Apr 1;20(7):2001–10.

Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.* 2010 Apr 15;17(4):616–23.

da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):49–69.

Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(17):4570–9.

Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-PD1/PD-L1 Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Actionable Oncogenic Driver Mutations. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 11;22(12):6288.

Delmonte A, Burgio MA, Verlicchi A, Bronte G, Cravero P, Ulivi P, et al. New generation anaplastic lymphoma kinase inhibitors. Vol. 8, *Translational Lung Cancer Research.* AME Publishing Company; 2019. p. S280–9.

Dietel M, Savelov N, Salanova R, Micke P, Bigras G, Hida T, et al. 1300 Real-world prevalence of PD-L1 expression in locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): The global, multicentre EXPRESS study. *J Thorac Oncol.* 2018 Apr 1;13(4):S74–5.

Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: Higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6169–77.

Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: A phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer.* 2014;110(1):55–62.

- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999 Dec 1;5(12):1365–9.
- Dong ZY, Zhang JT, Liu SY, et al. EGFR mutation correlates with uninflamed phenotype and weak immunogenicity, causing impaired response to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2017 Jul 26;6(11):e1356145
- Drilon A, Wang L, Arcila ME, Balasubramanian S, Greenbowe JR, Ross JS, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res.* 2015 Aug 15;21(16):3631–9.
- Drilon A, Rekhtman N, Arcila M, Wang L, Ni A, Albano M, et al. Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2016 Dec 1;17(12):1653–60.
- Du X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer.* 2018 Apr 1;9(4):423–30.
- Dubey AK, Gupta U, Jain S. Epidemiology of lung cancer and approaches for its prediction: a systematic review and analysis. *Chin J Cancer.* 2016;35(1):71.
- Dudnik E, Peled N, Nechushtan H, Wollner M, Onn A, Agbarya A, et al. BRAF Mutant Lung Cancer: Programmed Death Ligand 1 Expression, Tumor Mutational Burden, Microsatellite Instability Status, and Response to Immune Check-Point Inhibitors. *J Thorac Oncol.* 2018;13(8):1128–37.

El Osta B, Behera M, Kim S, Berry LD, Sica G, Pillai RN, et al. Characteristics and Outcomes of Patients With Metastatic KRAS-Mutant Lung Adenocarcinomas: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol*. 2019;14(5):876–89.

Esteban E, Majem M, Martínez Aguillo M, Martínez Banaclocha N, Dómine M, Gómez Aldaravi L, et al. Prevalence of EGFR mutations in newly diagnosed locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer Spanish patients and its association with histological subtypes and clinical features: The Spanish REASON study. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(3):291–7.

Esteban-Rodríguez I, Ruiz Bravo-Burguillos E, Rosas R, Losantos I, Rodríguez-Antolín C, de Castro J. Protein expression of PD-L1 and clinico-pathological data in a cohort of 53 patients with resectable non small cell lung cancer (NSCLC). Concordance between clones (22C3 and 28-8) and observers. Correlation and prognostic value of clinico-pathological dat. *Rev Esp Patol*. 2020 Jan 1;53(1):10–8.

Ettinger, D. S., Wood, D. E., Aggarwal, C., et al (2021) NCCN Guidelines Insights: Non–Small Cell Lung Cancer, Version 1.2022.

Fabrizio FP, Trombetta D, Rossi A, et al. Gene code CD274/PD-L1: from molecular basis toward cancer immunotherapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2018 Dec 17;10:1758835918815598.

Falk AT, Yazbeck N, Guibert N, Chamorey E, Paquet A, Ribeyre L, et al. Effect of mutant variants of the KRAS gene on PD-L1 expression and on the immune microenvironment and association with clinical outcome in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer Amst Neth*. 2018;121:70–5

- Farago AF, Taylor MS, Doebele RC, Zhu VW, Kummar S, Spira AI, et al. Clinicopathologic Features of Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring an NTRK Gene Fusion. *JCO Precis Oncol.* 2018;(2):1–12.
- Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer.* 2018;124(January):53–64.
- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009 Dec 21;206(13):3015–29.
- Friedlaender A, Drilon A, Weiss GJ, Banna GL, Addeo A. KRAS as a druggable target in NSCLC: Rising like a phoenix after decades of development failures. Vol. 85, *Cancer Treatment Reviews.* W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 101978.
- Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2016 Oct 1;6(10):1118–33.
- Gainor JF, Shaw AT, Sequist L V., Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR mutations and ALK rearrangements are associated with low response rates to PD-1 pathway blockade in non-small cell lung cancer: A retrospective analysis. *Clin Cancer Res.* 2016 Sep 15;22(18):4585–93.
- Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol.* 2006 May;79(5):896–903.

- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Paul Eder J, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Abstracts of the American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2015;21:2018–46.
- Garrido P, Conde E, de Castro J, Gómez-Román JJ, Felip E, Pijuan L, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2019 Oct 9;
- Gautschi O, Milia J, Cabarro B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, et al. Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF cohort. In: *Journal of Thoracic Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 1451–7.
- Golding B, Luu A, Jones R, Vitoria-Petit AM. The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC). Vol. 17, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2018. p. 52.
- Goss GD, Felip E, Cobo M, Lu S, Syrigos K, Lee KH, et al. Association of ERBB mutations with clinical outcomes of afatinib-or erlotinib-Treated patients with lung squamous cell carcinoma: Secondary analysis of the LUX-lung 8 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2018 Sep 1;4(9):1189–97.
- Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD. Tumor neoantigens: Building a framework for personalized cancer immunotherapy. Vol. 125, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2015. p. 3413–21.
- Guibert N, Barlesi F, Descourt R, Léna H, Besse B, Beau-Faller M, et al. Characteristics and Outcomes of Patients with Lung Cancer Harboring Multiple Molecular Alterations: Results from the

- IFCT Study Biomarkers France. *J Thorac Oncol.* 2017 Jun 1;12(6):963–73.
- Guo Y, Cao R, Zhang X, Huang L, Sun L, Zhao J, et al. Recent progress in rare oncogenic drivers and targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:10343–60.
- Haabeth OAW, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lorvik KB, Hofgaard PO, et al. How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol.* 2014;5:174.
- Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012 Sep 9;489(7417):519–25.
- Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 May 1;4(5):373–84.
- Heeke S, Hofman P. Tumor mutational burden assessment as a predictive biomarker for immunotherapy in lung cancer patients: Getting ready for prime-time or not? *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(6):631–8.
- Heist RS, Sequist L V, Engelman JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol.* 2012 May;7(5):924–33.
- Hendriks LE, Rouleau E, Besse B. Clinical utility of tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated with immunotherapy. *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(6):647–60.
- Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* 2018;553(7689):446–54.

Herbst RS, Heymach J V, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 25;359(13):1367–80.

Heydt C, Michels S, Thress KS, Bergner S, Wolf J, Buettner R. Novel approaches against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance. Vol. 9, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2018. p. 15418–34.

Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1757–66.

Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol*. 2017 Feb 1;12(2):208–22.

Hong S, Chen N, Fang W, Zhan J, Liu Q, Kang S, et al. Upregulation of PD-L1 by EML4-ALK fusion protein mediates the immune escape in ALK positive NSCLC: Implication for optional anti-PD-1/PD-L1 immune therapy for ALK-TKIs sensitive and resistant NSCLC patients. *Oncoimmunology*. 2016 Mar 3;5(3):e1094598.

Horn L, Pao W. EML4-ALK: Honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. Vol. 27, *Journal of Clinical Oncology*. NIH Public Access; 2009. p. 4232–6.

Hsu M-C, Hsiao J-R, Chang K-C, Wu Y-H, Su I-J, Jin Y-T, et al. Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol*. 2010 Oct 23;23(10):1393–403.

- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoeediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Apr;13(2):95–109.
- 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 May;468(5):511-25.
- Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhleb L et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol.* 2016 Jan;27(1):147-53.
- Jahanzeb M, Lin HM, Pan X, et al. Immunotherapy Treatment Patterns and Outcomes Among ALK-Positive Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2021;22(1):49–57.
- Jiang L, Su X, Zhang T, Yin X, Zhang M, Fu H, et al. PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget.* 2017;8(16):26845–57.
- Johnson DB, Lovly CM, Flavin M, Panageas KS, Ayers GD, Zhao Z, et al. Impact of NRAS Mutations for Patients with Advanced Melanoma Treated with Immune Therapies. 2015;
- Ju L, Han M, Su J, Wu C, Dong Z. A lung squamous carcinoma patient with ROS1 rearrangement sensitive to crizotinib. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;82(3):561–4.
- Karachaliou N, Cao MG, Teixidó C, Viteri S, Morales-Espinosa D, Santarpia M, et al. Understanding the function and dysfunction

of the immune system in lung cancer: the role of immune checkpoints. *Cancer Biol Med.* 2015;12(2):79–86.

Khunger A, Khunger M, Velcheti V. Dabrafenib in combination with trametinib in the treatment of patients with BRAF V600-positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer: clinical evidence and experience. *Ther Adv Respir Dis.* 2018 Jan-Dec;12:1-9

Kim H-J, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res.* 2014 Feb 1;2(2):91–8.

Kim JH, Kim HS, Kim BJ. Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: A metaanalysis and review. *Oncotarget.* 2017 May 3;8(29):48248–52.

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005 Feb 24;352(8):786–92.

Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of Met in lung cancer. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):283–9.

Kunimasa K, Goto T. Immunosurveillance and immunoediting of lung cancer: Current perspectives and challenges. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2).

Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. Pd-L1. *J Clin Pathol.* 2018;71(3):189–94.

Lai WC, Feldman D, Buonocore DJ, Brzostowski EB, Rizvi H, et al. PD-L1 expression, tumor mutation burden and response to

- immune checkpoint blockade in patients with HER2-mutant lung cancers. *J Clin Oncol* 2018;36. Suppl ABSTR 9060.
- Lawrence B, Perez-Atayde A, Hibbard MK, Rubin BP, Dal Cin P, Pinkus JL, et al. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2000 Aug;157(2):377–84.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
- Lee SE, Kim YJ, Sung M, Lee MS, Han J, Kim HK, et al. Association with PD-L1 expression and clinicopathological features in 1000 lung cancers: A large single-institution study of surgically resected lung cancers with a high prevalence of EGFR mutation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):1–20.
- Lee S, Brophy VH, Cao J, Velez M, Hoepfner C, Soviero S, et al. Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* 2012 Feb 16;460(2):141–9.
- Lee CK, Man J, Lord S, Links M, GebSKI V, Mok T, Yang JC. Checkpoint Inhibitors in Metastatic EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer-A Meta-Analysis. *J Thorac Oncol.* 2017 Feb;12(2):403-407
- Lesokhin AM, Hohl TM, Kitano S, Cortez C, Hirschhorn-Cymerman D, Avogadri F, et al. Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012 Feb 15;72(4):876–86.

- Li H, Xu Y, Wan B, Song Y, Zhan P, Hu Y, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11,383 patients. *Transl Lung Cancer Res.* 2019;8(4):429–49.
- Li X, Lian Z, Wang S, Xing L, Yu J. Interactions between EGFR and PD-1/PD-L1 pathway: Implications for treatment of NSCLC. *Cancer Lett.* 2018;418:1–9.
- Li Y, Li F, Jiang F, Lv X, Zhang R, Lu A, et al. A mini-review for cancer immunotherapy: Molecular understanding of PD-1/ PD-L1 pathway & translational blockade of immune checkpoints. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1–22.
- Lin JJ, Shaw AT. Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017 Nov;12(11):1611-1625.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the . *J Thorac Oncol.* 2018;13(3):e33–4.
- Lisberg, A, Cummings A, Goldman JW et al. A Phase II Study of Pembrolizumab in EGFRMutant,PD-L1+, Tyrosine Kinase Inhibitor Naive Patients With Advanced NSCLC. *Lung Cancer* 2018, 13, 1138–1145.
- Liu C, Zheng S, Jin R, Wang X, Wang F, Zang R, et al. The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity. *Cancer Lett.* 2020;470(August 2019):95–105.

- Liu J, Liu Y. Molecular diagnostic characteristics based on the next generationsequencing in lung cancer and its relationship with the expression of PD-L1. *Pathol Res Pract.* 2020;216(2):152797.
- Liu S yang, Dong Z yi, Wu S pei, Xie Z, Yan L xu, Li YF, et al. Clinical relevance of PD-L1 expression and CD8+ T cells infiltration in patients with EGFR-mutated and ALK-rearranged lung cancer. *Lung Cancer.* 2018;125(April):86–92.
- Liu Y, Zeng G. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J Immunother.* 2012 May;35(4):299–308.
- Liu Z, Zhao K, Wei S, Liu C, Zhou J, Gou Q, et al. ROS1-fusion protein induces PD-L1 expression via MEK-ERK activation in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology.* 2020;9(1).
- López-Ríos F, Paz-Ares L, Sanz J, Isla D, Pijuan L, Felip E, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: A National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. Vol. 53, *Revista Espanola de Patologia.* Ediciones Doyma, S.L.; 2020. p. 167–81.
- Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol.* 2019;21(1):3–17.
- Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jun 18;89(12):857–62.
- Matsushime H, Wang LH, Shibuya M. Human c-ros-1 gene homologous to the v-ros sequence of UR2 sarcoma virus encodes for a transmembrane receptorlike molecule. *Mol Cell Biol.* 1986 Aug;6(8):3000-4.

- Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. 2012 Feb 8;482(7385):400–4.
- Mazieres J, Drilon A, Lusque A, Mhanna L, Cortot AB, Mezquita L, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: Results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1321–8.
- McCusker MG, Russo A, Scilla KA, Mehra R, Rolfo C. How I treat ALK-positive non-small cell lung cancer. *ESMO Open*. 2019 Jul 20;4(Suppl 2):e000524
- Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-Small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: A systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*. 2015;5(9):2892–911.
- Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):947–57.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin’s lymphoma. *Science* (80-). 1994 Mar 4;263(5151):1281–4.
- Mu C-Y, Huang J-A, Chen Y, Chen C, Zhang X-G. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011 Sep 6;28(3):682–8.
- Mulligan LM. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat Rev Cancer*. 2014 Mar 24;14(3):173–86.

- Myall NJ, Henry S, Wood D, Neal JW, Han SS, Padda SK, et al. Natural Disease History, Outcomes, and Co-mutations in a Series of Patients With BRAF-Mutated Non-small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2019 Mar 1;20(2):e208–17.
- Nguyen-Ngoc T, Bouchaab H, Adjei AA, Peters S. BRAF Alterations as Therapeutic Targets in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015 Oct;10(10):1396-403.
- 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 Sep 1;21(17):3924–33.
- Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, et al. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: Tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Jun 24;94(13):6764–9.
- Ninomiya K, Ohashi K, Makimoto G, Tomida S, Higo H, Kayatani H, et al. MET or NRAS amplification is an acquired resistance mechanism to the third-generation EGFR inhibitor naquotinib. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
- Noeparast A, Teugels E, Giron P, Verschelden G, De Brakeleer S, Decoster L, et al. Non-V600 BRAF mutations recurrently found in lung cancer predict sensitivity to the combination of Trametinib and Dabrafenib. *Oncotarget*. 2017 Sep 1;8(36):60094–108.
- Ohashi K, Sequist L V, Arcila ME, Lovly CM, Chen X, Rudin CM, et al. Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res*. 2013 May 1;19(9):2584–91.

Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol*. 2007 Jul 22;19(7):813–24.

Ota K, Azuma K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Tanizaki J, et al. Induction of PD-L1 Expression by the EML4 – ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non – Small Cell Lung Cancer. 2015;21(17):23–7.

Paik PK, Drilon A, Fan P-D, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015 Aug 1;5(8):842–9.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252–64.

Patil T, Simons E, Mushtaq R, Pacheco JM, Doebele RC, Bowles DW. Targeted therapies for ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Drugs of Today*. 2019 Oct;55(10):641–52.

Patsoukis N, Li L, Sari D, Petkova V, Boussiotis VA. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol Cell Biol*. 2013 Aug 15;33(16):3091–8.

Paz-Ares L, Tan E-H, O’Byrne K, Zhang L, Hirsh V, Boyer M, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol*. 2017 Feb 1;28(2):270–7.

Penzel R, Sers C, Chen Y, Lehmann-Mühlenhoff U, Merkelbach-Bruse S, Jung A, et al. EGFR mutation detection in NSCLC—assessment of diagnostic application and recommendations of the German Panel for Mutation Testing in NSCLC. *Virchows Arch*. 2011 Jan 6;458(1):95–8.

- Politi K, Herbst RS. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res.* 2015;21(10):2213–20.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011 Oct 13;11(11):761–74.
- Ramadas K, Sauvaget C, Thomas G, Fayette J-M, Thara S, Sankaranarayanan R. Effect of tobacco chewing, tobacco smoking and alcohol on all-cause and cancer mortality: a cohort study from Trivandrum, India. *Cancer Epidemiol.* 2010 Aug;34(4):405–12.
- Ramnath N, Tan D, Li Q, Hylander BL, Bogner P, Ryes L, et al. Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Aug 27;55(8):891–9.
- Rangachari D, VanderLaan PA, Shea M, Le X, Huberman MS, Kobayashi SS, et al. Correlation between Classic Driver Oncogene Mutations in EGFR, ALK, or ROS1 and 22C3–PD-L1 $\geq 50\%$ Expression in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2017;12(5):878–83.
- Reck M, Rabe KF. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(9):849–61.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016 Nov 10;375(19):1823–33.
- Reinersman JM, Johnson ML, Riely GJ, Chitale DA, Nicastri AD, Soff GA, et al. Frequency of EGFR and KRAS mutations in

- lung adenocarcinomas in African Americans. *J Thorac Oncol.* 2011 Jan;6(1):28–31.
- Remon J, Hendriks LE, Cabrera C, Reguart N, Besse B. Immunotherapy for oncogenic-driven advanced non-small cell lung cancers: Is the time ripe for a change? *Cancer Treat Rev.* 2018 Dec;71:47-58.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 22;12(4):269–81.
- Ricciuti B, Brambilla M, Metro G, Baglivo S, Matocci R, Pirro M, et al. Targeting NTRK fusion in non-small cell lung cancer: rationale and clinical evidence. *Med Oncol.* 2017;34(6):1–8.
- Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Sep 15;14(18):5731–4.
- Rosell R, Molina MA, Costa C, Simonetti S, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, et al. Pretreatment EGFR T790M Mutation and BRCA1 mRNA Expression in Erlotinib-Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with EGFR Mutations. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 1;17(5):1160–8.
- Rosell R, Moran T, Queralt C, Cardenal F, Camps C, Majem M, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:958–67.
- Rothschild SI. KRAS and Immune Checkpoint Inhibitors—Serendipity Raising Expectations. *J Thorac Oncol.* 2019;14(6):951–4.

- Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):12–26.
- Ruiz-Bañobre J, Areses-Manrique MC, Mosquera-Martínez J, Cortegoso A, Afonso-Afonso FJ, De Dios-Álvarez N, et al. Evaluation of the lung immune prognostic index in advanced nonsmall cell lung cancer patients under nivolumab monotherapy. *Transl Lung Cancer Res.* 2019 Dec 1;8(6):1078–85.
- Saxena A, Nagasaka M, Li Z, Becker DJ, Levy BP. Double trouble: A case of concurrent De Novo T790M and L858R EGFR mutations in treatment-naive advanced non-small-cell lung cancer. *Oncology.* 2014;28(6):4.
- Scheffler M, Ihle MA, Hein R, Merkelbach-Bruse S, Scheel AH, Siemanowski J, et al. K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occurring Mutations in Other Oncogenic Pathways. *J Thorac Oncol.* 2019 Apr 1;14(4):606–16.
- Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):69-74.
- Shah R, Lester JF. Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Clash of the Generations. *Clin Lung Cancer.* 2020;1–13.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):56-61.
- Sharma S V., Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Mar;7(3):169–81.

- Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1 -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 19;371(21):1963–71.
- Shaw AT, Felip E, Bauer TM, Besse B, Navarro A, Postel-Vinay S, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Dec;18(12):1590–9.
- Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2385–94.
- Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2005 Mar 1;65(5):1642–6.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*. 1998 Oct;10(5):581–7.
- Sierra JR, Tsao M-S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. de Bono JS, editor. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Nov 1;3(1_suppl):S21–35.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561–6.
- Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2167–77.

- Song Z, Liu F, Zhang J. Targeting NRASQ61K mutant delays tumor growth and angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(4):831–44.
- Song Z, Yu X, Cheng G, Zhang Y. Programmed death-ligand 1 expression associated with molecular characteristics in surgically resected lung adenocarcinoma. *J Transl Med.* 2016;14(1):1–7.
- Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 2004 Sep 30;431(7008):525–6.
- Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med.* 2009 Aug 1;266(2):154–81.
- Suzuki A, Itami S, Ohishi M, Hamada K, Inoue T, Komazawa N, et al. Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res.* 2003 Feb 1;63(3):674–81.
- Suzuki M, Shiraishi K, Yoshida A, Shimada Y, Suzuki K, Asamura H, et al. HER2 gene mutations in non-small cell lung carcinomas: concurrence with Her2 gene amplification and Her2 protein expression and phosphorylation. *Lung Cancer.* 2015 Jan 1;87(1):14–22.
- Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012 Feb 12;18(3):378–81.
- Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. HER2 amplification: A potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR -mutant lung

- cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov.* 2012 Oct;2(10):922–33.
- Tanaka K, Nosaki K, Otsubo K, Azuma K, Sakata S, Ouchi H, et al. Acquisition of the T790M resistance mutation during afatinib treatment in EGFR tyrosine kinase inhibitor-naïve patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Oncotarget.* 2017 Sep 15;8(40):68123–30.
- Tang Y, Che N, Yu Y, Gao Y, Shi H, Feng Q, et al. Co-occurring genetic alterations and primary EGFR T790M mutations detected by NGS in pre-TKI-treated NSCLCs. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020;146(2):407–16.
- Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 1;20(19):5064–74.
- Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.* 2011 Oct 1;74(1):139–44.
- Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(5):275–87.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
- Torralvo J, Friedlaender A, Achard V, Addeo A. The activity of immune checkpoint inhibition in kras mutated non-small cell

lung cancer: A single centre experience. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2019 Nov 1;16(6):577–82.

Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Plura, Thymus and Heart 2015. In: Travis William, Branbilla Elisabeth BA, editor. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2015. p. 16.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243–60.

Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: Relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):992–1001.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Dec 1;11(12):834–48.

Ueno T, Toyooka S, Suda K, Soh J, Yatabe Y, Miyoshi S, et al. Impact of age on epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;78(3):207–11.

van der Wekken AJ, Saber A, Hiltermann TJN, Kok K, van den Berg A, Groen HJM. Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Apr 1;100:107–16.

Vargas-Rojas MI, Jiménez-Álvarez L, Ramírez G, Torres-García D, Barquera R, Gastelum-Martínez AA, et al. PD-1 y sus ligandos

- como reguladores de la respuesta inmune. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2008;21(4):272–9.
- Vázquez S, Casal J, Afonso FJA, Fírvida JL, Santomé L, Barón F, et al. EGFR testing and clinical management of advanced NSCLC: A galician lung cancer group study (GGCP 048-10). *Cancer Manag Res.* 2016;8:11–20.
- Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, Herbst RS, Gettinger SN, Chen L, Rimm DL. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* 2014 Jan;94(1):107-16
- Vuong HG, Ho ATN, Altibi AMA, Nakazawa T, Katoh R, Kondo T. Clinicopathological implications of MET exon 14 mutations in non-small cell lung cancer – A systematic review and meta-analysis. Vol. 123, *Lung Cancer.* Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 76–82.
- Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, Fang YC, Chen XF, Liu GT. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2015 Apr;41(4):450-6.
- Wang H, Wu X, Zhang X, Yang X, Long Y, Feng Y, et al. Prevalence of NRAS Mutation, PD-L1 Expression and Amplification, and Overall Survival Analysis in 36 Primary Vaginal Melanomas. *Oncologist.* 2020;25(2).
- 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 Dec 10;30(35):4352–9.
- Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and

- resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*. 2006 Jul;10(1):25–38.
- Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of Disease: oncogene addiction— a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 Aug;3(8):448–57.
- Won JK, Keam B, Koh J, Cho HJ, Jeon YK, Kim TM, et al. Concomitant ALK translocation and EGFR mutation in lung cancer: A comparison of direct sequencing and sensitive assays and the impact on responsiveness to tyrosine kinase inhibitor. *Ann Oncol*. 2015 Feb 1;26(2):348–54.
- Wu W, Haderk F, Bivona TG. Non-canonical thinking for targeting ALK-fusion onco-proteins in lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12):1–18.
- Xia L, Liu Y, Wang Y. PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Oncologist*. 2019;24(S1).
- Yamada T, Hirai S, Katayama Y, et al. Retrospective efficacy analysis of immune checkpoint inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Cancer Med*. 2019;(8):1521–1529.
- Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 Mar;63(3):315–21.
- Yang JJ, Zhang XC, Su J, Xu CR, Zhou Q, Tian HX, et al. Lung cancers with concomitant egfr mutations and ALK rearrangements: Diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation. *Clin Cancer Res*. 2014;20(5):1383–92.

- Yao X, Liu L, Zhnag H, Pu Q, Liao H. Comparative analysis of clinical features of lung cancer in West China Hospital in 2000 and 2010. *Chinese J Lung Cancer*. 2012;15(6):355–60.
- Yoh K, Seto T, Satouchi M, Nishio M, Yamamoto N, Murakami H, et al. Vandetanib in patients with previously treated RET-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (LURET): an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2017 Jan 1;5(1):42–50.
- Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2012 Jun 4;209(6):1201–17.
- Zhang M, Li G, Wang Y, Zhao S, Haihong P, Zhao H, et al. Expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: A meta-analysis. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
- Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, Fu XH, Han XR, Threapleton D, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(48):78985–93.
- Zhao W, Choi Y La, Song JY, Zhu Y, Xu Q, Zhang F, et al. ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung squamous cell carcinoma are very rare. *Lung Cancer*. 2016;94:22–7.
- Zhuang X, Zhao C, Li J, Su C, Chen X, Ren S, et al. Clinical features and therapeutic options in non-small cell lung cancer patients with concomitant mutations of EGFR, ALK, ROS1, KRAS or BRAF. *Cancer Med*. 2019 Jun 1;8(6):2858–66.

- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest*. 2008 Jun;118(6):1991–2001.
- Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):74–88.
- Zhou C, Tang J, Sun H, Zheng X, Li Z, Sun T, Li J, Wang S, Zhou X, Sun H, Cheng Z, Zhang H, Ma H. PD-L1 expression as poor prognostic factor in patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(35):58457-58468
- Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun 1;8(6):467–77.

VIII

Lista de figuras & tablas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones moleculares en cáncer de pulmón.	43
Figura 2. Algoritmo diagnóstico para realización de pruebas de biomarcadores en pacientes en estadios avanzados de CPCNP.	46
Figura 3. Estructura molecular del receptor del factor de crecimiento epidérmico.	47
Figura 4. Estructura génica del <i>EGFR</i> , frecuencia de mutaciones y resistencias.	50
Figura 5. Reordenamiento de <i>ALK</i> . Original tomado de la referencia Cheng 2012.	52
Figura 6. Variantes de la fusión <i>EML4-ALK</i> y otros genes de fusión descritos. Original tomado de la referencia Wu 2017.	53
Figura 7. Mecanismos de resistencia a crizotinib. Original tomado de la referencia Golding 2018.	55
Figura 8. Reordenamientos de <i>ROS1</i> y su frecuencia en CPCNP. Original tomado de la referencia Lin 2017.	57
Figura 9. Fosforilación de <i>KRAS</i> y sus vías de señalización.	59
Figura 10. <i>BRAF</i> en la vía de señalización intracelular.	62
Figura 11. Inmunidad innata. Componentes y efectos.	69
Figura 12. Inmunidad adaptativa. Componentes y efectos.	71
Figura 13. Ciclo de inmunidad frente al cáncer.	72

Figura 14. Fases de la inmunoección.....	74
Figura 15. Punto de control inmune-CTLA-4.....	78
Figura 16. Estructura del receptor PD1.....	80
Figura 17. Estructura del gen de PD-L1, su mRNA y la proteína. ...	81
Figura 18. Vías de señalización implicadas en el eje PD-1/PD-L1 y su relación con las células tumorales..	83
Figura 19. Vías de señalización implicadas en la activación de PD-1.....	84
Figura 20. Biomarcadores tumorales e inmunes en evaluación para predecir respuesta a inmunoterapia..	89
Figura 21. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1 (20X). Control positivo en amígdala.	102
Figura 22. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1-(20x). Control positivo en línea celular.	103
Figura 23. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1-(20x). Control negativo en línea celular.....	104
Figura 24. Interpretación de la prueba de FISH para <i>ROS1</i>	109
Figura 25. Flujograma de casos potenciales y casos definitivos valorados.	122
Figura 26. Distribución de edad según grupos etáreos.	123
Figura 27. Distribución según consumo de tabaco	125
Figura 28. Distribución según estadio clínico	125
Figura 29. Distribución según tipo histológico.....	126
Figura 30. Adenocarcinoma: estructuras glandulares atípicas sobre estroma fibroso e inflamación (HE 20x)	127

Figura 31. Carcinoma epidermoide: nidos sólidos de células tumorales malignas con disqueratocitos sobre un fondo fibroso con inflamación (HE 20x).	127
Figura 32. Carcinoma neuroendocrino: grupos tumorales de células con citoplasma amplio y nucleolo prominente con focos de necrosis (HE 20x).....	128
Figura 33. Positividad inmunohistoquímica para sinaptofisina en carcinoma neuroendocrino (20x).....	128
Figura 34. Categorías de expresión inmunohistoquímica de PD-L1.....	129
Figura 35. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1 (20X). Carcinoma de pulmón de célula no pequeña con TPS <1%	130
Figura 36. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1 (20X). Carcinoma de pulmón de célula no pequeña con TPS 1-49%	130
Figura 37. Tinción inmunohistoquímica para PD-L1(20X). Carcinoma de pulmón de célula no pequeña con TPS $\geq 50\%$	131
Figura 38. Estado mutacional de <i>EGFR</i> en todos los casos.	132
Figura 39. Reordenamientos de <i>ALK</i>	134
Figura 40. FISH con reordenamiento de <i>ROS1</i>	136
Figura 41. Estado mutacional de <i>KRAS</i>	138
Figura 42. Estado mutacional de <i>BRAF</i>	139
Figura 43. Distribución por tipo histológico de la categoría de expresión de PD-L1 1-49%. (NE= neuroendocrino, NOS= no especificado).	141

Figura 44. Distribución por tipo histológico de la categoría de expresión de PD-L1 \geq 50% (NE= neuroendocrino, NOS= no especificado).141

Figura 45. Correlación entre expresión de PD-L1 y *EGFR*, *ALK* y *ROS1*.....143

Figura 46. Correlación entre expresión de PD-L1 y *KRAS* y *BRAF*.143

Figura 47. Curva de supervivencia según categorías de expresión de PD-L1.145

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tumores de pulmón. Original tomado de la referencia Travis 2015.....	41
Tabla 2. Marcadores emergentes en CPCNP. Original a partir de la referencia Lindeman 2018.	45
Tabla 3. Medicamentos bloqueadores de los puntos de control inmunitarios. Original tomado de la referencia Kythreotou 2017.	86
Tabla 4. Valoración de la intensidad de la inmunohistoquímica de PD-L1.....	102
Tabla 5. Valoración de la expresión de la inmunohistoquímica de PD-L1.....	105
Tabla 6. Mutaciones de <i>KRAS</i> detectadas por el kit <i>KRAS Mutation Test v2 (LSR)</i>	112
Tabla 7. Mutaciones de <i>BRAF/NRAS</i> detectadas por el kit <i>BRAF/NRAS Mutation Test v2 (LSR)</i>	113
Tabla 8. Interpretación de resultados del kit <i>KRAS Mutation Test v2 (LSR)</i>	115
Tabla 9. Interpretación de resultados del kit <i>BRAF/NRAS Mutation Test (LSR)</i>	116
Tabla 10. Características clínicas y patológicas de los pacientes ...	124
Tabla 11. Características clínicas y patológicas de los pacientes y su correlación con el estado de <i>EGFR</i>	133

Tabla 12 .Características clínicas y patológicas de los pacientes en relación a <i>ALK</i> y <i>ROS1</i>	135
Tabla 13 . Características clínicas y patológicas de los pacientes y su correlación con el estado de <i>KRAS</i>	137
Tabla 14 . Características clínicas y patológicas de los pacientes y su correlación con la expresión de PD-L1.....	140
Tabla 15 . Correlación entre expresión de PD-L1 y mutaciones en <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> y <i>ROS1</i>	144
Tabla 16 . Correlación entre expresión de PD-L1 y mutaciones en <i>BRAF</i> y <i>KRAS</i>	144
Tabla 17 . Comparación entre diferentes estudios respecto a variables clínicas	151
Tabla 18 . Comparación entre diferentes estudios del nivel de expresión de PD-L1 en casos de CPCNP	152
Tabla 19 . Comparación entre diferentes estudios respecto al tipo de mutación de <i>EGFR</i> encontrado.....	155

IX

Anexos

ANEXO 1.

Estadio clínico AJCC séptima edición

T (primary tumor)	
TX	Primary tumor cannot be assessed, or tumor proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm in greatest dimension, surrounded by the lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (ie, not in the main bronchus)*
T1a	Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension
T1b	Tumor > 2 cm but ≤ 3 cm in greatest dimension
T2	Tumor > 3 cm but ≤ 7 cm or tumor with any of the following features (T2 tumors with these features are classified T2a if ≤ 5 cm) Involves the main bronchus, ≥ 2 cm distal to the carina Invades the visceral pleura Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung
T2a	Tumor > 3 cm but ≤ 5 cm in greatest dimension
T2b	Tumor > 5 cm but ≤ 7 cm in greatest dimension
T3	Tumor > 7 cm or one that directly invades any of the following: chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium; or tumor in the main bronchus < 2 cm distal to the carina* but without involvement of the carina; or associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung or separate tumor nodule(s) in the same lobe
T4	Tumor of any size that invades any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, carina; separate tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe
N (regional lymph nodes)	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)
M (distant metastasis)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe; tumor with pleural nodules or malignant pleural (or pericardial) effusion†
M1b	Distant metastasis

Anexo 1. Estadificación carcinomas de pulmón, séptima edición de la AJCC. Original tomado de la referencia Greaves 2011. Permitido por Journal of Thoracic Imaging.

Seventh Edition T/M	N0	N1	N2	N3
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIIB	IIIA	IIIB
T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1a	IV	IV	IV	IV
M1a	IV	IV	IV	IV
M1b	IV	IV	IV	IV

ANEXO 2. ESCALA ECOG

ECOG 0	El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
ECOG 1	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
ECOG 2	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
ECOG 3	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
ECOG 4	El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
ECOG 5	Fallecido.

ANEXO 3

Dictamen del comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Concellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel. 881546425. Correo-e: celic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Cristina Márquez Riveras, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 19/07/18 el estudio:

Título: Expresión de PD-L1 en carcinoma de Célula no pequeña de pulmón y su relación con otras dianas terapéuticas moleculares

Versión:

Promotor/a: Ihab Abdulkader Nallib, Máximo Fraga Rodríguez

Investigador/a: Ihab Abdulkader Nallib, Máximo Fraga Rodríguez

Código de Registro: 2018/399

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.



Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina. 23/07/2018 13:34
Z4C4-BOAH-OPXX-EB15-3234-5678-496

Y HACE CONSTAR QUE:

- 1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.
- 2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente)**. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Cristina Márquez Riveras (Secretaria)**. Enfermera. Dirección Xeral de Saúde Pública.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Secretario Suplente)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez**. Biólogo. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez**. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez**. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila**. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira**. Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz**. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Guillermo José Prada Ramallal** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Carlos Rodríguez Moreno**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Sandra Vidal Martínez**. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago
- **Rafael Carlos Vidal Pérez**. Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.

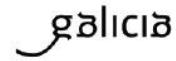
Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Cristina Márquez Riveras



Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina: 23/07/2018 13:34
Z4G4-BOAH-OF0X-EB15-3234-5678-496



Se emite un informe favorable condicionado a que se tengan en cuenta los siguientes aspectos:

1. Aspectos ético-legales:

En este apartado debe mencionarse que se conoce y se respetará el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (Reglamento general de protección de datos).

2. Modelos de documentos:


Para sucesivas solicitudes de evaluación, se sugiere utilizar el modelo de protocolo recomendado por el Comité. Puede utilizar el formulario para presentación de protocolos de investigación elaborado y aprobado por el CEI-SL colgado en su página web: <https://acis.sergas.gal/Paxinas/web.aspx?tipo=paxtab&idLista=3&idContido=83&migtab=83&idTax=15534>



Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina: 23/07/2018 13:34
Z4C4-BCAH-OFXX-EB15-3234-5678-496

ANEXO 4.

Permiso de reproducción de figuras



Welcome, Silvia
Not you?

Log out | Cart (0) | [Manage Account](#) | [Feedback](#) | [Help](#) |

[Get Permission / Find Title on Marketplace](#) Go

Order History

View Orders
View Order Details
View RIGHTS LINK Orders

View: Completed | Pending | Canceled | Credited | Denied

Sort orders by: Order Date
 Ascending
 Descending

LICENSE #: 5267271341516 Order Date: 03/13/2022	Nature Reviews Cancer Title: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy Type of use: Thesis/Dissertation Fee: 0.00 EUR
View printable order	
LICENSE #: 5242450446644 Order Date: 02/05/2022	Journal of Thoracic Imaging Title: The New Staging System for Lung Cancer: Imaging and Clinical Implications Type of use: Dissertation/Thesis Fee: 0.00 EUR
View printable order	
LICENSE #: 5230390394149 Order Date: 01/15/2022	Journal of Clinical Oncology Title: Targeting KRAS-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: One Mutation at a Time, With a Focus on KRAS G12C Mutations Type of use: Dissertation/Thesis Fee: 0.00 EUR
View printable order	
LICENSE #: 5223791102112 Order Date: 01/07/2022	Journal of Clinical Pathology Title: PD-L1 Type of use: Dissertation/Thesis Fee: 0.00 EUR
View printable order	
LICENSE #: 5223781142143 Order Date: 01/07/2022	Nature Reviews Cancer Title: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy Type of use: Thesis/Dissertation Fee: 0.00 EUR
View printable order	

<p>LICENSE #: 5223780628111 Order Date: 01/07/2022</p> <p>View printable order</p>	<p>Modern Pathology</p> <p>Title: Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine Type of use: Thesis/Dissertation Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 5223780226925 Order Date: 01/07/2022</p> <p>View printable order</p>	<p>The Journal of Molecular Diagnostics</p> <p>Title: Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology Type of use: reuse in a thesis/dissertation Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 5223771326876 Order Date: 01/07/2022</p> <p>View printable order</p>	<p>Nature</p> <p>Title: The biology and management of non-small cell lung cancer Type of use: Thesis/Dissertation Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 4844890742835 Order Date: 06/09/2020</p> <p>View printable order</p>	<p>Journal of Thoracic Oncology</p> <p>Title: The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification Type of use: reuse in a thesis/dissertation Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 4783750183100 Order Date: 03/07/2020</p> <p>View printable order</p>	<p>The Oncologist</p> <p>Title: Targeting BRAF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Profiling to Rationally Designed Therapy Type of use: Dissertation/Thesis Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 4782011309944 Order Date: 03/04/2020</p> <p>View printable order</p>	<p>Journal of Thoracic Oncology</p> <p>Title: Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer Type of use: reuse in a thesis/dissertation Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 4340391277110 Order Date: 05/01/2018</p> <p>View printable order</p>	<p>Journal of Clinical Pathology</p> <p>Title: PD-L1 Type of use: Dissertation/Thesis Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 4340340612372 Order Date: 05/01/2018</p> <p>View printable order</p>	<p>Nature</p> <p>Title: The biology and management of non-small cell lung cancer Type of use: Thesis/Dissertation Fee: 0.00 EUR</p>
<p>LICENSE #: 4335311020756 Order Date: 04/24/2018</p> <p>View printable order</p>	<p>Nature Reviews Cancer</p> <p>Title: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy Type of use: Thesis/Dissertation Fee: 0.00 EUR</p>



El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial y usualmente es diagnosticado en estadios avanzados cuando ya no es posible abordarlo de manera quirúrgica. El subtipo histológico más frecuente es el carcinoma de célula no pequeña, el cual es un tumor con potenciales dianas terapéuticas moleculares y subsidiario a inmunoterapia. Esta tesis se centra en la caracterización clínica y molecular de un grupo de pacientes con este tipo de tumores, explorando además posibles asociaciones de la expresión de PD-L1 con las alteraciones moleculares conductoras.